



BRUNO COLLING KLEIN

CULTIVO DE MICROALGAS PARA PRODUÇÃO DE
BIOETANOL DE TERCEIRA GERAÇÃO

CAMPINAS

2013



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

BRUNO COLLING KLEIN

CULTIVO DE MICROALGAS PARA PRODUÇÃO DE
BIOETANOL DE TERCEIRA GERAÇÃO

Orientador: Profa. Dra. Maria Regina Wolf Maciel

Coorientador: Prof. Dr. Reinaldo Gaspar Bastos

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de
Engenharia Química como parte dos requisitos exigidos para
a obtenção do título de Mestre em Engenharia Química na Área
de Concentração de Desenvolvimento de Processos Químicos.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA
DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELO ALUNO BRUNO COLLING KLEIN
E ORIENTADA PELA PROFA. DRA. MARIA REGINA WOLF MACIEL

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Maria Regina Wolf Maciel", is written over a horizontal line. Below the line, the text "ASSINATURA DA ORIENTADORA" is printed in a small, black, sans-serif font.

ASSINATURA DA ORIENTADORA

CAMPINAS

2013

FICHACATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECADA ÁREA DE ENGENHARIA E ARQUITETURA - BAE - UNICAMP

K673c Klein, Bruno Colling
Cultivo de microalgas para produção de bioetanol de terceira geração / Bruno Colling Klein. --Campinas, SP: [s.n.], 2013.

Orientador: Maria Regina Wolf Maciel
Coorientador: Reinaldo Gaspar Bastos.
Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Microalga. 2. Chlorella. 3. Alga - Fisiologia. 4. Bioreatores. 5. Bioetanol. I. Maciel, Maria Regina Wolf, 1955-. II. Bastos, Reinaldo Gaspar. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. IV. Título.

Título em Inglês: Microalgacultivation for thirdgenerationbioethanolproduction

Palavras-chave em Inglês: Microalgae, Chlorella, Seaweed - Physiology, Bioreactors, Bioethanol

Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Químicos

Titulação: MestremEngenharia Química

Banca examinadora: Ana Teresa Lombardi, Rodrigo de Oliveira Moraes

Data da defesa: 27-02-2013

Programa de Pós Graduação: Engenharia Química

Dissertação de Mestrado defendida por Bruno Colling Klein e aprovada em 27 de fevereiro de 2013 pela banca examinadora constituída pelos doutores:



Prof. Dra. Maria Regina Wolf Maciel



Prof. Dra. Ana Teresa Lombardi



Dr. Rodrigo de Oliveira Moraes

Aos meus pais, Telmo e Nelvi, e à minha irmã, Paula, que
constituem o alicerce para a realização de meus projetos
pessoais e profissionais

Agradecimentos

À minha família, Telmo, Nelvi e Paula, pelo apoio diário e incondicional em todos os aspectos de minha vida e pela dedicada atenção.

Aos Profs. Drs. Maria Regina Wolf Maciel e Rubens Maciel Filho pela oportunidade de realização deste projeto em seu grupo de pesquisa.

Ao Prof. Dr. Reinaldo Bastos, sem o qual este projeto não seria possível, por toda a coorientação, ensinamentos e ideias compartilhadas em diversas áreas do conhecimento.

À Prof. Dra. Ana Teresa Lombardi, da Universidade Federal de São Carlos, pela colaboração no desenvolvimento de conceitos explorados nesta dissertação.

Aos integrantes da *Salinha* (Ana Flávia, Anderson, Aulus, Ingrid, Marcele, Mariana e Paula), pelas constantes discussões tanto de cunho técnico quanto pelas bem-humoradas – as últimas mais numerosas que as primeiras.

Aos integrantes do LOPCA, LDPS e LEPFE, pela convivência e auxílio nas diversas etapas de execução deste trabalho, em especial à Andrea Komesu, Laura Plazas, Luisa Ríos, Daniele Machado e Luiza Helena Martins.

Aos amigos feitos em Campinas, em especial Cibelem Iribarrem e Viktor Cárdenas, Adrielle e Ederson Gratieri e Ana Cláudia Ueda e Leonardo de Oliveira, pelas discussões relacionadas ao projeto e pelos vários momentos de descontração fora da Unicamp.

Ao Evandro Mallmann, pelos dois anos de convivência no apartamento C3 e pela companhia do chimarrão/tereré diário.

Aos amigos da Engenharia Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Alan Ambrosi, Fábio Priori, Marcelo Duarte, Thiago Fleck, Ricardo Ivanov e Samuel Moura) que, mesmo após o período de graduação, continuam sendo presença certa na caixa de e-mails com suas discussões filosóficas e momentos de nostalgia.

Aos amigos de diversas paragens, em especial à Annica Andersson, Federico Bonelli, Arthur Steffens, Carlos Felipe de Souza, Mateus Veeck e Maurício Costa, pelo apoio e amizade, apesar dos reencontros esporádicos.

Ao pessoal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de São Carlos, pela condução de análises químicas e ensaios fermentativos.

Ao CNPq pelo apoio à pesquisa.

A todos que, de alguma forma, estiveram presentes e manifestaram seu encorajamento.

“O conhecimento deve preceder a aplicação”

Max Planck

Resumo

A busca por uma maior sustentabilidade tem levado a uma mudança em direção à utilização de fontes renováveis para geração de energia em detrimento do uso de combustíveis fósseis, visando uma modificação na matriz energética global. A utilização da biomassa de microalgas para produção de biocombustíveis vem sendo vista como uma alternativa promissora, uma vez que o seu cultivo proporciona produtividades em carboidratos e lipídios superiores às matérias-primas vegetais convencionalmente utilizadas na obtenção de etanol e biodiesel. Neste contexto, o objetivo da presente dissertação de mestrado foi avaliar a produção de biomassa da microalga clorofícea *Chlorella vulgaris* em fotobiorreator de placa plana em diferentes condições de fluxo luminoso, concentração de CO₂ na alimentação gasosa e concentração de NaNO₃ no meio de cultivo, visando o acúmulo de carboidratos para obtenção de bioetanol de terceira geração. As influências das variáveis nutricionais e de processo sobre a eficiência fotossintética das microalgas também foram estimadas para determinação do estado fisiológico das culturas. A produtividade média de biomassa e a concentração máxima final das microalgas foram significativamente afetadas pela incidência de radiação luminosa e pela suplementação de CO₂ gasoso, obtendo-se maiores produtividades de carboidratos em cultivos com alto fluxo luminoso e concentrações de CO₂ intermediárias (7,5%). Também foi observado o efeito positivo do aumento do fotoperíodo sobre o crescimento das microalgas. Através de hidrólise ácida foi possível atingir concentrações de até 2 g L⁻¹ de açúcares fermentescíveis no hidrolisado a partir de biomassa de microalgas cultivadas em meio com baixo teor de nitrogênio. A fermentação etanólica foi então conduzida com a levedura *Dekkerabruxellensis* capaz de converter diferentes hexoses e pentoses em bioetanol, dada a presença de ambos os tipos de açúcares no hidrolisado.

Palavras-chave: microalgas, *Chlorella vulgaris*, fotobiorreator de placa plana, acúmulo de carboidratos, bioetanol

Abstract

The search for industrial processes with higher sustainability has led to a change towards the utilization of renewable sources for energy generation in substitution of fossil fuels, aiming the modification of the global energy matrix. The utilization of microalgal biomass for the production of biofuels is viewed as a promising alternative, since its cultivation yields carbohydrate and lipid productivities superior to those of conventional sources used in the obtention of bioethanol and biodiesel. In this context, the goal of this master thesis was to evaluate the biomass production of the chlorophycean microalga *Chlorella vulgaris* in a flat plate photobioreactor under different conditions of light flux, CO₂ concentration in the gas feed and NaNO₃ concentration in the culture medium, aiming carbohydrate accumulation for the production of third generation bioethanol. The influences of both process and nutritional variables on the photosynthetic efficiency of microalgae were estimated for the determination of the physiological condition of the cultures. The mean biomass productivity and the maximum final microalgae concentration were significantly affected by the incidence of light radiation and by the supplementation of gaseous CO₂, the highest carbohydrate productivities being obtained in cultivations with high light flux and intermediate CO₂ concentrations (7,5%). It was also observed the positive effect of increasing the photoperiod over microalgae growth. Through acid hydrolysis, it was possible to attain fermentable sugar concentration of up to 2 g L⁻¹ from biomass of microalgae cultivated in low-nitrogen medium. The ethanolic fermentation was then carried out with the *Dekkerabruxellensis* yeast, capable of converting different hexoses and pentoses into ethanol, due to the presence of both sugar types in the hydrolysate.

Keywords: microalgae, *Chlorella vulgaris*, flat plate photobioreactor, carbohydrate accumulation, bioethanol

Sumário

Capítulo 1 – Introdução e Objetivos.....	19
1.1 Introdução	21
1.2 Objetivos	22
1.3 Estrutura do trabalho.....	23
Capítulo 2 – Revisão Bibliográfica	24
2.1 Biocombustíveis.....	25
2.2 Bioetanol.....	26
2.3 Microalgas	30
2.4 Produção de bioetanol a partir de microalgas	35
2.4.1 Sistemas para produção industrial de biomassa de microalgas	39
2.4.1.1 Sistemas abertos.....	40
2.4.1.2 Sistemas fechados	41
2.4.1.3 Sistemas híbridos	45
2.4.2 Recuperação da biomassa de microalgas	45
2.4.3 Hidrólise	46
2.4.4 Fermentação.....	47
2.5 Conclusões parciais.....	48
Capítulo 3 – Materiais e Métodos	49
3.1 Microalga e meio de cultura	51
3.2 Câmara de fotoperíodo para propagação de inóculos	51
3.3 Fotobiorreator de placa plana	52
3.4 Condições de cultivo e planejamento experimental	54
3.5 Cinética de crescimento	55
3.6 Pós-processamento.....	56
3.7 Hidrólise ácida	56
3.8 Fermentação etanólica	57
3.9 Métodos analíticos	57
3.9.1 Concentração de biomassa no cultivo	57
3.9.2 Quantificação de lipídios	58

3.9.3	Análise qualitativa de ácidos graxos	58
3.9.4	Quantificação de proteínas	59
3.9.5	Quantificação de açúcares fermentescíveis, inibidores de fermentação e etanol	59
Capítulo 4 – Resultados e Discussão		60
4.1	Cultivo de microalgas	61
4.1.1	Propagação do inóculo.....	61
4.1.2	Delineamento do planejamento experimental	62
4.1.3	Produtividade média de biomassa	63
4.1.4	Cinéticas de crescimento dos cultivos do planejamento experimental.....	68
4.1.5	Efeito nos parâmetros auxiliares.....	72
4.1.6	Avaliação da biomassa	75
4.1.6.1	Carboidratos	76
4.1.6.2	Lipídios	79
4.1.6.3	Proteínas.....	81
4.2	Atividade fotossintética	83
4.2.1	Eficiência fotossintética.....	83
4.2.2	Utilização do fluxo luminoso	90
4.2.3	Influência da atividade fotossintética nos parâmetros auxiliares	95
4.3	Caso específico: fotoperíodo de 24 h.....	99
4.4	Fermentação etanólica	103
Capítulo 5 – Conclusão		104
5.1	Sugestões para trabalhos futuros.....	105
Capítulo 6 – Referências Bibliográficas		107
Capítulo 7 – Anexo.....		115

Índice de Figuras

Figura 1 – Evolução do número de células (linha sólida) e da concentração de nutrientes (linha tracejada) ao longo do tempo em um cultivo batelada de microalgas.....	31
Figura 2 – Processo de produção de bioetanol de terceira geração	38
Figura 3 – Representações de alguns dos principais tipos de reatores utilizados no cultivo de microalgas em larga escala: (a) lagoa do tipo <i>raceway</i> ; (b) fotobiorreator tubular com tubos horizontais paralelos; (c) fotobiorreator de placas paralelas	43
Figura 4 – Câmara de fotoperíodo utilizada para propagação de microalgas	52
Figura 5 – Foto do fotobiorreator FMT 150/1000.....	53
Figura 6 – Perfil de crescimento de um inóculo usado no planejamento experimental	61
Figura 7 – Superfície de resposta para a produtividade média de biomassa em função dos níveis de fluxo luminoso e de CO ₂ na alimentação gasosa.....	67
Figura 8 – Curva de nível para a produtividade média de biomassa em função dos níveis de fluxo luminoso e de CO ₂ na alimentação gasosa.....	67
Figura 9 – Curvas de crescimento para os cultivos com nível de NaNO ₃ igual a -1. Demais condições: cultivo 1 (L-1, C-1); cultivo 3 (L-1, C+1); cultivo 5 (L+1, C-1); cultivo 7 (L+1, C+1)	69
Figura 10 – Curvas de crescimento para os cultivos com nível de NaNO ₃ igual a +1. Demais condições: cultivo 2 (L-1, C-1); cultivo 4 (L-1, C+1); cultivo 6 (L+1, C-1); cultivo 8 (L+1, C+1)	69
Figura 11 – Curvas de crescimento para os cultivos com nível de fluxo luminoso igual a 0. Demais condições: cultivos 9, 10 e 11 (L0, C0); cultivo 12 (C-1,68, N0); cultivo 13 (C0, N-1,68)	70
Figura 12 – Concentração de CO ₂ dissolvido nos cultivos 1, 3 e 10.....	72
Figura 13 – Concentrações de O ₂ dissolvido e pH iniciais dos cultivos do planejamento experimental	74
Figura 14 – Imagens de microscópio da cultura de microalgas no (a) início e (b) fim do cultivo 8 (ampliação de 40x)	75

Figura 15 – Imagens de microscópio da suspensão de microalgas hidrolisada. Ampliações de (a) 40x e (b) 100x.....	76
Figura 16 – Extração de lipídios de <i>Chlorella vulgaris</i> : (a) caráter trifásico do método de Bligh e Dyer e (b) fase orgânica contendo os lipídios	79
Figura 17 – Valores de eficiência fotossintética (luzes azul e vermelha) dos cultivos do planejamento experimental.....	83
Figura 18 – Curva representativa do modelo matemático para a eficiência fotossintética (azul) (linha sólida) e valores individuais determinados para a eficiência fotossintética (azul) no planejamento experimental (pontos azuis)	86
Figura 19 – Superfície de resposta para a eficiência fotossintética (vermelho) em função dos níveis de fluxo luminoso e de CO ₂	89
Figura 20 – Curva de nível para a eficiência fotossintética (vermelho) em função dos níveis de fluxo luminoso e de CO ₂	90
Figura 21 – Representação gráfica das utilizações de fluxo luminoso para as luzes azul, vermelha e total	91
Figura 22 – Superfície de resposta para a utilização do fluxo luminosos total em função dos níveis de fluxo luminoso e de CO ₂	94
Figura 23 – Curva de nível para a utilização do fluxo luminoso total em função dos níveis de fluxo luminoso e de CO ₂	95
Figura 24 – Evolução do pH e da concentração de O ₂ dissolvido no cultivo 1	96
Figura 25 – Evolução do pH e da concentração de CO ₂ dissolvido no cultivo 12.....	97
Figura 26 – Variação do pH e da concentração de O ₂ dissolvido nos cultivos do planejamento experimental	98
Figura 27 – Curvas de crescimento de cultivos com fotoperíodo de 12 h (pontos vermelhos) e 24 h (pontos pretos)	99
Figura 28 – Perfil de pH e concentração de O ₂ dissolvido no cultivo com fotoperíodo de 24 h	100
Figura 30 – Curva de calibração para determinação da concentração de biomassa.....	115

Índice de Quadros

Quadro 1 – Principais combustíveis derivados de biomassa, tecnologias produtivas e suas utilizações	25
Quadro 2 – Comparação entre sistemas abertos e fechados para o cultivo de microalgas em larga escala	44

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Funções dos nutrientes para o crescimento de microalgas	35
Tabela 2 – Rendimento de bioetanol de diferentes fontes de biomassa por área cultivada e por tempo	36
Tabela 3 – Valores das variáveis independentes analisadas no planejamento composto central..	55
Tabela 4 – Valores codificados e reais das variáveis nos cultivos do planejamento experimental	62
Tabela 5 – Concentrações iniciais e finais de biomassa e produtividades médias de biomassa dos cultivos do planejamento experimental	64
Tabela 6 – Análise de significância para P com todas as variáveis	65
Tabela 7 – Análise de significância para P com as variáveis significativas (modelo simplificado)	65
Tabela 8 – ANOVA para P (modelo simplificado).....	66
Tabela 9 – Velocidades específicas máximas de crescimento e tempos de geração para os cultivos do planejamento experimental.....	71
Tabela 10 – Concentrações de açúcares fermentescíveis obtidos após hidrólise e fração de carboidratos na composição de <i>Chlorella vulgaris</i>	77
Tabela 11 – Concentrações de produtos de degradação e inibidores de fermentação obtidos após hidrólise	78
Tabela 12 – Fração lipídica na constituição da <i>Chlorella vulgaris</i>	80
Tabela 13 – Ácidos graxos identificados na composição lipídica da <i>Chlorella vulgaris</i>	81

Tabela 14 – Análise de significância para a eficiência fotossintética (azul) com todas as variáveis	84
Tabela 15 – Análise de significância para a eficiência fotossintética (azul) com as variáveis significativas (modelo simplificado)	85
Tabela 16 – ANOVA para a eficiência fotossintética (azul) (modelo simplificado)	85
Tabela 17 – Análise de significância para a eficiência fotossintética (vermelho) com todas as variáveis.....	87
Tabela 18 – Análise de significância para a eficiência fotossintética (vermelho) com as variáveis significativas (modelo simplificado)	88
Tabela 19 – ANOVA para a eficiência fotossintética (vermelho) (modelo simplificado).....	89
Tabela 20 – Composição da radiação luminosa fornecida aos cultivos do planejamento experimental	91
Tabela 21 – Análise de significância para a utilização do fluxo luminoso total com todas as variáveis.....	92
Tabela 22 – Análise de significância para a utilização do fluxo luminoso (total) com as variáveis significativas (modelo simplificado)	93
Tabela 23 – ANOVA para a utilização do fluxo luminoso (total) (modelo simplificado).....	94
Tabela 24 – Dados gerais referentes ao cultivo de microalgas com fotoperíodo de 24 h	102

Nomenclatura

Abreviaturas

ANOVA – análise de variância
ATP – trifosfato de adenosina
EUA – Estados Unidos da América
E10, E20-25, E85, E100 – misturas combustíveis contendo 10, 20-25, 85 e 100% de bioetanol, respectivamente
FBR – fotobiorreator fechado
FSI –fotossistema I
FSII –fotossistema II
GC – cromatografia gasosa
HPLC – cromatografia líquida de alta performance
LED – diodo emissor de luz
NADP – nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato
OD – O₂ dissolvido
pH– potencial hidrogeniônico
ProÁlcool– Programa Nacional do Álcool
RuBisCo–ribulose-bisfosfatocarboxilase/oxigenase
VVM –vazão volumétrica gasosa por minuto dividida pelo volume de líquido (volume por volume por minuto)

Variáveis matemáticas

C – concentração de biomassa no tempo t (células mL⁻¹ ou g L⁻¹)
 C_{0i} – concentração de biomassa no início da fase exponencial de crescimento (células mL⁻¹ ou g L⁻¹)
 C_f – concentração final de biomassa (g L⁻¹)
 C_i – concentração inicial de biomassa (g L⁻¹)
 $EF'(azul)$ – eficiência fotossintética (luz azul), valor operacional
 $EF'(vermelho)$ – eficiência fotossintética (luz vermelha), valor operacional
 F_t' – fluorescência instantânea da clorofilain vivo
 F_m' – fluorescência máxima da clorofila no estado adaptado à luz
 P – produtividade média de biomassa (g L⁻¹ dia⁻¹)
 t – tempo (h ou dia)
 t_g – tempo de geração (dia)
 t_i – tempo de início da fase exponencial de crescimento (h ou dia)
 $UL(total)$ – utilização do fluxo luminoso total (ua)
 $\mu_{máx}$ – velocidade específica máxima de crescimento (dia⁻¹)

CAPÍTULO 1
INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1.1 Introdução

Recentemente, tem-se vislumbrado uma mudança em direção à utilização de fontes renováveis para geração de energia em detrimento do uso de combustíveis fósseis, indispensável em um cenário de economia mundial baseada sobre o conceito de desenvolvimento sustentável. No que tange aos biocombustíveis de utilização veicular, sua utilização tem ganhado força e aceitação mundial, em especial nos últimos 30 anos. Os mais representativos desta classe – o biodiesel, resultado do processamento de lipídios, e o bioetanol, originário da fermentação de carboidratos – apresentam processos produtivos estabelecidos e contam com utilização obrigatória em diversos países (DEMIRBAS *et al.*, 2009). Em vista da necessidade de aumentar a produção global de tais biocombustíveis, tem-se cogitado o emprego de fontes de biomassa não convencionais, com produtividades de substratos (lipídios e carboidratos) muito superiores às de culturas tradicionais. Uma das alternativas consideradas é a utilização de biomassas aquáticas, entre elas as de cianobactérias e de microalgas.

As microalgas são uma classe de micro-organismos unicelulares encontrados em ambientes de água doce e salgada. Historicamente, a biomassa de microalgas foi largamente utilizada para produção de uma série de compostos interessantes para a indústria e para consumo humano, como, por exemplo, esteróis, aminoácidos, ácidos graxos e carotenoides (KIRROLIA *et al.*, 2013). Nos últimos anos, tem-se estudado o potencial de utilização de sua biomassa para produção de uma série de biocombustíveis, dentre os quais podem ser citados o biodiesel, o bioetanol, o gás de síntese e gás hidrogênio. O apelo para a conversão de biomassa de microalgas em biocombustíveis se baseia em diversos pontos: (1) produção de biomassa ininterrupta, durante o ano todo, com a possibilidade de alta produtividade em lipídios e carboidratos; (2) após a extração de lipídios e carboidratos, existe a possibilidade de recuperação de diversos coprodutos de valor comercial, como proteínas e pigmentos; (3) baixo consumo de água em comparação com fontes de biomassa usuais; (4) cultivo pode ser realizado em terras não aráveis, com o uso de água não potável e sem a aplicação de pesticidas ou herbicidas; (5) manutenção e melhora da qualidade do ar, devido ao uso de gás carbônico (CO₂) atmosférico para seu crescimento (BRENNAN e OWENDE, 2010).

Dentre os biocombustíveis, espera-se que o bioetanol se torne o de maior utilização mundial, dada a sua produção industrial bem estabelecida (DAROCH *et al.*, 2013) e a sua grande

aplicação em veículos automotivos leves (JOHN *et al.*, 2011). Atualmente, o bioetanol é obtido em grande parte a partir de dois tipos principais de fontes de biomassa, denominadas de primeira e segunda geração: enquanto a primeira compreende culturas tradicionais, como a cana-de-açúcar e o milho, a segunda engloba materiais lignocelulósicos, como o bagaço de cana-de-açúcar e a palha de milho, normalmente resíduos do processamento dos primeiros. O chamado bioetanol de terceira geração, uma das opções para a produção de bioetanol em volumes ainda maiores que os atuais, utiliza como substrato da fermentação etanólica a biomassa de microalgas, microorganismos capazes de ostentar produções anuais de carboidratos dezenas ou centenas de vezes maiores que biomassas de primeira ou segunda geração (LAM e LEE, 2012).

Vinculado ao Projeto Temático BIOEN (“Um Processo Integrado para Produção Total de Bioetanol e Emissão Zero de CO₂” – Processo FAPESP nº 2008/57873-8), o presente trabalho tem o intuito de contribuir com as áreas científica e tecnológica relacionadas ao cultivo de microalgas para produção de bioetanol, uma vez que se trata de um assunto relativamente novo e com limitação de dados disponíveis na literatura científica. O emprego da biomassa de microalgas na produção de biocombustíveis em biorrefinarias é considerado uma alternativa promissora para o aumento da oferta mundial de biocombustíveis. Neste contexto, é indiscutível o papel que as Engenharias Química e Biotecnológica desempenham na busca de soluções tanto para o desenvolvimento de novos processos biotecnológicos quanto na otimização de processos já existentes.

Embora se presuma que a tecnologia de produção e processamento de microalgas em escala industrial para produção de biocombustíveis seja interessante, esta ainda se encontra em um estágio incipiente (ALAM *et al.*, 2012; LAM e LEE, 2012). Devido ao caráter relativamente inicial da técnica, pesquisas em diversas frentes devem ser realizadas de modo a tornar o processo de produção de bioetanol de terceira geração economicamente viável, dentre as quais este trabalho pretende dar sua parcela de contribuição avaliando o acúmulo de carboidratos em diferentes condições de cultivo.

1.2 Objetivos

Desenvolvido nos Laboratórios de Desenvolvimento de Separação (LDPS) e de Otimização, Projeto e Controle Avançado (LOPCA) da Faculdade de Engenharia Química da

Unicamp (FEQ – Unicamp) e no Centro de Ciências Agrárias (CCA) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), esta dissertação teve por objetivo principal a avaliação da produção de biomassa e acúmulo de carboidratos por *Chlorella vulgaris* visando à produção de bioetanol de terceira geração. Os objetivos específicos foram:

1. Determinação dos efeitos de diferentes condições nutricionais (fonte de carbono e nitrogênio) e luminosidade na produtividade de biomassa de microalgas e sua composição;
2. Avaliação das condições de processo e seus efeitos sobre a eficiência fotossintética das microalgas;
3. Realização de ensaios fermentativos exploratórios com a biomassa de microalgas para produção de bioetanol.

1.3 Estrutura do trabalho

A presente dissertação está dividida em 5 (cinco) capítulos. O Capítulo I apresenta uma introdução ao tema proposto, seguido dos objetivos gerais e específicos previstos para o desenvolvimento do projeto de mestrado.

O Capítulo II consiste em uma revisão bibliográfica dedicada a expor os fundamentos e o estado da arte das diversas áreas envolvidas no projeto.

No Capítulo III, encontram-se as descrições dos equipamentos utilizados na produção de biomassa de microalgas e dos métodos empregados para as diferentes análises químicas realizadas.

O Capítulo IV expõe os resultados obtidos referentes à produção de microalgas, à atividade fotossintética dos micro-organismos, ao cultivo de microalgas com iluminação contínua e à fermentação etanólica, bem como as discussões pertinentes.

No Capítulo V, são feitas tanto as conclusões gerais em relação ao projeto quanto sugestões para trabalhos futuros.

Por fim, são apresentadas as referências bibliográficas consultadas e os anexos pertinentes ao trabalho.

CAPÍTULO 2
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Biocombustíveis

No que tange à geração de energia, a necessidade de transição de uma economia baseada na utilização de combustíveis fósseis para uma fundada no emprego de combustíveis oriundos de fontes renováveis é indiscutível para o desenvolvimento sustentável. Qualquer combustível gerado a partir de biomassa é denominado biocombustível (JOHN *et al.*, 2011). Embora a combustão de biocombustíveis também emita CO₂, a sua utilização é considerada de carbono neutro, ou seja, todo carbono emitido é proveniente de CO₂ atmosférico, uma vez que grande parte de toda biomassa existente o utiliza durante seu crescimento. Além disto, a biomassa é considerada uma matéria-prima atrativa por ser um recurso renovável que pode ser desenvolvido sustentavelmente no futuro e por ter grande potencial econômico, caso o preço dos combustíveis fósseis venha a aumentar (BALAT e BALAT, 2009). O Quadro 1 reúne os biocombustíveis predominantes atualmente.

Quadro 1 – Principais combustíveis derivados de biomassa, tecnologias produtivas e suas utilizações

Biocombustível	Tecnologia atual	Tecnologias futuras	Produtos gerados
Biogás	Digestão anaeróbica	Cogeração, turbina a gás, célula a combustível, produção de gás natural sintético, gás de síntese e etanol	Eletricidade, calor, substituto de gás natural
Gás de síntese	Gaseificação	Cogeração, turbina a gás, célula a combustível, síntese de gás natural sintético e metanol, síntese de Fischer-Tropsch e processo Mobil Oil	Eletricidade, calor, substituto de gás natural, óleo de aquecimento, óleo combustível, diesel, gasolina, metanol, etanol
Produtos líquidos	Fermentação e moinho de óleo	Biorrefinaria e esterificação	Eletricidade, calor, óleo de aquecimento, óleo combustível, diesel, gasolina, bioetanol, óleos vegetais

Fonte: adaptado de MARTINSEN *et al.*, 2010

2.2 Bioetanol

Dentre os biocombustíveis existentes, presume-se que o etanol se torne mais difundido globalmente (JOHN *et al.*, 2011). Aproximadamente 9% do etanol mundial são produzidos sinteticamente a partir de eteno, enquanto os 91% restantes são obtidos através da fermentação de açúcares com micro-organismos (DEMIRBAŞ, 2005). O etanol produzido via bioquímica é conhecido por bioetanol. O bioetanol é considerado uma alternativa interessante para substituição de combustíveis fósseis por diversos motivos: é facilmente biodegradável (JOHN *et al.*, 2011), apresenta combustão mais limpa que combustíveis fósseis por conter oxigênio em sua composição (MUSSATTO *et al.*, 2010), reduz emissões de óxidos de nitrogênio e material particulado (DEMIRBAŞ, 2005), reduz emissões de CO₂ em mais de 80% ao mesmo tempo em que elimina a emissão de dióxido de enxofre, causador da chuva ácida (LASHINKY e SCHWARTZ, 2006).

