

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica

Área de Tecnologia de Fermentações

**Estudo da produção de biomassa e lipídios no cultivo de  
*Neochloris oleoabundans* sob diferentes condições de estresse  
nutricional e físico.**

**Iván Alejandro Avila León**

Tese para obtenção do grau de

**DOUTOR**

Orientador:

Prof. Dr. João Carlos Monteiro de Carvalho

São Paulo

2014

Iván Alejandro Avila León

Estudo da produção de biomassa e lipídios no cultivo de *Neochloris oleoabundans* sob diferentes condições de estresse nutricional e físico

Versão corrigida

Comissão Julgadora  
da  
Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof. Dr. João Carlos Monteiro de Carvalho  
orientador/presidente

---

1º. examinador

---

2º. examinador

---

3º. examinador

---

4º. examinador

São Paulo, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2014.

**Ficha Catalográfica**

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e  
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Avila León, Iván Alejandro

A958es Estudo da produção de biomassa e lipídios no cultivo de *Neochloris oleoabundans* sob diferentes condições de estresse nutricional e físico / Iván Alejandro Avila León. -- São Paulo, 2014.  
107p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica.

Orientador: Carvalho, João Carlos Monteiro de

1. Microbiologia industrial 2. Biotecnologia I. T. II. Carvalho, João Carlos Monteiro de, orientador.

660.6 CDD

“The secret of genius is to carry the spirit of the child into old age, which means never losing your enthusiasm.”

— Aldous Huxley

“I am so clever that sometimes I don't understand a single word of what I am saying.”

— Oscar Wilde

## AGRADECIMENTOS

À Ana e ao Samuel, por serem os motores físicos e emocionais da minha vida pessoal e acadêmica.

Ao Prof. Dr. João Carlos Monteiro de Carvalho, pela ajuda, compreensão, apoio e paciência, pela disposição para sempre ajudar e por me transmitir seu conhecimento e experiência.

Aos meus companheiros do laboratório pela pronta ajuda, a resolução de dúvidas, o apoio logístico, os conhecimentos compartilhados, as risadas, as comemorações, o sorriso apesar da angústia, as conversações furadas e especialmente pela amizade sincera.

Ao pessoal de iniciação científica pelo apoio nos experimentos e nas análises, pela paciência com minha bagunça e meu sotaque e pela amizade.

Ao Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica e seus funcionários, pelos serviços prestados, a celeridade do seu trabalho e sua disposição.

Aos meus amigos e irmãos, na distancia ou na proximidade, por sempre estarem prontos a me apoiar, pela força e o carinho que me permitiu continuar.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos que me possibilitou realizar o doutorado.

A todos os envolvidos e desenvolvidos.

*Gracias totales.*  
- G. Cerati

## RESUMO

AVILA-LEON, I.A. 2014. **Estudo da produção de biomassa e lipídios no cultivo de *Neochloris oleoabundans* sob diferentes condições de estresse nutricional e físico**. 107p. (Tese de Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

As microalgas são candidatas promissoras para a produção em larga escala de biocombustíveis devido a sua alta eficiência fotossintética. No entanto, os custos relativamente altos de produção por baixas produtividades em lipídios têm sido um dos principais obstáculos que impedem sua produção comercial. Portanto, é necessário focar a pesquisa no aumento da biomassa e na produtividade em lipídios, através do desenvolvimento de biorreatores e técnicas de cultivo inovadoras. Numa primeira fase, este estudo mostra a otimização dos regimes de adição de nutrientes no cultivo de *Neochloris oleoabundans* em fotobiorreatores tubulares, determinando que a melhor metodologia de adição de CO<sub>2</sub> é adicionando-o de forma intermitente e automatizada, enquanto que o melhor processo de alimentação de nitrogênio é por meio de um processo em batelada alimentada tomando como uma referência a produtividade diária de biomassa. Na segunda etapa, foi testada a influência de agentes estressores adicionados ao cultivo sob carência de nitrogênio, tais como tiosulfato de sódio como agente redutor e cloreto de sódio e glicerina como agentes de choque osmótico, buscando um acúmulo de lipídios na biomassa. Os resultados mostraram que o tiosulfato de sódio em 1,2 mM e o cloreto de sódio em 2,2 mM aumentaram o total de lipídios em 21% e 25%, respectivamente. Finalmente, foram testados diferentes regimes de luz, com um esquema 12:12, sendo 12 horas de luz fluorescente e 12 horas com um sistema distinto: escuro, diodos emissores de luz (LED) vermelha e LED branca. Os melhores resultados foram obtidos com LED branca, com um acúmulo de lipídios de até 27% da biomassa seca e uma concentração final de células de 2335mg/L, estabelecendo assim um método de iluminação econômica com alta produtividade (145mg / L dia).

*Palavras-chave:* microalgas, fotobiorreatores, tiosulfato de sódio, choque osmótico, diodos emissores de luz (LED).

## ABSTRACT

AVILA-LEON, I.A. 2014. **Investigation on biomass and lipids accumulation in *Neochloris oleoabundans* cultivation under different nutritional and physical stress conditions.** 107p (Tese de Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Microalgae are promising candidates for large-scale global biofuel production because of their high photosynthetic efficiency. However, relatively high production costs due to low lipid productivity have been one of the major obstacles impeding their commercial production. Therefore, it is necessary to accurate the research into an increase in biomass and oil productivity, by means of novel bioreactors' design and cultivation techniques. On a first stage, this study shows the optimization of nutrients' addition regimes in *Neochloris oleoabundans* cultivation in tubular photobioreactors, finding that the best CO<sub>2</sub> addition methodology is an automatized intermittent adding and the best feeding process for nitrogen is a fed-batch process taking as a reference the daily biomass productivity. On the second step, it was tested the influence of stressing agents added to the culture under nitrogen starvation, such as sodium thiosulphate for reducing environment and sodium chloride and glycerol for osmotic shock, aiming lipid accumulation in the biomass. The results showed that sodium thiosulphate at 1,2mM and sodium chloride at 2,2mM raised the total lipids up to 21% and 25% respectively. Finally, there were tested different light regimes, with a scheme 12:12, being 12 hours of fluorescent light and 12 hours of a singular system: dark, red light-emitting-diodes (LED) and white LED. The best results were obtained with white LED, with an accumulation up to 27% of dry biomass and a final cell concentration up to 2335mg/L, establishing an economic illumination method with high productivity.

**Keywords:** microalgae, photobioreactors, sodium thiosulphate, osmotic shock, light-emitting-diodes (LED).

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Reação de transesterificação	19
<b>Figura 2</b>	Via metabólica da síntese <i>de novo</i> de ácidos graxos em microalgas	25
<b>Figura 3</b>	Biossíntese de triglicerídeos em microalgas	27
<b>Figura 4</b>	<i>Neochloris oleoabundans</i>	29
<b>Figura 5</b>	Absorbância ótima para a medição da concentração celular no cultivo de <i>N. oleoabundans</i>	47
<b>Figura 6</b>	Curva de calibração para a determinação da concentração celular no cultivo de <i>N. oleoabundans</i>	48
<b>Figura 7</b>	Curva de calibração para a determinação da concentração de nitrato de sódio	49
<b>Figura 8</b>	Curva de calibração para determinação da concentração de amônia total	49
<b>Figura 9</b>	Curvas de crescimento de <i>N. oleoabundans</i> sob concentrações 3 (3N), 6 (6N), 9 (9N) e 12 (12N) vezes maiores à concentração de nitrato de sódio no meio padrão (1N)	53
<b>Figura 10</b>	Curvas de crescimento de <i>N. oleoabundans</i> sob concentrações (3N), 6 (6N) e 9 (9N) vezes maiores à concentração de nitrato de sódio no meio padrão (1N).	54
<b>Figura 11</b>	pH em função do tempo para os cultivos de <i>N. oleoabundans</i> sob diferentes concentrações de nitrato de sódio.	55
<b>Figura 12</b>	Curvas de crescimento de <i>N. oleoabundans</i> sob diferentes concentrações de nitrato de sódio.	56
<b>Figura 13</b>	pH em função do tempo para os cultivos de <i>N. oleoabundans</i> sob diferentes concentrações de fosfatos.	57
<b>Figura 14</b>	Curvas de crescimento de <i>N. oleoabundans</i> em erlenmeyer sob diferentes proporções N:P, tendo fixada a concentração de nitrogênio em 3N.	60

<b>Figura 15</b>	Curvas de crescimento de <i>N. oleoabundans</i> em erlenmeyer sob diferentes proporções N:P, tendo fixada a concentração de nitrogênio em 6N.	61
<b>Figura 16</b>	Concentração celular e pH em função do tempo no cultivo em fotobiorreator tubular, com meio padrão.	64
<b>Figura 17</b>	Concentração celular e pH em função do tempo no cultivo em fotobiorreator tubular, com nitrato de sódio (3N:3P)	64
<b>Figura 18</b>	Concentração celular e pH em função do tempo no cultivo em fotobiorreator tubular, com sulfato de amônio (3N:3P).	66
<b>Figura 19</b>	Concentração celular e pH em função do tempo no cultivo em fotobiorreator tubular, com nitrato de amônio (3N:3P).	66
<b>Figura 20</b>	Curva de crescimento de <i>N. oleoabundans</i> sob regime de adição constante de CO <sub>2</sub> (os losangos abertos correspondem ao valor de pH corrigido diariamente e os fechados correspondem aos valores de pH antes da correção).	69
<b>Figura 21</b>	Curva de crescimento de <i>N. oleoabundans</i> sob regime de adição constante de CO <sub>2</sub> (os losangos abertos correspondem ao valor de pH corrigido diariamente e os fechados correspondem aos valores de pH antes da correção)	70
<b>Figura 22</b>	Concentração celular em função do tempo no cultivo <i>N. oleoabundans</i> sem (A) e com (B) o sistema automatizado de adição de CO <sub>2</sub>	71
<b>Figura 23</b>	Concentração celular em função do tempo no cultivo de <i>N. Oleoabundans</i> sob diferentes regimes de alimentação de nitrogênio	72
<b>Figura 24</b>	Porcentagem de lipídeos totais em função do tiosulfato de sódio adicionado no cultivo de <i>N. oleoabundans</i>	75

<b>Figura 25</b>	Porcentagem de lipídeos totais em função do glicerol adicionado no cultivo de <i>N. oleoabundans</i>	77
<b>Figura 26</b>	Porcentagem de lipídeos totais em função do cloreto de sódio adicionado no cultivo de <i>N. oleoabundans</i>	78
<b>Figura 27</b>	Concentração celular em função do tempo no cultivo de <i>N. oleoabundans</i> sob adição de tiosulfato de sódio.	79
<b>Figura 28</b>	Concentração celular em função do tempo no cultivo de <i>N. oleoabundans</i> sob compostos que aumentam a osmolaridade do meio	79
<b>Figura 29</b>	Porcentagem de lipídios totais, proteínas e carboidratos no cultivo sem adição de agente estressor.	82
<b>Figura 30</b>	Porcentagem de lipídios totais, proteínas e carboidratos nos cultivos com adição de tiosulfato de sódio.	83
<b>Figura 31</b>	Porcentagem de lipídios totais, proteínas e carboidratos sob diferentes condições de aumento osmótico	84
<b>Figura 32</b>	Concentração celular em função no tempo no cultivo de <i>N. oleoabundans</i> sob diferentes regimes de luz.	87
<b>Figura 33</b>	Porcentagem de lipídeos totais, proteínas e carboidratos sob diferentes regimes de luz	89

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1</b>	Comparação dos processos de produção do biodiesel pelas rotas metílica e etílica na reação de transesterificação	21
<b>Tabela 2</b>	Composições lipídicas de diversos óleos vegetais	22
<b>Tabela 3</b>	Concentração dos agentes utilizados para gerar um ambiente favorável ao acúmulo de lipídios	46
<b>Tabela 4</b>	Parâmetros de crescimento para os cultivos de <i>N. oleoabundans</i> sob diferentes proporções de nitrato e fosfato	60
<b>Tabela 5</b>	Concentração celular máxima e produtividade em células para os ensaios em fotobiorreatores tubulares, empregando diferentes fontes de nitrogênio.	68
<b>Tabela 6</b>	Comparação dos parâmetros de crescimento e avaliação da biomassa em fotobiorreator com e sem o sistema de adição de CO <sub>2</sub> .	71
<b>Tabela 7</b>	Parâmetros de crescimento e avaliação da biomassa nos cultivos com diversos tempos de adição de tiosulfato de sódio 2.5mM	74
<b>Tabela 8</b>	Parâmetros de crescimento e teor proteico nos cultivos com diversas concentrações de tiosulfato de sódio	74
<b>Tabela 9</b>	Parâmetros de crescimento nos cultivos com diversas concentrações de glicerol	77
<b>Tabela 10</b>	Parâmetros de crescimento nos cultivos com diversas concentrações de cloreto de sódio	78
<b>Tabela 11</b>	Parâmetros de crescimento nos cultivos sob diferentes condições de estresse ambiental	81
<b>Tabela 12</b>	Parâmetros de crescimento nos cultivos sob diferentes regimes de luz	88
<b>Tabela 13</b>	Perfil de ácidos graxos na biomassa de <i>N. oleoabundans</i> nos cultivos com Tiosulfato de sódio	92

<b>Tabela 14</b>	Perfil de ácidos graxos na biomassa de <i>N. oleoabundans</i> nos cultivos com cloreto de sódio e glicerol.	93
<b>Tabela 15</b>	Perfil de ácidos graxos na biomassa de <i>N. oleoabundans</i> nos cultivos com diferentes regimes de luz.	94

**LISTA DE ABREVIÇÕES E SIMBOLOS**

$X_m$	concentração celular máxima ( $\text{mg.L}^{-1}$ )
$P_x$	produtividade em células ( $\text{mg.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ )
$Y_{X/N}$	fator de conversão de nitrogênio em células ( $\text{mg.mg}^{-1}$ )
$X_i$	concentração celular inicial ( $\text{mg.L}^{-1}$ )
$X_f$	concentração celular final ( $\text{mg.L}^{-1}$ )
$\mu_{\text{max}}$	velocidade específica de crescimento máxima ( $\text{dia}^{-1}$ )
LED	diodos emissores de luz

## SUMARIO

1.	INTRODUÇÃO	17
2.	REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1.	Biodiesel	19
2.1.1.	Tecnologia para a produção de biodiesel	20
2.1.2.	Reação de transesterificação	20
2.1.3.	Matérias-primas na produção de biodiesel	22
2.2.	Microalgas como matéria-prima para a produção de biodiesel	23
2.2.1.	Metabolismo dos lipídeos	25
2.2.2.	Características de <i>Neochloris oleoabundans</i>	28
2.2.2.1.	Distribuição e histórico	28
2.2.2.2.	Taxonomia	29
2.2.2.3.	Morfologia	29
2.2.2.4.	Composição	30
2.2.2.5.	Aplicações	31
2.2.2.6.	Condições de cultivo	31
2.2.3.	Produção de biomassa de microalgas	32
2.2.3.1.	Fatores nutricionais associados à produção de lipídeos	32
2.2.3.1.1.	Nitrogênio	32
2.2.3.1.2.	Fósforo	34
2.2.3.2.	Fatores ambientais associados à produção de lipídeos	34
2.2.3.2.1.	Temperatura	34
2.2.3.2.2.	Intensidade luminosa	35
2.2.3.2.3.	Diodos de emissão de luz (LED)	36
2.2.3.2.4.	Agitação	37
2.2.3.2.5.	Compostos adicionados no cultivo	38
2.2.3.3.	Fotobiorreatores	39
3.	OBJETIVOS	40
4.	MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1.	Micro-organismo e manutenção da cultura	41

4.2.	Meio de cultivo	41
4.3.	Ativação da cepa e preparo do inóculo	42
4.4.	Ensaio em shaker para avaliação dos nutrientes no meio	42
4.5.	Ensaio com difusão de ar estéril	43
4.6.	Descrição do fotobiorreator utilizado	43
4.7.	Ensaio de adição de CO <sub>2</sub> em fotobiorreatores	44
4.8.	Ensaio em fotobiorreatores com diversas fontes de nitrogênio	44
4.9.	Ensaio em fotobiorreatores com diferentes formas de adição de nitrogênio	45
4.10.	Ensaio em Erlenmeyer com adição de agentes indutores de estresse no cultivo	45
4.11.	Ensaio em fotobiorreatores com adição de agentes indutores de estresse	46
4.12.	Ensaio em fotobiorreatores com diversos regimes de luz	46
4.13.	Acompanhamento do cultivo	47
4.13.1.	Padronização da densidade ótica	47
4.13.2.	Construção da curva de calibração para determinação da concentração celular	47
4.13.3.	Curva de calibração para determinação do nitrato residual	48
4.13.4.	Determinação da concentração de amônia total	49
4.14.	Avaliação da biomassa obtida	50
4.14.1.	Lipídeos totais	50
4.14.2.	Proteínas totais	50
4.14.3.	Determinação de teor de cinzas	51
4.14.4.	Determinação de teor de carboidratos	51
4.14.5.	Determinação de composição de ácidos graxos	51
4.15.	Análise estatística dos resultados	52
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
5.1.	Otimização do inóculo	53
5.1.1.	Ensaio em shaker	53

5.1.2.	Ensaio com difusão de ar	58
5.2.	Cultivo de <i>N. oleoabundans</i> em fotobiorreatores com diferentes fontes de nitrogênio	63
5.3.	Ensaio de adição de CO <sub>2</sub> em fotobiorreatores	68
5.4.	Cultivo de <i>N. oleoabundans</i> em foto biorreatores com diferentes regimes de adição de nitrogênio	71
5.5.	Ensaio em Erlenmeyer com indução de estresse ambiental	73
5.5.1.	Adição de tiosulfato de sódio no cultivo	73
5.5.2.	Adição de Glicerol	75
5.5.3.	Adição de Cloreto de sódio	77
5.6.	Cultivo em fotobiorreatores sob condições de estresse ambiental	78
5.7.	Ensaio em fotobiorreatores com diversos regimes de luz	86
5.8.	Perfil de ácidos graxos	92
6.	CONCLUSÕES	96
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97

## 1. INTRODUÇÃO

Atualmente o planeta se encontra em uma conjuntura energética crítica, devido aos frequentes incrementos no preço do petróleo. O preço do petróleo aumentou de cerca de US\$ 82 por barril no final de novembro de 2010 para mais de US\$ 112 por barril em abril de 2011. Em 2020, o preço do petróleo bruto nos Estados Unidos deve chegar a 108 dólares por barril e US\$125 por barril em 2035. A demanda mundial de energia aumentará em um terço entre 2010 e 2035 e as emissões de CO<sub>2</sub> relacionadas com essa demanda aumentarão em 20%, seguindo a trajetória constante de aumento da temperatura média global superior a 3,5°C (INTERNATIONAL ENERGY OUTLOOK, 2011). Conseqüentemente, pesquisadores do mundo todo têm buscado fontes de energia renováveis, em que se possa diminuir a emissão de gases de efeito estufa na atmosfera. Por esta razão, muitos países têm começado a tomar uma série de medidas para resolver este problema, pois encontrar fontes alternativas de energia é um objetivo indispensável, em especial para aquelas nações que não são autossuficientes em combustíveis (HUANG *et al.*, 2010). Um bom exemplo disso é a ampla atenção dada à indústria alcooleira. O etanol voltou a ocupar um lugar de destaque no cenário energético do Brasil e, com a demanda crescente, governo, usineiros e empresários do setor empenham-se em aumentar a produção de álcool (OLIVEIRA & VASCONCELOS, 2006).

Além do etanol, o biodiesel é um combustível renovável que merece maior atenção, pois aparece como uma boa fonte de energia alternativa por diversas razões. Primeiro, ao ser um combustível sustentável, pode ser fornecido constantemente. Segundo, o biodiesel tem propriedades ambientais favoráveis, pois sua produção não contribui no aumento do CO<sub>2</sub> e possui pouco conteúdo de enxofre, podendo reduzir a liberação destes dois compostos em 30% e 10% respectivamente, empregando-o como fonte energética. Terceiro, sua importância econômica está garantida graças ao aumento dos preços do petróleo. Quarto, o biodiesel é melhor que o diesel de

petróleo em termos de ponto de fulgor e biodegradabilidade (HUANG *et al.*, 2010).

Portanto, seja pela exaustão das reservas ou pelos efeitos negativos causados ao meio ambiente, a diversificação da matriz energética mundial, por meio da busca por fontes renováveis de energia, se faz absolutamente imprescindível (da SILVA, 2009), figurando dentre as possíveis alternativas os biocombustíveis líquidos derivados de fontes alternativas, como o biodiesel derivado de microalgas.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. Biodiesel

Quimicamente, o biodiesel é definido como éster monoalquílico de ácidos graxos derivados de lipídeos de ocorrência natural e pode ser produzido, juntamente com a glicerina, pela reação de triacilgliceróis (ou triglicerídeos) com álcool, comumente etanol ou metanol, na presença de um catalisador ácido ou básico (Figura 1) (SCHUCHARDT *et al.*, 1998). Como característica principal, os ácidos graxos que darão origem ao biodiesel devem ser derivados de fontes renováveis, sejam estes óleos vegetais, gorduras animais ou micro-organismos; nestas matérias-primas, a glicerina formada corresponde de 15 a 20% do óleo, a qual é removida na transesterificação (PARENTE, 2003). A grande compatibilidade do biodiesel com o diesel convencional o caracteriza como uma alternativa capaz de atender à maior parte da frota de veículos a diesel já existente no mercado, sem qualquer necessidade de investimentos tecnológicos no desenvolvimento dos motores (CHRISTOFF, 2006).