Apesar de ter sido utilizado como combustível desde o século XIV, o bioetanol foi produzido em larga escala apenas a partir da segunda metade do século XX. No Brasil, o mercado de bioetanol foi revivido em 1975, quando o programa ProÁlcool (Programa Nacional do Álcool) foi instituído no país para estimular o emprego do bioetanol de cana-de-açúcar em substituição aos combustíveis veiculares derivados do petróleo. À época, dois motivos levaram à instalação do ProÁlcool: a crise do petróleo de 1973 (posteriormente agravada pela crise do petróleo de 1979), que acarretou um aumento no preço do barril de petróleo, e a sobreoferta de açúcar no mercado internacional. Com os maciços investimentos do governo brasileiro e o eventual desenvolvimento da indústria de açúcar e bioetanol, o ProÁlcool acabou sendo desativado em 1999 (MUSSATTO *et al.*, 2010).

Nos Estados Unidos da América (EUA), a produção de bioetanol, feita quase totalmente a partir de milho, ganhou força somente no século XXI, já que este biocombustível passou a ser considerado um dos principais meios de redução da dependência externa de petróleo do país por razões de segurança energética nacional. Desde 2001, a produção de bioetanol cresce mais de 20% ao ano, impulsionada pelos fortes subsídios oferecidos pelos governos federal e dos estados produtores (CHAVANNE e FRANGI, 2008). Como os EUA desenvolveram sua indústria de bioetanol mais rapidamente que o Brasil, eles são, atualmente, os maiores produtores mundiais do biocombustível com cerca de 50 bilhões de litros em 2010 contra cerca de 26 bilhões de litros no

Brasil. Na União Europeia, o bioetanol é produzido basicamente a partir de açúcar proveniente de beterraba e, mais recentemente, a partir de materiais lignocelulósicos e outros grãos. A produção estimada do biocombustível nos 27 países da União Europeia em 2011 é de aproximadamente 4,4 bilhões de litros (RFA, 2012).

O bioetanol pode ser utilizado como combustível em diferentes concentrações e misturas, sendo as mais conhecidas o E10 (10% de bioetanol e 90% de gasolina), o E20-25 (com 20 a 25% de bioetanol misturado em gasolina), E85 (85% de bioetanol e 15% de gasolina) e E100 (contendo cerca de 96% de bioetanol e 4% de água). No Brasil, atualmente, são comercializadas duas misturas principais para veículos de pequeno porte: E20-25 (adição obrigatória de bioetanol à gasolina) e E100. Embora veículos movidos a E100 existam desde a década de 1970 devido ao sucesso do ProÁlcool, foi a introdução dos veículos *flex* no mercado brasileiro que transformou o país em exemplo internacional na utilização de biocombustíveis (MUSSATTO *et al.*, 2010). Os motores de veículos *flex* possibilitam o consumo de qualquer mistura de bioetanol (anidro ou hidratado) e gasolina, permitindo que os motoristas escolham qual combustível utilizar de acordo com seus preços. Nos EUA, a mistura de 10% de bioetanol em toda gasolina comercializada (E10) é obrigatória em alguns estados; o E85 também é utilizado em veículos *flex* americanos (DEMIRBAS *et al.*, 2009).

O bioetanol é produzido a partir de diversas fontes de biomassa e através de diferentes tecnologias de conversão. De uma forma geral, a produção de bioetanol ocorre em três etapas: (1) formação de uma solução de açúcares fermentescíveis, (2) fermentação dos açúcares a bioetanol e (3) separação e purificação do bioetanol produzido (DEMIRBAŞ, 2005). Pode-se classificar o bioetanol segundo a matéria-prima utilizada na sua produção em bioetanol de primeira, segunda e terceira gerações. Entre as três classes de bioetanol, a maior diferença de execução técnica – e, portanto, de viabilidade econômica – se encontra na primeira etapa do processo produtivo, que envolve múltiplos estágios de tratamento de acordo com a matéria-prima empregada. (JOHN *et al.*, 2011).

Historicamente, a produção de bioetanol no mundo se deu a partir do cultivo de espécies vegetais ricas em amido ou açúcar, como a cana-de-açúcar no Brasil, o milho nos EUA e a beterraba na Europa (JOHN *et al.*, 2011). Os processos industriais de produção de bioetanol a partir da fermentação da glicose contida no melaço de cana-de-açúcar ou de açúcares de cana-de-açúcar, milho e beterraba são bem conhecidos, tecnologicamente estabelecidos e amplamente

difundidos no planeta, embora ainda se possa trazer melhorias aos sistemas de fermentação e separação (DEMIRBAŞ, 2005). O bioetanol produzido a partir destas matérias-primas é conhecido pelo termo “bioetanol de primeira geração”.

Para a produção de bioetanol de primeira geração, a utilização de espécies vegetais que fornecem diretamente os açúcares necessários à fermentação resulta em um processo produtivo mais simples (MUSSATTO *et al.*, 2010). A obtenção de glicose a partir da cana-de-açúcar ocorre de forma direta, necessitando apenas de uma etapa de moagem da planta para liberação do caldo. Analogamente, o açúcar pode ser removido da beterraba em duas etapas simples: (1) corte da beterraba em fatias finas e (2) lavagem das fatias com uma corrente de água em contracorrente em um extrator apropriado (BOGLIOLO *et al.*, 1996).

O milho – e outros cereais como o arroz, o trigo, a mandioca e a batata – estoca glicose sob a forma de amido. Portanto, na produção de bioetanol a partir destas matérias-primas, necessita-se de uma etapa adicional de liberação da glicose armazenada pela planta, uma vez que os micro-organismos fermentadores não são capazes de utilizar o amido diretamente. O processo conhecido por sacarificação consiste na quebra do amido em glicose através de hidrólise, realizada por ácidos ou por combinações de enzimas (como a α -amilase e a amiloglicosidase).

A produção de bioetanol de primeira geração, no entanto, apresenta duas grandes desvantagens: (1) utilização de terras aráveis que poderiam ser empregadas no cultivo de alimentos e (2) emprego de matérias-primas com grande valor nutritivo para a produção de combustível ao invés de produtos alimentícios (como açúcar e farinha de milho). O impacto do bioetanol de primeira geração sobre os preços globais dos alimentos é sensível, especialmente nas regiões mais economicamente vulneráveis do planeta (BRENNAN e OWENDE, 2010). A questão alimento *vs.* combustível é, atualmente, o fator limitante para o aumento da produção de bioetanol utilizando matérias-primas convencionais. Além disto, Socolow *et al.*, 2005, estimam que, para a produção de cerca de 1,5 trilhão de litros de bioetanol de primeira geração para uso como combustível, cerca de 20 vezes a sua atual produção, seriam necessários 250 milhões de hectares de terras aráveis, ou seja, um sexto de todas as terras cultiváveis do planeta.

Dada a quantidade de terra necessária para os cultivos, outras fontes de biomassa devem ser consideradas para o aumento da produção deste biocombustível. Recentemente, tem-se estudado a produção de bioetanol a partir de materiais lignocelulósicos, o chamado “bioetanol de segunda geração” (MUSSATTO *et al.*, 2010). Os diferentes tipos de biomassa lignocelulósica

(tais como sobras de colheitas, gramíneas, serragem e cavacos de madeira) são matérias-primas alternativas, subprodutos de atividades agrícolas ou resíduos industriais (MUSSATTO *et al.*, 2010). Por serem abundantes e por se situarem fora da cadeia alimentar humana – o que não acontece com as matérias-primas do bioetanol de primeira geração –, os materiais lignocelulósicos são uma matéria-prima de baixo custo para a produção de bioetanol (DEMIRBAŞ, 2005).

A biomassa lignocelulósica é composta, basicamente, por microfibras de três materiais distintos: lignina, celulose e hemicelulose, dos quais apenas os dois últimos são passíveis de fermentação a bioetanol (SÁNCHEZ e CARDONA, 2008). A lignina, um polímero aromático altamente irregular sintetizado a partir de precursores fenilpropanoides, confere resistência mecânica à parede celular e, conseqüentemente, a toda a planta. Embora possa ser mecanicamente fragmentada a massas molares relativamente baixas, a lignina não é hidrossolúvel (BALAT e BALAT, 2009). Devido à natureza aromática da lignina, ela não é utilizada como substrato para fermentação a bioetanol, embora possa ser queimada em caldeiras para geração de calor e energia elétrica ou gaseificada para produção de outros biocombustíveis. A celulose é, da mesma forma que a amilose (um dos componentes do amido), um homopolímero linear composto por unidades de glicose (BAILEY e OLLIS, 1986). Na celulose, as moléculas de glicose estão unidas através de ligações glicosídicas β -1,4, o que resulta tanto em uma estrutura bastante diferente em relação à da amilose (composta por ligações glicosídicas α -1,4) quanto em uma reatividade química mais baixa. Dentro da parede celular, a celulose se divide entre regiões amorfas (15%) e cristalinas (85%): enquanto as primeiras podem ser facilmente hidrolisadas por ácidos, as últimas são de difícil decomposição (BAILEY e OLLIS, 1986). Já a hemicelulose é uma mistura de heteropolímeros ramificados compostos por hexoses (glicose, manose, galactose) e pentoses (xilose, arabinose) (BALAT e BALAT, 2009). Como a celulose e a hemicelulose são compostas por açúcares fermentescíveis, pode-se utilizá-las em escala industrial para fermentação a bioetanol após pré-tratamento adequado.

A produção de bioetanol de segunda geração, por utilizar matérias-primas mais complexas, requer um processo produtivo com mais etapas que o de primeira geração. O processo produtivo pode ser resumido em quatro estágios (SÁNCHEZ e CARDONA, 2008):

1. Pré-tratamento mecânico ou químico da biomassa para expor a celulose e a hemicelulose, tornando-as mais reativas para as etapas subsequentes;

2. Hidrólise ácida ou enzimática para quebra da celulose e da hemicelulose em seus açúcares constituintes;
3. Fermentação dos açúcares a bioetanol utilizando micro-organismos capazes de utilizar hexoses e pentoses;
4. Separação e concentração do bioetanol produzido.

A vantagem do bioetanol de segunda geração reside no virtual aproveitamento de 100% da planta para a produção do biocombustível, o que aumenta em grande parte a quantidade de biomassa disponível para produção de bioetanol. As desvantagens desta técnica são o seu baixo rendimento (pequena conversão da biomassa lignocelulósica em bioetanol) e o alto custo envolvido com o processo de hidrólise no seu atual estado de desenvolvimento (JOHN *et al.*, 2011). Mesmo com a matéria-prima sendo acessível a baixo custo, a produção de bioetanol lignocelulósico em escala industrial é mais cara que a produção de bioetanol de primeira geração devido ao alto custo energético envolvido com as técnicas usuais de pré-tratamento da biomassa (HARUN e DANQUAH, 2011).

2.3 Microalgas

As microalgas são definidas como micro-organismos unicelulares e realizadores de fotossíntese (LI *et al.*, 2008). Elas podem se desenvolver como células individuais isoladas ou associadas em fileiras ou pequenas colônias e são encontradas tanto em água doce como em ambientes marinhos (KUMAR *et al.*, 2010), diferenciando-se das cianobactérias por serem eucarióticas (LI *et al.*, 2008).

Atualmente, são conhecidas mais de 40 mil espécies de microalgas e cianobactérias. Entre os maiores grupos de microalgas, os mais frequentemente citados devido a suas propriedades de fixação de CO₂, tratamento de efluentes ou produção de substratos para síntese de biocombustíveis se encontram as *Cyanophyceae* (cianobactérias), *Chlorophyceae* (algas verdes), *Bacillariophyceae* (diatomáceas) e *Chrysophyceae* (algas douradas) (KUMAR *et al.*, 2010).

As microalgas podem ser classificadas segundo a maneira pela qual se dá o seu metabolismo, utilizando fontes orgânicas ou inorgânicas de carbono com ou sem a presença de luz. São quatro os tipos de metabolismo possíveis em microalgas: fotoautotrófico, heterotrófico, mixotrófico e fotoheterotrófico (CHOJNACKA e MARQUEZ-ROCHA, 2004).

O cultivo fotoautotrófico envolve a utilização de luz solar como a única fonte de energia, que é convertida em energia química através da fotossíntese juntamente com CO_2 como fonte de carbono. Já o cultivo heterotrófico é definido pela utilização de compostos orgânicos – como açúcares e ácido acético – como única fonte de energia e de carbono (KUMAR *et al.*, 2010). O cultivo mixotrófico é um processo metabólico misto: a fotossíntese é a principal fonte de energia para a célula, embora também possa haver assimilação de compostos orgânicos complexos. Já o cultivo fotoheterotrófico exige a presença de luz para que compostos orgânicos sejam utilizados como fonte de carbono (CHOJNACKA e MARQUEZ-ROCHA, 2004). Uma mesma espécie de microalga não cresce, necessariamente, sempre com o mesmo regime metabólico. Sob baixa intensidade luminosa, por exemplo, muitas espécies de microalgas mudam de metabolismo fotoautotrófico para heterotrófico, desde que existam moléculas orgânicas assimiláveis no meio de cultivo (ZENG *et al.*, 2011).

O crescimento de microalgas segue a sequência típica de fases para cultivo em batelada de qualquer micro-organismo, conforme a Figura 1.

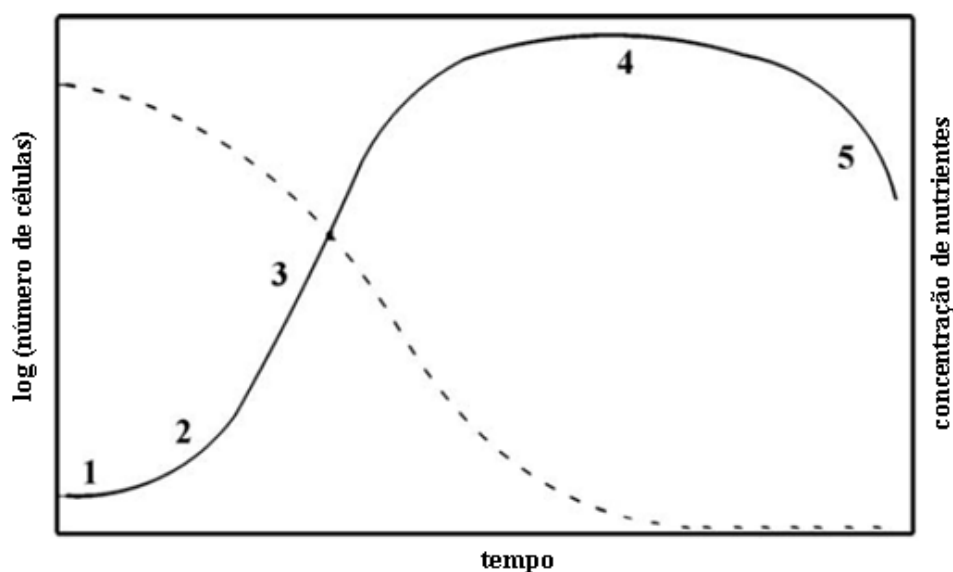


Figura 1 – Evolução do número de células (linha sólida) e da concentração de nutrientes (linha tracejada) ao longo do tempo em um cultivo batelada de microalgas.

Fonte: adaptado de MATA *et al.*, 2010.

Cinco diferentes fases de crescimento podem ser reconhecidas: (1) fase de *lag*, onde não há um aumento aparente do número de células, pois as microalgas estão se adaptando ao meio de

cultivo; (2) fase de aceleração, durante a qual a taxa de crescimento aumenta; (3) fase de crescimento exponencial, caracterizada pela aparição da máxima taxa de crescimento nas condições de cultivo; (4) fase estacionária, na qual a população de microalgas atinge o seu tamanho máximo – uma vez que a massa de microalgas não pode aumentar indefinidamente em um recipiente com nutrientes limitados; (5) fase de declínio, onde há um decréscimo exponencial no número de células (MATA *et al.*, 2010). A evolução da concentração de substratos é vista na linha tracejada na Figura 1.

Diversos fatores influenciam o crescimento de microalgas: fatores abióticos, como intensidade e qualidade luminosa, temperatura, concentração de nutrientes, de O₂ e de CO₂, potencial hidrogeniônico (pH), salinidade e presença de produtos químicos tóxicos; fatores bióticos, como patógenos (bactérias, fungos, vírus) e competição de outras espécies de microalgas; fatores operacionais, como cisalhamento produzido pela agitação, taxa de diluição e frequência de recuperação da biomassa (em cultivos contínuos), profundidade do leito e adição de bicarbonato (MATA *et al.*, 2010). Para que o tempo total de cultivo de microalgas em batelada seja minimizado, alguns cuidados devem ser tomados com o inóculo utilizado: (1) o inóculo deve ser o mais ativo possível e oriundo de cultura na fase de crescimento exponencial, (2) o meio de cultivo do inóculo deve ter composição semelhante à do processo em escala aumentada e (3) o inóculo utilizado deve perfazer de 5 a 10% do volume do meio final de modo a evitar perdas indevidas de intermediários ou ativadores por difusão (BAILEY e OLLIS, 1986).

As microalgas são capazes de fixar o carbono contido em diversas fontes: (1) CO₂ atmosférico; (2) CO₂ contido em gases de exaustão industriais; (3) CO₂ fixado na forma de carbonatos solúveis em água (KUMAR *et al.*, 2010). Para utilização em cultivos fotoautotróficos de microalgas, os atuais níveis atmosféricos de CO₂ (em torno de 392ppm, segundo NOAA, 2012) não são suficientemente altos para manutenção de taxas de crescimento e de produtividade encontrados em escala industrial. A fim de se contornar este problema e tornar o cultivo de microalgas interessante em termos industriais, tem-se considerado a possibilidade de utilizar gases de exaustão gerados em processos de combustão como fonte de CO₂ para os cultivos, uma vez que estes contêm de 5 a 15% de CO₂ em sua composição. No entanto, a concentração de CO₂ na corrente gasosa não reflete necessariamente a concentração de CO₂ dissolvido no meio de cultivo, ou seja, a concentração à qual as microalgas são expostas durante seu crescimento. Esta

última depende tanto do pH do meio quanto do gradiente de concentração de CO₂ criado pela resistência do meio à transferência de massa (KUMAR *et al.*, 2010).

Como a luz solar é fonte de energia direta para o crescimento de microalgas fotoautotróficas, a qualidade de sua irradiação sobre o cultivo afeta diretamente a eficiência fotossintética dos micro-organismos. A fotossíntese combina energia luminosa com CO₂ e H₂O para a produção de glicose, molécula fundamental na fabricação dos biopolímeros amido e celulose, responsáveis pelo armazenamento de energia e pela estrutura de célula, respectivamente. A reação de fotossíntese é simplificada representada na Equação 1, onde CH₂O corresponde à fórmula empírica da glicose (BAILEY e OLLIS, 1986; ZENG *et al.*, 2011).



A fotossíntese se divide em duas etapas sequenciais: a fase clara, dependente de luz, e a fase escura, chamada de ciclo de Calvin, independente da luz. A primeira etapa ocorre em organelas especializadas na obtenção de energia luminosa, denominadas cloroplastos. Tais estruturas se valem de organizações complexas de pigmentos, moléculas responsáveis pela absorção de luz de comprimentos de onda particulares dentro do espectro visível, e complexos proteicos (chamados fotossistemas) para realizar a absorção e a estocagem da energia luminosa sob a forma de trifosfato de adenosina (ATP) e do aceptor de elétrons nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato (NADP). Entre os pigmentos presentes nos fotossistemas, pode-se citar: clorofilas, que absorvem comprimentos de onda na região do azul e do vermelho, assim conferindo a cor verde a plantas e microalgas; ficobilinas, pigmentos que absorvem comprimentos de onda do verde ao vermelho, transferindo energia para as clorofilas durante a realização da fotossíntese (MIMURO e FUJITA, 1978); carotenoides, pigmentos acessórios que absorvem luz visível azul e verde e atuam na remoção do excesso de energia das clorofilas, dissipando-o como calor (COGDELL, 1978). Dois tipos de fotossistemas, atuando em série, são utilizados durante a fase clara da fotossíntese: o fotossistema II (FSII) e o fotossistema I (FSI), nesta ordem. No centro reacional fotossintético de cada um deles, encontra-se uma molécula de clorofila, responsável pelo estabelecimento do fluxo de elétrons necessário ao complexo mecanismo de fotossíntese. As clorofilas do FSII e do FSI são denominadas, respectivamente, P680 e P700, onde *P* indica “pigmento” e o número subsequente corresponde ao comprimento de

onda (em nm) no qual a clorofila apresenta o seu máximo de absorção (KARP, 2005). Já a fase escura da fotossíntese ocorre no estroma do cloroplasto e, embora não necessite diretamente de incidência luminosa, emprega a energia estocada em ATP e NADP nas reações da fase clara. Através da enzima ribulose-bisfosfatocarboxilase/oxigenase, denominada RuBisCo, o CO₂ é utilizado para síntese de intermediários químicos de três carbonos, imediatamente combinados para formar uma molécula de glicose.

Em cultivos industriais de microalgas, a luminosidade pode ser o principal fator limitante para o aumento de escala. Como o crescimento fotoautotrófico e a produtividade de biomassa são altamente dependentes de luz, as melhores áreas geográficas para cultivos de microalgas são aquelas com alta radiação solar durante o ano inteiro (JOHN *et al.*, 2011). No entanto, a exposição prolongada a grandes intensidades luminosas pode acarretar danos (normalmente reversíveis) aos centros reacionais fotossintéticos. Este fenômeno, denominado fotoinibição, é o resultado de danos causados ao FSII pela sua superexcitação, devido à absorção de luz em excesso (KARP, 2005). Este efeito implica que, acima de certo valor de intensidade luminosa, um aumento adicional no nível de luminosidade faz com que a taxa de aumento da biomassa diminua ao invés de crescer (CHISTI, 2007).

Como mostrado na Equação 1, a reação de fotossíntese tem O₂ como um de seus produtos. Sob alta luminosidade, a taxa volumétrica máxima de geração de O₂ em fotobiorreatores tubulares pode chegar a 10 g O₂ m⁻³ min⁻¹. Entretanto, a presença de O₂ dissolvido (OD) no meio de cultivo em quantidades muito superiores à concentração de saturação pode inibir a fotossíntese, uma vez que o OD em excesso, juntamente com luz solar intensa, pode causar danos foto-oxidativos às células. Estima-se que o nível máximo de OD tolerável a fim de se evitar danos às microalgas seja de 400% do valor de saturação do ar (CHISTI, 2007). Para assegurar que o OD permaneça em níveis aceitáveis, deve-se fazer a remoção contínua de O₂ de fotobiorreatores (MOLINA *et al.*, 2001). Dessa forma, em reatores contínuos em escala industrial, o O₂ dissolvido no cultivo é periodicamente retirado em equipamentos de degaseificação.

Os nutrientes necessários ao crescimento das microalgas devem ser fornecidos pelo meio de cultivo. Como mostrado na Tabela 1, diversos elementos químicos são utilizados pelas microalgas durante as diferentes fases do seu desenvolvimento. Além de carbono, nitrogênio, fósforo e enxofre, os principais elementos constituintes da matéria orgânica de microalgas e de

organismos vivos em geral, o ferro, por exemplo, é empregado em funções metabólicas essenciais, tais como o transporte eletrônico na fotossíntese, redução de nitritos e nitratos, fixação de N₂ e detoxificação de espécies reativas de oxigênio (DRAGONE *et al.*, 2011; ZENG *et al.*, 2011).

Tabela 1– Funções dos nutrientes para o crescimento de microalgas

Nutriente	Fontes principais	Função	Concentração
Carbono (C)	CO ₂ , HCO ₃ ⁻ , CO ₃ ²⁻	Suprir C para toda a célula	1-10 g L ⁻¹
Nitrogênio (N)	NO ₃ ⁻ , ureia, aminoácidos, N ₂	Suprir N para toda a célula	10-2000 mg L ⁻¹
Fósforo (P)	Fosfatos, hidrofosfatos	Suprir P para reações celulares	10-500 mg L ⁻¹
Enxofre (S)	Sulfatos	Suprir S para proteínas e reações celulares	1-200 mg L ⁻¹
Sais inorgânicos	K, Ca, Na, Mg	Manter estrutura e atividade da célula	0,1-100 mg L ⁻¹
Elementos-traço	Fe, Zn, Mn, Pb, Cd	Agir como cofator de enzimas	0,01-10 mg L ⁻¹
Vitaminas	B, C, E	Auxiliar a divisão celular	0,01-1000 µg L ⁻¹

Fonte: adaptado de ZENG *et al.*, 2011

2.4 Produção de bioetanol a partir de microalgas

Diferentes estudos (LI *et al.*, 2008; BRENNAN e OWENDE, 2010; JOHN *et al.*, 2011; LAM e LEE, 2012; KIRROLIA *et al.*, 2013) apontam para a possibilidade de utilização da biomassa de microalgas para produção de biocombustíveis – tais como biodiesel, bioetanol, gás de síntese e hidrogênio. Para a produção do chamado “bioetanol de terceira geração”, os carboidratos produzidos pelas microalgas são empregados como substrato para fermentação.

A biomassa de microalgas é uma alternativa interessante às culturas tradicionais para produção de bioetanol, pois não apresenta as desvantagens inerentes ao bioetanol de primeira ou segunda gerações. O cultivo de microalgas pode ser realizado em diferentes meios de cultivo,

sem necessariamente utilizar água potável e podendo levar efluentes industriais, água salina (água do mar) e água salobra em sua composição (PHUKAN *et al.*, 2011). Este fato é vantajoso no sentido de os cultivos de microalgas não competirem pela água doce destinada à irrigação de plantações ou ao consumo humano e animal. Além disto, o cultivo de microalgas pode ocorrer em pequenas áreas e em terras não aráveis, semiáridas ou desérticas, uma vez que os principais fatores que influenciam o desenvolvimento das microalgas são a disponibilidade de luz solar e de água para o cultivo (BRENNAN e OWENDE, 2010). Desta forma, o cultivo de microalgas não compete diretamente por terras aráveis para produção de alimentos nem aumenta a ocorrência de queimadas e desmatamento, principais métodos para a obtenção de novas terras cultiváveis. Outra vantagem reside no fato de que, ao se utilizar carboidratos produzidos por certas espécies de microalgas, a produtividade de bioetanol de terceira geração (em litros por hectare e por ano) pode ser algumas ordens de grandeza maior que a produtividade de matérias-primas utilizadas na produção de bioetanol de primeira e segunda gerações, conforme estimado na Tabela 2.

Tabela 2– Rendimento de bioetanol de diferentes fontes de biomassa por área cultivada e por tempo

Fonte de biomassa	Rendimento de bioetanol (L ha ⁻¹ ano ⁻¹)
Palha de milho	1050-1400
Trigo	2590
Mandioca	3310
Sorgo doce	3050-4070
Milho	3460-4020
Beterraba	5010-6680
Cana-de-açúcar	6190-7500
<i>Panicumvirgatum</i> (<i>switchgrass</i> , gramínea de crescimento rápido)	10760
Microalgas	46760-140290

Fonte: adaptado de MUSSATTO *et al.*, 2010

Devido à sua estrutura, mais simples que as de plantas superiores, as microalgas podem atingir eficiências fotossintéticas consideravelmente maiores que as plantas terrestres (BRENNAN e OWENDE, 2010). Assim, uma maior parcela da energia solar capturada é

armazenada através do acúmulo de carboidratos no interior da célula. Da mesma forma, a produção de biomassa de microalgas ocorre em um espaço de tempo relativamente curto, muito inferior em comparação com plantas terrestres utilizadas na produção de bioetanol de primeira e segunda gerações (BRENNAN e OWENDE, 2010). Existe, portanto, a possibilidade de se fazer a recuperação da biomassa das microalgas várias vezes ao ano ou de maneira contínua, dependendo do tipo de reator em que se dá o cultivo. Desta forma, tem-se uma fonte abundante e barata de biomassa para a produção de bioetanol. Visto o potencial de utilização das microalgas, a grande diversidade de espécies e as diferentes condições possíveis de cultivo, o conhecimento da fisiologia e do metabolismo destes micro-organismos se torna imperativo para o desenvolvimento de novos processos industriais.

Entre os diversos tipos de biocombustíveis passíveis de produção a partir de microalgas, a síntese de biodiesel de microalgas tem recebido grande interesse acadêmico recentemente, uma vez que muitas espécies de microalgas podem acumular quantidades significativas de lipídios e, desta forma, serem candidatas potenciais para a produção do biocombustível em escala industrial. O biodiesel – oriundo de lipídios de microalgas ou de óleos vegetais – é tanto substituto quanto aditivo renovável do diesel, combustível fóssil que movimenta veículos de transporte pesado como caminhões e ônibus. Já o bioetanol é um biocombustível que pode ser utilizado em conjunto ou em substituição à gasolina empregada em automóveis leves. Deve-se, portanto, aumentar os esforços de pesquisa em torno da produção de bioetanol de microalgas, uma alternativa para o aumento da produção do biocombustível, uma vez que o consumo mundial de combustíveis fósseis leves é maior que o consumo de diesel por veículos pesados (BP, 2011). O Brasil, no entanto, apresenta um panorama inverso devido ao largo emprego do modal rodoviário para transporte de cargas: em 2011, o consumo de diesel (52 milhões de m³) foi superior ao de bioetanol e de bioetanol combinados (46 milhões de m³), segundo ANP, 2012.

O processo de conversão de microalgas em bioetanol é bastante similar ao processo empregado na transformação de materiais lignocelulósicos, embora a ausência de lignina na biomassa microalgal facilite o processo em grande parte (HARUN *et al.*, 2009). Um esquema simplificado da produção de bioetanol de terceira geração pode ser visto na Figura 2. Cada uma das etapas envolvidas será detalhada subsequentemente.