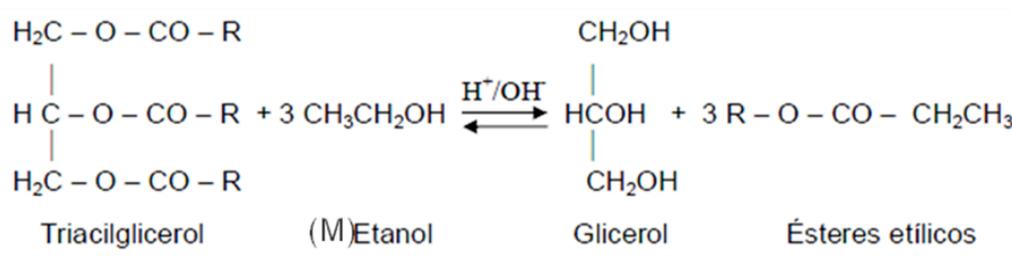


Figura 1: Reação de transesterificação (CHRISTOFF, 2006).

A qualidade do biodiesel obtido a partir da reação de transesterificação está relacionada com a qualidade da matéria-prima que lhe deu origem. Parâmetros químicos e físico-químicos de óleos vegetais como viscosidade, ponto de fusão, estabilidade térmica e índice de cetano, que permitem prever o comportamento de um dado óleo vegetal quanto a sua decomposição e manuseio, estão relacionados com a sua composição química (CHRISTOFF, 2006).

O marco legal do uso do biodiesel foi respaldado pelo Congresso Brasileiro e regulamentado pela Lei 11.097 de 13/01/2005. Essa lei introduz o

biodiesel na matriz energética brasileira e estabelece o percentual mínimo obrigatório de adição de biodiesel ao óleo Diesel fixado em 2% desde Janeiro/2008. Houve antecipação da obrigatoriedade da adição de 5% de biodiesel ao diesel (B-5) de 2013 para 2010, de acordo com a Resolução ANP Nº 4 de 22/02/2010, devido ao aumento do preço do óleo de soja que poderá resultar no incremento dos custos de produção do biocombustível. Em 2013 a Europa produziu 10,5 bilhões de litros de biodiesel (42% do total produzido mundialmente) e os Estados Unidos produziram 4,8 bilhões de litros (17%), seguidos pela Alemanha e o Brasil, os quais aumentaram sua produção de biodiesel em 16% e 5%, para 3,1 bilhões de litros e 2,9 bilhões de litros, respectivamente. A Argentina foi o quarto maior produtor com 2,3 bilhões de litros. No entanto, a produção da Argentina diminuiu quase 10% em relação a 2012, como resultado de direitos anti-dumping impostos pela Comissão Europeia sobre as importações de biodiesel argentino e norte americano (REN 21, 2014).

### **2.1.1. Tecnologia para a produção de biodiesel**

O biodiesel, como explicado anteriormente, pode ser obtido através da reação de óleos vegetais com um intermediário ativo formado pela reação de um álcool com um catalisador, processo conhecido como transesterificação.

### **2.1.2. Reação de transesterificação**

Industrialmente, o processo mais tradicional para a produção do biodiesel é baseado na transesterificação alcalina em meio homogêneo, geralmente utilizando óxidos comerciais ou hidróxidos (NaOH ou KOH) para geração dos alcóxidos correspondentes e variando-se o tipo de óleo vegetal, de acordo com a região (SCHUCHARDT *et al.*, 1998).

A reação na qual o éster é transformado em outro ocorre pela mudança na porção alcóxi. Esta reação é composta por três reações consecutivas e reversíveis, nas quais são formados, respectivamente, diacilgliceróis e monoacilgliceróis como intermediários de reação. Assim, os triésteres de ácidos graxos que compõem os óleos vegetais são transformados em

monoésteres e glicerina (SCHUCHARDT *et al.*, 1998). O rendimento da reação dependerá do deslocamento do equilíbrio químico em favor dos ésteres produzidos, a partir da otimização de parâmetros como a temperatura da reação e a concentração efetiva do catalisador, bem como o excesso estequiométrico do agente de transesterificação (3:1 álcool:lipídeo) e a agitação do meio (da SILVA, 2009).

Um catalisador é normalmente usado para acelerar a reação, podendo ser de natureza básica, ácida ou enzimática. O hidróxido de sódio é o catalisador mais usado tanto por razões econômicas como pela sua disponibilidade no mercado. As reações com catalisadores básicos são mais rápidas do que as com catalisadores ácidos. Somente álcoois simples, tais como metanol, etanol, propanol, butanol e amil-álcool, podem ser usados na transesterificação. Sob o ponto de vista técnico, o metanol é mais frequentemente utilizado por razões de natureza física e química (cadeia curta e polaridade). Contudo, o etanol está se tornando mais popular, por ser de origem renovável e muito menos tóxico que o metanol (CHRISTOFF, 2006).

Na Tabela 1, são apresentadas as vantagens técnicas e econômicas da rota metílica sobre a etílica, levando em conta a produção nos EUA.

Tabela 1: Comparação dos processos de produção do biodiesel pelas rotas metílica e etílica na reação de transesterificação

Quantidades e Condições Usuais Médias Aproximadas	Rotas de Processo	
	Metílica	Etílica
Quantidade consumida de álcool para produção de 1.000 litros de biodiesel	90 kg	130 kg
Preço médio do álcool, U\$/kg*	190	360
Excesso recomendado de álcool, recuperável, por destilação, após reação	100%	650%
Temperatura recomendada de reação	60 °C	85 °C
Tempo de reação	45 minutos	90 minutos

\* Cotação nos EUA.

Fonte: PARENTE (2003)

### 2.1.3. Matérias-primas na produção de biodiesel

De uma forma geral, ésteres alquílicos de ácidos graxos podem ser produzidos a partir de qualquer tipo de óleo vegetal; porém, nem todo óleo vegetal pode ser utilizado como matéria-prima para a produção de biodiesel. Portanto, ao se pensar em propor uma fonte de oleaginosa, deve-se ter a clareza do atendimento a três aspectos fundamentais: (i) as viabilidades técnica e econômica para a produção agrícola da oleaginosa; (ii) as viabilidades técnica e econômica para a extração do óleo e transformá-lo em biodiesel; e (iii) as garantias de que a qualidade do biocombustível produzido será compatível com o seu uso em motores veiculares ou estacionários. Se um desses três aspectos não for contemplado adequadamente, a fonte oleaginosa em questão não deverá ser considerada adequada para a produção de biodiesel (SUAREZ, 2007). Na Tabela 2 são apresentados diversos óleos vegetais e suas as composições lipídicas.

Tabela 2. Composições lipídicas de diversos óleos vegetais.

	Fatty-Acid Content of each oil by type of fatty acid chain (in percent)*							
	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3	20:0	20:1	22:1
<u>Oilseed</u>								
Canola								
Winter <sup>a</sup>	6	0	61	22	7	0	0	0
Spring <sup>a</sup>	6	0	61	22	7	0	0	0
Flax								
Linsed (High-linolenic) <sup>b</sup>	5	3	16	15	60	0	0	1
Solin/Linola (Low-linolenic) <sup>b</sup>	10	5	16	65	2	0	0	0
Camelina <sup>a</sup>	8	3	17	23	31	0	12	3
Yellow Mustard <sup>c</sup>	3	1	28	10	10	0	11	32
Safflower <sup>d</sup>	7	2	14	77	0	0	0	0
Sunflower <sup>b</sup>	6	4	17	72	0	0	0	0
Soybean (for comparison) <sup>d</sup>	14	2	23	56	4	0	0	0

\* Fatty acids chain types are described as X:Y where X denotes the number of carbon atoms and Y the number of double bonds. Source: (a) Ehrensing, D. (2007a); (b) Ehrensing, D. (2007b); (c) Idaho, University of (2003); (d) Demirbas (2002).

Fonte: Jaeger e Siegel, 2008.

Alguns óleos vegetais apresentam propriedades não desejáveis para a produção de biodiesel, como altos números de iodo e altas viscosidades, uma vez que estas são transferidas para o biocombustível produzido. O número de iodo revela o grau de insaturação de uma determinada amostra, podendo indicar que esta é susceptível à oxidação e, portanto, instável para o armazenamento por longos períodos e inadequado para uso direto em motores do ciclo Diesel. Do mesmo modo, altas viscosidades derivadas de ácidos graxos de cadeia longa, como a do biodiesel produzido a partir de óleo de mamona ( $\sim 14 \text{ mm}^2/\text{s}$ ), evitam que o combustível seja atomizado de forma eficiente no interior da câmara de combustão, gerando acúmulos nos filtros de combustível e nos sistemas de injeção e comprometendo, assim, o desempenho e a vida útil do motor (da SILVA, 2009). Por este motivo, o biodiesel de óleo de mamona necessita ser misturado com diesel de petróleo ou com outro éster de menor viscosidade para ter alguma aplicação prática (SUAREZ, 2007).

## **2.2. Microalgas como matéria-prima para a produção de biodiesel**

As microalgas são os mais eficientes produtores biológicos de óleo do planeta e podem ser uma das mais importantes fontes de combustíveis renováveis (GOUVEIA E OLIVEIRA, 2009) devido a sua alta eficiência fotossintética, altas produtividades de biomassa, velocidades de crescimento maiores que as das plantas superiores, maior taxa de fixação de  $\text{CO}_2$  e produção de  $\text{O}_2$ , crescimento em meios líquidos de fácil manuseio; seu cultivo tem adaptabilidade a ambientes adversos não adequados para cultivos convencionais, empregam água não potável e incluso águas residuais para seu cultivo, e finalmente, as microalgas não competem por solo nem água com cultivos tradicionais e de alimentação (HU *et al.*, 2008).

O uso de microalgas e cianobactérias para a produção de biodiesel é uma alternativa a ser aplicada, pois estes micro-organismos são ricos em lipídeos que podem ser convertidos a biodiesel (CHISTI, 2007). Os lipídeos e os ácidos graxos nas células cumprem funções estruturais, como moléculas de armazenamento, metabólitos e fontes de energia (BECKER, 1994). O

conteúdo de óleo em algumas espécies pode atingir até 70% da massa seca (embora associados com baixas produtividades em biomassa), valores muito mais altos do que os conteúdos das plantas oleaginosas mais utilizadas para o biodiesel, como a soja e a palma (CHISTI, 2008), tendo as microalgas produtividades entre 10 e 20 vezes maiores quando comparados com sementes oleaginosas e/ou óleos vegetais (GOUVEIA E OLIVEIRA, 2009).

Espécies comuns como *Chlorella*, *Cryptocodinium*, *Cylindrotheca*, *Dunaliella*, *Isochrysis*, *Nannochloris*, *Nannochloropsis*, *Neochloris*, *Nitzschia*, *Phaeodactylum*, *Porphyridium*, *Schizochytrium* e *Tetraselmis* têm teores entre 20 e 50%, porém podem ser atingidas produtividades maiores (MATA *et al.*, 2010). As algas oleaginosas podem ser encontradas em diversos grupos taxonômicos, e o total do conteúdo lipídico pode variar consideravelmente entre espécies e cepas de iguais ou diferentes grupos. Das cepas estudadas como produtoras de óleo, a maioria pertence ao grupo das algas verdes, não pelo fato destas conterem maiores valores de lipídeos quando comparados com outros táxons, mas sim porque são espécies ubíquas em diversos hábitat, o que facilita seu isolamento (HU *et al.*, 2008).

Mais de 30.000 cepas diferentes de microalgas têm sido identificadas e a cada ano dezenas de novas espécies têm sido isoladas e caracterizadas. No entanto, somente algumas têm tido aplicação industrial, como *Chlorella*, *Spirulina*, *Dunaliella*, ou *Haematococcus*. O fator chave para exploração industrial destes micro-organismos é a operabilidade de grandes fotobiorreatores que possam multiplicar estas cepas e produzir assim, compostos bioquímicos valiosos (PULZ E GROSS, 2004).

A composição dos ácidos graxos das diferentes espécies é muito relevante, pois sua composição pode ter um efeito significativo nas características do biodiesel produzido. As rotas para a síntese de lipídeos em algas são análogas àquelas encontradas em plantas superiores, porém as algas respondem a flutuações nas condições de cultivo o a certos tipos de estresses ambientais, variando na composição dos ácidos graxos acumulados (BECKER, 1994). Os ácidos graxos presentes nas microalgas são principalmente saturados e insaturados com cadeias de 12 a 22 átomos de

carbono, dos grupos  $\omega 3$  e  $\omega 6$  (MATTA *et al.*, 2010). Thomas *et al.*, (1984) analisou a composição dos ácidos graxos de sete espécies de microalgas não marinhas, observando que todas elas sintetizavam os ácidos graxos C14:0, C16:0, C18:1, C18:2 e C18:3. Os mesmos pesquisadores determinaram que só algumas espécies produzem ácidos graxos diferenciados, como C16:4 e C18:4 em *Ankistrodesmus* sp., C18:4 e C22:6 em *Isochrysis* sp., C16:2, C16:3 e C20:5 em *Nannochloris* sp. e C16:2, C16:3, e C20:5 em *Nitzschia* sp.

### 2.2.1. Metabolismo dos lipídeos

Os lipídeos presentes na biomassa de microalgas são divididos em duas classes principais, com base em suas características químicas: polares e neutros (também citados como simples, ou apolares). Lipídeos neutros incluem o tri-, di- e mono- glicerídeos, ceras e isoprenóides (por exemplo, carotenoides). Lipídeos polares incluem fosfolipídios (por exemplo, fosfatidilinositol, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina) e glicolipídeos (como combinações de oligossacarídeos e lipídeos). Uma subcategoria importante de lipídeos polares são os glicolipídeos (por exemplo, monogalactosil-diglicerídeo), os quais ésteres de ácidos graxos e glicerol em que um dos grupos hidroxilo do glicerol é combinado com uma molécula de açúcar (neste caso galactose) para formar ligações éster com ácidos graxos (GREENWELL *et al.*, 2010).

Devido à diversidade de moléculas lipídicas, há um grande número de vias metabólicas envolvidas na sua biossíntese. A via que tem sido estudada em detalhe é a síntese *de novo* (GREENWELL *et al.*, 2010). Em microalgas, a síntese de novo de ácidos graxos ocorre principalmente no cloroplasto. Um esquema generalizado para a biossíntese de ácidos graxos é mostrado na Figura 2. No geral, a via produz ácidos graxos de 16 e/ou 18 átomos de carbono. Estes são usados como os precursores para a síntese de membranas celulares, bem como para a síntese de lipídeos neutros de armazenamento, principalmente triacilglicerol, que podem ser acumulados sob condições ambientais adversas ou sub-ótimas (HU *et al.*, 2008).

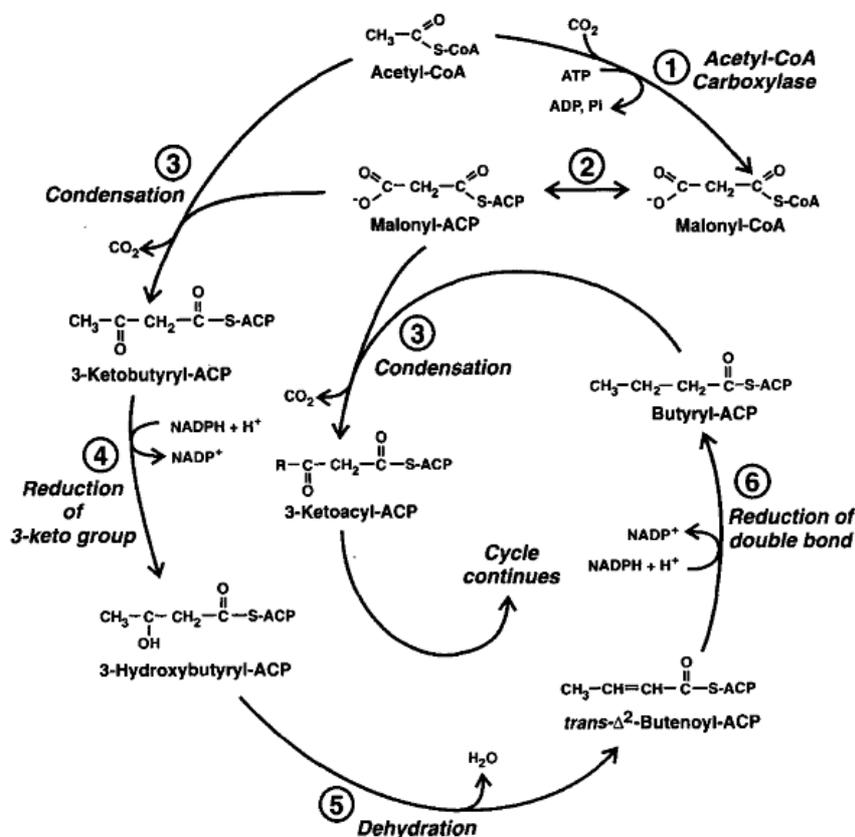


Figura 2: Via metabólica da síntese *de novo* de ácidos graxos em microalgas  
 FONTE: Ohlroge; Browse (1995)

De acordo com a figura 2, o primeiro passo na síntese de ácidos graxos é a formação de malonil-CoA a partir de acetil-CoA e  $\text{CO}_2$ , reação catalisada pela acetil-CoA carboxilase (ACCase). No cloroplasto a fotossíntese fornece uma fonte endógena de acetil-CoA, e mais do que uma via pode contribuir para manter o pool de acetil-CoA. É possível que o piruvato derivado da glicólise seja o foto metabolito principal a ser convertido para acetil-CoA. (HU *et al.*, 2008). A segunda reação é a transferência do grupo malonil da Coenzima-A a um co-fator proteico, o ACP. Em seguida ocorre a condensação de um acetil-CoA para formar um grupo acetoacetyl-ACP. Posteriormente, o acetoacetyl-ACP sofre redução do grupo carbonila no carbono 3 para formar D-beta-hidroxibutiril-ACP, reação dependente de NAPH. O quinto passo é a desidratação, onde os elementos da água são removidos de C-2 e C-3 do D- $\beta$ -hidroxibutiril-ACP para liberar uma dupla ligação no produto *trans*- $(\Delta)^2$ -butenoil-ACP; finalmente a dupla ligação do *trans*- $(\Delta)^2$ -butenoil-ACP é reduzido (saturado) para formar butiril-ACP pela

ação da enoil-ACP redutase, de novo, o NADPH é o doador de elétrons. (NELSON E COX, 2008)

Para produzir um ácido graxo insaturado, a ligação dupla é introduzida pela enzima estearoil-ACP dessaturase. O alongamento de ácidos graxos é terminado quando o grupo acilo é removido do ACP por uma acil-ACP tioesterase, que hidrolisa os acil ACP e libera ácidos graxos livres, como também pela ação de aciltransferases no cloroplasto que transferem o ácido graxo directamente da ACP para glicerol-3-fosfato ou monoacilglicerol-3-fosfato (OHLROGGE; BROWSE, 1995). A composição final do ácido graxo nas espécies de microalgas é determinada pelas atividades das enzimas que utilizam esses acil-ACPs na fase de terminação da síntese de ácido graxo (HU *et al.*, 2008).

Como qualquer planta ou animal, as microalgas podem sintetizar triglicerídeos como reserva de carbono e energia. Na figura 3 é possível observar a síntese deste composto. Em geral, L- $\alpha$ -fosfoglicerol e acetil-CoA são os principais precursores na biossíntese dos triglicerídeos. O L- $\alpha$ -fosfoglicerol deriva principalmente da fosfohidroxiacetona, um produto da glicólise. Um dos hidroxilo no L- $\alpha$ -fosfoglicerol reage com o acetil-CoA para formar o ácido lisofosfatídico e depois se combina com outro acetil-CoA para formar o ácido fosfatídico. Estas duas reações são catalisadas pela glicerol fosfato acil-transferase. Nas etapas seguintes, ácido Lisofosfatídico é hidrolisado pela fosfatidato fosfatase para formar um diglicérido que é depois condensado com um terceiro acetil-CoA para completar a biossíntese de triglicerídeos. O último passo da reação é catalisada pela última gliceril diéster transacilase (HUANG *et al.*, 2010)

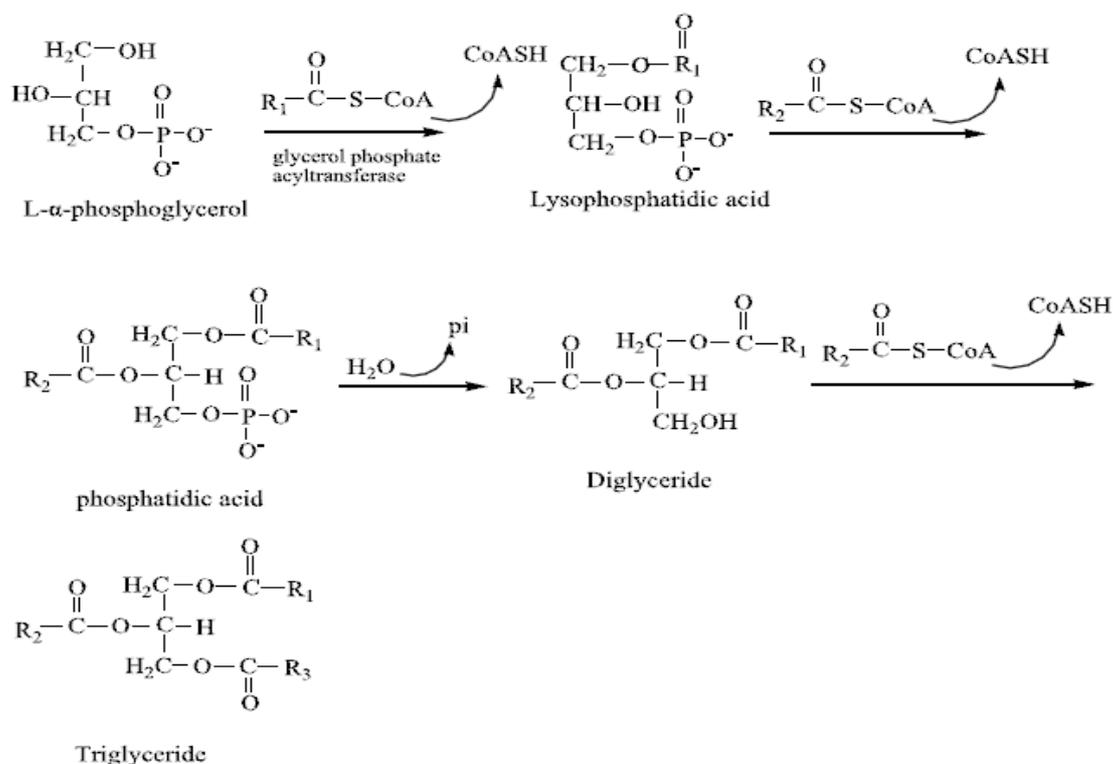


Figura 3: Biossíntese de triglicerídeos em microalgas.  
 FONTE: HUANG *et al.* (2010)