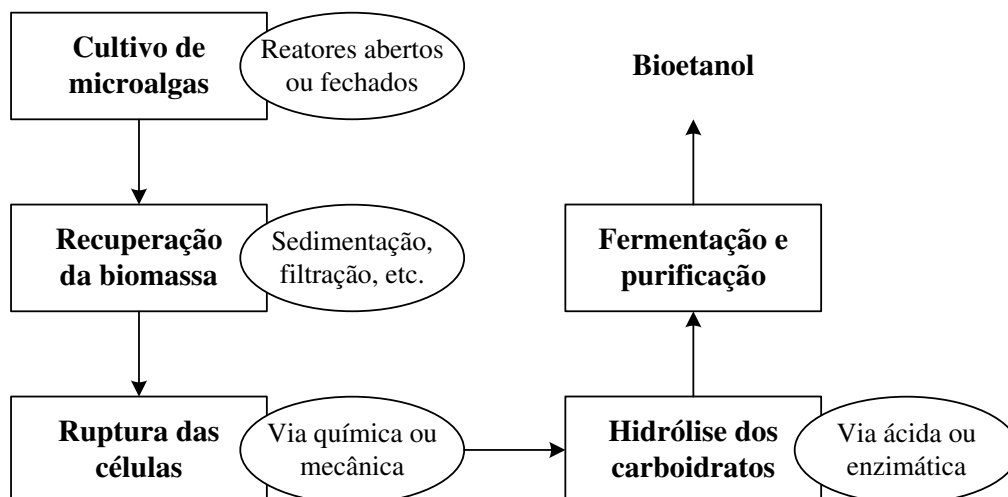


Figura 2 – Processo de produção de bioetanol de terceira geração

Fonte: adaptado de MUSSATTO *et al.*, 2010

A seleção da espécie de microalga apropriada para a produção de biocombustíveis é um fator importante para o sucesso do processo produtivo como um todo. Brennan e Owende, 2010, listam algumas das características desejáveis para que uma microalga seja interessante para a produção de biocombustíveis: (1) tolerar tensões de cisalhamento encontradas nos reatores, especialmente em fotobiorreatores fechados; (2) ser dominante em relação a linhagens de micro-organismos contaminantes; (3) grande capacidade de absorção de CO₂; (4) tolerar grandes variações de temperatura, resultantes dos ciclos diários e sazonais; (5) baixo requerimento de nutrientes; (6) potencial de produção de coprodutos de alto valor agregado em adição ao produto desejado; (7) apresentar ciclo produtivo de curta duração; (8) apresentar alta eficiência fotossintética; (9) ser capaz de auto-floculação: a formação de agregados celulares facilita a etapa de recuperação da biomassa microalgal. A espécie de microalga *Chlorella vulgaris*, por exemplo, é amplamente descrita na bibliografia tanto para a produção de biocombustíveis quanto como fonte de alimentos e de pigmentos (PHUKAN *et al.*, 2011), é de fácil cultivo e apresenta comportamento sensível em relação a diferentes condições de processo.

As microalgas apresentam diversos compostos em suas células, tais como lipídios, carboidratos, proteínas e pigmentos, em diferentes concentrações. Este perfil químico reflete diretamente a natureza do micro-organismo (como sua espécie ou linhagem), a influência das condições de cultivo escolhidas e a fase de crescimento da cultura. Desta forma, uma mesma

espécie de microalga pode apresentar diferentes composições ao se manipular os fatores especificados (ZEPKA *et al.*, 2008).

Para a produção de bioetanol de terceira geração, deve-se selecionar uma espécie de microalga com a habilidade de produzir altas concentrações de carboidratos ao invés de lipídios como composto de reserva energética (MUSSATTO *et al.*, 2010). Diversos estudos (BEHRENS *et al.*, 1989; DRAGONE *et al.*, 2011) indicam que a limitação da quantidade de nitrogênio no meio de cultivo é um dos principais fatores que acarretam o acúmulo de carboidratos pelas microalgas. Segundo Behrenset *al.*, 1989, as microalgas em um meio de cultivo com privação de nitrogênio direcionam o fluxo de carbono para a síntese de carboidratos em detrimento da produção de proteínas.

Sob condições de cultivo otimizadas ou não, algumas espécies de microalgas vêm ganhando atenção especial por apresentarem potencial de aplicação industrial para a produção de bioetanol de terceira geração. Hirano *et al.*, 1997, ao cultivarem diversas espécies e cepas de microalgas em condições não otimizadas, encontraram duas com grande concentração de amido: *Chlamydomonas reinhardtii* (UTEX2247) com 45% de amido (base seca) e *Chlorella vulgaris* (IAM C-534) com 37% de amido (base seca). As produtividades das microalgas foram, respectivamente, 11 e 32 g massa seca m⁻² dia⁻¹. Dragone *et al.*, 2011, produziram biomassa de *Chlorella vulgaris* com até 41% de amido (base seca) em condições de cultivo com baixo teor de nitrogênio. Behrenset *al.*, 1989, encontraram 55% de amido (base seca) em microalgas da espécie *Chlorella vulgaris* cultivadas em meio com limitação de nitrogênio. Segundo Doucha e Lívanský, 2009, uma cepa mutante para produção de amido de *Chlorella* sp. pode acumular 70% de amido (base seca) em condições de supressão de produção de proteínas.

2.4.1 Sistemas para produção industrial de biomassa de microalgas

A produção de biomassa de microalgas para obtenção de biocombustíveis apresenta, em geral, custos mais altos e desafios técnicos maiores que o cultivo de culturas vegetais (ALAM *et al.*, 2012). Em larga escala, o cultivo de microalgas deve ser feito de modo a simular as melhores condições possíveis para crescimento dos micro-organismos. Atualmente, os cultivos são realizados em sistemas abertos, em sistemas fechados ou em sistemas híbridos, que combinam as

vantagens de ambas as técnicas (uma comparação sistemática entre as duas primeiras técnicas é apresentada no Quadro 2).

2.4.1.1 Sistemas abertos

Os sistemas abertos são os mais utilizados para o cultivo de microalgas em escala industrial, uma vez que são mais baratos e mais fáceis de construir e operar que fotobiorreatores fechados (FBRs). Estes sistemas podem ser divididos em corpos d'água naturais (como lagos e lagoas) e em lagoas artificiais, como as circulares, as inclinadas e as do tipo *raceway*. Dentre as lagoas artificiais, as do tipo *raceway* são as mais comumente empregadas, uma vez que as lagoas circulares são menos atrativas por apresentarem estruturas em concreto caras, alto consumo de energia para agitação, complexidade mecânica para injeção de CO₂ e uso ineficiente da terra. As lagoas do tipo *raceway* são canais de recirculação de ciclo fechado, normalmente ovais ou sinuosas (como mostrado na Figura 3a). Comumente construídos em concreto ou em valas revestidas de plástico branco, os *raceways* são compostos por canais com 20 a 50 cm de profundidade e até centenas de metros de comprimento, por uma roda de pás para promover agitação e circulação do meio e evitar a sedimentação das microalgas e de dispositivos de injeção de CO₂ para melhora da aeração do sistema. Como os *raceways* operam, em geral, em regime contínuo, o inóculo de microalgas e o meio de cultivo fresco são continuamente introduzidos logo após a roda de pás e circulados pelo circuito até o ponto de retirada da biomassa, localizado imediatamente antes da roda de pás (BRENNAN e OWENDE, 2010; JOHN *et al.*, 2011). Embora este tipo de reator aberto seja amplamente utilizado industrialmente, seu *design* ainda é estudado e modificado, como, por exemplo, através da diminuição da profundidade dos canais e do uso de hélices alternativas para circulação do meio de cultivo (CHIARAMONTI *et al.*, 2013).

Os sistemas abertos em geral são de construção e de operação baratas, podem ser instalados em terras com baixo potencial agrícola, têm baixos requerimentos energéticos e manutenção mínima. No entanto, eles apresentam certas desvantagens: o fato de existirem grandes perdas de água por evaporação, flutuação da temperatura no meio de cultivo, penetração limitada de luz e baixa eficiência de utilização de CO₂ acarretam baixas produtividade e baixas concentrações de biomassa colhida. Além disto, por serem abertos à atmosfera, existe uma alta possibilidade de contaminação do cultivo por outras espécies de microalgas. A manutenção de

uma monocultura de microalgas é possível mediante o estabelecimento de um meio de cultivo com condições extremas, ao qual apenas as microalgas desejadas possam se adaptar – e não os micro-organismos contaminantes (BRENNAN e OWENDE, 2010; JOHN *et al.*, 2011; MATA *et al.*, 2010).

2.4.1.2 Sistemas fechados

As diversas limitações dos sistemas abertos levaram ao desenvolvimento de FBRs. Um FBR é definido como um reator projetado para o crescimento fotoautotrófico de micro-organismos, de forma isolada do meio externo. Os principais *designs* de FBRs incluem fotobiorreatores tubulares, de placas paralelas e de coluna.

Um fotobiorreator tubular (Figura 3b) consiste em um arranjo de tubos retos e transparentes, normalmente confeccionados em plástico ou vidro, que permitem a passagem da luz solar para o crescimento das microalgas fotoautotróficas. Em geral, os tubos têm diâmetro de 10 cm ou menos, já que a luz solar não penetra profundamente em cultivos com altas concentrações de células – normalmente encontrados em sistemas fechados. Os tubos são orientados de forma a maximizar a captura da luz solar. Da mesma forma que em lagoas *raceway*, o cultivo é feito de modo contínuo: o meio de cultivo é circulado entre o arranjo de tubos e o reservatório, onde ele é degaseificado e resfriado. A recuperação da biomassa é feita logo antes da introdução do meio de cultivo no reservatório (CHISTI, 2007).

Os fotobiorreatores de placas paralelas são conhecidos pela grande área de superfície exposta à iluminação solar e pelas altas densidades de células, podendo-se alcançar concentrações de até 80 g L⁻¹ em determinadas condições de cultivo (HU *et al.*, 1998). Como representado na Figura 3c, este *design* consiste em compridas placas paralelas confeccionadas em materiais transparentes, por entre as quais circula uma fina camada de meio de cultivo. A operação do equipamento também se dá de forma contínua: em uma das extremidades do fotobiorreator, insere-se meio de cultivo fresco, juntamente com ar, CO₂ e meio de cultivo reciclado; na outra extremidade, faz-se a degaseificação do meio de cultivo, que é posteriormente direcionado para a retirada da biomassa microalgal ou para resfriamento e reciclo (BRENNAN e OWENDE, 2010; JORQUERA *et al.*, 2010).

Já os fotobiorreatores de coluna são semelhantes aos tubulares, uma vez que são compostos basicamente por um tubo vertical onde se faz o cultivo de microalgas. Este *design* apresenta agitação eficiente, as maiores taxas volumétricas de transferência de massa e as condições de crescimento de mais fácil controle entre os FBRs, além de terem baixo custo e serem compactos e de fácil operação. A injeção de ar no fundo do equipamento permite a aeração do meio de cultivo, evitando igualmente a sedimentação das microalgas. A iluminação se dá internamente ou através das paredes transparentes do tubo (BRENNAN e OWENDE, 2010).

Por serem fechados, apresentam bom aproveitamento da luz solar, grande área de superfície iluminada e baixos riscos de contaminação, os FBRs apresentam culturas de microalgas com concentração muito maior que em sistemas abertos. As condições de crescimento (pH, temperatura, agitação e concentrações de O₂ e CO₂) são de fácil controle, uma vez que a evaporação de água e as perdas de gases do meio de cultivo são praticamente inexistentes. Os FBRs apresentam, contudo, certas desvantagens inerentes: superaquecimento; *biofouling*, o crescimento de microalgas nas paredes do fotobiorreator que diminui a penetração de luz no meio de cultivo; acúmulo de O₂ gerado pela fotossíntese; altas tensões de cisalhamento sobre as células. Os custos de construção e operação de FBRs convencionais também são altos, sendo que o custo total de produção de biomassa pode chegar a ser até uma ordem de grandeza maior que em sistemas abertos. Mesmo assim, dependendo da espécie de microalga e da aplicação desejada, a maior produtividade de biomassa pode compensar os custos de produção e justificar o seu uso industrial (BRENNAN e OWENDE, 2010; JOHN *et al.*, 2011; MATA *et al.*, 2010).

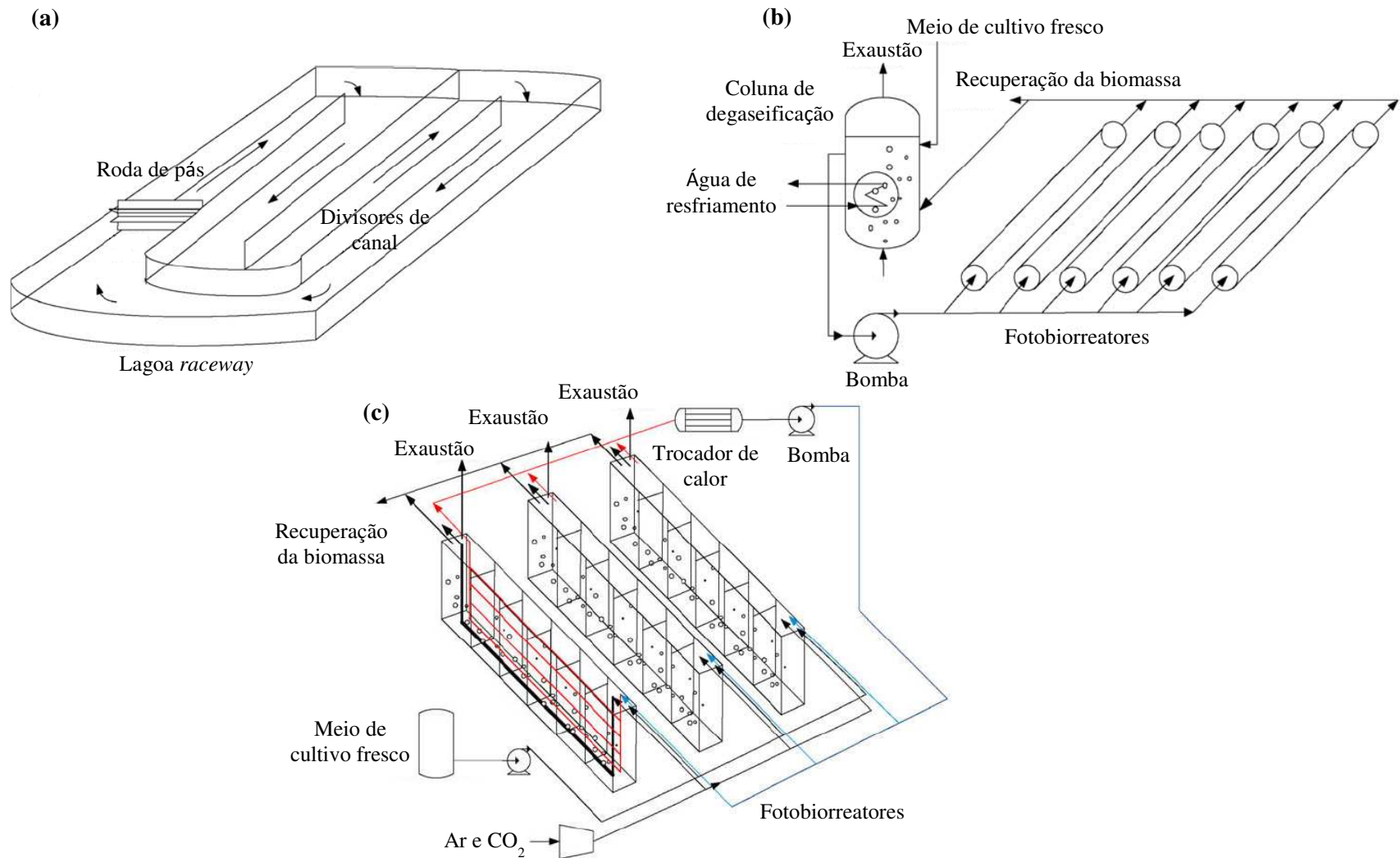


Figura 3– Representações de alguns dos principais tipos de reatores utilizados no cultivo de microalgas em larga escala: (a) lagoa do tipo *raceway*; (b) fotobiorreator tubular com tubos horizontais paralelos; (c) fotobiorreator de placas paralelas

Fonte: adaptado de JORQUERA *et al.*, 2010

Quadro 2 – Comparação entre sistemas abertos e fechados para o cultivo de microalgas em larga escala

Sistema de cultivo	Sistemas abertos (lagoas)	Sistemas fechados (FBRs)
Controle de contaminantes	Difícil	Fácil
Risco de contaminação	Alto	Reduzido
Esterilidade	Nenhuma	Possível
Controle de processo	Difícil	Fácil
Controle de espécie	Difícil	Fácil
Agitação	Deficiente	Uniforme
Regime de operação	Batelada ou semi-contínuo	Batelada ou semi-contínuo
Área requerida	FBRs ~ lagoas	Dependente da produtividade
Razão área/volume	Baixa (5-10 m ⁻¹)	Alta (20-200 m ⁻¹)
Densidade populacional	Baixa	Alta
Investimento	Baixo	Alto
Custos de operação	Baixo	Alto
Eficiência de utilização de luz	Baixa	Alta
Controle de temperatura	Difícil	Temperatura mais uniforme
Produtividade	Baixa	De 3 a 5 vezes mais produtivos
Perdas de água	FBRs ~ lagoas	Dependentes do sistema de resfriamento
Tensão hidrodinâmica sobre as microalgas	Muito baixa	Baixa-alta
Evaporação do meio de cultivo	Alta	Baixa
Controle de transferência de gás	Baixo	Alto
Perdas de CO ₂	FBRs ~ lagoas	Dependentes do pH, alcalinidade, etc.
Inibição por O ₂	FBRs > lagoas	Maior problema em FBRs
Concentração de biomassa	FBRs > lagoas	De 3 a 5 vezes maior
Aumento de escala	Difícil	Difícil

Fonte: adaptado de MATA *et al.*, 2010

2.4.1.3 Sistemas híbridos

Os sistemas híbridos combinam dois estágios separados de crescimento. Primeiramente, as microalgas são cultivadas em FBRs até que se atinja uma quantidade de células que minimize os efeitos de contaminação por espécies indesejadas e bactérias. Em seguida, as microalgas são transferidas para lagoas abertas e cultivadas sob condições controladas de nutrientes para estímulo de produção de biomassa ou do composto desejado (BRENNAN e OWENDE, 2010). Esta configuração combina algumas das vantagens de sistemas abertos e fechados de cultivo.

2.4.2 Recuperação da biomassa de microalgas

A etapa de recuperação da biomassa microalgal contida no cultivo, também conhecida como “colheita”, requer o emprego de diferentes operações de separação sólido-líquido. A escolha da técnica de colheita apropriada exige o conhecimento das características das microalgas (como diâmetro e concentração de células no cultivo) e do valor agregado dos produtos desejados (BRENNAN e OWENDE, 2010). Outro critério para seleção do procedimento de separação é a possibilidade de se ajustar a concentração final de biomassa ou o nível aceitável de umidade no concentrado em função das etapas subsequentes (MATA *et al.*, 2010). O custo da colheita de microalgas pode representar de 20 a 30% do custo total do processo de produção de biomassa microalgal, sendo fundamental sua correta escolha para cada unidade industrial (BRENNAN e OWENDE, 2010).

Em geral, a recuperação de microalgas envolve dois estágios sequenciais: separação inicial da biomassa do meio de cultivo e espessamento. O primeiro estágio da colheita opera com fatores de concentração de 100 a 800 vezes para atingir concentrações de matéria sólida de 2 a 7%. Este desempenho é fortemente dependente da concentração inicial da biomassa no cultivo e da técnica empregada, entre elas a floculação (agregação das microalgas através da adição de floclulantes inorgânicos como cloreto de ferro ou sulfato de alumínio), a flotação (coleta das microalgas através da dispersão de microbolhas de ar no cultivo) e sedimentação por gravidade. Com um maior custo energético, a etapa de espessamento visa à concentração adicional da lama obtida no primeiro estágio através de técnicas como filtração e centrifugação (BRENNAN e OWENDE, 2010).

Após a recuperação da biomassa, as microalgas devem ser rapidamente processadas por serem perecíveis. Os métodos mais utilizados nesta etapa são a desidratação ou a secagem nas suas mais diversas formas. A secagem ao sol é o método com menor custo, mas que envolve longos períodos e grandes superfícies de secagem, além da possibilidade de perda de material. A secagem por aspersão é utilizada na recuperação de produtos com alto valor agregado por apresentar custo de operação relativamente alto. A liofilização é um processo de desidratação de custo mais elevado, especialmente em operações em larga escala (BRENNAN e OWENDE, 2010).

A etapa de processamento descrita serve de preparação para a ruptura das células das microalgas. Como os carboidratos de interesse para a produção de bioetanol de terceira geração, ou seja, amido e celulose, se encontram no interior das paredes celulares das microalgas, estas devem ser rompidas para liberação dos açúcares (HARUN e DANQUAH, 2011). Entre os métodos existentes, pode-se citar homogeneizadores de alta pressão, autoclavagem ou adição de ácido clorídrico (HCl), hidróxido de sódio e lise alcalina (BRENNAN e OWENDE, 2010).

2.4.3 Hidrólise

Como ocorre com diferentes matérias-primas celulósicas para produção de bioetanol, a biomassa de microalgas deve ser hidrolisada a açúcares fermentescíveis para que ela possa servir de substrato para a fermentação a bioetanol. Diversos métodos de hidrólise, também conhecida por sacarificação, têm sido utilizados, cada um com suas vantagens e desvantagens inerentes. A hidrólise com ácido concentrado requer o emprego de HCl ou de ácido sulfúrico (H₂SO₄) em diferentes concentrações e com alta temperatura. Mesmo que a recuperação de açúcares com este método seja alta, a sua aplicação é limitada devido aos altos riscos de manuseio de ácidos concentrados e à dificuldade de se fazer seu reciclo. A hidrólise com ácido diluído exclui a necessidade de recuperação do ácido utilizado, embora a sua eficiência de conversão seja mais baixa que a hidrólise com ácido concentrado. Já a hidrólise enzimática emprega enzimas juntamente com pré-tratamento termoquímico para obter altas eficiências de conversão. No entanto, o alto custo das enzimas e o longo tempo de reação necessário diminuíram a sua aplicação comercial (ZHOU *et al.*, 2011).

A hidrólise com ácido diluído, o método mais empregado em grande escala para a hidrólise de materiais lignocelulósicos por ser o mais rápido e passível de utilização em biomassa aquáticas, apresenta a desvantagem de promover a degradação de parte da glicose (JEONG *et al.*, 2012). Diversas espécies químicas indesejáveis à fermentação são geradas, tais como furfural, hidroximetilfurfural (HMF), ácido acético e ácido levulínico, os quais podem inibir a atividade fermentativa dos micro-organismos produtores de bioetanol.

2.4.4 Fermentação

Como exemplo da possibilidade técnica da produção de bioetanol a partir de microalgas em escala laboratorial, pode-se citar Harun *et al.*, 2009, que produziram 3,83 g L⁻¹ de bioetanol com a fermentação de 10 g L⁻¹ da biomassa resultante da extração de lipídios de um cultivo de microalgas da espécie *Chlorococum* sp. Efremenko *et al.*, 2012, produziram bioetanol a partir da fermentação alcoólica com *Clostridium acetobutylicum* de carboidratos oriundos de biomassa de diferentes espécies de microalgas (entre elas *Arthrospira platensis*, *Chlorella vulgaris* e *Dunaliella tertiolecta*), obtendo rendimentos de bioetanol entre 3,6 e 34,5%.

Em escala industrial, a produção de bioetanol de terceira geração se dá da forma tradicional, ou seja, a solução de açúcares fermentescíveis é mantida em dornas de fermentação juntamente com o agente fermentador, que utiliza os açúcares em seu metabolismo e excreta bioetanol no meio de fermentação. Na sequência, um processo de destilação separa água por diferença de pressão de vapor, elevando a concentração de bioetanol de 10 a 15%, após a fermentação, para 95%, onde há formação do azeótropo etanol-água. O bioetanol em forma líquida produzido desta forma pode ser utilizado em substituição ou em conjunto com gasolina em veículos automotivos (BRENNAN e OWENDE, 2010; MUSSATTO *et al.*, 2010).

Da mesma forma que na utilização de biomassa de segunda geração, a produção de bioetanol de terceira geração passa pela fermentação tanto de hexoses quanto de pentoses. A hidrólise de microalgas produz uma solução de carboidratos rica em açúcares simples oriundos da quebra das paredes celulares das células. Para a produção de bioetanol de terceira geração se tornar economicamente viável, todos os potenciais substratos devem ser empregados. Neste sentido, agentes fermentadores tradicionais, como a levedura *Saccharomyces cerevisiae* ou a bactéria *Zymomonas mobilis*, apresentam a limitação prática de produzirem etanol de forma

eficiente apenas a partir de hexoses. Embora existam micro-organismos naturais capazes de fermentar diversas formas de açúcares, alguns apresentam desvantagens em relação à produção em escala industrial, como baixas estabilidade e tolerância a inibidores (MUSSATTO *et al.*, 2010).

2.5 Conclusões parciais

Neste capítulo, foram expostas as bases teóricas do cultivo de microalgas e da sua utilização como matéria-prima para a síntese de bioetanol. Apesar de ser uma alternativa relativamente nova para a síntese do biocombustível, diversos estudos referentes à produção de bioetanol de terceira geração e aos processos químicos e biotecnológicos envolvidos podem ser encontrados na literatura científica. Assim, o presente trabalho objetiva contribuir para o desenvolvimento desta área do conhecimento, tomando como referência os pontos aqui apresentados para delineamento dos experimentos apropriados.

CAPÍTULO 3
MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Microalga e meio de cultura

A microalga utilizada nos experimentos foi a *Chlorella vulgaris*, cedida pelo Centro de Ciências Agrárias (CCA) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), em Araras (SP).

O meio de cultura BG-11, usado tanto para manutenção e propagação dos inóculos quanto nos cultivos do planejamento experimental, apresenta a seguinte composição (RIPPKA *et al.*, 1979): 1500 mg L⁻¹ de NaNO₃, 40 mg L⁻¹ de K₂HPO₄, 30 mg L⁻¹ de CaCl₂.2H₂O, 19 mg L⁻¹ de Na₂CO₃, 8 mg L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O, 7 mg L⁻¹ de C₆H₈O₇.H₂O, 6 mg L⁻¹ de citrato de ferro e amônio, 3 mg L⁻¹ de H₃BO₃, 2 mg L⁻¹ de MnCl₂.4H₂O, 0,7 mg L⁻¹ de Na₂EDTA.2H₂O, 0,4 mg L⁻¹ de Na₂MoO₄.2H₂O, 0,2 mg L⁻¹ de ZnSO₄.7H₂O, 0,1 mg L⁻¹ de CuSO₄.5H₂O e 0,05 mg L⁻¹ de Co(NO₃)₂.6H₂O.

Todos os meios de cultivo e demais materiais (vidrarias, sensores, filtros de ar) foram esterilizados por 15 min a 121 °C em autoclave vertical (Phoenix Luferco, modelo AV-50 Plus) e manuseados em bancada de fluxo laminar vertical (Pachane, modelo PA 050). Antes da autoclavagem, o pH dos meios de cultivo é ajustado para 7,5 (RIPPKA *et al.*, 1979) utilizando-se solução de HCl 0,1 N.

3.2 Câmara de fotoperíodo para propagação de inóculos

Uma câmara com um banco de luzes foi projetada e construída para proporcionar a propagação de inóculos para os cultivos de microalgas e para a manutenção da cepa de *Chlorella vulgaris*. O equipamento, que pode ser visto na Figura 4, é composto por duas caixas em MDF branco de 45 cm x 70 cm x 70 cm, com oito lâmpadas fluorescentes brancas tipo “luz do dia” (temperatura de cor de 6400 K) de 20 W internas a cada uma delas. Um agitador do tipo *wrist-action* (Burrell Scientific, modelo 75) foi empregado para suportar até oito cultivos de microalgas simultaneamente. O fotoperíodo, ou seja, o período diário em que as lâmpadas ficam ligadas, foi controlado por um temporizador digital, enquanto a aeração foi feita por um compressor de ar de 2 W.



Figura 4—Câmara de fotoperíodo utilizada para propagação de microalgas

3.3 Fotobiorreator de placa plana

Os experimentos foram realizados em um fotobiorreator de placa plana de bancada (Photon Systems Instruments, modelo FMT 150/1000). O fotobiorreator dispõe de uma cuba retangular, de dimensões 19,7 cm de altura, 10,3 cm de largura e 6,0 cm de profundidade, confeccionada com placas de vidro de 3 mm de espessura e de volume total igual a 1,2 L. O volume empregado nos cultivos do planejamento experimental foi de 1 L e a montagem do aparato experimental pode ser vista na Figura 5.

O topo do fotobiorreator dispõe de quatro entradas para agulhas de aço inoxidável acopladas a conexões do tipo Luer-Lock, das quais três foram utilizadas para retirada de amostras do cultivo e para injeção separada de ar e CO₂. Além destas, outras três entradas de maior diâmetro são dispostas na parte central da cuba para inserção de sensores de O₂ dissolvido (Mettler Toledo, modelo InPro 6800), CO₂ dissolvido (Mettler Toledo, modelo InPro 5000) e sensor integrado de pH e temperatura (Mettler Toledo, modelo InPro 325X).