## 2.2.2. Características de *Neochloris oleoabundans*

### 2.2.2.1 Distribuição e histórico

De acordo com Archibald (1973), Starr em 1955 caracterizou pela primeira vez o gênero *Neochloris*, em um estudo comparativo de *Chlorococcales* formadores de zoósporos esféricos. Três anos mais tarde Bold e colaboradores definiram seis novas espécies: *N. gelatinosa*, *N. terrestris*, *N. fusispora*, *N. minuta*, *N. pyrenoidosa* e *N. alveolaris*. Durante os anos 60 foram descobertas mais quatro espécies: *N. pseudoalveolaris*, *N. oleoabundans*, *N. pseudostigmatica* e *N. cohaerens*. Estas microalgas são isoladas de ambientes aquáticos e terrestres (ARCHIBALD, 1973). Segundo Guiry (2012), a espécie *Neochloris oleoabundans* é uma espécie terrestre, tendo sido isolada em uma duna de areia na Arabia Saudita por Chantanachat e Bold (1962).

### 2.2.2.2 Taxonomia

Existem até o momento 19 nomes de espécies do gênero *Neochloris* na base de dados proposta por Garofalo e colaboradores (2009). Archibald (1973) indica 15 espécies morfológicamente diferentes, as quais são reconhecidas e aceitas taxonomicamente, sendo que a maioria das espécies são gelatinase positiva e amilase negativa, nas provas bioquímicas taxonômicas. A cepa *Neochloris oleoabundans* UTEX 1185, é classificada como do Phylum *Chlorophyta*, Classe *Chlorophyceae*, Ordem *Chlorococcales* e Família *Chlorococcaceae* (CHANTANACHAT, S. & BOLD, 1962).

### 2.2.2.3 Morfologia

Os atributos gerais deste gênero foram baseados na espécie *Neochloria aquática*: a) células vegetativas com cloroplastos esféricos e ocos, contendo pelo menos um pirenoide; b) formação de zoósporos sem paredes e com dois flagelos do mesmo tamanho. São identificados dois grupos dentro deste gênero, uninucleados e multinucleados, com diferenças na morfologia, na formação de grânulos e na espessura da parede celular. Possuem diferentes tamanhos celulares de acordo com a fase de crescimento (fase Log, fase estacionária e zoósporos), variando entre 5 e 75  $\mu\text{m}$ . A posição do núcleo nos zoósporos pode ser anterior, médio ou posterior (ARCHIBALD, 1973).

*Neochloris oleabundans* apresenta na sua fase Log um tamanho entre 5 e 8  $\mu\text{m}$ , com uma espessura na parede celular entre 0,5 e 1  $\mu\text{m}$ . Na fase estacionária seu tamanho atinge até 25  $\mu\text{m}$  e sua parede 1  $\mu\text{m}$ ; os zoósporos possuem o núcleo na parte anterior. A espécie produz vacúolos oleaginosos nas células velhas, é uninucleada e sua parede celular é mais espessa em um polo do que no outro (ARCHIBALD, 1973).

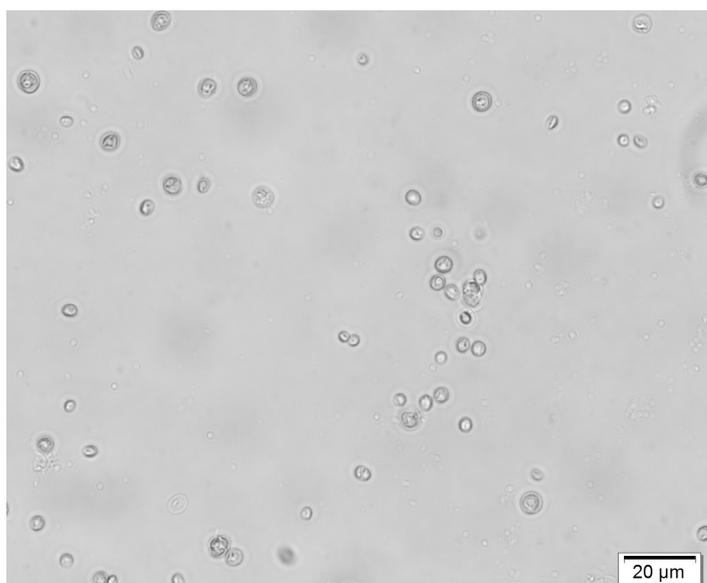


Figura 4: *Neochloris oleoabundans*  
FONTE: O Autor

#### 2.2.2.4 Composição

Gatenby *et al* (2003) observou a produção de carboidratos, proteínas e lipídeos produzidos por *N. oleoabundans* durante as diferentes fases de crescimento, notando uma redução na porcentagem de proteínas a medida que a microalga entrava na fase estacionária; o valor máximo de proteína foi aproximadamente 65% da biomassa seca. Por outro lado, foi visto um aumento no acúmulo de lipídeos e carboidratos no decorrer dos ensaios. O maior valor de carboidratos observado ocorreu na fase estacionária, atingindo 40% da biomassa seca; o maior teor de lipídeos também foi produzido na fase estacionária, concordando com uma redução nos nutrientes do meio.

*N. oleoabundans* produz entre 36 e 54% da massa seca em lipídeos totais, dos quais até 80% são triglicerídeos. A maioria dos ácidos graxos é saturada, com cadeias de C14 a C20, na sua maioria cadeias com números pares de carbonos e com uma baixa proporção de monoinsaturados (TORNABENE *et al.* 1983). Os mesmos autores detectaram a formação de sete diferentes esteróis nesta espécie, dos quais tão só quatro foram identificados. O mais abundante foi identificado como  $\Delta^7$ -ergostenol, seguido em proporção por um esterol C-28 com duplas ligações nos anéis B e D.

### 2.2.2.5 Aplicações

Devido ao perfil de ácidos graxos produzidos visto por TORNABENE e colaboradores (1983), *N. oleoabundans* torna-se uma microalga com grande potencial como matéria-prima na produção de biodiesel. Diversos estudos tem analisado o potencial da microalga para produzir ácidos graxos que serão transesterificados para obter o biodiesel, todos eles com limitação de nitrogênio e outros fatores ambientais (LI *et al.*, 2008; MURRAY *et al.*, 2011; PRUVOST *et al.*, 2009; WANG E LAN, 2011). De fato, Gouveia e Oliveira (2009) determinaram que os ácidos graxos produzidos por esta microalga cumprem com as especificações técnicas europeias para biodiesel (Standard EN 14214 e Standard EN 14213), em termos de índice de iodo; estes autores conseguiram um acúmulo de até 50% de ácidos graxos na biomassa seca, sem câmbios significativos no perfil de ácidos graxos formados.

Por outro lado, Wu e colaboradores (2011) observaram a capacidade de *Neochloris oleoabundans* para produzir polímeros de alta viscosidade, até 5g/L, em cultivos mixotróficos com lactose como fonte de carbono. As propriedades do polímero sugerem um possível uso em indústrias alimentícias, cosméticas e petroquímica.

### 2.2.2.6 Condições de cultivo

Até o momento não existem reportes na literatura de cultivo de *N. oleoabundans* em escala piloto ou maior, pelo qual todos os cultivos têm sido feitos em condições de laboratório, focando seu cultivo autotrófico com limitações de nitrogênio e fósforo, diferentes intensidades luminosas e diversas concentrações de CO<sub>2</sub>. Têm se empregado biorreatores convencionais (Sousa *et al.*, 2012), “bubble glass column” (GOUVEIA *et al.*, 2009; LI *et al.*, 2008), “flat-panel airlift” (PRUVOST *et al.*, 2009) e sistema aberto (MURRAY *et al.*, 2011).

Santos *et. al* (2012) observaram o crescimento da microalga em diferentes salinidades e valores de pH, indicando que seu cultivo a 420mM de sais e pH 10 oferece uma nova possibilidade na produção desta microalga, sugerindo

também que o acúmulo de lipídeos é mais pronunciada em condições de carência de nitrogênio sob pH alcalino.

### **2.2.3. Produção de biomassa de microalgas**

Do ponto de vista prático, as microalgas são fáceis de cultivar, podem crescer com pouca atenção, utilizam água imprópria para consumo humano e a obtenção de nutrientes é simples. No entanto, não só substrato (carbono inorgânico ou orgânico), vitaminas, sais e outros nutrientes (enxofre e fósforo) são essenciais para o crescimento de algas, mas também o equilíbrio entre os parâmetros operacionais (oxigênio, dióxido de carbono, temperatura, pH, a intensidade da luz, e a remoção de produtos e subprodutos). Ao considerar o uso de microalgas para a produção de biodiesel, é ainda importante definir quantitativamente a influência destes parâmetros operacionais e sua inter-relação, para poder manipulá-los. Desta forma, pode-se ter sucesso na obtenção de certo controle sobre a composição das populações de microalgas, mesmo em grande escala (MATA *et al.*, 2010).

#### **2.2.3.1. Fatores nutricionais associados com a produção de lipídeos**

No cultivo de microalgas e cianobactérias, o meio de cultura é um dos fatores limitantes, pois o custo dos nutrientes representa um fator importante na viabilização da produção em larga escala (TROTТА, 1978). Sabe-se que 15 a 25% do gasto total com a produção de cianobactérias é devido ao meio de cultura exigido para seu desenvolvimento (BELAY, 1997), e por isso se faz importante o estudo dos nutrientes presentes no meio, principalmente as fontes de nitrogênio, e também as fontes de fósforo no caso da produção de microalgas (CHISTI, 2007).

##### **2.2.3.1.1. Nitrogênio**

O nitrogênio é um nutriente que influencia notavelmente na produção de ácidos graxos. Sabe-se que a quantidade e qualidade da fonte de nitrogênio usada no meio de cultura podem influenciar no conteúdo de proteína, bem como em outros constituintes (BOUSSIBA & RICHMOND, 1980). Geralmente,

as microalgas podem assimilar nitrato, amônia e outras fontes orgânicas de nitrogênio, como uréia; adicionalmente, algumas cianobactérias podem fixar o nitrogênio atmosférico (BECKER, 1994).

Existe uma tendência geral de acúmulo de lipídeos, em particular triacilglicerol, em resposta à deficiência de nitrogênio. Isto tem sido observado em numerosas espécies ou estirpes de diversos táxons de algas (HU et al., 2008). Em *Botryococcus*, uma maior porcentagem de lipídeos apolares foi produzida em carência de nitrogênio, enquanto que em *Dunaliella bardawil* e *Dunaliella salina* se observou um direcionamento do metabolismo na acumulação de carboidratos sob condições de estresse por carência deste elemento (THOMAS et al., 1984). Li et al (2008) determinaram que uma concentração de nitrato de sódio sete vezes menor à concentração ótima de crescimento permitiu uma acumulação de até 40% de lipídeos na biomassa, um valor acima da média citada na literatura para este micro-organismo (30%) (MATA et al., 2010). Takagi et al., (2000) obtiveram teores de lipídeos de 40% na biomassa de *Nannochloris sp.* UTEX LB1999, quando cultivada em 0.9mM de nitrato de potássio.

Diversas fontes de nitrogênio têm sido estudadas além dos sais de nitrato. Li et al (2008) analisou o crescimento de *N. oleoabundans* empregando carbonato de amônio e ureia, comparadas com nitrato de sódio. Observaram que ao utilizar ureia, a tendência de crescimento da microalga era similar com o nitrato, porém obtiveram maiores concentrações celulares e maiores valores de lipídeos produzidos quando cultivada com o nitrato. O carbonato de amônio apresentou uma redução de duas vezes os valores obtidos com nitrato, porém teve um ligeiro aumento na produção de lipídeos, quando comparado com a uréia. Deste modo, a uréia não se apresenta como uma boa fonte de nitrogênio, toda vez que o crescimento do micro-organismo neste nutriente não é potencializado, nem apresenta um aumento nos lipídeos produzidos. Do mesmo modo, como a microalga não apresenta uma alta taxa de consumo da uréia no decorrer do tempo (Li et al., 2008), esta pode permitir o crescimento de outros microorganismos com crescimento heterotrófico, inviabilizando os ensaios.

### **2.2.3.1.2. Fósforo**

Outro nutriente importante para o cultivo de microalgas é o fósforo. Este elemento é essencial para a maioria dos processos celulares, como biossíntese de ácidos nucleicos, transferência de energia e formação de fosfolipídeos, componentes da membrana celular. A forma assimilável por parte das microalgas é o fosfato inorgânico ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  ou  $\text{HPO}_4^{2-}$ ); também podem assimilar fósforo orgânico, sendo necessária sua hidrólise por fosfatases extracelulares próprias ou bacterianas (BECKER, 1994). A influência do fósforo na qualidade e quantidade dos lipídeos produzidos está amplamente reportada na literatura. Floreto *et al.* (1996) cultivando a macroalga verde *Ulva pertusa*, observou uma diminuição nas proporções de C16:0 e um aumento nas proporções de C16:4 n-3 sob carência de fósforo.

A limitação de fósforo resultou em um aumento no conteúdo lipídeo, principalmente triacilglicerídeos, no cultivo de *Monodus subterraneus* (KHOZIN-GOLDBERG E COHEN, 2006). Notaram que ao carecer o fósforo houve uma queda na proporção de fosfolipídeos de 8.3% a 1.4% dos lipídeos totais, enquanto que a proporção de triacilgliceróis aumentou de 6.5% a 39% do total. Isto concorda com o sugerido por Dörmann e Benning (2002), em que a carência de fosfato, causa a produção de galactolipídeos, os quais substituem os fosfolipídeos nas membranas das células vegetais, conservando o fosfato para outros processos essenciais como a biossíntese de polinucleotídeos.

### **2.2.3.2. Fatores ambientais associados com a produção de lipídeos**

#### **2.2.3.2.1. Temperatura**

A temperatura é um dos fatores mais importantes que influenciam a composição bioquímica das microalgas. O efeito mais estudado tem sido sob a composição dos lipídios das membranas. Temperaturas abaixo do nível ótimo de crescimento, em geral, aumentam o grau de insaturações dos ácidos graxos, ocorrendo um aumento da estabilidade e fluidez das membranas celulares, em especial as membranas dos tilacoides,

protegendo assim a maquinaria fotossintética da foto-inibição em baixas temperaturas. Por outro lado, altas temperaturas induzem a produção de carotenoides. É possível que ocorra a formação de radicais ativos de oxigênio nas células sob altas temperaturas, resultando numa carotenogênese induzida por estresse oxidativo. Finalmente, o aumento na temperatura de crescimento influencia o consumo de nitrogênio e carbono, bem como o tamanho celular: sob condições de crescimento não ótimas requerem-se maiores concentrações desses nutrientes para produzir células na mesma velocidade de crescimento, porém o volume celular aumenta (HU, 2004)

#### **2.2.3.2.2. Intensidade luminosa**

A taxa de crescimento e o rendimento da produção sofrem influência da intensidade luminosa e da duração da irradiação até um limite que é denominado ponto de saturação luminosa. De acordo com Balloni *et al.* (1980), este ponto está por volta de 60 a 120  $\mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Vonshak *et al.* (1983) mostraram que um fator importante, que influencia a taxa de crescimento e a eficiência fotossintética, é o ciclo claridade/escuridão ao qual a célula é exposta. O regime claridade/escuridão é afetado pela intensidade de agitação do tanque, da turbulência e da densidade populacional (RICHMOND; QIANG, 1988; RANGEL, 2000). Em cultivos de *Arthrospira platensis* submetidos à alta intensidade luminosa, 144  $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , aumenta a quantidade de polissacarídeos reduzindo a quantidade de lipídeos totais e proteínas (OLGUÍN *et al.*, 2001). O processo térmico bem como a exposição da luz pode afetar o conteúdo de ácidos graxos insaturados e poliinsaturados por causa do processo de oxidação.

Há evidências que a irradiância possa regular o metabolismo de lipídeos. Khotimchenko e Yakovleva (2005) relataram que altas intensidades luminosas estimulam o acúmulo de lipídeos de reserva, como o triacilglicerol, enquanto que baixas intensidades luminosas induzem um aumento na quantidade de lipídeos estruturais, como fosfatilglicerol, fosfatidilcolina e monogalactosildiácilglicerol. Solovchenko *et al.* (2008) cultivaram a microalga

*Parietochloris incisa* sob diferentes intensidades luminosas, advertindo um aumento no conteúdo colométrico de lipídeos totais e ácido araquidônico, bem como um aumento lineal da biomassa com o aumento da intensidade luminosa.

#### **2.2.3.2.3. Diodos de emissão de luz (LED)**

Apenas áreas limitadas do espectro de luz branca podem ser captadas pelos pigmentos e subsequentemente utilizadas para a fotossíntese. Teoricamente, a cor da luz incidente deverá coincidir com a faixa de absorção do pigmento no seu estado mais baixo de excitação. No caso das clorofilas *a* e *b*, as faixas de absorção estão presentes no azul e nas regiões espectrais vermelhas. Em termos de economia energética, os fótons vermelhos são menos energéticos e servem igualmente bem para a fotossíntese como os fótons azuis, com aproximadamente 40% mais energia; este excesso de energia não é adequadamente utilizado, sendo liberado em forma de calor para que a clorofila passe de um estado altamente excitado a um estado de menor excitação dentro do fotossistema (MATTHIJS *et al.*, 1996).

Nesse contexto, para explorar eficazmente o potencial comercial das microalgas é necessária uma fonte de luz barata, durável, confiável e altamente eficiente; com uma faixa de luz estreita que se sobreponha ao espectro de absorção fotossintética, a conversão global de energia é melhorada. Uma fonte de luz que atende a esses critérios são os diodos emissores de luz (LED). Os LED são leves e pequenos o suficiente para caber em praticamente qualquer fotobiorreator; têm uma longa vida útil, sua eficiência elétrica é alta e a geração de calor é minimizada (LEE e PALSSON, 1994).

Park e colaboradores (2012) realizaram experimentos com *M. aeruginosa* e *C. vulgaris*, observando altas produtividades quando cultivadas com LED; no estudo concluíram que a cor azul tem uma maior influência nos estágios iniciais do cultivo, enquanto que o efeito da luz vermelha no cultivo é maior na fase tardia do crescimento. Do mesmo modo, Okumura *et al* (2014) determinaram que a eficiência na produção de biomassa no cultivo de *B.*

*braunii* aumentava quando usadas combinações de LED azul-verde e vermelho-verde-azul. Assim, os diversos estudos feitos apontam o uso da luz LED como uma tecnologia promissória para o cultivo de microalgas.

#### **2.2.3.2.4 Agitação**

Uma agitação adequada é necessária para a homogeneidade do meio. Isso garante a manutenção das células em suspensão e a distribuição de nutrientes e calor gerado dentro do reator, melhora a transferência de CO<sub>2</sub> e remoção de O<sub>2</sub> produzido, melhora a transferência de massa entre as células e o meio de cultivo e facilita o movimento das células entre as regiões iluminadas e não iluminadas do reator (TORZILLO, 1997). A relação da agitação com a iluminação se torna mais evidente quando o cultivo apresenta alta concentração celular, pois, nessa condição, a luz é absorvida rapidamente pelas células da região superficial, e a intensidade luminosa diminui acentuadamente à medida que se aproxima do centro do reator (OGBONNA; TANAKA, 1997). Disso resulta-se uma gradiente de luz dentro do reator e, dependendo do grau de agitação, o micro-organismo é exposto a um determinado ciclo de claro/escuro. Então, as células recebem luz de forma intermitente, o que é a forma mais prática de diluir altas intensidades luminosas, resultando em um uso efetivo da luz pela cultura (RICHMOND, 1997).

A velocidade de crescimento de alguns micro-organismos fotossintetizantes pode aumentar com o aumento de turbulência, provavelmente devido a um melhor fornecimento de luz e CO<sub>2</sub>, mas acima de um nível ótimo de turbulência, esse crescimento decresce acentuadamente, o que deve ser consequência do dano causado à célula (BARBOSA, 2003). Muitos micro-organismos fotossintetizantes apresentam uma parede celular frágil, e alguns ainda são móveis ou filamentosos, promovendo fragilidade e sensibilidade ao estresse físico. Por isso, é desejável que se possa promover a agitação correta com um mínimo de estresse hidrodinâmico possível (OGBONNA e TANAKA, 1997).