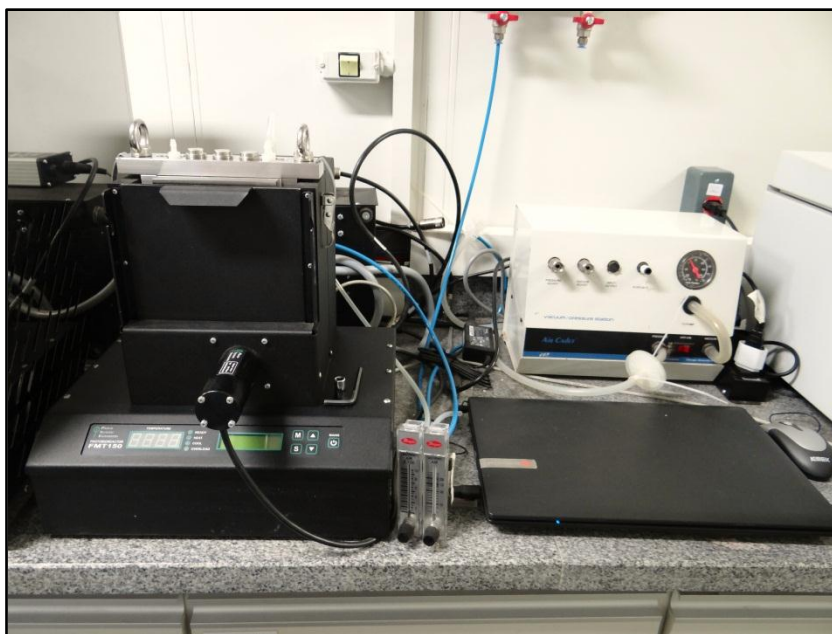


Figura 5 – Foto do fotobiorreator FMT 150/1000

A cuba foi disposta ao lado de um arranjo contendo 12 fileiras de LEDs azuis (comprimento de onda de 455 nm) e vermelhos (comprimento de onda de 627 nm) intercalados, que fornecem fluxo luminoso uniforme e constante ao cultivo, de até $3500 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (micromoles de fótons por metro quadrado e por segundo). Nos frascos de propagação e no fotobiorreator, o fluxo luminoso foi determinado com um luxímetro LI-COR, modelo LI-250A, equipado com sensor de radiação Quantum LI-190. Este sensor é sensível à radiação fotossinteticamente ativa, compreendendo a região do espectro luminoso entre 400 e 700 nm.

A temperatura do cultivo foi regulada mediante o uso de dois elementos Peltier de 200 W integrados na base do equipamento, em contato direto com a cuba contendo a suspensão de microalgas. Tais dispositivos termoelétricos se valem do efeito Peltier-Seebeck para atuarem tanto como aquecedores quanto como refrigeradores, sendo utilizados como controladores de temperatura. A agitação do cultivo foi feita através de barra magnética posicionada na face frontal da cuba, oposta à placa adjacente ao arranjo de LEDs.

O crescimento das microalgas pôde ser monitorado em tempo real através de densitômetro óptico integrado na parte inferior do equipamento. Um LED infravermelho com comprimentos de onda de 680 nm emite radiação luminosa através de um caminho óptico de 1 cm, sendo captada por um fotodiodo PIN com faixa de detecção entre 665 e 750 nm (NEDBAL

et al., 2008). A densidade óptica medida a 680 nm apresentou alta correlação com a concentração de *Chlorella vulgaris* em massa seca por litro. Em altas concentrações celulares, amostras foram retiradas do fotobiorreator e medidas conforme a Seção 3.9.1 após diluição com meio BG-11. As radiações luminosas de 455 nm (azul) e 627 nm (vermelho), também emitidas por LEDs, foram utilizadas para determinação das eficiências fotossintéticas operacionais associadas ao cultivo. A eficiência fotossintética operacional (EF'), fornecida diretamente pelo fotobiorreator, é dada pela Equação 2:

$$EF' = 1 - \frac{F_t'}{F_m'} \quad (2)$$

onde F_t' é a fluorescência instantânea da clorofila *in vivo* e F_m' é a fluorescência máxima da clorofila no estado adaptado à luz.

O fotobiorreator operou conectado a um computador externo para definição de protocolos de experimento (fotoperíodo e fluxo luminoso, controle de temperatura e periodicidade da aquisição de dados) e gravação de dados oriundos dos sensores em tempo real.

3.4 Condições de cultivo e planejamento experimental

Os inóculos de *Chlorella vulgaris* foram mantidos e propagados em frascos Erlenmeyers com 600 ml de meio de cultura BG-11, sob fluxo luminoso de $62 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ fornecido na câmara de fotoperíodo, aeração forçada constante de 1 VVM, temperatura de $26 \pm 4^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 h (claro-escuro). Os cultivos foram mantidos até que se atingisse a fase exponencial de crescimento e posteriormente centrifugados (Eppendorf, modelo 5810R) a $1620 \times g$ por 15 min para coleta da biomassa. As condições empregadas no fotobiorreator foram: inóculo de cerca de 300 mgL^{-1} ; aeração de 1 VVM; fotoperíodo de 12 h (claro-escuro); agitação de 300 rpm; tempo total de cultivo de 168 h; e temperatura de $27 \pm 0,5^\circ\text{C}$.

Nos cultivos realizados no fotobiorreator, foram avaliados os efeitos de duas variáveis de processo (fluxo luminoso e concentração de CO_2 na alimentação gasosa) e uma condição nutricional (concentração de NaNO_3 de cultura) sobre a produtividade de biomassa e composição das microalgas em termos de lipídios, carboidratos e proteínas. Os níveis das variáveis são mostrados na Tabela 3 e foram estabelecidos após consulta à bibliografia apropriada (BEHRENS

et al., 1989; BILANOVIC *et al.*, 2009; DRAGONE *et al.*, 2011; PHUKAN *et al.*, 2011). O fluxo luminoso é facilmente modulado através do computador conectado ao fotobiorreator. A concentração de CO₂ na alimentação gasosa foi ajustada através da medição das vazões volumétricas de ar e CO₂ com rotâmetros (Dwyer, modelos RMA-13-SSV e RMA-11-SSV, respectivamente). No menor nível desta variável (valor codificado de -1,68), fez-se a injeção de apenas ar atmosférico. O nível central para a concentração de NaNO₃ (valor codificado de 0) corresponde à concentração encontrada na formulação original do meio BG-11.

Tabela 3– Valores das variáveis independentes analisadas no planejamento composto central

Variável independente	Nível (valores codificados)			
	-1,68	-1	0	+1
Fluxo luminoso ($\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	-	60	90	120
Concentração de CO ₂ (%)	0	3	7,5	12
Concentração de NaNO ₃ (mg L ⁻¹)	156	700	1500	2300

Devido ao número de experimentos que seriam necessários para um planejamento fatorial completo de três variáveis e cinco níveis, optou-se por utilizar um planejamento composto central de três fatores. Desta forma, existe a possibilidade de se investigar diferentes fatores e suas interações com menos experimentos e, portanto, com um menor custo total de análise.

3.5 Cinética de crescimento

Nos diferentes cultivos, o comportamento da fase exponencial de crescimento foi caracterizado pela reta descrita na Equação 3:

$$\ln C - \ln C_{0i} = \mu_{m\acute{a}x} (t - t_i) \quad (3)$$

onde C é a concentração celular no tempo t , C_{0i} é a concentração celular no instante de início da fase exponencial de crescimento, t é o tempo, t_i é o tempo no instante de início da fase exponencial de crescimento e $\mu_{m\acute{a}x}$ é a velocidade máxima específica de crescimento.

A partir de $\mu_{máx}$, foi possível calcular o tempo de geração (t_g) associado, ou seja, o tempo necessário para duplicação do número de células e, por conseguinte, da biomassa do cultivo. A Equação 4 fornece a expressão para t_g :

$$t_g = \frac{\ln 2}{\mu_{máx}} \quad (4)$$

A produtividade média de biomassa (P), dada em $\text{g L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$, é calculada segundo a Equação 5:

$$P = \frac{C_f - C_i}{t} \quad (5)$$

onde C_f é a concentração final de biomassa no cultivo (g L^{-1}), C_i é a concentração inicial de biomassa no cultivo (g L^{-1}) e t é o tempo total da batelada (dias).

3.6 Pós-processamento

Ao fim de cada cultivo, a biomassa foi recuperada através de centrifugação em centrífuga (Eppendorf, modelo 5810R) a $1843 \times g$ por 15 min a $20 \text{ }^\circ\text{C}$. As amostras foram lavadas com água destilada para retirada dos sais remanescentes do meio de cultivo e se procedeu a nova centrifugação a $1843 \times g$ por 15 min. A biomassa coletada foi congelada com nitrogênio líquido ($-196 \text{ }^\circ\text{C}$) e conservada através de liofilização em um liofilizador (Labconco, modelo FreeZoneTriad) por 40 horas, a uma temperatura de $-50 \text{ }^\circ\text{C}$ e sob vácuo de pelo menos $0,02 \text{ mbar}$ a fim de se evitar alterações na composição e perdas de nutrientes. Posteriormente, as amostras foram armazenadas em dessecador.

3.7 Hidrólise ácida

A ruptura das células anterior à hidrólise foi feita por desintegração mecânica através do uso de pilão e almofariz. Para a obtenção dos carboidratos contidos nas microalgas, optou-se pela hidrólise ácida das células com $\text{H}_2\text{SO}_4 2 \text{ N}$. Para isto, suspensões de 225 mg de biomassa

liofilizada com concentração de 15 g L^{-1} foram tratadas por 30 min em autoclave vertical a uma temperatura de $120 \text{ }^\circ\text{C}$, conforme determinado por Harun e Danquah, 2011.

3.8 Fermentação etanólica

Para a obtenção de biomassa em quantia suficiente para o ensaio fermentativo, o cultivo do planejamento experimental com maior produtividade de carboidratos foi repetido no fotobiorreator descrito na Seção 3.3 e nas condições determinadas na Seção 3.4.

Para o ensaio de fermentação etanólica a partir do hidrolisado de microalgas obtido, foi utilizada a levedura *Dekkerabruxellensis* CCA155 (mantida no Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de São Carlos), reconhecidamente produtora de etanol a partir de hexoses e pentoses (BLOMQVIST *et al.*, 2010; BASSI *et al.*, 2011). Os experimentos foram conduzidos em agitador orbital a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ e agitação de 160 rpm por 120 h, com inóculo na proporção de 10 g de massa úmida por litro de hidrolisado e meio padrão YEPD como controle.

Amostras foram coletadas a cada 24 h para quantificação de açúcares, inibidores e etanol em cromatografia líquida de alta performance (HPLC), conforme Seção 3.9.5, estimativa de concentração celular por absorbância a 600 nm utilizando curva padrão e pH dos meios de cultivo. Estes ensaios foram conduzidos nos laboratórios do CCA da UFSCar, em Araras (SP).

3.9 Métodos analíticos

3.9.1 Concentração de biomassa no cultivo

A visualização do estado do cultivo e a determinação do número de células foram feitas através de contagem em microscópio (Olympus, modelo CX21) com utilização de câmara de Neubauer.

A concentração de biomassa (g L^{-1}) foi medida periodicamente durante a realização do cultivo para acompanhamento da produção de biomassa e obtenção das curvas de crescimento através da determinação da densidade óptica do cultivo com um espectrofotômetro a 682 nm (GBC Scientific Equipment, modelo Cintra 10e). Uma curva de calibração foi determinada a

partir de diferentes padrões com concentrações conhecidas de biomassa seca da microalga (Anexo, Figura 30). Todas as medidas foram feitas em triplicata.

3.9.2 *Quantificação de lipídios*

A quantidade de lipídios contida nas microalgas foi determinada através do método de Bligh e Dyer modificado (BLIGH e DYER, 1959). Foram pesadas 50 mg de amostra, posteriormente maceradas com bastão de vidro em tubo de ensaio. Adicionou-se 1,6 mL de H₂O, 4mL de metanol e 2 mL de clorofórmio e misturou-se em agitador orbital de tubos por 30 min. Adicionou-se 2 mL de clorofórmio e 2 mL de uma solução aquosa de 1,5% de Na₂SO₄ e misturou-se novamente por 2 min. A emulsão foi separada através de centrifugação (Eppendorf, modelo 5810R) a 4500 × g por 10 min, após a qual três fases distintas são observadas: uma fase aquosa, no topo; um disco de proteína, central; e uma fase orgânica, no fundo do tubo, contendo os lipídios. A fase orgânica foi transferida para uma placa de vidro e colocada em uma estufa a 105 °C por 24h para remoção do clorofórmio. A massa da fração lipídica foi determinada por gravimetria em balança analítica após atingir peso constante em dessecador.

3.9.3 *Análise qualitativa de ácidos graxos*

A preparação do óleo de microalgas para determinação dos ácidos graxos foi feita através de derivatização com metanol, segundo Hartmann e Lago, 1973. Os ésteres metílicos dos ácidos graxos foram separados de acordo com o procedimento AOCS Ce 1f-96 (2009), em um cromatógrafo gasoso capilar (Agilent, modelo 6850) equipado com coluna capilar DB-23 Agilent (50% cianopropil – metilpolisiloxano), de 60 m x 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura de filme.

As condições de operação do cromatógrafo foram: fluxo de gás de arraste (He) de 1 mL min⁻¹, velocidade linear de 24 cm s⁻¹, temperatura do detector de 280°C, temperatura do injetor de 250°C, temperatura do forno de 110 – 215 °C (aquecimento de 5°C min⁻¹), 215°C por 24 min, volume de injeção de 1 µL e razão de *split* de 1:50.

3.9.4 Quantificação de proteínas

A determinação do teor de proteínas na biomassa microalgal foi estimada pelo teor de nitrogênio total através do método de digestão com persulfato de potássio e hidróxido de sódio. Após digestão em reator Hach DRB200 durante 30 min, realizou-se a leitura a 410 nm em espectrofotômetro Hach DR5000, descontando-se o valor de nitrato determinado por reagente NITRAVER 5 (Hach). A concentração de proteínas foi então estimada pelo teor de nitrogênio total multiplicado pelo fator de conversão de 6,25 (VOLTOLINA *et al.*, 1999).

3.9.5 Quantificação de açúcares fermentescíveis, inibidores de fermentação e etanol

Utilizou-se HPLC para determinação das concentrações dos diferentes compostos provenientes das etapas de hidrólise da biomassa de microalgas e de fermentação etanólica.

As concentrações de açúcares (glicose, xilose, arabinose e celobiose), ácido acético, ácido levulínico e etanol foram determinadas em um equipamento (Agilent, modelo 1260 Infinity) com detector de índice de refração modelo G1362A a 35 °C, utilizando-se uma coluna Aminex HPX-87H de 300 mm x 7,8 mm a 30 °C, fase móvel de H₂SO₄ 0,01 N e fluxo de eluente de 0,6 mL min⁻¹. O volume de amostra injetado foi de 15 µL e o tempo total de análise foi fixado em 30 min. Os tempos médios de retenção de cada composto foram: celobiose (7,3 min), glicose (8,9 min), xilose (9,6 min), arabinose (10,6 min), ácido acético (15,6 min), ácido levulínico (17,7 min) e etanol (21,1 min).

As concentrações de inibidores de fermentação etanólica, furfural e HMF, foram determinadas em um equipamento (Agilent, modelo 1260 Infinity) com detector de arranjo de diodos modelo G4212B em um comprimento de onda de 280 nm, utilizando-se uma coluna WatersNova-Pak C-18 de 150 mm x 4,6 mm a 30 °C, fase móvel de acetonitrila em água 1:8 e 1% de ácido acético (v/v) e fluxo de eluente de 0,8 mL min⁻¹. O volume de amostra injetado foi de 15 µL e o tempo total de análise foi fixado em 20 min. Os tempos médios de retenção de cada composto foram: HMF (2,7 min) e furfural (4,2 min).

CAPÍTULO 4
RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Cultivo de microalgas

4.1.1 Propagação do inóculo

A Figura 6 mostra o perfil de concentração celular de *Chlorella vulgaris* usada nos experimentos, determinado através de contagem em câmara de Neubauer.

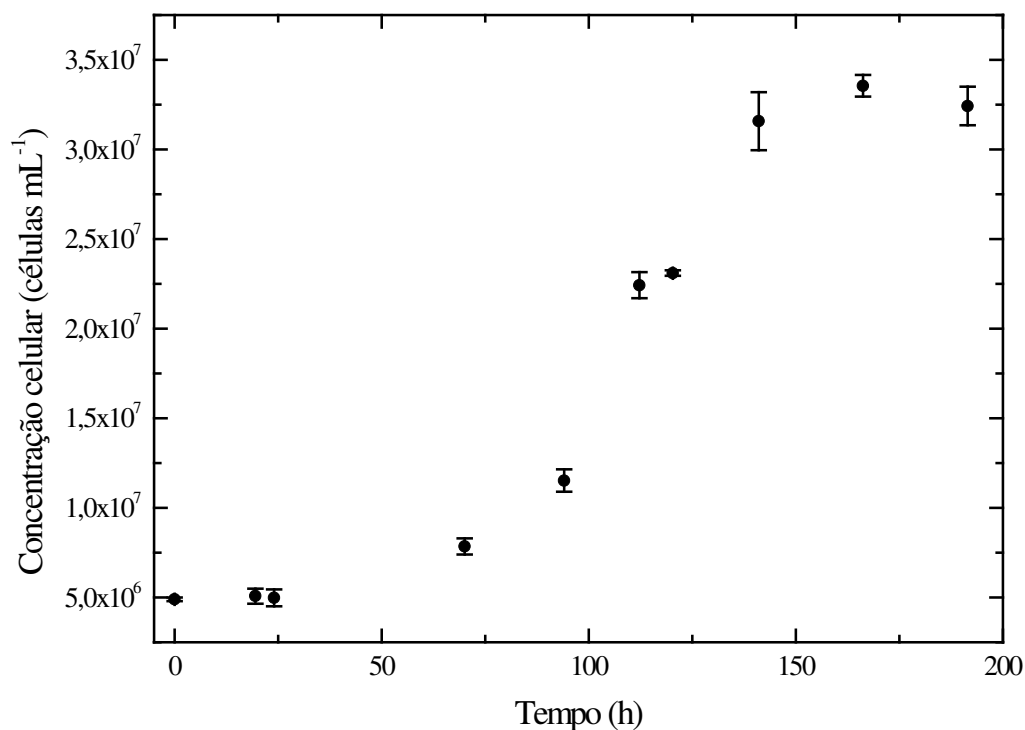


Figura 6 – Perfil de crescimento de um inóculo usado no planejamento experimental

Através da Figura 6, pode-se constatar a ocorrência de uma fase *lag* de aproximadamente 72 h de duração. A partir do fim desta, inicia-se uma fase de crescimento exponencial até cerca de 140 h de cultivo. Nos dias finais dos cultivos, percebe-se uma desaceleração no aumento da concentração celular, à qual se segue uma fase estacionária de crescimento. Para garantir que o inóculo estivesse na fase exponencial de crescimento e com alta concentração celular, a recuperação da biomassa foi feita com 120 h de tempo total de cultivo.

Para este perfil de crescimento, foi calculada uma $\mu_{m\acute{a}x}$ de $0,497 \pm 0,113 \text{ dia}^{-1}$ e emat_g de $1,44 \pm 0,28 \text{ dia}$.

4.1.2 Delineamento do planejamento experimental

A Tabela 4 traz os valores empregados em cada uma das bateladas do planejamento experimental. Ao todo, foram realizados 13 cultivos, sendo 11 referentes ao planejamento fatorial completo e dois correspondentes aos pontos axiais de concentrações de CO₂ na alimentação gasosa e de NaNO₃ no cultivo mínimas.

Tabela 4– Valores codificados e reais das variáveis nos cultivos do planejamento experimental

Cultivo	Valores codificados			Valores reais		
	Fluxo luminoso	Concentração de CO ₂	Concentração de NaNO ₃	Fluxo luminoso (μE m ⁻² s ⁻¹)	Concentração de CO ₂ (%)	Concentração de NaNO ₃ (mg L ⁻¹)
1	-1	-1	-1	60	3	700
2	-1	-1	1	60	3	2300
3	-1	1	-1	60	12	700
4	-1	1	1	60	12	2300
5	1	-1	-1	120	3	700
6	1	-1	1	120	3	2300
7	1	1	-1	120	12	700
8	1	1	1	120	12	2300
9	0	0	0	90	7,5	1500
10	0	0	0	90	7,5	1500
11	0	0	0	90	7,5	1500
12	0	-1,68	0	90	0	1500
13	0	0	-1,68	90	7,5	156

4.1.3 Produtividade média de biomassa

A Tabela 5 resume as concentrações iniciais e finais, bem como as produtividades médias de biomassa de cada um dos 13 cultivos realizados no fotobiorreator de placa plana. Para cálculo de P , conforme a Equação 5, foi utilizado um tempo total de cultivo igual a sete dias. Os níveis das variáveis estudadas também são mostrados.

Em uma avaliação preliminar, observa-se que os cultivos 5 a 8 – aqueles com nível superior de fluxo luminoso – apresentam concentrações finais de biomassa mais altas que as demais (em torno de 2 g L^{-1}) e, conseqüentemente, maiores valores de produtividade média de biomassa (acima de $0,22 \text{ g L}^{-1}$). Bholael *et al.*, 2011, ao analisarem o cultivo autotrófico de *Chlorella vulgaris*, mostraram que fluxos luminosos de até cerca de $200 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ limitam a realização da fotossíntese pela microalga. Portanto, na faixa estudada, os cultivos do planejamento experimental são limitados pela quantidade de luz fornecida, o que explica a obtenção de maiores produtividades de biomassa com maiores fluxos luminosos. Os pontos centrais do planejamento experimental (com todas as variáveis codificadas no nível 0) apresentaram boa reprodutibilidade, com produtividades médias de biomassa de $0,193$, $0,198$ e $0,206 \text{ g L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$.

Empregando-se o *software* estatístico STATISTICA 7.0, pôde-se fazer uma análise mais detalhada da resposta da produtividade média de biomassa em função das variáveis estudadas. Trabalhou-se com um intervalo de confiança de 95%, com erro puro, visto que há três repetições no ponto central, e com efeitos lineares, quadráticos e interações de até dois efeitos. A Tabela 6 indica os coeficientes de regressão para cada um dos efeitos, bem como os erros padrões e outros dados estatísticos das variáveis codificadas. Através do p-valor, pode-se constatar que os efeitos significativos para explicar a variação da produtividade de biomassa são o fluxo luminoso (linear e quadrático) e a concentração de CO_2 na alimentação gasosa (quadrático). Ao se ignorar os outros seis efeitos não significativos, gerou-se a Tabela 7, que conta com os coeficientes de regressão para estabelecimento de um modelo descritivo simplificado.

Tabela 5– Concentrações iniciais e finais de biomassa e produtividades médias de biomassa dos cultivos do planejamento experimental

Cultivo	Fluxo luminoso	Concentração de CO ₂	Concentração de NaNO ₃	Concentração inicial de biomassa (g L ⁻¹)	Concentração final de biomassa (g L ⁻¹)	Produtividade média de biomassa (g L ⁻¹ dia ⁻¹)
1	-1	-1	-1	0,247 ± 0,003	1,350 ± 0,015	0,158 ± 0,002
2	-1	-1	1	0,293 ± 0,004	1,566 ± 0,005	0,182 ± 0,001
3	-1	1	-1	0,293 ± 0,001	1,290 ± 0,033	0,140 ± 0,003
4	-1	1	1	0,306 ± 0,001	1,317 ± 0,009	0,144 ± 0,001
5	1	-1	-1	0,242 ± 0,001	2,046 ± 0,062	0,262 ± 0,006
6	1	-1	1	0,316 ± 0,002	2,092 ± 0,011	0,254 ± 0,001
7	1	1	-1	0,304 ± 0,001	1,902 ± 0,019	0,227 ± 0,002
8	1	1	1	0,326 ± 0,005	2,062 ± 0,011	0,248 ± 0,002
9	0	0	0	0,316 ± 0,009	1,699 ± 0,061	0,193 ± 0,006
10	0	0	0	0,302 ± 0,001	1,739 ± 0,015	0,206 ± 0,001
11	0	0	0	0,344 ± 0,003	1,752 ± 0,057	0,198 ± 0,007
12	0	-1,68	0	0,318 ± 0,001	1,224 ± 0,016	0,130 ± 0,002
13	0	0	-1,68	0,326 ± 0,004	1,710 ± 0,009	0,198 ± 0,001

Tabela 6– Análise de significância para *P* com todas as variáveis

Fator	Coeficiente de regressão	Erro padrão	t(2)	p-valor	Estimativas por intervalo	
					-95%	+95%
Média	0,198161	0,003618	54,7751	0,000333	0,182595	0,213727
L (L)	0,045875	0,002572	17,8329	0,003130	0,034806	0,056944
L (Q)	0,031843	0,004604	6,9164	0,020271	0,012034	0,051653
C (L)	0,012093	0,003242	3,7299	0,064954	-0,001857	0,026042
C (Q)	-0,056857	0,005417	-10,4957	0,008956	-0,080165	-0,033549
N (L)	0,003898	0,003242	1,2023	0,352269	-0,010051	0,017848
N (Q)	0,004841	0,005417	0,8937	0,465777	-0,018467	0,028150
L x C	0,002513	0,003107	0,8087	0,503572	-0,010854	0,015879
L X N	-0,002512	0,003107	-0,8087	0,503572	-0,015879	0,010854
C x N	0,002020	0,004163	0,4852	0,675452	-0,015892	0,019932

L: nível de fluxo luminoso; C: nível de CO₂ na alimentação gasosa; N: nível de NaNO₃ no meio de cultivo; (L): efeito linear; (Q): efeito quadrático

Tabela 7– Análise de significância para *P* com as variáveis significativas (modelo simplificado)

Fator	Coeficiente de regressão	Erro padrão	t(2)	p-valor	Estimativas por intervalo	
					-95%	+95%
Média	0,197005	0,003174	62,07505	0,000259	0,183350	0,210660
L (L)	0,045875	0,002318	19,78731	0,002544	0,035900	0,055850
L (Q)	0,034526	0,004142	8,33534	0,014090	0,016704	0,052349
C (Q)	-0,047733	0,004824	-9,89448	0,010061	-0,068490	-0,026976

L: nível de fluxo luminoso; C: nível de CO₂ na alimentação gasosa; (L): efeito linear; (Q): efeito quadrático

A partir dos coeficientes de regressão da Tabela 7, é possível estabelecer um modelo simplificado em variáveis codificadas para a produtividade média de biomassa no fotobiorreator de placa plana, como mostrado na Equação 6:

$$P = 0,197 + 0,046L + 0,034L^2 - 0,048C^2 \quad (6)$$

onde L é o fluxo luminoso e C é a concentração de CO_2 na alimentação gasosa, em valores codificados.

O modelo gerado foi validado através de uma análise de variância (ANOVA), mostrada na Tabela 8. A percentagem de variação explicada pelo modelo é de 93,95%, um valor satisfatório. Através de testes com a distribuição de Fisher (teste F), valida-se a descrição dos dados experimentais pelo modelo simplificado. No primeiro teste F, compara-se a razão entre as médias quadráticas da regressão e dos resíduos com o valor tabelado da distribuição de Fisher para os graus de liberdade das duas fontes de variação. O modelo passa no primeiro teste se a razão calculada for maior que o valor tabelado. Já no segundo teste F, a razão entre as médias quadráticas da falta de ajuste e do erro puro é comparada com o valor tabelado da distribuição de Fisher para os graus de liberdade das duas fontes de variação. O modelo matemático passa no teste se a razão calculada for menor que o valor tabelado, sendo assim considerado válido. No caso da produtividade média de biomassa, o modelo matemático passa no primeiro teste F ($F_{\text{calculado}} = 46,6 \gg F_{3,9} = 3,86$) e no segundo ($F_{\text{calculado}} = 4,40 \ll F_{7,2} = 19,4$), sendo útil para descrição dos dados experimentais.

Tabela 8– ANOVA para P (modelo simplificado)

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática
<i>Regressão</i>	0,021922	3	0,007307
<i>Resíduos</i>	0,001411	9	0,000157
<i>Falta de ajuste</i>	0,001325	7	0,000189
<i>Erro puro</i>	0,000086	2	4,3E-05
<i>Total</i>	0,023333	12	
% de variação explicada		93,95%	
% máxima de variação explicável		99,63%	

A partir do modelo simplificado, pode-se traçar a superfícies de resposta e a curva de nível associadas, como mostrado nas Figuras 7 e 8, respectivamente.