#### 2.2.3.2.5 Compostos adicionados no cultivo

Autores apontam o tiosulfato de sódio como um fator que aumenta o acúmulo de lipídios totais em *Scenedesmus* (MANDAL e MALLIK, 2009) e *Chlorella* (FENG et al., 2005). Isto pode acontecer devido a que o ambiente redutor causado conduz a uma maior concentração de NADH, que inibe a enzima citrato sintase, uma enzima chave do ciclo de Krebs, levando assim a um aumento no pool de acetil-CoA (DOI, 1990). Este excesso de Acetil-CoA pode ser convertido para malonil-CoA pela acetil-CoA carboxilase (ACCase), enzima chave na biossíntese de ácidos graxos (OHLROGGE e BROWSE, 1995).

Por outro lado, têm sido observados diversos mecanismos de sobrevivência em resposta a pressões osmóticas, como redução do tamanho celular, excreção de glicerol e acúmulo de lipídios. Baldisserotto *et al* (2012) observaram modificações na configuração das paredes celulares, acúmulo de amido e grânulos de polifosfato como resposta a altas condições de salinidade em *N. oleoabundans*. Resultados vistos por Xu e Berdall, (1997) sugerem que um aumento na salinidade do meio de cultivo favorece a produção de ácidos graxos saturados e diminui a fração de insaturados, reduzindo assim a fluidez e permeabilidade das membranas das microalgas. Takagi e colaboradores (2006) observaram que uma adição de 0,5 e 1 M de NaCl na metade da fase de crescimento exponencial teve um efeito significativo no aumento dos lipídios totais no cultivo da microalga *Dunalliella*, porém acima de 1M o crescimento vê-se inibido. Do mesmo modo, Santos *et al* (2012) analisaram o acúmulo de grânulos lipídicos nas células de *N. oleoabundans*, visualizando um aumento em condições de alcalinidade e salinidade quando cultivados sob carência de nitrogênio.

Do mesmo modo, Wang e colaboradores (2011) estudaram o efeito de estresse osmótico acoplado com carência de nitrogênio usando NaCl, KCl (0,34M) e sorbitol (0,68M) no cultivo da cepa UTEX2219-4, observando um aumento no teor de lipídios de 80%, 66% e 150% respectivamente quando comparados com condições ótimas de crescimento. As concentrações desses compostos empregadas no estudo equivalem à mesma osmolaridade;

todavia, os autores não determinaram certamente a diferença do acúmulo de lipídios quando usado o sorbitol e os sais.

### **2.2.3.3 Fotobiorreatores**

A produção comercial em larga escala de cianobactérias e microalgas ocorre em tanques abertos. No entanto, possuem certas desvantagens, como a menor eficiência fotossintética e a menor qualidade do produto da cianobactéria (VONSHAK e RICHMOND, 1988). A baixa eficiência fotossintética ocorre, principalmente, devido ao efeito de sombreamento quando a densidade celular alcança um determinado valor. Por outro lado, os fotobiorreatores tubulares, um tipo de fotobiorreator fechado, apresentam-se mais adequados para a produção de biomassa de microalgas e cianobactérias na escala necessária para produção do combustível (CHISTI, 2008).

Entre os diferentes tipos de foto biorreatores fechados, aqueles do tipo *air lift* são particularmente interessantes, pois apresentam uma maior transferência de massa líquido-gás com menor gasto de energia, o escoamento do líquido é facilmente controlado e permitem o cultivo de organismos sensíveis ao cisalhamento mecânico (CHOI *et al.*, 2003; SIEGEL; ROBINSON, 1992). Estes reatores, do tipo tubular, permitem também melhores controles das condições de cultivo, maiores produtividades, menores evaporação de água e volatilização de amônia, reduzindo a necessidade de adição de fonte de nitrogênio e reduzindo e conseqüentemente o custo de produção (MATSUDO, 2010). Considerando o emprego de CO<sub>2</sub> como fonte de carbono, o emprego de reator tubular facilitaria a incorporação deste nutriente no meio de cultivo. Nesse sentido, o CO<sub>2</sub> teria duas contribuições: manteria o valor de pH do meio de cultivo em um valor ótimo de crescimento celular e promoveria a movimentação da cultura (WATANABE; HALL, 1996). Monoculturas de *Spirulina*, *Chlorella* e outras microalgas têm sido mantidas com sucesso em foto biorreatores tubulares fechados (CHEN, 1997)

### 3 OBJETIVOS

O objetivo geral da tese foi analisar as condições nutricionais e ambientais no cultivo da microalga *N. oleoabundans* em fotobiorreatores tubulares, avaliando o desempenho da cultura em termos de parâmetros de crescimento, bem como na composição da biomassa.

Os objetivos específicos do trabalho foram:

- Otimizar as condições nutricionais de crescimento da microalga, em termos de fonte de carbono, nitrogênio e fósforo, em erlenmeyers e fotobiorreatores tubulares.
- Avaliar o efeito de compostos que influenciam no acúmulo de lipídios, como tiosulfato de sódio (agente redutor), cloreto de sódio e glicerol (aumento da osmolaridade) em erlenmeyers e fotobiorreatores tubulares.
- Analisar o emprego de luz LED (diodos de emissão de luz) no crescimento e na composição da biomassa da microalga em fotobiorreatores tubulares.
- Examinar a composição da fração lipídica na biomassa produzida nos cultivos.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Micro-organismo e manutenção da cultura.

A cepa *Neochloris oleoabundans* UTEX 1185, foi obtida a partir da coleção de culturas da Universidade do Texas, mantida em intensidade luminosa constante (24h) de  $33 \mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  (TORNABENE *et al.*, 1983), em Meio Bold 3N com adição de 2% de Agar (UTEX), cuja composição é a seguinte:

NaNO <sub>3</sub>	8.82 mM
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.17 mM
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.3 mM
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.43 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.29 mM
NaCl	0.43 mM
CaCO <sub>3</sub>	0.05 mM
Suspensão de solo de estufa	1 colher em 200mL

### 4.2. Meio de cultivo

Foi empregado o meio Bold padrão (UTEX; LI *et al.* 2008; PRUVOST *et al.* 2009) com NaNO<sub>3</sub> como fonte de nitrogênio, utilizado para a ativação do micro-organismo e o preparo do inóculo; do mesmo modo, foram modificadas as quantidades de NaNO<sub>3</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, para variar as concentrações fornecidas destes nutrientes. O pH do meio padrão   $7,0\pm 0,5$  e as concentrações de nutrientes são as seguintes:

NaNO <sub>3</sub>	2.94 mM
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.17 mM
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.3 mM
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.43 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.29 mM
NaCl	0.43 mM
PIV solução de metais	6 mL/L
Mix de vitaminas	1 mL/L

PIV solução de metais (em 1 litro de água destilada):

Na <sub>2</sub> EDTA	750 mg
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	97 mg
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	41 mg
ZnCl <sub>2</sub>	5 mg
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	2 mg
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	4 mg

Mix de vitaminas (em 100mL de água destilada)

Vitamina B12	13.5 mg
Tiamina	2.5 mg
Biotina	110 mg

#### **4.3. Ativação da cepa e preparo do inoculo**

A microalga mantida em Agar foi colhida com auxílio de alça de platina, em fluxo laminar, inoculada em Erlenmeyer de 125 mL, com 50 mL de meio Bold padrão (item 3.2) autoclavado a 121°C por 30 minutos e levadas a agitador rotativo, cultivadas a 120rpm (SOUSA *et al.*, 2012), 25 °C e intensidade luminosa de 33  $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  (TORNABENE *et al.*, 1983), fornecida por lâmpadas fluorescentes de 40Watts. Depois de 15 dias, esse material foi inoculado em Erlenmeyer de 500mL com 250mL de meio e cultivadas nas mesmas condições durante dez dias.

#### **4.4. Ensaios em shaker para avaliação dos macro nutrientes no meio**

Para observar o efeito no crescimento da microalga, diferentes concentrações de nitrato de sódio e de sais monobásica e bibásica de fosfato foram empregadas, com valores 3, 6, 9 e 12 vezes maiores da concentração padrão no meio Bold (2,94mM para NaNO<sub>3</sub>; 0,43mM para KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e 1,29mM para K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), aumentando a concentração de um nutriente por vez, mantendo os outros nutrientes na concentração padrão do meio. Estes ensaios foram feitos em Erlenmeyer de 500mL com 300 mL de meio e agitados em shaker a 120rpm, 25°C e 33  $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  de intensidade

luminosa. O pH foi medido por um potenciômetro METTLER Toledo. Os ensaios foram feitos em triplicata.

#### **4.5. Ensaios com difusão de ar estéril**

Foram testadas, em conjunto, diferentes concentrações de nitrato de sódio e sais fosfato, para garantir um melhor desenvolvimento do micro-organismo, baseados nos resultados dos ensaios em shaker. Não foram modificados os outros nutrientes presentes no meio, tão só a proporção de nitrato e fosfato total. Utilizou-se um sistema de adição de ar comprimido estéril nos Erlenmeyer inoculados, para proporcionar agitação no cultivo, bem como para fornecer com maior eficiência o CO<sub>2</sub> do ar para a microalga; este sistema é composto por uma mangueira de silicone conectada a um difusor poroso de ar, pelo qual passa ar comprimido estéril por filtros Millipore de 0,22µm. Os ensaios foram feitos em Erlenmeyer de 500mL com 300mL de meio, cultivados a 25°C e 33 µmol fótons m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> de intensidade luminosa. Foram medidas: concentração celular por OD, pH e concentração de nitrato residual. Os ensaios foram feitos em triplicata.

#### **4.6. Descrição do fotobiorreator utilizado**

Os fotobiorreatores tubulares tipo *air-lift*, desenvolvidos no Laboratório de Tecnologia de Fermentações, são constituídos por tubos de vidro transparentes (diâmetro interno de 1,0 cm; CARLOZZI & PINZANI, 2005), com inclinação de 2 % e volume total de 3,5 litros, conectados entre eles por mangueiras de silicone em forma de U (SILVA & PIRT, 1984). Na parte mais baixa dos tubos do reator tubular há um tubo na forma de Y que recebe ar proveniente de uma bomba, deslocando a suspensão celular para um frasco na parte superior que atua como saída de gás, permitindo que a cultura borbulhe (LEE & PIRT, 1981).

O sistema de agitação tipo *air-lift* foi desenvolvido empregando ar comprimido, sendo fornecido continuamente aos reatores por mangueiras de PVC, as quais adicionam o ar esterilizado por membranas de 0,2 µm pela parte inferior dos biorreatores. Na parte superior dos fotobiorreatores foi

acoplado o sistema de dosagem de CO<sub>2</sub>, para garantir a eficiência na transferência do gás para as microalgas, o qual será adicionado diretamente no frasco de vidro contendo o meio, tanto para suprir carbono ao sistema como também para abaixar o pH do cultivo. O fornecimento de luz foi feito com lâmpadas fluorescentes de 20W, encaixadas no meio dos tubos de vidro.