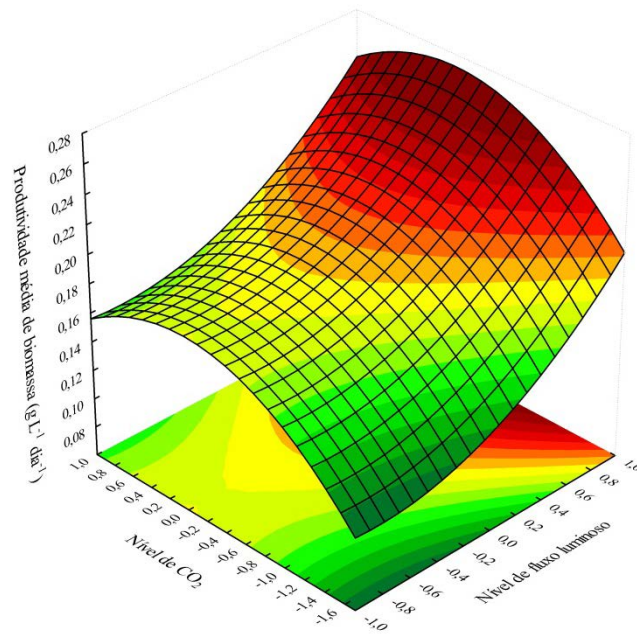


Figura 7—Superfície de resposta para a produtividade média de biomassa em função dos níveis de fluxo luminoso e de CO₂ na alimentação gasosa

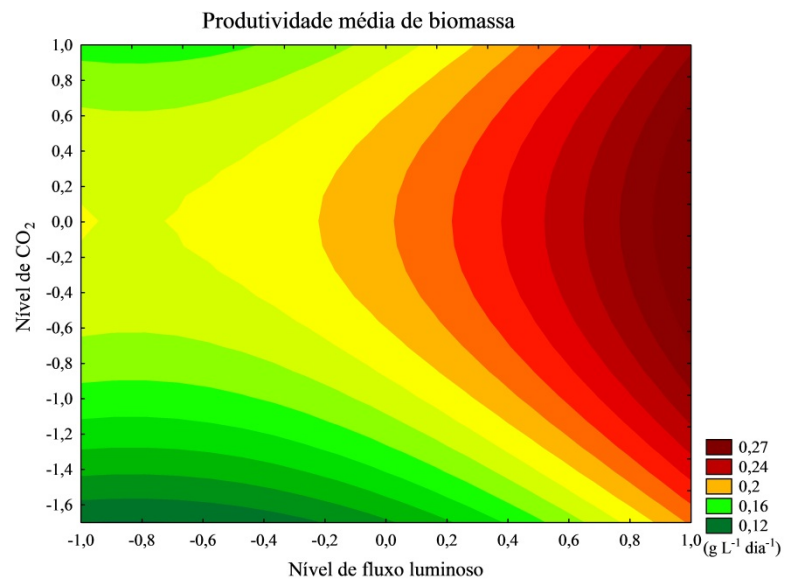


Figura 8 – Curva de nível para a produtividade média de biomassa em função dos níveis de fluxo luminoso e de CO₂ na alimentação gasosa

Através da superfície de resposta e da curva de nível, percebe-se nitidamente um aumento na produtividade média de biomassa com um aumento no fluxo luminoso fornecido ao cultivo. Já a adição de CO₂ na alimentação gasosa tem efeitos similares nos seus extremos: em cultivos aerados sem suplementação de CO₂, a produtividade de biomassa é baixa, o que indica que as microalgas têm capacidade para absorver mais CO₂ que o fornecido pelo ar atmosférico. Entretanto, em cultivos com alta concentração de CO₂ na alimentação gasosa (em torno de 12%), a produtividade de biomassa é tão baixa quanto em cultivos aerados apenas com ar atmosférico. Isto se deve, muito provavelmente, ao baixo pH inicial (em torno de 4) do meio de cultivo proporcionado pelo borbulhamento de CO₂. Bholat *et al.*, 2011, obtiveram resultados similares: em concentrações intermediárias de CO₂ (cerca de 4%), a produtividade de biomassa de *Chlorella vulgaris* foi significativamente maior que em cultivos aerados com ar atmosférico ou com altas concentrações de CO₂ (de até 15%).

A quantidade inicial de NaNO₃ no meio de cultivo não foi significativa para explicar a produtividade de biomassa de *Chlorella vulgaris*. Em comparação com outros meios de cultivo de microalgas, como o meio Bristol, por exemplo, o meio de cultivo BG-11 apresenta quantidades de nitrogênio relativamente altas (250 e 1500 mg L⁻¹, respectivamente). Os menores níveis de nitrogênio empregados no planejamento experimental (-1 e -1,68, correspondentes a 700 e 156 mg L⁻¹ de NaNO₃, respectivamente) não afetaram a produtividade de biomassa significativamente.

4.1.4 Cinéticas de crescimento dos cultivos do planejamento experimental

Através do monitoramento periódico da concentração de biomassa nos cultivos, foram traçadas as curvas de crescimento correspondentes às diferentes condições dos experimentos. Os perfis de concentração de biomassa referentes às 13 bateladas definidas no planejamento experimental estão agrupados em três figuras distintas: cultivos com nível de NaNO₃ igual a -1 (Figura 9), cultivos com nível de NaNO₃ igual a +1 (Figura 10) e cultivos com fluxo luminoso no nível intermediário, igual a 0 em variáveis codificadas (Figura 11).

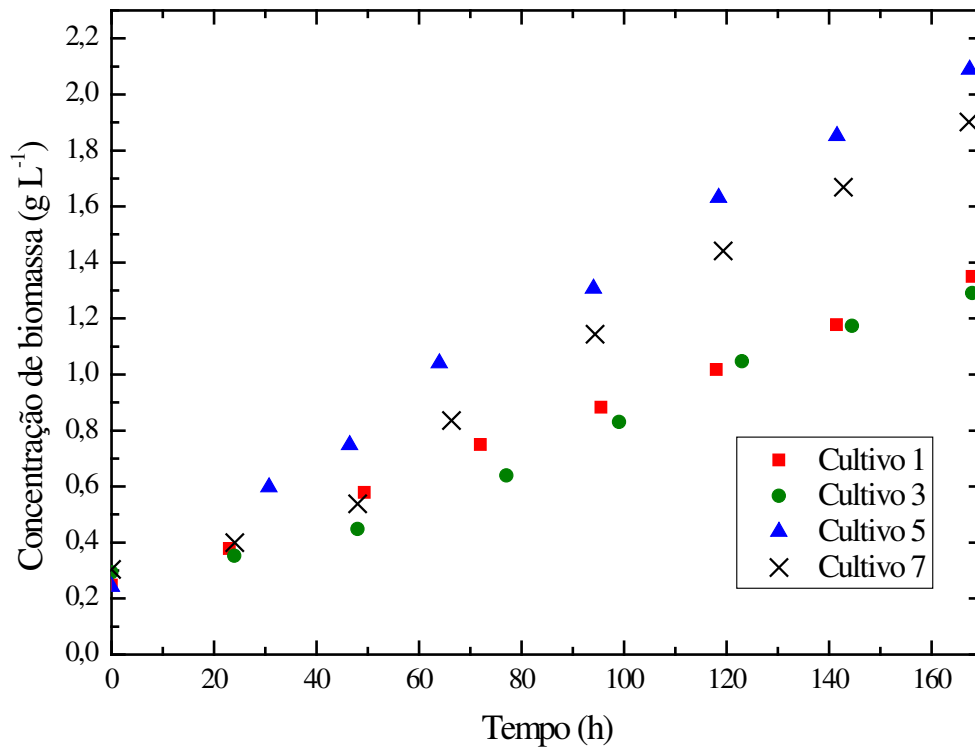


Figura 9 – Curvas de crescimento para os cultivos com nível de NaNO₃ igual a -1. Demais condições: cultivo 1 (L-1, C-1); cultivo 3 (L-1, C+1); cultivo 5 (L+1, C-1); cultivo 7 (L+1, C+1)

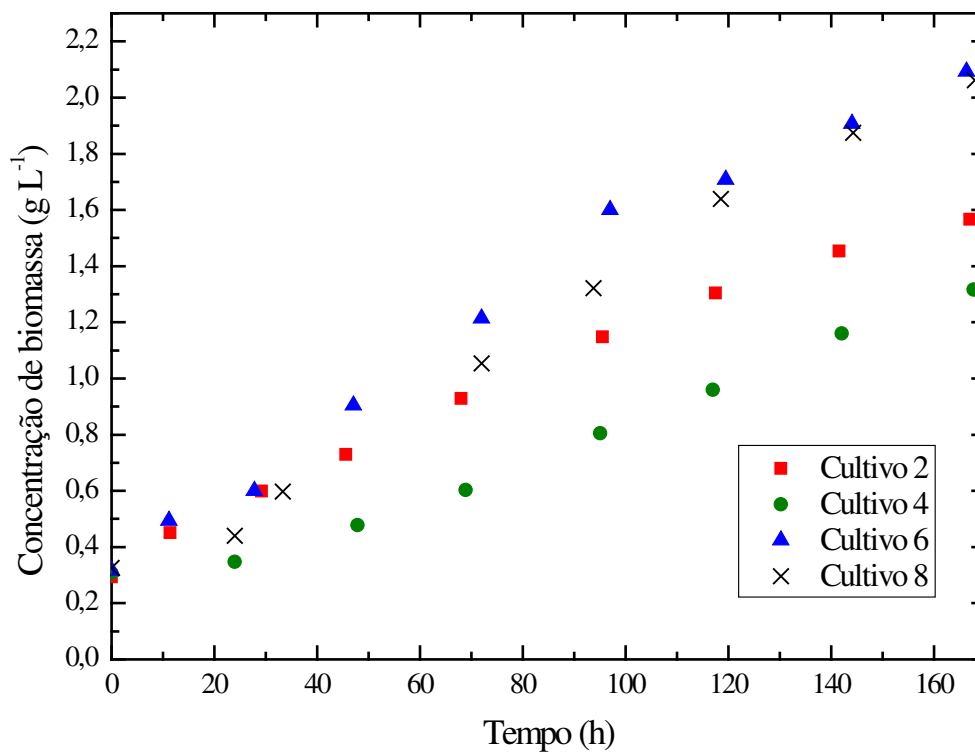


Figura 10 – Curvas de crescimento para os cultivos com nível de NaNO₃ igual a +1. Demais condições: cultivo 2 (L-1, C-1); cultivo 4 (L-1, C+1); cultivo 6 (L+1, C-1); cultivo 8 (L+1, C+1)

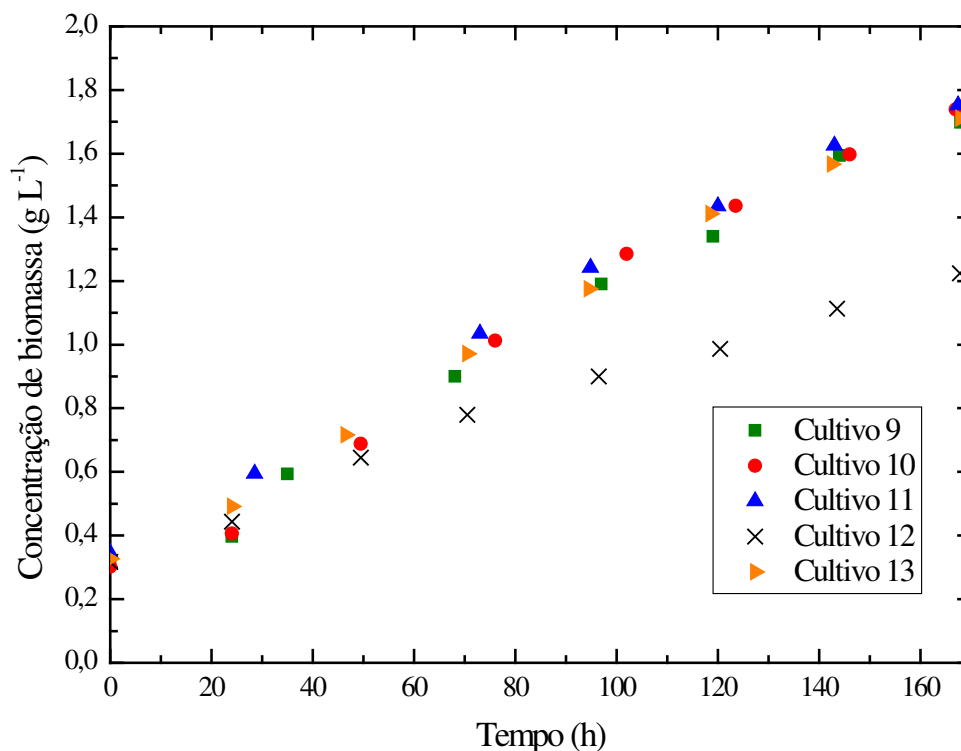


Figura 11 – Curvas de crescimento para os cultivos com nível de fluxo luminoso igual a 0. Demais condições: cultivos 9, 10 e 11 (L0, C0); cultivo 12 (C-1,68, N0); cultivo 13 (C0, N-1,68)

Através da análise das curvas, percebe-se a inexistência da fase de *lag* no crescimento da biomassa, fato que se deve à inoculação de microalgas na fase exponencial tardia de crescimento. Constata-se, no entanto, a presença de fases exponenciais de crescimento bastante longas, com cerca de quatro a cinco dias de duração.

Nas Figuras 9 e 10, há uma nítida diferença entre as curvas de crescimento dos cultivos expostos a um maior fluxo luminoso (cultivos 5 e 7 em relação aos cultivos 1 e 3 e cultivos 6 e 8 em relação aos cultivos 2 e 4, respectivamente). Na Figura 11, as cinéticas de crescimento dos três pontos centrais do planejamento experimental (cultivos 9, 10 e 11) se confundem com a curva representativa do cultivo 13, com nível de NaNO_3 igual a -1,68. Isto demonstra que concentrações de NaNO_3 acima de 156 mg L^{-1} no meio de cultivo não influenciam o desenvolvimento dos cultivos. Já o cultivo 12, aerado apenas com ar atmosférico, apresentou cinética de crescimento distinta dos demais cultivos da Figura 11, com menor concentração final de biomassa. Portanto, a suplementação de quantidades intermediárias de CO_2 em cultivos de *Chlorella vulgaris* foi benéfica ao crescimento das microalgas, fato corroborado

pelo modelo matemático que descreve a produtividade de biomassa no planejamento experimental (Equação 6).

A partir da análise das cinéticas de crescimento, $\mu_{m\acute{a}x}$ e t_g foram calculados para cada um dos 13 cultivos, conforme as Equações 3 e 4. Os resultados são mostrados na Tabela 9 e os desvios obtidos são referentes às regressões lineares para determinação de $\mu_{m\acute{a}x}$. O maior valor de $\mu_{m\acute{a}x}$, de $0,517 \pm 0,059 \text{ dia}^{-1}$, foi encontrado para o cultivo 5, que também apresentou a maior produtividade média de biomassa. Uma análise dos dados, contudo, mostrou que não houve diferença estatística significativa entre os valores de $\mu_{m\acute{a}x}$ em função das variáveis do planejamento experimental e sua distribuição não pôde se explicada por um modelo matemático satisfatório.

Tabela 9– Velocidades específicas máximas de crescimento e tempos de geração para os cultivos do planejamento experimental

Cultivo	Fluxo luminoso	Concentração de CO ₂	Concentração de NaNO ₃	$\mu_{m\acute{a}x}$ (dia ⁻¹)	t_g (dia)
1	-1	-1	-1	$0,372 \pm 0,026$	$1,87 \pm 0,11$
2	-1	-1	1	$0,383 \pm 0,057$	$1,84 \pm 0,23$
3	-1	1	-1	$0,256 \pm 0,013$	$2,71 \pm 0,11$
4	-1	1	1	$0,253 \pm 0,017$	$2,75 \pm 0,16$
5	1	-1	-1	$0,517 \pm 0,059$	$1,35 \pm 0,13$
6	1	-1	1	$0,430 \pm 0,049$	$1,63 \pm 0,15$
7	1	1	-1	$0,350 \pm 0,025$	$1,99 \pm 0,12$
8	1	1	1	$0,398 \pm 0,036$	$1,75 \pm 0,13$
9	0	0	0	$0,342 \pm 0,036$	$2,04 \pm 0,18$
10	0	0	0	$0,393 \pm 0,025$	$1,77 \pm 0,09$
11	0	0	0	$0,322 \pm 0,032$	$2,17 \pm 0,18$
12	0	-1,68	0	$0,310 \pm 0,019$	$2,24 \pm 0,11$
13	0	0	-1,68	$0,374 \pm 0,018$	$1,85 \pm 0,07$

4.1.5 Efeito nos parâmetros auxiliares

O borbulhamento de uma corrente gasosa rica em CO_2 altera certas propriedades do meio de cultivo, como pH e concentrações de O_2 e CO_2 dissolvidos, afetando o crescimento das microalgas e a concentração de reagentes em solução.

Tomando-se como base o valor de $1,49 \text{ g L}^{-1}$ para a solubilidade de CO_2 em água a 1 atm e 27°C , determinado pela lei de Henry, foram calculadas as concentrações de CO_2 dissolvido em cada um dos experimentos. A Figura 12 mostra os perfis de CO_2 dissolvido de três cultivos com diferentes concentrações de CO_2 na alimentação gasosa: cultivo 1 (3%), cultivo 3 (12%) e cultivo 10, um dos pontos centrais do planejamento experimental (7,5%).

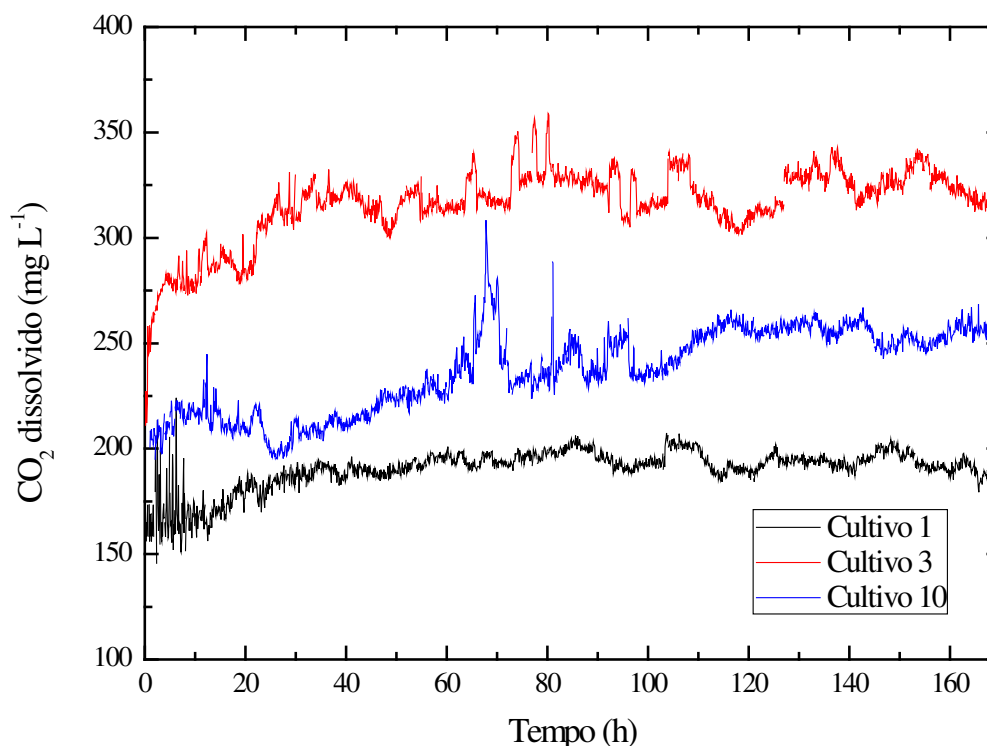


Figura 12 – Concentração de CO_2 dissolvido nos cultivos 1, 3 e 10

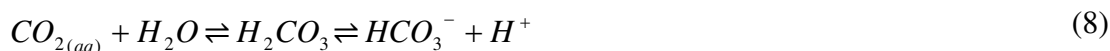
Nota-se que os níveis de CO_2 dissolvido apresentaram pouca variação ao longo dos experimentos, com um leve aumento após os dois dias iniciais de cultivo. Para cada concentração de CO_2 na injeção gasosa, um nível distinto de CO_2 dissolvido pode ser observado no meio. Uma alimentação com 3% de CO_2 gerou uma concentração de cerca de 200 mg L^{-1} de CO_2 dissolvido,

enquanto alimentações gasosas de 7,5% e 12% geraram níveis de CO₂ dissolvido em torno de 250 e 325 mg L⁻¹, respectivamente. Já o cultivo 12, aerado apenas com ar atmosférico, apresentou níveis de CO₂ dissolvido entre 0,5 e 1,0 mg L⁻¹, dada a baixa concentração de CO₂ na alimentação gasosa (cerca de 392 ppm, segundo NOAA, 2012).

A injeção de CO₂ no cultivo também acarreta uma diminuição no pH, como visto na Figura 13. No equilíbrio de carbonatos, há quatro espécies principais: CO₂ dissolvido (CO_{2(aq)}), ácido carbônico (H₂CO₃) e os íons bicarbonato (HCO₃⁻) e carbonato (CO₂³⁻). Inicialmente, ocorre a dissolução do CO₂ contido na fase gasosa, conforme a Equação 7.



Parte do CO₂ em solução aquosa se combina com a água para formação do ácido fraco H₂CO₃, que se dissocia em HCO₃⁻ e em um hídrion (H⁺), segundo a Equação 8.



O íon HCO₃⁻ se dissocia, ainda, em um íon CO₂³⁻ e um hídrion, conforme a Equação 9.



Por se tratar de um equilíbrio químico, as espécies envolvidas se interconvertem umas nas outras devido a perturbações no sistema. Dependendo do pH do meio, ocorre a predominância de determinada espécie química: em soluções aquosas com pH abaixo de 6,3, a espécie majoritária é o CO_{2(aq)}; com pH acima de 10,3, predominam íons CO₂³⁻; em soluções com pH intermediário (entre 7 e 10), a espécie predominante é o íon HCO₃⁻ (GLIME, 2007).

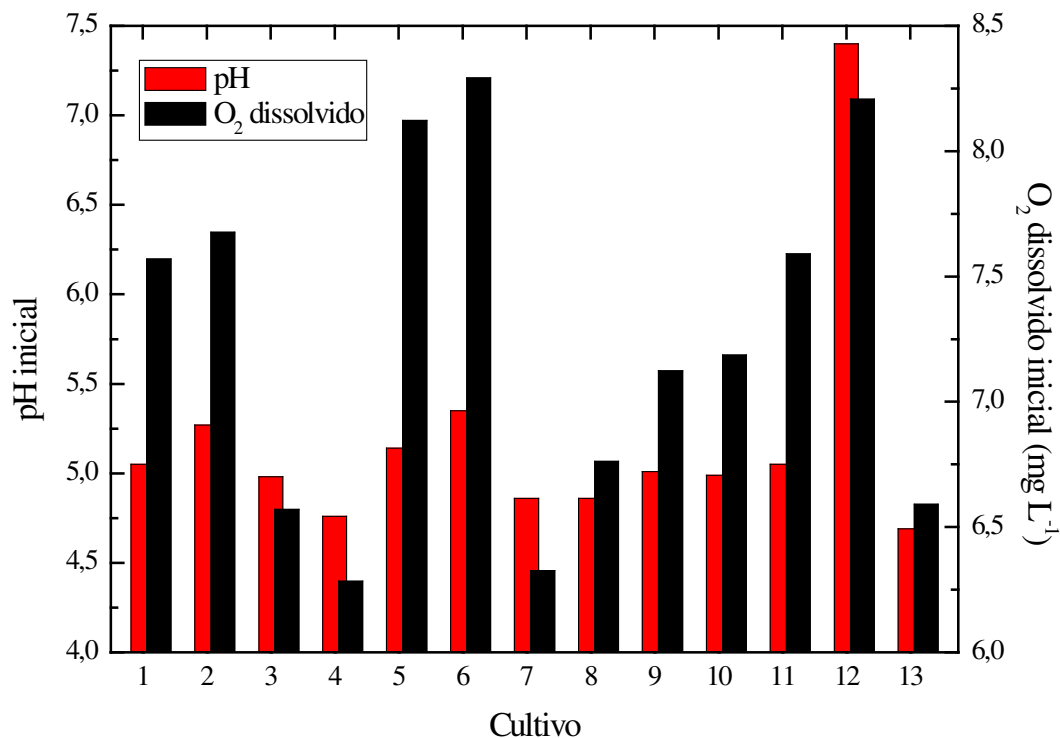


Figura 13 – Concentrações de O₂ dissolvido e pH iniciais dos cultivos do planejamento experimental

Em todos os cultivos realizados com suplementação de CO₂, o pH inicial foi consideravelmente menor que o pH do meio antes da autoclavagem, de cerca de 7,5. Em cultivos borbulhados com 3% de CO₂, o pH obtido foi em torno de 5,2, enquanto injeção de maiores quantidades de CO₂ alteraram o pH mais fortemente (pH em torno de 4,8 em cultivos borbulhados com 12% de CO₂ e pH em torno de 5 nos pontos centrais do planejamento experimental). O pH menos afetado pela alimentação gasosa foi o do cultivo 12, que permaneceu próximo ao valor original de 7,5 devido ao borbulhamento de ar com baixa concentração de CO₂.

A concentração de O₂ dissolvido seguiu a mesma tendência do pH: quanto maior a injeção de CO₂, menor foi o nível de O₂ no meio de cultivo. Utilizando-se o valor de 8,42 mg L⁻¹ para a solubilidade de O₂ em água a 1 atm e 27 °C (DORAN, 1995), calculou-se as concentrações iniciais de O₂ dissolvido nos cultivos do planejamento experimental, mostradas na Figura 13. Para injeções contendo 3%, 7,5% e 12% de CO₂, foram encontradas concentrações de O₂ dissolvido de cerca de 8,0mg L⁻¹, 7,3 mg L⁻¹ e 6,5 mg L⁻¹, respectivamente.

4.1.6 Avaliação da biomassa

Análises microscópicas foram feitas periodicamente para avaliação das culturas de microalgas. As duas imagens justapostas na Figura 14 mostram a variação no número de células entre o início e o fim do cultivo 8. Em ambas as imagens, constata-se a presença de microalgas de uma espécie diversa da *Chlorella vulgaris*, provavelmente do gênero *Desmodesmus* (apontadas por setas). Esta contaminação é comum e já estava presente no inóculo inicial de *Chlorella vulgaris* adquirido, o que caracteriza o cultivo como sendo multiespecífico. No entanto, ao longo dos cultivos iniciados no planejamento experimental, percebe-se que a quantidade de microalgas contaminantes permanece relativamente constante, enquanto que a microalga desejada se desenvolve no meio de cultivo. Medidas do diâmetro das células de *Chlorella vulgaris* foram realizadas para o cultivo 8, a fim de se avaliar a possível influência de altas concentrações de CO₂ (12%) no desenvolvimento da microalga. O diâmetro inicial médio das células foi de $4,05 \pm 0,37 \mu\text{m}$ e, o final, de $4,36 \pm 0,59 \mu\text{m}$, não sendo influenciado pela concentração de CO₂ na alimentação gasosa. Wong *et al.*, 2000, indicam que o diâmetro médio de células de *Chlorella vulgaris* é de cerca de $4,50 \mu\text{m}$.

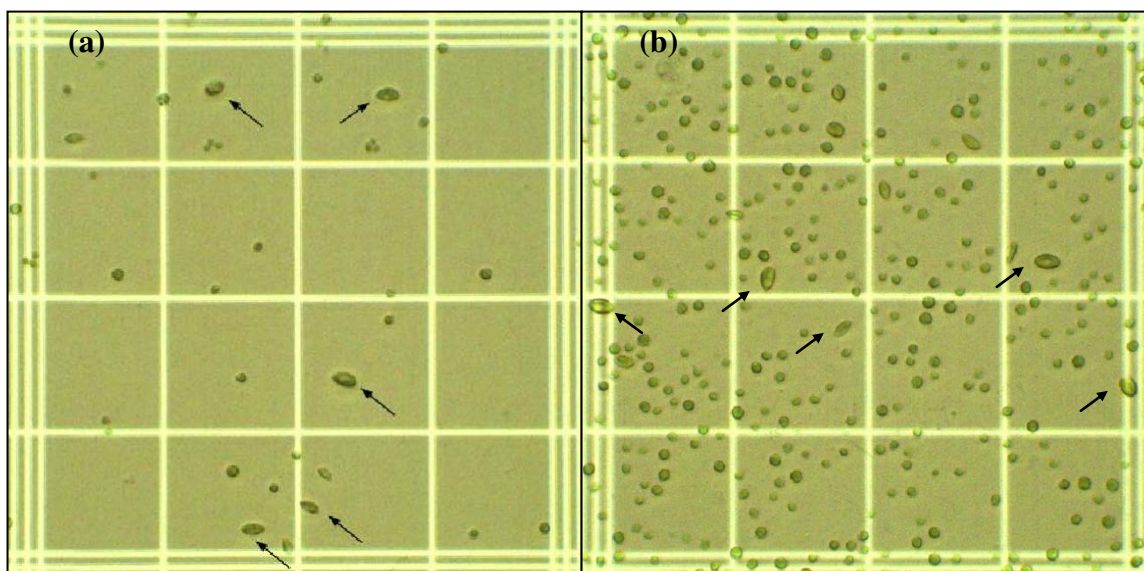


Figura 14 – Imagens de microscópio da cultura de microalgas no (a) início e (b) fim do cultivo 8 (ampliação de 40x)

4.1.6.1 Carboidratos

A percentagem de carboidratos contida nas microalgas foi avaliada após a hidrólise ácida para liberação de açúcares. As Figuras 15a e 15b apresentam duas micrografias do hidrolisado após tratamento com H_2SO_4 e temperatura de $120\text{ }^\circ\text{C}$, com ampliações de 40x e 100x, respectivamente. Através delas, constata-se a existência de células rompidas, com o seu conteúdo interno disperso na suspensão e células aparentemente intactas. Sendo assim, a presença de células de *Chlorella vulgaris* não afetadas pela hidrólise ácida é um indicativo de que a quebra das paredes celulares e liberação de açúcares não foi completa. Pode-se creditar tal fato a uma maceração ineficiente da biomassa de microalgas liofilizada.

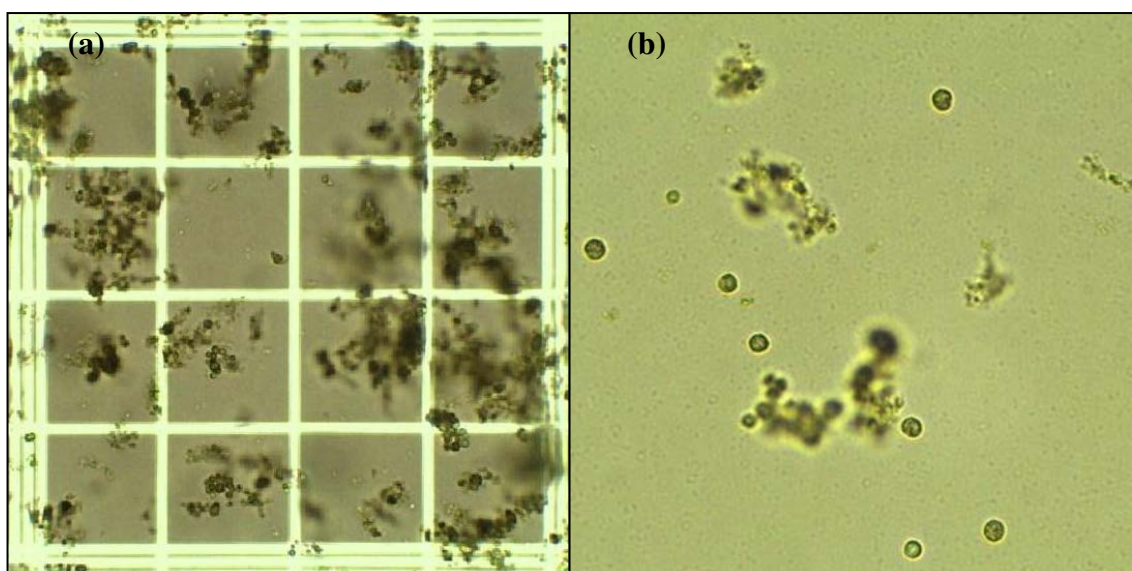


Figura 15 – Imagens de microscópio da suspensão de microalgas hidrolisada. Ampliações de (a) 40x e (b) 100x

A Tabela 10 mostra as concentrações de açúcares fermentescíveis obtidas para a biomassa de microalgas produzida em cada cultivo do planejamento experimental. Não foram detectados os açúcares celobiose e arabinose, mas nota-se a grande quantidade de xilose presente em todos os cultivos, resultado da quebra da parede celular das microalgas. A glicose aparece em menor quantidade, produto da quebra do polissacarídeo amido. Quantidades maiores de ambos os açúcares poderiam ter sido obtidas com uma hidrólise ácida mais eficiente ou outro método de pré-tratamento, como hidrólise enzimática, por exemplo. A Tabela 10 também apresenta a fração

total de carboidratos nas microalgas, calculada através da razão entre a soma das concentrações de glicose e xilose e a concentração inicial de microalgas na hidrólise (em torno de 15 g L^{-1}). Pelo mesmo raciocínio, uma hidrólise mais eficiente poderia ter mostrado o real conteúdo de carboidratos nas células de *Chlorella vulgaris*. Phukanet *et al.*, 2011, indicam concentrações de carboidratos em *Chlorella vulgaris* em torno de 9,5%, embora Dragoneet *et al.*, 2011, reportem valores de até 37% e Ho *et al.*, 2012, informem conteúdos de carboidratos entre 12 e 18% em cultivos de *Chlorella vulgaris* sem limitação de nitrogênio.

Nota-se um aumento sensível na concentração de glicose obtida após hidrólise da biomassa oriunda do cultivo 13 do planejamento experimental (realizado com nível de NaNO_3 igual a -1,68). Este resultado é devido à limitação de nitrogênio disponível para crescimento no meio de cultivo, o que leva as microalgas a aumentarem a produção de carboidratos em detrimento de proteínas, como apontado por Behrenset *et al.*, 1989, e Dragoneet *et al.*, 2011.

Tabela 10– Concentrações de açúcares fermentescíveis obtidos após hidrólise e fração de carboidratos na composição de *Chlorella vulgaris*

Cultivo	Açúcares fermentescíveis		Fração de carboidratos (%)
	Glicose (g L^{-1})	Xilose (g L^{-1})	
1	0,31	0,86	7,79
2	0,30	0,82	7,49
3	0,38	0,93	8,73
4	0,27	0,75	6,86
5	0,41	0,98	9,20
6	0,31	0,88	7,92
7	0,38	1,05	9,47
8	0,28	0,87	7,69
9	0,32	0,95	8,44
10	0,32	0,92	8,29
11	0,34	0,87	8,06
12	0,35	0,86	8,07
13	1,80	0,23	13,54

Miranda *et al.*, 2012, indicam que concentrações maiores de microalgas na etapa de hidrólise levariam a concentrações mais altas de açúcares fermentescíveis no hidrolisado, embora a eficiência de extração de glicose seja menor devido à alta viscosidade no hidrolisado, que leva a uma maior retenção de açúcares na biomassa residual.

Uma das consequências da hidrólise ácida de biomassa com altas temperaturas é a formação de determinadas espécies químicas a partir da degradação de açúcares e outros compostos orgânicos. Neste sentido, a Tabela 11 mostra as concentrações no hidrolisado de ácido levulínico e dos inibidores de fermentação etanólica furfural e HMF.

Tabela 11– Concentrações de produtos de degradação e inibidores de fermentação obtidos após hidrólise

Cultivo	Ácido levulínico (ppm)	Furfural (ppm)	HMF (ppm)
1	63,9	37,6	2,88
2	85,0	34,7	2,72
3	69,3	30,5	2,81
4	64,9	23,8	2,35
5	73,6	31,6	3,25
6	66,0	33,8	2,79
7	71,0	39,5	3,18
8	72,3	38,6	2,90
9	79,0	36,6	2,84
10	70,2	36,2	2,95
11	60,5	26,7	2,96
12	61,0	27,4	3,91
13	116,0	34,3	10,8

A produção destes compostos é indesejável, uma vez que são prejudiciais aos agentes fermentadores na síntese de bioetanol. Além disto, a sua formação indica a perda de açúcares fermentescíveis pela sua decomposição: as hexoses (como a glicose) são degradadas para produzir ácido levulínico e HMF, enquanto o furfural é resultado da degradação de pentoses (JEONG *et*

al., 2012). Nos 12 primeiros cultivos do planejamento experimental, as concentrações dos inibidores não variaram consideravelmente. No entanto, a hidrólise do cultivo 13 gerou concentrações de ácido levulínico e de HMF significativamente maiores que as demais: uma vez que ambos os compostos são produtos de degradação da glicose, o resultado obtido é influência direta da maior concentração deste açúcar no hidrolisado.

4.1.6.2 Lipídios

A Figura 16 mostra a aparência geral obtida na extração de lipídios de *Chlorella vulgaris*. Após centrifugação, as diferentes frações mencionadas na Seção 3.9.2 podem ser distinguidas na Figura 16a: a fase incolor, no topo, é composta por água e metanol; a fase intermediária constitui um disco sólido de proteínas; e a fase do fundo contém clorofórmio, no qual estão dissolvidos os triglicerídios. A Figura 16b apresenta esta fase orgânica, transferida para uma placa de Petri de vidro. Pode-se notar que a cor desta fração é um verde vivo, o que assinala a coextração da clorofila contida nas microalgas.

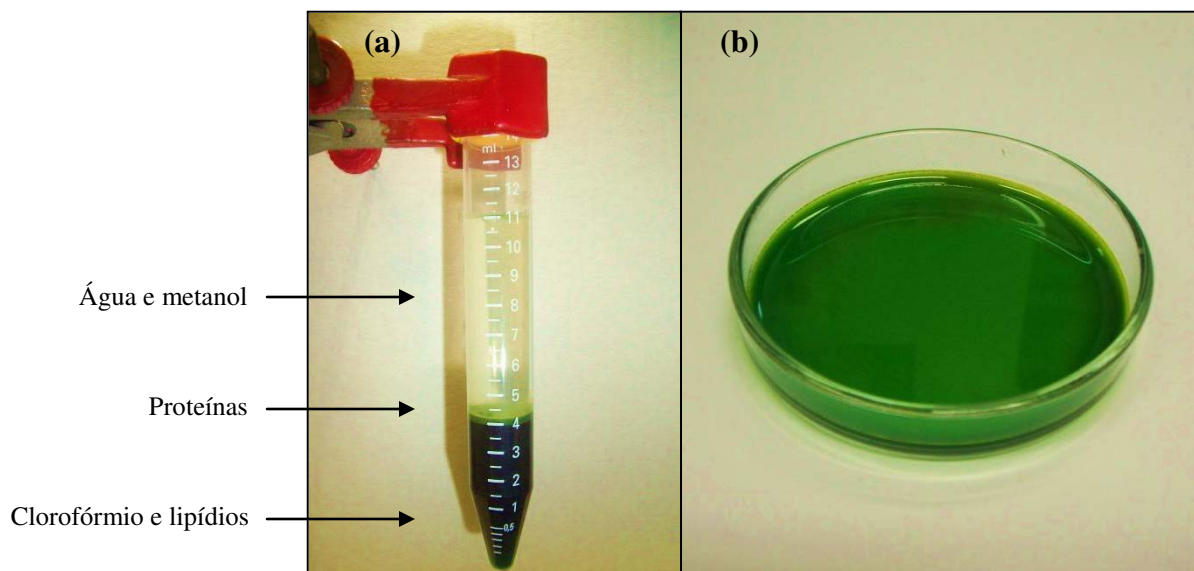


Figura 16 – Extração de lipídios de *Chlorella vulgaris*: (a) caráter trifásico do método de Bligh e Dyer e (b) fase orgânica contendo os lipídios

As quantidades de lipídios determinadas para a biomassa de cada cultivo do planejamento experimental são mostradas na Tabela 12. A certeza nos valores de percentual de lipídios obtidos através de extração com solventes orgânicos pode ser, muitas vezes, contestada, uma vez que o método de Bligh e Dyer pode coextrair diversos compostos, tais como não-lipídios (hidrocarbonetos, esteróis, cetonas e pigmentos, como clorofila e carotenos) e matéria graxa não saponificável. Pode-se, ainda, ter a presença de matéria graxa na biomassa residual, ou seja, no disco de proteínas ou na fase aquosa de topo. Os valores determinados, contudo, se encontram entre cerca de 29 e 35% da biomassa seca, estando de acordo com a literatura correspondente, uma vez que Chisti, 2007, indicou o percentual de lipídios de *Chlorella* sp. entre 28 e 32%, enquanto Lvet *al.*, 2010, reportaram variações de fração lipídica entre 14 e 40% em *Chlorella vulgaris*.

Constatou-se, também, que tanto as frações de lipídios quanto as de carboidratos não variaram significativamente entre os cultivos do planejamento experimental, salvo pela concentração de glicose obtida após hidrólise do cultivo 13 (realizado com concentração de NaNO_3 igual a 156 mg L^{-1}). Isto indica que as demais concentrações de NaNO_3 testadas não foram suficientes para indução do efeito de acúmulo de lipídios e carboidratos em detrimento de proteínas. Jianget *al.*, 2012, citaram a supressão de nitrogênio no meio de cultivo – ao invés da simples limitação – a fim de levar as microalgas a sintetizarem tais compostos de estocagem energética. Visto o considerável conteúdo lipídico apresentado pela *Chlorella vulgaris* no planejamento experimental, pode-se cogitar a produção de biodiesel a partir desta espécie de microalga em conjunto com a obtenção de carboidratos para fermentação a bioetanol.

Tabela 12– Fração lipídica na constituição da *Chlorella vulgaris*

Cultivo	Fração de lipídios (%)	Cultivo	Fração de lipídios (%)
1	$33,4 \pm 1,5$	8	$35,9 \pm 0,2$
2	$34,6 \pm 3,0$	9	$29,8 \pm 2,6$
3	$29,7 \pm 0,2$	10	$31,5 \pm 0,6$
4	$35,1 \pm 1,5$	11	$32,3 \pm 2,0$
5	$34,1 \pm 2,6$	12	$33,5 \pm 2,2$
6	$31,4 \pm 0,9$	13	$31,0 \pm 3,4$
7	$31,3 \pm 2,5$		

O perfil médio dos ácidos graxos constituintes dos triglicerídios das microalgas é visto na Tabela 13. São apresentados os nomes comuns dos ácidos graxos e seus respectivos símbolos numéricos, que tomam a forma $CX:Y$, onde X é o número de carbonos contidos na cadeia carbônica e Y é o número de ligações duplas na cadeia carbônica (normalmente do tipo *cis*). Quatro ácidos graxos majoritários correspondem a cerca de 75% do total de matéria lipídica: ácidos linolênico, palmítico, linoleico e hexadecatrienoico, os três primeiros encontrados em grande proporção em óleos vegetais e, o último, em óleos de peixes. Da mesma forma, predominam ácidos graxos de cadeia longa (entre 14 e 20 carbonos).

Tabela 13– Ácidos graxos identificados na composição lipídica da *Chlorella vulgaris*

Ácido graxo	Símbolo numérico	Fração (%)
Linolênico	C18:3	26,37
Palmítico	C16:0	23,95
Linoleico	C18:2	13,30
Hexadecatrienoico	C16:3	10,21
Palmitoleico	C16:1	4,10
Estearico	C18:0	1,37
Oleico	C18:1	1,07
Araquídico	C20:0	0,79
Mirístico	C14:0	0,29
Pentadecíclico	C15:0	0,20
Eicosenoico	C20:1	0,18
Behênico	C22:0	0,09
Outros		18,08

4.1.6.3 Proteínas

Com relação ao teor de proteínas na biomassa gerada nas diferentes condições do planejamento experimental, verificou-se que, em muitos casos, a análise de nitrogênio total usada

para estimativa da proteína não foi bem sucedida devido ao alto teor de nitrato no meio BG-11. Mesmo descontando a quantidade de nitrato para estimativa mais correta do nitrogênio proteico, em muitos ensaios o teor de proteínas foi muito superior ao encontrado na literatura para microalgas (Kay, 1991, reporta conteúdos de proteína de até 70% em microalgas de diversos gêneros).

De qualquer forma, ao se analisar o efeito da quantidade de NaNO_3 no meio percebe-se que no ensaio 6 onde foram usados 2300 mg L^{-1} de NaNO_3 inicial (nível 1 do planejamento experimental) tem-se 43% (base seca) de proteínas na biomassa. Nestas condições, um dos ensaios de maior produtividade em termos de biomassa, temos um rendimento médio de aproximadamente $0,33 \text{ mg}$ de proteínas por mg de nitrato. Por outro lado, a média do teor de proteína na biomassa obtida nas condições do nível central do planejamento (1500 mg L^{-1} de NaNO_3) foi de 30%, com rendimento de aproximadamente $0,28 \text{ mg}$ de proteínas por mg de nitrato. Estes resultados indicam a alta influência da quantidade de nitrogênio disponível na conversão em proteínas. Os teores determinados estão dentro da faixa de proteína encontrada na literatura para *Chlorella vulgaris* (entre 19 e 40% para cultivos limitados e não limitados por nitrogênio, segundo Behrenset *al.*, 1989, e entre 22 e 60%, segundo Ho *et al.*, 2012) e não foi possível a análise da influência da luminosidade e da concentração de CO_2 devido à interferência pela quantidade de nitrato no meio.

Cabe ressaltar ainda que estes resultados se referem à estimativa de proteína pela determinação de nitrogênio total nas amostras ao invés de Nitrogênio Total Kjeldhal, valor este que, por ser pouco inferior, levaria a um menor teor de proteínas (VOLTOLINA *et al.*, 1999).

4.2 Atividade fotossintética

4.2.1 Eficiência fotossintética

Os valores determinados para as eficiências fotossintéticas das microalgas, medidas com pulsos de luzes azuis e vermelhas, são representados graficamente na Figura 17. As eficiências fotossintéticas para cada uma das luzes foram calculadas a partir de cinco medidas durante as 12 primeiras horas de cultivo (conforme Equação 2). Devido à alteração da composição do meio provocada pelo crescimento das microalgas, os dias finais dos cultivos tendem a apresentar eficiências fotossintéticas menores que os iniciais (LOMBARDI e MALDONADO, 2011).

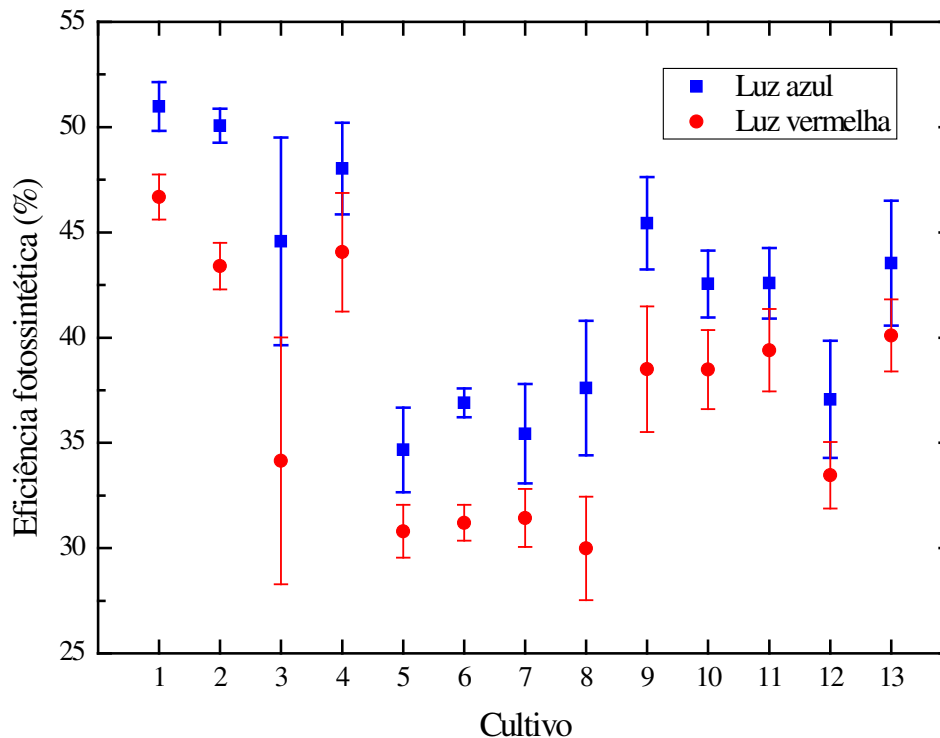


Figura 17 – Valores de eficiência fotossintética (luzes azul e vermelha) dos cultivos do planejamento experimental

Pela Figura 17, pode-se ver que, para qualquer cultivo, a eficiência fotossintética determinada através da luz azul é maior que aquela determinada por pulsos de luz vermelha. Isto se deve ao fato de a luz azul, por ter um comprimento de onda menor que a luz vermelha (455 nm e 627 nm, respectivamente), apresentar um maior conteúdo energético. Além

disto, o FSII, fotossistema para o qual as eficiências fotossintéticas são calculadas, é composto por uma maior quantidade de clorofila “b” que de clorofila “a”, sendo que o primeiro pigmento absorve mais fortemente na região do azul que o segundo.

Em uma análise preliminar, através da Figura 17, distinguem-se regiões características de eficiências fotossintéticas de acordo com as variáveis testadas nos cultivos. Experimentos realizados com alto e baixo fluxo luminoso apresentam, respectivamente, baixos e altos valores de eficiência fotossintética, enquanto que os cultivos do ponto central apresentam eficiências fotossintéticas intermediárias. Este comportamento indica que a medida se equivale ao rendimento quântico operacional do FSII, indicando o estado fisiológico do cultivo e o percentual do fluxo luminoso que é efetivamente utilizado pelas microalgas.

Procedeu-se à análise estatística da resposta da eficiência fotossintética (determinada pela luz azul) em função das variáveis estudadas nos moldes da Seção 4.1.3 (análise com erro puro e intervalo de confiança de 95%). A análise de significância para o modelo completo pode ser vista na Tabela 14.

Tabela 14– Análise de significância para a eficiência fotossintética (azul) com todas as variáveis

Fator	Coeficiente de regressão	Erro padrão	t(2)	p-valor	Estimativas por intervalo	
					-95%	+95%
Média	43,33739	0,891865	48,5919	0,000423	39,5000	47,17477
L (L)	-6,63900	0,634186	-10,4685	0,009002	-9,3677	-3,91032
L (Q)	1,06024	1,135005	0,9341	0,448850	-3,8233	5,94377
C (L)	1,12420	0,799257	1,4066	0,294815	-2,3147	4,56313
C (Q)	-5,04143	1,335471	-3,7750	0,063555	-10,7875	0,70464
N (L)	0,45382	0,799257	0,5678	0,627410	-2,9851	3,89275
N (Q)	0,90064	1,335471	0,6744	0,569564	-4,8454	6,64671
L x C	1,65825	0,765874	2,1652	0,162769	-1,6370	4,95354
L X N	0,31825	0,765874	0,4155	0,718088	-2,9770	3,61354
C x N	0,96514	1,026271	0,9404	0,446270	-3,4506	5,38082

L: nível de fluxo luminoso; C: nível de CO₂ na alimentação gasosa; N: nível de NaNO₃ no meio de cultivo; (L): efeito linear; (Q): efeito quadrático

Pela análise do p-valor, o único efeito significativo para explicar a eficiência fotossintética (azul) é o fluxo luminoso (linear). Ao se ignorar os demais efeitos não significativos, oito no total, gerou-se a Tabela 15, que contém os parâmetros estatísticos relacionados à análise.

Tabela 15– Análise de significância para a eficiência fotossintética (azul) com as variáveis significativas (modelo simplificado)

Fator	Coeficiente de regressão	Erro padrão	t(2)	p-valor	Estimativas por intervalo	
					-95%	+95%
Média	42,26923	0,448359	94,2755	0,000112	40,34010	44,19836
L (L)	-6,13750	0,571548	-10,7384	0,008561	-8,59667	-3,67833

L: nível de fluxo luminoso; (L): efeito linear

Com os coeficientes de regressão da Tabela 15, deriva-se um modelo matemático descritivo simplificado para a eficiência fotossintética (azul), mostrado na Equação 10:

$$EF'(azul) = 42,27 - 6,14L \quad (10)$$

onde $EF'(azul)$ é a eficiência fotossintética (azul) e L é o fluxo luminoso (em valores codificados). A ANOVA para o modelo matemático simplificado é mostrada na Tabela 16.

Tabela 16– ANOVA para a eficiência fotossintética (azul) (modelo simplificado)

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática
<i>Regressão</i>	301,351250	1	301,3513
<i>Resíduos</i>	67,836442	11	6,166949
<i>Falta de ajuste</i>	62,6098	9	6,956642
<i>Erro puro</i>	5,2267	2	2,613333
<i>Total</i>	369,1877	12	
% de variação explicada		81,63%	
% máxima de variação explicável		98,58%	

O teste com as distribuições de Fisher validam o modelo obtido. No primeiro teste F, o $F_{\text{calculado}}$ de 48,9 é maior que o valor tabelado de $F_{1,11}$ de 3,86. Já no segundo teste F, o $F_{\text{calculado}}$ de 2,66 é menor que o valor tabelado de $F_{9,2}$ de 19,4. A partir da Equação 10, foi gerada a curva representativa do modelo matemático obtido, mostrada na Figura 18. Por ser função de apenas uma variável (nível de fluxo luminoso), o modelo matemático pode ser descrito através de uma reta. Os valores individuais determinados para a eficiência fotossintética (azul) também são representados na Figura 18.

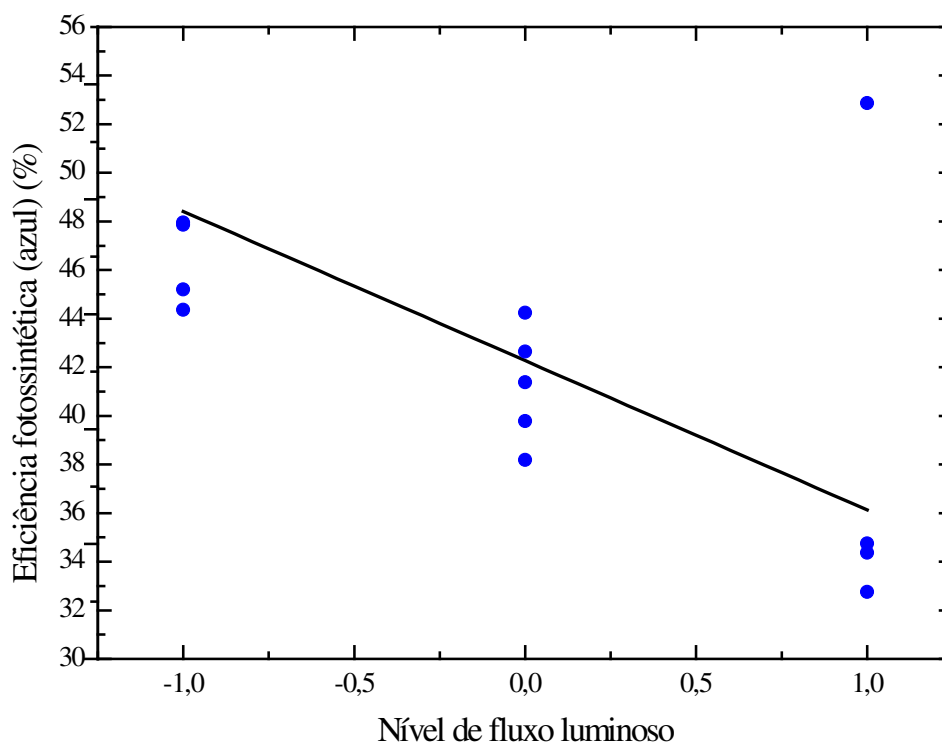


Figura 18 – Curva representativa do modelo matemático para a eficiência fotossintética (azul) (linha sólida) e valores individuais determinados para a eficiência fotossintética (azul) no planejamento experimental (pontos azuis)

A eficiência fotossintética determinada por pulsos de luz vermelha também foi analisada estatisticamente. A Tabela 17 mostra a análise de significância para o modelo completo.

Tabela 17– Análise de significância para a eficiência fotossintética (vermelho) com todas as variáveis

Fator	Coeficiente de regressão	Erro padrão	t(2)	p-valor	Estimativas por intervalo	
					-95%	+95%
Média	39,03141	0,286671	136,1541	0,000054	37,79796	40,26485
L (L)	-5,77800	0,203846	-28,3450	0,001242	-6,65508	-4,90092
L (Q)	-0,40181	0,364823	-1,1014	0,385555	-1,97152	1,16789
C (L)	-0,17446	0,256904	-0,6791	0,567139	-1,27983	0,93091
C (Q)	-5,02849	0,429258	-11,7144	0,007209	-6,87544	-3,18154
N (L)	-0,51060	0,256904	-1,9875	0,185216	-1,61597	0,59477
N (Q)	1,57522	0,429258	3,6696	0,066894	-0,27173	3,42217
L x C	1,87600	0,246174	7,6206	0,016787	0,81680	2,93520
L X N	-1,27300	0,246174	-5,1711	0,035421	-2,33220	-0,21380
C x N	2,55873	0,329873	7,7567	0,016217	1,13940	3,97806

L: nível de fluxo luminoso; C: nível de CO₂ na alimentação gasosa; N: nível de NaNO₃ no meio de cultivo; (L): efeito linear; (Q): efeito quadrático

Através da análise do p-valor, constata-se que a eficiência fotossintética (vermelho) é função de um maior número de efeitos: fluxo luminoso (linear), concentração de CO₂ na alimentação gasosa (quadrático) e as três interações de dois fatores (fluxo luminoso por concentração de CO₂ na alimentação gasosa, fluxo luminoso por concentração inicial de NaNO₃ e concentração de CO₂ na alimentação gasosa por concentração inicial de NaNO₃). Em comparação com a eficiência fotossintética (azul), a eficiência fotossintética (vermelho) é explicada pela combinação de mais variáveis. Dada a baixa energia contida na radiação luminosa vermelha, alguns efeitos antes encobertos pela maior energia da luz azul agora aparecem como significativos, como a concentração de CO₂ (quadrático) e as três interações de dois efeitos

possíveis. Ao se ignorar os efeitos não significativos, gerou-se a Tabela 18, que mostra a análise de significância do modelo matemático simplificado.

Tabela 18– Análise de significância para a eficiência fotossintética (vermelho) com as variáveis significativas (modelo simplificado)

Fator	Coeficiente de regressão	Erro padrão	t(2)	p-valor	Estimativas por intervalo	
					-95%	+95%
Média	39,55587	0,221209	178,8164	0,000031	38,60409	40,50766
L (L)	-5,77800	0,203846	-28,3450	0,001242	-6,65508	-4,90092
C (Q)	-5,28737	0,352085	-15,0173	0,004405	-6,80227	-3,77247
L x C	1,87600	0,246174	7,6206	0,016787	0,81680	2,93520
L X N	-1,27300	0,246174	-5,1711	0,035421	-2,33220	-0,21380
C x N	2,50518	0,295232	8,4855	0,013605	1,23490	3,77546

L: nível de fluxo luminoso; C: nível de CO₂ na alimentação gasosa; N: nível de NaNO₃ no meio de cultivo; (L): efeito linear; (Q): efeito quadrático

Com os coeficientes de regressão acima, deriva-se o modelo matemático simplificado para a resposta eficiência fotossintética (vermelho), mostrada na Equação 11:

$$EF'(\text{vermelho}) = 39,56 - 5,78L - 5,29C^2 + 1,88LC - 1,27LN + 2,50CN \quad (11)$$

onde $EF'(\text{vermelho})$ é a eficiência fotossintética (vermelho), L é o fluxo luminoso, C é a concentração de CO₂ na alimentação gasosa e N é a concentração inicial de NaNO₃ no meio de cultivo (em valores codificados).

A ANOVA para o modelo simplificado é apresentada na Tabela 19. O modelo passa no primeiro teste F ($F_{\text{calculado}} = 14,9 > F_{5,7} = 3,97$), sendo adequado para descrição da eficiência fotossintética (vermelho). O modelo matemático apresenta uma alta percentagem de variação explicada (91,42%).

Tabela 19– ANOVA para a eficiência fotossintética (vermelho) (modelo simplificado)

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática
<i>Regressão</i>	345,386259	5	69,07725
<i>Resíduos</i>	32,424510	7	4,632073
<i>Falta de ajuste</i>	31,8845	5	6,376902
<i>Erro puro</i>	0,5400	2	0,27
<i>Total</i>	377,8108	12	
% de variação explicada		91,42%	
% máxima de variação explicável		99,86%	

A superfície de resposta e a curva de nível associadas são mostradas nas Figuras 19 e 20, respectivamente.

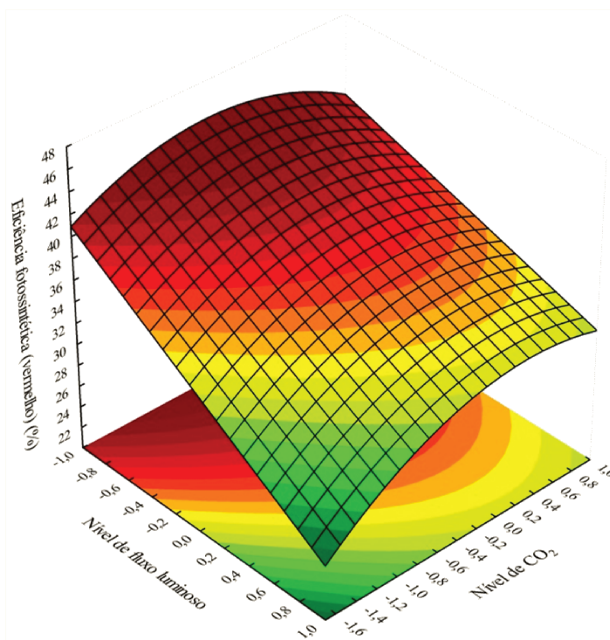


Figura 19 – Superfície de resposta para a eficiência fotossintética (vermelho) em função dos níveis de fluxo luminoso e de CO₂

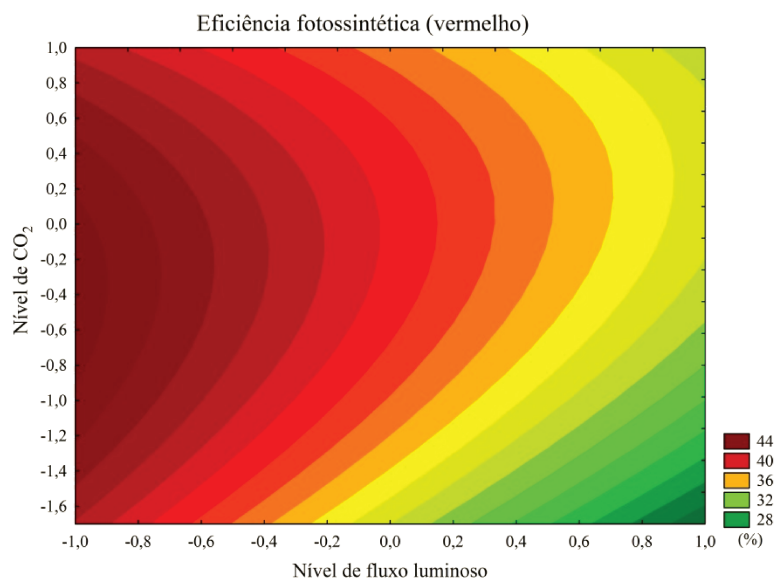


Figura 20 – Curva de nível para a eficiência fotossintética (vermelho) em função dos níveis de fluxo luminoso e de CO₂

4.2.2 Utilização do fluxo luminoso

A partir das eficiências fotossintéticas previamente determinadas, pode-se calcular a utilização do fluxo luminoso pelas microalgas, ou seja, uma estimativa da quantidade de radiação luminosa efetivamente empregada pelo micro-organismo para realização da fotossíntese. A radiação luminosa fornecida aos cultivos é uma combinação de luzes azuis e vermelhas, conforme os valores mostrados na Tabela 20. As proporções entre as radiações das duas cores em cada um dos três níveis empregados no planejamento experimental são levemente diferentes. Assim, a utilização do fluxo luminoso é calculada ao se multiplicar a eficiência fotossintética (azul ou vermelha) pelo fluxo luminoso correspondente. A utilização do fluxo luminoso total é obtida ao se somar as utilizações dos fluxos luminosos azul e vermelho e fornecida em ua (unidades arbitrárias).

Tabela 20– Composição da radiação luminosa fornecida aos cultivos do planejamento experimental

Radiação luminosa	Fluxo luminoso ($\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$)		
<i>Luz azul</i>	37	57	77
<i>Luz vermelha</i>	23	33	43
Total	60	90	120
Nível codificado	-1	0	1

A Figura 21 mostra uma representação gráfica dos valores obtidos para os valores de utilização do fluxo luminoso de ambas as luzes, bem como a utilização luminosa total.

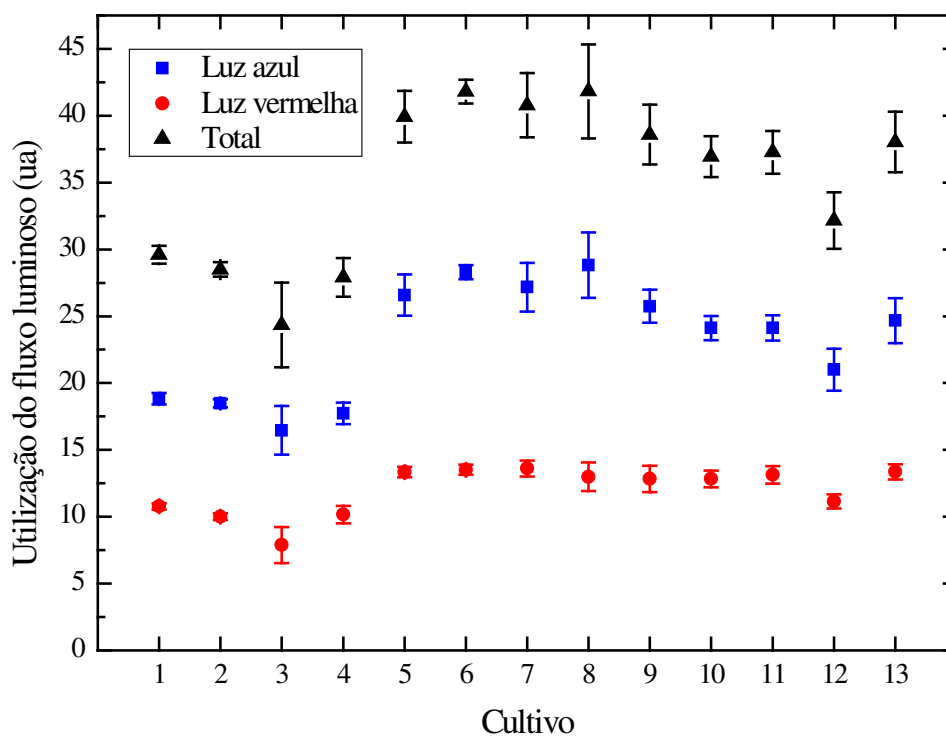


Figura 21 – Representação gráfica das utilizações de fluxo luminoso para as luzes azul, vermelha e total

Através da avaliação da Figura 21, percebe-se que a utilização do fluxo luminoso total é composta, majoritariamente, pela utilização do fluxo luminoso azul, uma vez que a radiação luminosa desta cor é majoritária e a eficiência fotossintética associada a ela também é maior. Como esperado, os cultivos expostos a uma menor incidência luminosa apresentaram uma menor utilização total do fluxo luminoso. Esta variável é diretamente proporcional à produtividade média de biomassa e, por consequência, à concentração final de biomassa que cada cultivo atinge.

A análise de significância para a avaliação da utilização do fluxo luminoso total em função das variáveis do planejamento experimental é mostrada na Tabela 21.

Tabela 21– Análise de significância para a utilização do fluxo luminoso total com todas as variáveis

Fator	Coeficiente de regressão	Erro padrão	t(2)	p-valor	Estimativas por intervalo	
					-95%	+95%
Média	37,43084	0,478965	78,14937	0,000164	35,37002	39,49166
L (L)	6,44500	0,340582	18,92348	0,002781	4,97959	7,91040
L (Q)	-1,51864	0,609541	-2,49145	0,130336	-4,14128	1,10400
C (L)	1,04162	0,429232	2,42670	0,136010	-0,80522	2,88845
C (Q)	-4,12429	0,717199	-5,75056	0,028934	-7,21015	-1,03844
N (L)	0,17771	0,429232	0,41403	0,719031	-1,66912	2,02455
N (Q)	1,00030	0,717199	1,39474	0,297813	-2,08555	4,08616
L x C	1,12675	0,411303	2,73947	0,111418	-0,64294	2,89645
L X N	0,07588	0,411303	0,18449	0,870639	-1,69381	1,84558
C x N	0,85384	0,551147	1,54921	0,261446	-1,51755	3,22524

L: nível de fluxo luminoso; C: nível de CO₂ na alimentação gasosa; N: nível de NaNO₃ no meio de cultivo; (L): efeito linear; (Q): efeito quadrático

Pela análise do p-valor, os efeitos considerados significativos para explicar a utilização do fluxo luminoso total são o fluxo luminoso (linear) e a concentração de CO₂ (quadrático). Ao se

ignorar os sete efeitos não significativos, a Tabela 22 foi gerada, contendo os parâmetros estatísticos relacionados à análise do modelo simplificado.

Tabela 22– Análise de significância para a utilização do fluxo luminoso (total) com as variáveis significativas (modelo simplificado)

Fator	Coeficiente de regressão	Erro padrão	t(2)	p-valor	Estimativas por intervalo	
					-95%	+95%
Média	37,02296	0,366381	101,0504	0,000098	35,44655	38,59937
L (L)	6,75014	0,306943	21,9915	0,002061	5,42948	8,07081
C (Q)	-3,79547	0,576425	-6,5845	0,022296	-6,27563	-1,31532

L: nível de fluxo luminoso; C: nível de CO₂ na alimentação gasosa; (L): efeito linear; (Q): efeito quadrático

Com os coeficientes de regressão da Tabela 22, um modelo matemático simplificado para a variável utilização de fluxo luminoso total pode ser obtido, como mostrado na Equação 12:

$$UL(total) = 37,02 + 6,75L - 3,80C^2 \quad (12)$$

onde $UL(total)$ é utilização do fluxo luminoso total, L é o fluxo luminoso e C é a concentração de CO₂ na alimentação gasosa (em valores codificados). Nota-se que o modelo matemático obtido é bastante similar ao modelo representativo da produtividade média de biomassa, mostrado na Equação 6.

A ANOVA para o modelo simplificado é apresentada na Tabela 23. O modelo mostrado na Equação 12 passa em ambos os testes com a distribuição de Fisher: no primeiro teste, $F_{calculado}$ (72,7) é maior que $F_{2,10}$ (3,86); no segundo, $F_{calculado}$ (4,28) é menor que $F_{8,2}$ (19,4). Isto atesta a validade do modelo obtido para descrição dos dados experimentais.

Tabela 23– ANOVA para a utilização do fluxo luminoso (total) (modelo simplificado)

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática
<i>Regressão</i>	397,193210	2	198,5966
<i>Resíduos</i>	27,310314	10	2,731031
<i>Falta de ajuste</i>	25,8029	8	3,225361
<i>Erro puro</i>	1,5074	2	0,753711
<i>Total</i>	424,5035	12	
% de variação explicada		93,57%	
% máxima de variação explicável		99,64%	

A partir do modelo matemático, pode-se traçar a superfície de resposta e curva de nível correspondentes, mostradas nas Figuras 22 e 23, respectivamente.

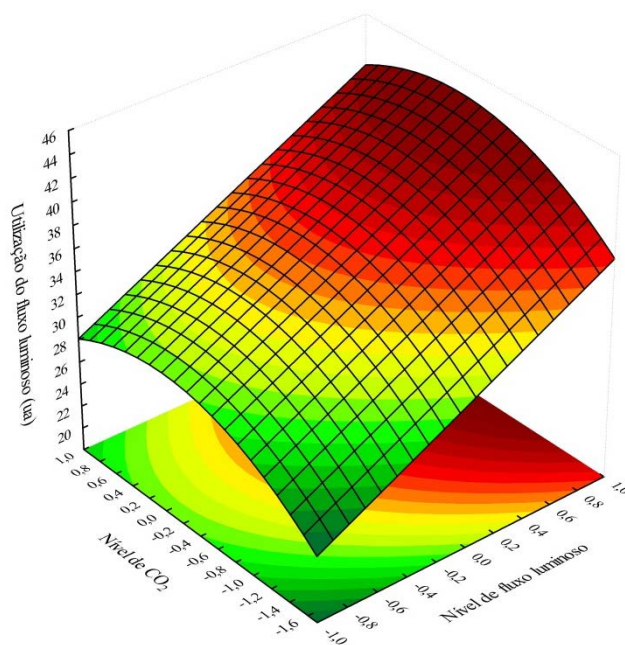


Figura 22– Superfície de resposta para a utilização do fluxo luminoso total em função dos níveis de fluxo luminoso e de CO₂

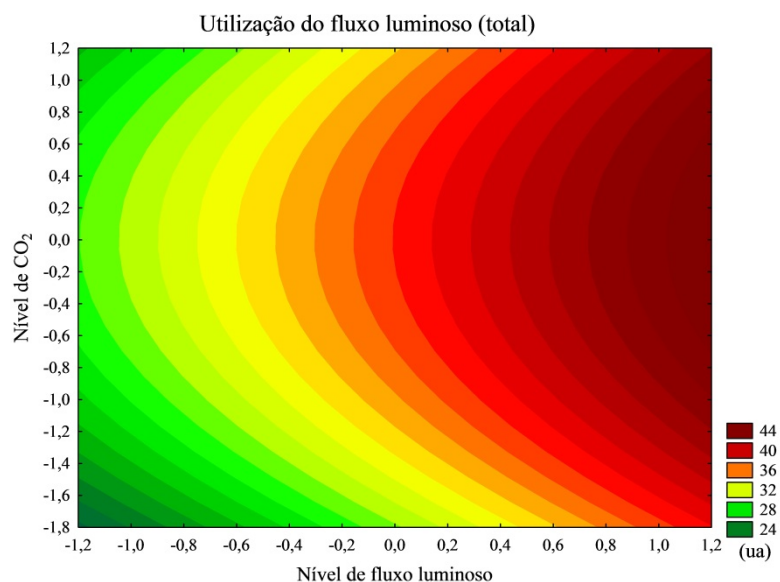


Figura 23 – Curva de nível para a utilização do fluxo luminoso total em função dos níveis de fluxo luminoso e de CO₂

Tanto a eficiência fotossintética quanto a utilização do fluxo luminoso são parâmetros passíveis de estudo para melhoria do aproveitamento da radiação luminosa pelo cultivo de microalgas, uma vez que maiores produtividades de biomassa são obtidas com o aumento destas propriedades.

4.2.3 Influência da atividade fotossintética nos parâmetros auxiliares

A atividade fotossintética das microalgas pôde ser comprovada pelo seu efeito na variação de certos parâmetros auxiliares, como o pH do meio de cultivo e a concentração de O₂ dissolvido.

Em todos os experimentos, foi observado o aumento do pH do meio de cultivo devido à realização da fotossíntese. Tal comportamento pode ser explicado pelo mecanismo de utilização de CO₂ por micro-organismos aquáticos, pois a fotossíntese de microalgas pode se tornar limitada pela baixa quantidade de CO_{2(aq)} disponível. Como há a predominância de íons HCO₃⁻ em soluções aquosas com pH intermediário, os micro-organismos aquáticos são capazes de utilizá-los indiretamente para realização de fotossíntese em adição ao CO_{2(aq)} (CHEN e GAO, 2004). Em microalgas clorofíceas, esta capacidade se baseia em dois processos químicos principais: o

transporte ativo de HCO_3^- nas células e a conversão de HCO_3^- em CO_2 pela enzima anidrase carbônica (LARCHER, 1986), mostrados nas Equações 13 e 14, respectivamente. Em combinação com a reação global da fotossíntese, de acordo com a Equação 1, pode-se derivar uma expressão geral para justificar o aumento de pH pela fotossíntese.



A Equação 15 indica que a formação de glicose (de fórmula empírica CH_2O) e O_2 se dá a partir da remoção de íons HCO_3^- e de hidrões do cultivo, o que leva ao aumento do pH da solução. O mesmo raciocínio pode ser empregado para explicar o aumento da concentração de O_2 dissolvido no cultivo quando da exposição das microalgas à radiação luminosa.

De um modo geral, os perfis de pH e de concentração de O_2 dissolvido dos cultivos realizados com suplementação de CO_2 na alimentação gasosa seguiram o comportamento das curvas mostradas na Figura 24 para o cultivo 1.

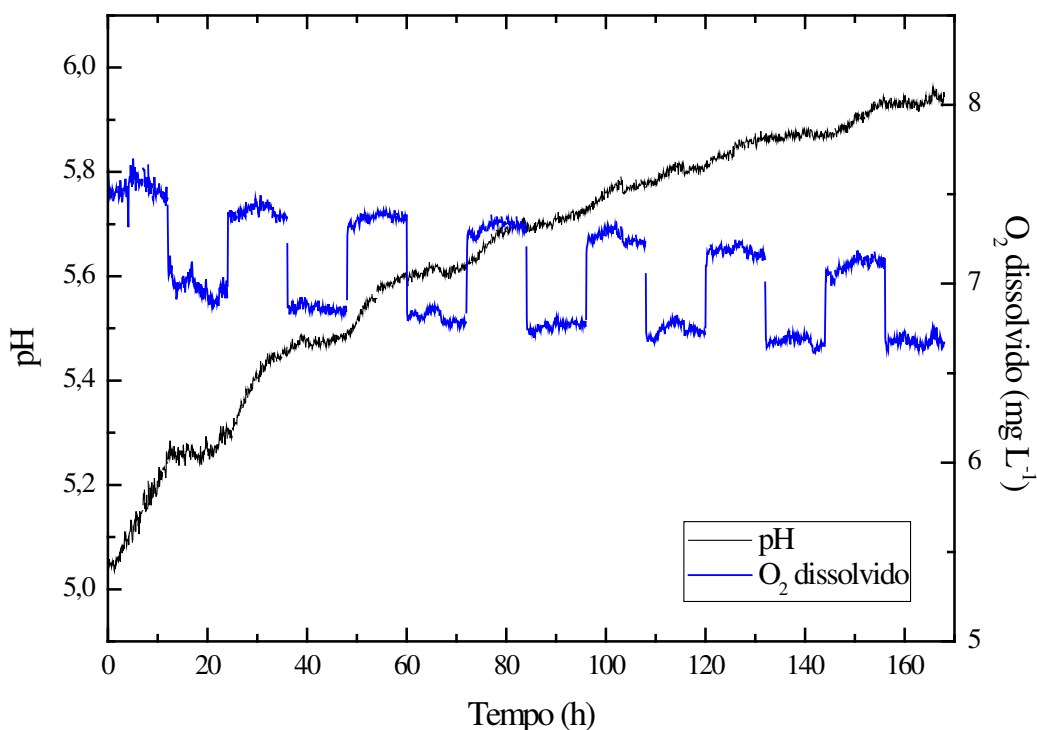


Figura 24 – Evolução do pH e da concentração de O_2 dissolvido no cultivo 1

Na Figura 24, percebe-se a nítida influência do fotoperíodo na concentração de O_2 dissolvido: durante a iluminação do cultivo, a quantidade de O_2 dissolvido aumenta (resultado direto da atividade fotossintética dos micro-organismos), decrescendo imediatamente na fase escura do cultivo. No total, são observados sete períodos claros e sete períodos escuros, cada um de 12 h de duração. Já a evolução do pH ocorre de maneira mais suave, embora a influência do fotoperíodo também possa ser constatada nos dias iniciais do cultivo: o aumento do pH é mais acentuado no período iluminado, sendo estabilizado durante a respiração celular (fase escura).

A exceção a este comportamento foi observada no cultivo 12, no qual não se fez injeção de CO_2 suplementar na alimentação gasosa. A evolução do pH e da concentração de CO_2 dissolvido no cultivo pode ser vista na Figura 25. Aqui também se percebe a influência do fotoperíodo nos parâmetros citados, que os faz oscilar de forma cíclica. Devido à injeção de uma corrente gasosa com baixa quantidade de CO_2 , o pH varia drasticamente durante o período com iluminação, passando de 7,5 para cerca de 10, retornando para valores ligeiramente acima dos iniciais no período escuro. Nos dias finais do cultivo, a amplitude de variação de pH diminui. Nos demais cultivos, a injeção de CO_2 suplementar em quantidades muito maiores que a capacidade das microalgas de absorverem mantém a concentração de CO_2 dissolvido estabilizada, evitando que o pH oscile da mesma forma que no cultivo 12.

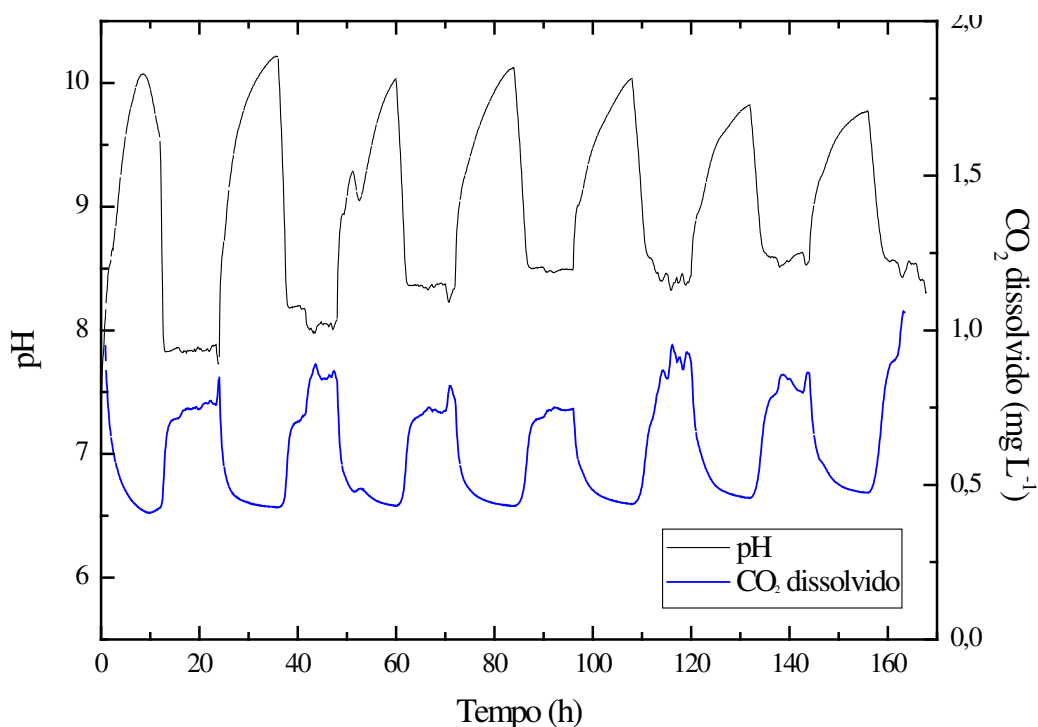


Figura 25 – Evolução do pH e da concentração de CO_2 dissolvido no cultivo 12

Para todos os cultivos do planejamento experimental, foram calculadas as variações produzidas no pH e na concentração de O_2 dissolvido. A variação de pH foi determinada através da diferença entre os valores no início e no fim dos cultivos, enquanto que a variação da concentração de O_2 dissolvido foi calculada pela diferença entre as médias dos valores dos períodos claro e escuro nas primeiras 24 h de cultivo. Para o cultivo 12, a variação de pH foi calculada através da diferença entre o pH inicial e o pico de pH nas primeiras 24h de cultivo. A Figura 26 resume graficamente os valores encontrados. As maiores variações de pH e de O_2 dissolvido foram encontradas para os cultivos com maior utilização do fluxo luminoso (5 a 8), devido à maior atividade fotossintética das microalgas. Nota-se também a influência do CO_2 sobre a variação de pH: entre cultivos submetidos a um mesmo fluxo luminoso, aqueles alimentados com maiores quantidades de CO_2 apresentaram uma maior variação de pH. Isto se deve, provavelmente, aos menores pHs iniciais destes cultivos, proporcionados pelas maiores concentrações de CO_2 dissolvido, pela alta atividade metabólica e pelo consumo de íons NO_3^- .

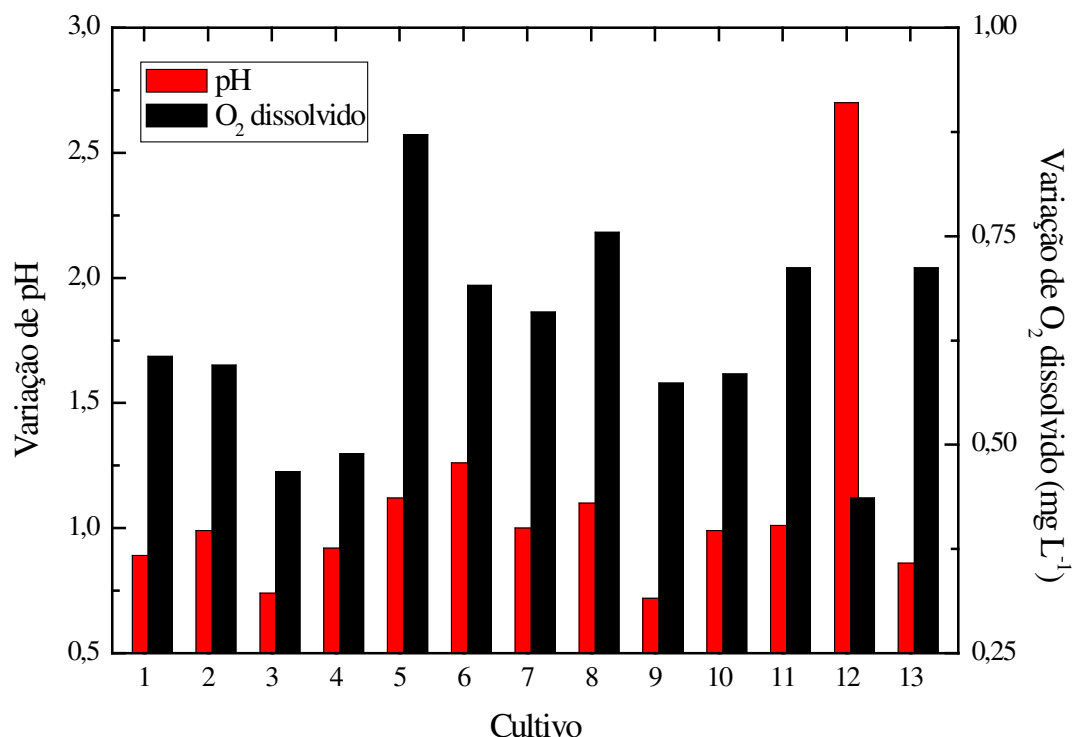


Figura 26 – Variação do pH e da concentração de O_2 dissolvido nos cultivos do planejamento experimental

4.3 Caso específico: fotoperíodo de 24 h

Uma das condições de cultivo que podem alterar significativamente o crescimento e as propriedades fisiológicas de microalgas é o fotoperíodo. Para avaliação do seu efeito sobre o cultivo de *Chlorella vulgaris*, realizou-se um experimento em fotobiorreator de placa plana com iluminação contínua, ou seja, sem períodos escuros. Foram utilizadas as mesmas condições apresentadas na Seção 3.4, sendo que as variáveis do planejamento experimental empregadas são equivalentes às do ponto central (fluxo luminoso de $90 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$, concentração de CO_2 de 7,5% e concentração de NaNO_3 no meio de cultivo de 1500 mg L^{-1}). A Figura 27 mostra as curvas de crescimento de dois cultivos de *Chlorella vulgaris* nestas condições submetidos a fotoperíodos de 12 h (pontos vermelhos) e de 24 h (pontos pretos).

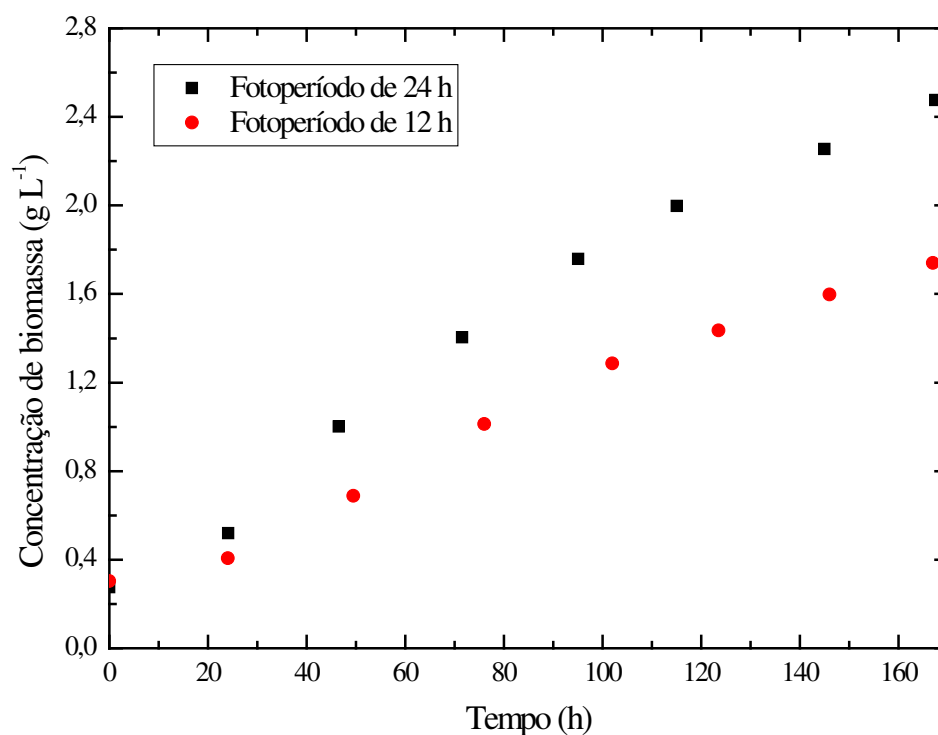


Figura 27 – Curvas de crescimento de cultivos com fotoperíodo de 12 h (pontos vermelhos) e 24 h (pontos pretos)

Após sete dias de cultivo, atingiu-se uma concentração final de biomassa seca de $2,476 \pm 0,079 \text{ g L}^{-1}$ e uma produtividade média de biomassa de $0,315 \pm 0,013 \text{ g L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$. Nestas condições, o crescimento se torna acelerado a partir de 24 h de cultivo. A velocidade máxima

específica de crescimento $\mu_{m\acute{a}x}$ calculada foi de $0,559 \pm 0,059 \text{ dia}^{-1}$, fornecendo um t_g de $1,25 \pm 0,11$ dias. Os valores obtidos indicam que o fotoperíodo de 24 h proporciona uma taxa de crescimento maior que qualquer um dos cultivos realizados no planejamento experimental, o que mostra a influência positiva do fotoperíodo sobre o crescimento das microalgas. A Figura 28 mostra a evolução do pH e da concentração de O_2 dissolvido no cultivo. A curva depH segue a mesma tendência que nos experimentos do planejamento experimental (como exemplificado na Figura 24), passando de 5,1 no início para 6,2 no fim do cultivo. Já a concentração de O_2 dissolvido deixa de exibir o comportamento cíclico característico das condições de fotoperíodo de 12 h do planejamento experimental (Figura 24), apresentando uma pequena queda (cerca de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$) ao longo dos sete dias de cultivo.

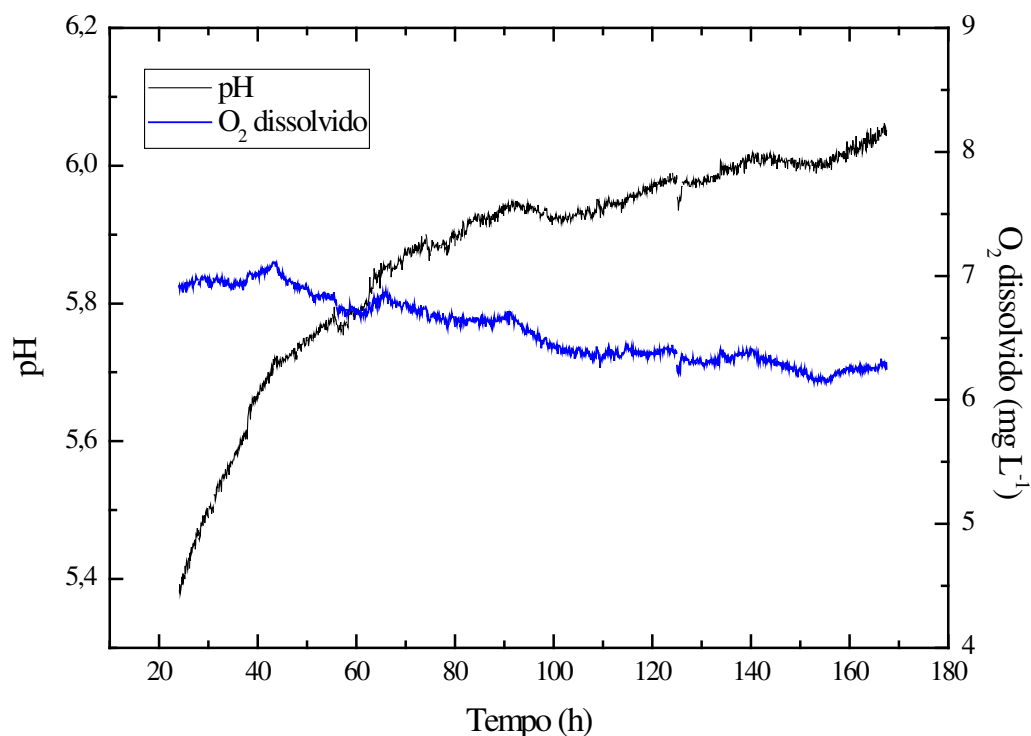


Figura 28 – Perfil de pH e concentração de O_2 dissolvido no cultivo com fotoperíodo de 24 h

Os valores determinados para as eficiências fotossintéticas (azul e vermelho) e para a utilização do fluxo luminoso (Tabela 24) se encontram na mesma faixa que para os cultivos do planejamento experimental submetidos a um fluxo luminoso de $90 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Tal resultado era

esperado, uma vez que as medidas de eficiência fotossintética são realizadas apenas no período de iluminação do cultivo, descartando a influência do fotoperíodo.

A análise de composição das microalgas também é mostrada na Tabela 24. O teor de lipídios determinado ($29,9 \pm 0,1\%$) foi similar aos demais cultivos do planejamento experimental (Tabela 12). Já a hidrólise ácida da biomassa forneceu concentrações de glicose muito maiores que no cultivo experimental e um percentual de carboidratos de cerca de 12%, um valor em melhor acordo com a literatura. No entanto, estes valores não devem ser vistos como resultados diretos da influência do fotoperíodo no crescimento dos micro-organismos, mas sim devidos a uma melhor maceração da biomassa liofilizada. Provavelmente, a quantidade de microalgas com paredes celulares intactas nesta etapa de hidrólise foi menor que nas hidrólises feitas com a biomassa dos cultivos nas condições do planejamento experimental.

Da mesma forma que a liberação de glicose na solução foi maior, a produção de compostos oriundos da degradação de açúcares também foi mais importante: 137 ppm de ácido levulínico, 43,5 ppm de furfural e 5,5 ppm de HMF.

A utilização de iluminação contínua no cultivo de microalgas se mostrou interessante, principalmente do ponto de vista de produtividade média de biomassa, ou seja, cerca de 20% maior que para o cultivo do planejamento experimental com maior destaque (cultivo 5). É uma alternativa a ser considerada e melhor explorada para o cultivo de microalgas em escala industrial em fotobiorreatores com iluminação artificial.

Tabela 24– Dados gerais referentes ao cultivo de microalgas com fotoperíodo de 24h

Parâmetro	Valor
Concentração inicial de biomassa (g L^{-1})	$0,276 \pm 0,013$
Concentração final de biomassa (g L^{-1})	$2,476 \pm 0,079$
Produtividade média de biomassa ($\text{g L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$)	$0,315 \pm 0,013$
$\mu_{máx}$ (dia^{-1})	$0,559 \pm 0,059$
t_g (dia)	$1,25 \pm 0,11$
Eficiência fotossintética	
<i>Luz azul</i> (%)	$42,6 \pm 1,6$
<i>Luz vermelha</i> (%)	$34,0 \pm 2,3$
Utilização do fluxo luminoso total ($\mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	$35,5 \pm 1,7$
Composição centesimal	
<i>Carboidratos</i> (%)	12,14
<i>Glicose</i> (g L^{-1})	0,89
<i>Xilose</i> (g L^{-1})	0,94
<i>Lipídios</i> (%)	$29,9 \pm 0,1$
Variação de pH	1,11

4.4 Fermentação etanólica

A fermentação do hidrolisado de biomassa de microalgas obtida no cultivo⁵ do planejamento experimental foi conduzida com a levedura *Dekkerabruxellensis* CCA 155. Embora seja um micro-organismo capaz de produzir bioetanol a partir de hexoses e pentoses, esta levedura apresenta metabolismo mais lento quando comparada às cepas de *Saccharomyces cerevisiae* usadas nas usinas de açúcar e álcool para produção de bioetanol a partir de caldo ou melaço de cana-de-açúcar. Apesar da discreta queda no pH (de 7,1 para 6,2 em 120 h), o que é típico em processos fermentativos, e o rápido consumo de glicose em 24 h, não foi possível a análise dos parâmetros de cultivo uma vez que as análises de açúcares e etanol geraram resultados abaixo do limite de detecção das curvas de calibração do HPLC. Além disso, a baixa variação de biomassa nas 120 amostradas sugere que talvez o inóculo das leveduras deva ser adaptado ao hidrolisado de microalgas. Outra situação importante a ser explorada é o estudo das condições de hidrólise de maneira a disponibilizar uma quantidade adequada de hexoses e pentoses para conversão em etanol pela *Dekkerabruxellensis*. A relação entre o substrato limitante e o inóculo previamente adaptado deve ser estudada de forma a se determinar o tempo de batelada ideal para este tipo não convencional de fermentação etanólica.

CAPÍTULO 5

CONCLUSÃO

Conclusão

Nas diferentes condições de cultivo avaliadas, pôde-se perceber a robustez da microalga *Chlorella vulgaris*, capaz de suportar concentrações de CO₂ variadas e pHs entre 4 e 10.

O fluxo luminoso fornecido aos cultivos e a concentração de CO₂ na alimentação gasosa são variáveis com efeito significativo na produtividade média de biomassa das microalgas e, portanto, determinam a concentração final de biomassa possível de obtenção.

Da faixa de concentração inicial de nitrogênio no meio de cultivo explorada no planejamento experimental, apenas o nível mais baixo (156 mg L⁻¹ de NaNO₃) foi capaz de induzir acúmulo de carboidratos na biomassa de microalgas.

A eficiência fotossintética e a utilização do fluxo luminoso pela *Chlorella vulgaris* afeta diretamente a produtividade de biomassa da microalga.

A avaliação da influência do fotoperíodo de 24 h sobre o crescimento de microalgas mostrou que a iluminação contínua do cultivo proporcionou uma produtividade média de biomassa maior que a de qualquer cultivo com fotoperíodo de 12 h. Produtividades e concentrações finais de biomassa superiores poderiam ter sido atingidas com o aumento do fluxo luminoso fornecido ao cultivo e com o ajuste fino da concentração de CO₂ na alimentação gasosa.

Os diferentes modelos matemáticos obtidos apresentam significância estatística e podem ser utilizados para estimativa de parâmetros dentro das faixas estudadas.

5.1 Sugestões para trabalhos futuros

Devido às diversas etapas envolvidas no cultivo e no processamento de microalgas para produção de bioetanol de terceira geração, várias abordagens podem ser consideradas para trazer avanço ao assunto, especialmente em escala industrial:

Cultivo:(1) testar diferentes espécies de microalgas e cianobactérias com maior capacidade de armazenamento de carboidratos, geneticamente modificadas ou não; (2) testar o cultivo conjunto (consórcio) de microalgas de diferentes espécies ou de microalgas e cianobactérias para maximização da produtividade de biomassa;(3) explorar menores

concentrações de nitrogênio no meio de cultivo;(4) avaliar o uso de FBRs e de lagoas abertas para o cultivo em larga escala de microalgas.

Recuperação da biomassa: explorar a utilização de sedimentadores e de agentes flocculantes (naturais e artificiais) na separação da biomassa de microalgas do meio de cultivo.

Armazenamento: testar o efeito da secagem e da liofilização sobre a composição centesimal das microalgas, avaliando a perda de nutrientes e a degradação de lipídios e carboidratos.

Ruptura e hidrólise:(1) explorar a utilização de diferentes ácidos em concentrações e temperaturas variadas ou de coquetéis enzimáticos para maximização da ruptura das células das microalgas e liberação de açúcares fermentescíveis; (2) avaliar o aumento da concentração de microalgas na suspensão a ser hidrolisada para maximização da concentração de açúcares fermentescíveis no hidrolisado.

Fermentação etanólica:(1) testar diferentes micro-organismos (bactérias, fungos filamentosos e leveduras não convencionais) para produção de bioetanol a partir do hidrolisado de microalgas; (2) adaptar estes micro-organismos às condições do hidrolisado; (3) avaliar o efeito de concentrações iniciais mais altas de açúcares fermentescíveis na produção de bioetanol.

Processo global: avaliar a viabilidade econômica do processo produtivo de bioetanol a partir de microalgas.

Capítulo 6 – Referências Bibliográficas

ALAM, F., DATE, A., RASJIDIN, R., MOBIN, S., MORIA, H., BAQUI, A. Biofuel from algae - Is it a viable alternative? *Procedia Engineering*, v. 49, p. 221-227, 2012.

ANP (AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCMBUSTÍVEIS). Anuário Estatístico Brasileiro do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. Disponível em: <http://www.anp.gov.br/?pg=60983>. Acesso em: 14 de março de 2013.

AOCS (AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY). Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society. Champaign: American Oil Society. 2009.

BAILEY, J. E., OLLIS, D. F. Biochemical Engineering Fundamentals. Second Edition. 928p. McGraw-Hill, 1986.

BALAT, M., BALAT, H. Recent trends in global production and utilization of bio-ethanol fuel. *Applied Energy*, v. 86, p. 2273-2282, 2009.

BASSI, A. P. G., REIS, V. R., SILVA, S. C. G., CECCATO-ANTONINI, S. R. Efeito do pH e etanol sobre o crescimento de linhagens de *Dekkerabruxellensis* isoladas da fermentação alcoólica. XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos (Sinaferm). Caxias do Sul (RS), 2011.

BEHRENS, P. W., BINGHAM, S. E., HOEKSEMA, S. D., COHOON, D. L., COX, J. C. Studies on the incorporation of CO₂ into starch by *Chlorella vulgaris*. *Journal of Applied Phycology*, v. 1, p. 123-130, 1989.

BHOLA, V., DESIKAN, R., SANTOSH, S. K., SUBBURAMU, K., SANNIYASI, E., BUX, F. Effects of parameters affecting biomass yield and thermal behaviour of *Chlorella vulgaris*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 111, n. 3, p. 377-382, 2011.

BILANOVIC, D., ANDARGATCHEW, A., KROEGER, T., SHELEF, G. Freshwater and marine microalgae sequestering of CO₂ at different C and N concentrations – Response surface methodology analysis. *Energy Conversion and Management*. V. 20, p. 262-267. 2009.

BLIGH, G., DYER, W. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, v. 37, p. 911-917, 1959.

BLOMQUIST, J., EBERHARD, T., SCHNÜRER, J., PASSOTH, V., Fermentation characteristics of *Dekkerabruxellensis* strains. *Applied Microbial and Cell Physiology*, v. 87, p. 1487-1497, 2010.

BOGLIOLO, M., BOTTINO, A., CAPANNELLI, G., DE PETRO, M., SERVIDA, A., PEZZI, G., VALLINI, G. Clean water recycle in sugar extraction process: Performance analysis of reverse osmosis in the treatment of sugar beet press water. *Desalination*, v. 108, p. 261-271, 1996.

BP (BRITISH PETROLEUM). Statistical Review of World Energy 2011. Disponível em: www.bp.com/statisticalreview. Acesso em: 9 de setembro de 2011.

BRENNAN, L., OWENDE, P. Biofuels from microalgae - A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 14, p. 557-577, 2010.

CHAVANNE, X., FRANGI, J.-P. Le rendement énergétique de la production d'éthanol à partir de maïs. *Comptes Rendus Geoscience*, v. 340, p. 263-287, 2008.

CHEN, X.-W., GAO, K.-S. Roles of Carbonic Anhydrase in Photosynthesis of *Skeletonema costatum*. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*, v. 30, n. 5, p. 511-516, 2004.

CHIARAMONTI, D., PRUSSI, M., CASINI, D., TREDICI, M. R., RODOLFI, L., BASSI, N., ZITTELLI, G. C., BONDIOLI, P. Review of energy balance in raceway ponds for microalgae cultivation: Re-thinking a traditional system is possible. *Applied Energy*, v. 102, p. 101-111, 2013.

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

CHOJNACKA, K., MARQUEZ-ROCHA, F.-J. Kinetic and stoichiometric relationships of the energy and carbon metabolism in the culture of microalgae. *Biotechnology*, v. 3, n. 1, p. 21-34, 2004.

COGDELL, R. J. Carotenoids in Photosynthesis. *Philosophical Transactions of The Royal Society B*, v. 284, p. 569-579, 1978.

DAROCH, M., GENG, S., WANG, G. Recent advances in liquid biofuel production from algal feedstocks. *Applied Energy*, v. 102, p. 1371-1381, 2013.

DEMIRBAŞ, A. Bioethanol from Cellulosic Materials: A Renewable Motor Fuel from Biomass. *Energy Sources*, v. 27, p. 327-337, 2005.

DEMIRBAS, M. F., BALAT, M., BALAT, H. Potential contribution of biomass to the sustainable energy development. *Energy Conversion and Management*, v. 50, p. 1746-1760, 2009.

DORAN, P. M. *Bioprocess Engineering Principles*. Academic Press. 439p. 1995.

DOUCHA, J., LÍVANSKÝ, K. Outdoor open thin-layer microalgal photobioreactor: potential productivity. *Journal of Applied Phycology*, v. 21, p. 111-117, 2009.

DRAGONE, G., FERNANDES, B. D., ABREU, A. P., VICENTE, A. A., TEIXEIRA, J. A. Nutrient limitation as a strategy for increasing starch accumulation in microalgae. *Applied Energy*, v. 88, p. 3331-3335, 2011.

EFREMENKO, E. N., NIKOLSKAYA, A. B., LYAGIN, I. V., SENKO, O. V., MAKHLIS, T. A., STEPANOV, N. A., MASLOVA, O. V., MAMEDOVA, F., VARFOLOMEEV, S. D. Production of biofuels from pretreated microalgae biomass by anaerobic fermentation with immobilized *Clostridium acetobutylicum* cells. *Bioresource Technology*, v. 114, p. 342-348, 2012.

GLIME, J. M. Bryophyte Ecology. V. 1, Physiological Ecology. 2007. Disponível em: www.bryocol.mtu.edu . Acesso em 28 de dezembro de 2012.

HARTMANN, L., LAGO, L. C. A. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. *Laboratory Practice*, p. 475, 1973.

HARUN, R., DANQUAH, M. K., Forde, G. M. Microalgal biomass as a fermentation feedstock for bioethanol production. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 85, p. 199–203, 2009.

HARUN, R., DANQUAH, M. K. Influence of acid pre-treatment on microalgal biomass for bioethanol production. *Process Biochemistry*, v. 46, p. 304-309, 2011.

HIRANO, A., UEDA, R., HIRAYAMA, S., OGUSHI, Y. CO₂ fixation and ethanol production with microalgal photosynthesis and intracellular anaerobic fermentation. *Energy*, v. 22, p. 137-142, 1997.

HO, S.-H., HUANG, S.-W., CHEN, C.-Y., HASUNUMA, T., KONDO, A., CHANG, J.-S. Characterization and optimization of carbohydrate production from an indigenous microalga *Chlorella vulgaris* FSP-E. doi:10.1016/j.biortech.2012.10.100. 2012.

HU, Q., KURANO, H., KAWACHI, M., IWASAKI, I., MIYACHI, S. Ultrahigh-cell-density culture of a marine green alga *Chlorococcum littorale* in a flat-plate photobioreactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 49, n. 6, p. 655-662, 1998.

JIANG, Y., YOSHIDA, T., QUIGG, A. Photosynthetic performance, lipid production and biomass composition in response to nitrogen limitation in marine microalgae. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 54, p. 70-77, 2012.

JEONG, T. S., CHOI, C. H., LEE, J. Y. KYEONG, K. O. Behaviors of glucose decomposition during acid-catalyzed hydrothermal hydrolysis of pretreated *Gelidiumamansii*. *BioresourceTechnology*, v. 116, p. 435-440, 2012.

JOHN, R. P., ANISHA, G. S., NAMPOOTHIRI, K. M., PANDEY, A. Micro and macroalgal biomass: A renewable source for bioethanol. *Bioresource Technology*, v. 102, p. 186-193, 2011.

JORQUERA, O., KIPERSTOK, A., SALES, E. A., EMBIRUÇU, M., GHIRARDI, M. L. Comparative energy life-cycle analyses of microalgal biomass production in open ponds and photobioreactors. *Bioresource Technology*, v. 101, p. 1406-1413, 2010.

KAY, R. A. Microalgae as food and supplement. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 30, n. 6, p. 555-573, 1991.

KIRROLIA, A., BISHNOI, N. R., SINGH, R. Microalgae as a boon for sustainable energy production and its future research & development aspects. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 20, p. 642-656, 2013.

LV, J.-M., CHENG, L.-H., XU, X.-H., ZHANG, L., CHEN, H.-L. Enhanced lipid production of *Chlorella vulgaris* by adjustment of cultivation conditions. *Bioresource technology*, v. 101, n. 17, p. 6797-6804, 2010.

KARP, G. *Biologia Celular e Molecular*. Terceira edição. Manole, 2005.

-
- KUMAR, A., ERGAS, S., YUAN, X., SAHU, A., ZHANG, Q., DEWULF, J., MALCATA, F. X., VAN LANGENHOVE, H. Enhanced CO₂ fixation and biofuel production via microalgae: recent developments and future directions. *Trends in Biotechnology*, v. 28, p. 371-380, 2010.
- LAM, M. K., LEE, K. T. Microalgae biofuels: A critical review of issues, problems and the way forward. *Biotechnology Advances*, v. 30, p. 673-690, 2012.
- LARCHER, W. *Ecofisiologia vegetal*. 319 p. São Paulo: EPU, 1986.
- LASHINKY, A., SCHWARTZ, N. D. How to Beat the High Cost of Gasoline Forever! 2006. Disponível em: money.cnn.com/magazines/fortune/fortune_archive/2006/02/06/8367959/index.html. Acesso em: 14 de setembro de 2011.
- LI, Y., HORSMAN, M., WU, N., LAN, C. Q., DUBOIS-CALERO, N. Biofuels from Microalgae. *Biotechnology Progress*, v. 24, p. 815-820, 2008.
- LOMBARDI, A. T., MALDONADO, M. T. The effects of copper on the photosynthetic response of *Phaeocystis cordata*. *Photosynthesis Research*, v. 108, p. 77-87, 2011.
- MARTINSEN, D., FUNK, C., LINSSEN, J. Biomass for transportation fuels - A cost-effective option for the German energy supply? *Energy Policy*, v. 38, p. 128-140, 2010.
- MATA, T. M., MARTINS, A. A., CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 14, p. 217-232, 2010.
- MIMURO, M., FUJITA, Y. Excitation energy transfer between pigment system II units in blue-green algae. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 504, p. 406-412, 1978.
- MIRANDA, J. R., PASSARINHO, P. C., GOUVEIA, L. Pre-treatment optimization of *Scenedesmus obliquus* microalga for bioethanol production. *Bioresource Technology*, v. 104, p. 342-348, 2012.
-

MOLINA, E., FERNÁNDEZ, J., ACIÉN, F. G., CHISTI, Y. Tubular photobioreactor design for algal cultures. *Journal of Biotechnology*, v. 92, p. 113-131, 2001.

MUSSATTO, S. I., DRAGONE, G., GUIMARÃES, P. M. R., SILVA, J. P. A., CARNEIRO, L. M., ROBERTO, I. C., VICENTE, A., DOMINGUES, L., TEIXEIRA, J. A. Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production. *Biotechnology Advances*, v. 28, p. 817-830, 2010.

NEDBAL, L., TRÍTLEK, M., ČERVENÝ, J., KOMÁREK, O., PAKRASI, H. B. A photobioreactor system for precision cultivation of photoautotrophic microorganisms and for high-content analysis of suspension dynamics. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 100, n. 5, p. 902-910, 2008.

NOAA (NATIONAL OCEANIC AND ATMOSPHERIC ADMINISTRATION). Trends in Atmospheric Carbon Dioxide. Disponível em: <http://www.esrl.noaa.gov/gmd/ccgg/trends/global.html>. Acesso em: 29 de dezembro de 2012. 2012.

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

RFA (RENEWABLE FUELS ASSOCIATION). 2012 Ethanol Industry Outlook. 2012. Disponível em: <http://www.ethanolrfa.org/pages/annual-industry-outlook>. Acesso em: 18 de janeiro de 2013.

RIPPKA, R., DERUELLES, J., WATERBURY, J. B., HERDMAN, M., STANIER, R. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *Journal of General Microbiology*, v. 111, p. 1-61, 1979.

SÁNCHEZ, O. J., CARDONA, C. A. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresource technology*, v. 99, p. 5270-5295, 2008.

SOCOLOW, R., GREENBLATT, J., PACALA, S. "Wedges": Early mitigation with familiar technology. *Greenhouse Gas Control Technologies*, v. 2, p. 1983-1986, 2005.

VOLTOLINA, D., CORDERO, B., NIEVES, M., SOTO, L. P. Growth of *Scenedesmus* sp. in artificial wastewater. *Bioresource Technology*, v. 68, n. 3, p. 265-268, 1999.

WONG, J. P. K., WONG, Y. S., TAM, N. F. Y. Nickel biosorption by two *Chlorella* species, *C. vulgaris* (a commercial species) and *C. miniata* (a local isolate). *Bioresource Technology*, v. 73, n. 2, p. 133-137, 2000.

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

ZEPKA, L. Q., JACOB-LOPES, E., GOLDBECK, R., QUEIROZ, M. I. Production and biochemical profile of the microalgae *Aphanothecum microscopica* Nägeli submitted to different drying conditions. *Chemical Engineering and Processing*, v. 47, p. 1305-1310, 2008.

ZHOU, N., ZHANG, Y., WU, X., GONG, X., WANG, Q. Hydrolysis of *Chlorella* biomass for fermentable sugars in the presence of HCl and MgCl₂. *Bioresource Technology*, v. 102, n. 21, p. 10158-10161, 2011.

Capítulo 7 – Anexo

- Curva de calibração para determinação de concentração de biomassa em espectrofotômetro

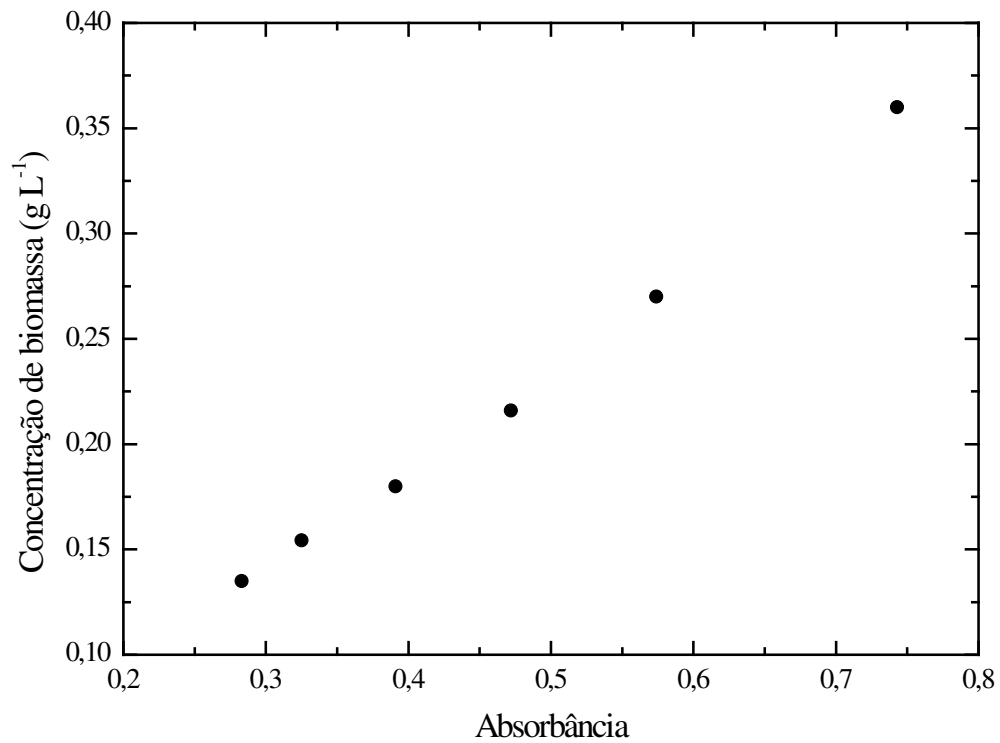


Figura 29 – Curva de calibração para determinação da concentração de biomassa

A Equação 16 mostra a expressão obtida para a curva de calibração, onde C é a concentração de biomassa seca e ABS é a absorbância lida no espectrofotômetro a 682 nm. O coeficiente de determinação R^2 é de 0,9966.

$$C = 0,4883ABS - 0,0077 \quad (16)$$

- Gerenciamento de resíduos

Durante a execução deste projeto, quatro tipos principais de resíduos foram identificados:

- 1) Meios de cultura esgotados e com suspensão de microalgas: por se tratarem de soluções aquosas diluídas e por poderem conter microalgas em diferentes concentrações, todos os meios de cultura foram autoclavados a 121 °C por 15 min antes de serem descartados na pia.
 - 2) Fase móvel de HPLC para análise de açúcares: este resíduo é composto basicamente por uma solução aquosa de H₂SO₄ em baixa concentração (cerca de 5mM), tendo sido descartado diretamente na pia.
 - 3) Fase móvel de HPLC para análise de inibidores de fermentação: o resíduo é composto por acetonitrila em água na proporção de 1:8 e 1% de ácido acético (v/v). De acordo com a NBR 10004, a acetonitrila é um composto que confere periculosidade aos resíduos. Desta forma, todo o volume de fase móvel gerado teve seu pH neutralizado, sendo posteriormente acondicionado em bombona de 20 L para recolhimento e tratamento futuros.
 - 4) Resíduos de análise de lipídios através do método de BligheDyer modificado: os cerca de 400 mL de resíduo gerados nesta análise são compostos por água, metanol, uma fração de sólidos proveniente da biomassa de microalgas e clorofórmio. Como o clorofórmio confere periculosidade aos resíduos, segundo a NBR 10004, esta mistura foi acondicionada em frasco âmbar de 1 L, etiquetada e armazenada para recolhimento e tratamento futuros.
-