#### **4.7. Ensaio de adição de CO<sub>2</sub> em fotobiorreatores**

Foram realizados cultivos da microalga para estabelecer os comportamento do pH e, conseqüentemente, a frequência de alimentação com CO<sub>2</sub>. Duas formas de adição do gás foram testadas: adição constante no fotobiorreator, numa vazão aproximada de 0,6 L/h e adição intermitente, testando tempos e frequências de adição. Uma suspensão de *N. oleoabundans* em fase exponencial foi adicionada ao biorreator, na concentração inicial de 25 mg.L<sup>-1</sup> e com um volume de trabalho de 3,5 L. Empregou-se o meio Bold padrão com nitrato de sódio como fonte de nitrogênio. A intensidade luminosa foi de 60 μmol fótons m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>, a temperatura de 25±2°C e o pH foi medido por um potenciômetro METTLER Toledo. Os ensaios foram feitos em duplicata.

#### **4.8. Ensaio em fotobiorreatores com diversas fontes de nitrogênio.**

A partir da otimização da concentração de nutrientes para o inoculo, a microalga foi cultivada em fotobiorreatores empregando fontes alternativas de nitrogênio, para observar se a mudança do tipo de nitrogênio fornecido favorecia ou não o crescimento. A biomassa contida nos Erlenmeyer de 5L foi centrifugada a 3000rpm, lavada e ressuspensa em solução salina 0.9%; posteriormente foi inoculada em fotobiorreatores tubulares com 3.5L de meio modificado (3N:3P). Foram cultivados a 25±2°C, 60 μmol fótons m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> e com uma vazão de ar aproximada de 29 ± 1 L.h<sup>-1</sup>. Os cultivos foram feitos em duplicata.

#### **4.9. Ensaios em fotobiorreatores com diferentes formas de adição de nitrogênio**

Foram realizados ensaios com diferentes regimes de adição da melhor fonte de nitrogênio avaliada no item 4.8, para otimizar a produção de biomassa nos fotobiorreatores. A microalga foi cultivada usando meio Bold em: *a*) processo descontínuo com a concentração padrão do nitrato de sódio (2,94mM); *b*) processo descontínuo com três vezes a concentração padrão de nitrato (8,82mM); *c*) processo descontínuo alimentado de acordo com o valor de  $\mu_{max}$  obtido no ensaio *b*; *d*) processo descontínuo alimentado de acordo com a produtividade específica. A intensidade luminosa foi de  $60 \pm 5 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , a temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  e o pH foi medido por um potenci\u00f4metro METTLER Toledo. Os cultivos foram feitos em duplicata.

#### **4.10. Ensaios em Erlenmeyer com adição de agentes indutores de estresse no cultivo.**

Foram testados diferentes compostos que alteram o ambiente do cultivo da microalga, como aumento de poder redutor com tiosulfato de s\u00f3dio, aumento da osmolaridade com cloreto de s\u00f3dio e com glicerol, como uma fonte org\u00e2nica de carbono.

A microalga foi cultivada em Erlenmeyer com 350mL de meio Bold (3N:3P) est\u00e9ril. O cultivo foi feito a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , intensidade luminosa  $60 \pm 5 \mu\text{mol f\u00f3tons/m}^2 \cdot \text{s}$  e com adi\u00e7\u00e3o de ar est\u00e9ril. Na primeira etapa dos ensaios foram avaliadas tanto a adi\u00e7\u00e3o de tiosulfato em diferentes est\u00e1gios (na metade e no final da fase exponencial de crescimento da microalga de acordo com ensaios do item 4.5), como o efeito do aumento da concentra\u00e7\u00e3o desse composto (Tabela 3). Em ambos os experimentos a adi\u00e7\u00e3o do tiosulfato foi feita por pulsos di\u00e1rios at\u00e9 atingir a concentra\u00e7\u00e3o final.

Numa segunda etapa, foram testados compostos que alteram a osmolaridade do meio de cultivo. Foram empregadas diferentes concentra\u00e7\u00f5es de cloreto de s\u00f3dio e de glicerol (Tabela 3), sendo adicionados no final da fase exponencial por pulsos di\u00e1rios at\u00e9 atingir a concentra\u00e7\u00e3o final.

Foram medidos: pH, concentração celular por OD a 495nm, teor da fração lipídica e das proteínas. Os ensaios de foram feitos em triplicata.

Tabela 3. Concentração dos agentes utilizados para gerar um ambiente favorável ao acúmulo de lipídios.

Composto	Concentração final (mM)				Testes adicionais
Tiosulfato de sódio	1,2	2,5	3,8		Metade fase exponencial Final fase exponencial
Cloreto de sódio	1,0	2,2	4,5		-
Glicerol P.A	340	680	1020	1360	-

#### 4.11. Ensaios em fotobiorreatores com agentes indutores de estresse.

A partir dos resultados do item anterior, foi feito o *scaling up* do cultivo da microalga em fotobiorreatores tubulares, reproduzindo as concentrações que apresentaram melhores condições em termos de biomassa e lipídios produzidos. Os ensaios seguiram o mesmo padrão de adição por pulsos que os experimentos em Erlenmeyer; e tanto a adição de nitrogênio como de CO<sub>2</sub> foi feita de acordo com os melhores resultados da otimização feita nos itens 4.7, 4.8 e 4.9. A intensidade luminosa foi  $60 \pm 5 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , a temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  e o pH mantido em  $7,5 \pm 0,3$  por um potenci\u00f4metro METTLER Toledo. Os ensaios foram feitos em duplicata e foram determinados os valores de lip\u00eddios totais e prote\u00ednas na biomassa.

#### 4.12. Ensaios em fotobiorreatores com diversos regimes de luz

Com o intuito de reduzir o consumo de energia na forma de luz no cultivo, foram testados diversos regimes de fornecimento simulando o ciclo *dia:noite*, assumindo 12h de claridade e 12h de escurid\u00e3o. As 12h de luz foram fornecidas por lâmpadas fluorescentes de 20W, enquanto que nas 12h de escurid\u00e3o foram testadas, al\u00e9m da aus\u00eancia de luz, luzes LED vermelhas e brancas. Foram acopladas duas fitas de 5m de luz LED (IP65; 2,4W; 60diodos/m) na parte interna do fotobiorreator. A intensidade luminosa na fase clara foi  $60 \pm 5 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , na luz LED vermelha  $20 \pm 2 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  e na LED branca  $15 \pm 2 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ; a temperatura foi de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$

e o pH mantido em  $7,5\pm 0,3$  por um potenciômetro METTLER Toledo. Os ensaios foram feitos em duplicata e foram determinados os valores de lipídios totais e proteínas na biomassa. Os cultivos foram feitos em duplicata.

#### 4.13. Acompanhamento do cultivo.

##### 4.13.1. Padronização da densidade ótica

Determinou-se o comprimento de onda ( $\lambda$ ) ótimo para determinar a concentração de massa celular presente no cultivo, usando uma suspensão de células e medindo sua absorvância em um espectrofotômetro (FEMTO 700 Pl $\mu$ s), até encontrar a maior absorvância na suspensão em uma faixa de  $\lambda$  determinada a partir dos diversos valores vistos na literatura, para análises de densidades óticas de *N. oleoabundans*. A longitude de onda onde se teve uma maior absorvância foi 495nm (Figura 5), valor padronizado para as curva de calibração da concentração celular (item 4.9.2) e para os testes posteriores de otimização do inóculo e ensaios nos fotobiorreatores.

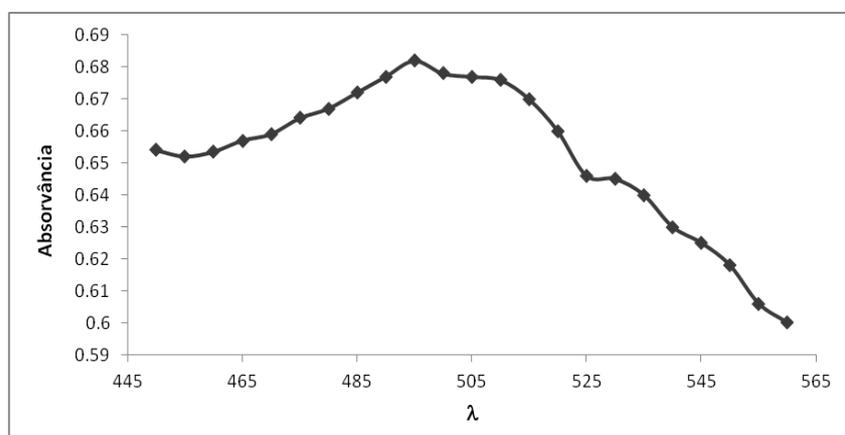


Figura 5: Absorvância ótica para a medição da concentração celular no cultivo de *N. oleoabundans*.

##### 4.13.2. Construção da curva de calibração para determinação da concentração celular

Para determinar a concentração de massa celular ao longo dos cultivos, foi feita uma curva de calibração correlacionando a absorvância de uma suspensão celular com um valor de concentração celular, em miligramas por litro de massa seca (MATSUDO, 2010). A massa de células foi determinada

com base na diferença de massa de membranas de celulose de  $0.45\mu\text{m}$ , nas quais foram filtrados 25 mL da referida suspensão e em seguida secas a  $100^{\circ}\text{C}$  por cinco horas. A partir desta mesma suspensão, foram preparadas diferentes diluições, e alíquotas dessas diluições foram levadas ao espectrofotômetro (FEMTO 600 Plus) para leitura da transmitância a 495nm. Dessa forma, foi obtida uma curva que relaciona concentração celular com a absorbância, a qual é apresentada na figura 6.

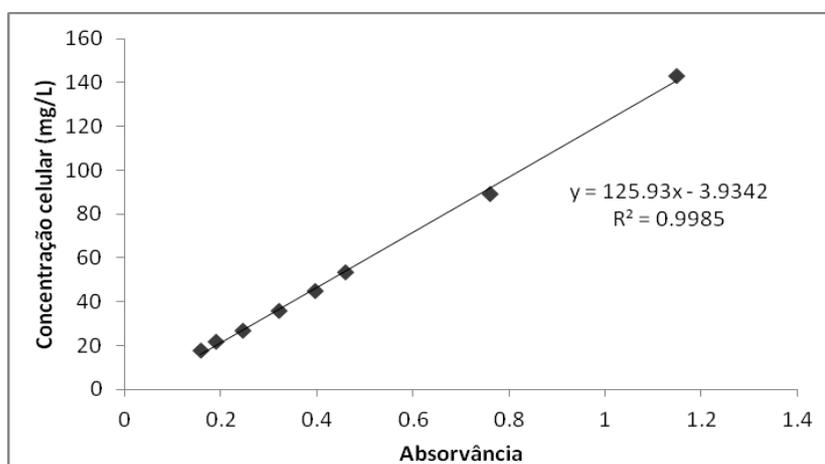


Figura 6: Curva de calibração para a determinação da concentração celular no cultivo de *N. oleoabundans*

#### 4.13.3. Curva de calibração para determinação do nitrato residual.

Foi realizada a curva de calibração para a determinação de nitrato durante o cultivo de acordo com a metodologia espectrofotométrica proposta por Cataldo (1975) para baixas concentrações deste composto em tecidos vegetais, a qual consiste em uma nitrificação do ácido acetilsalicílico em pH ácido.

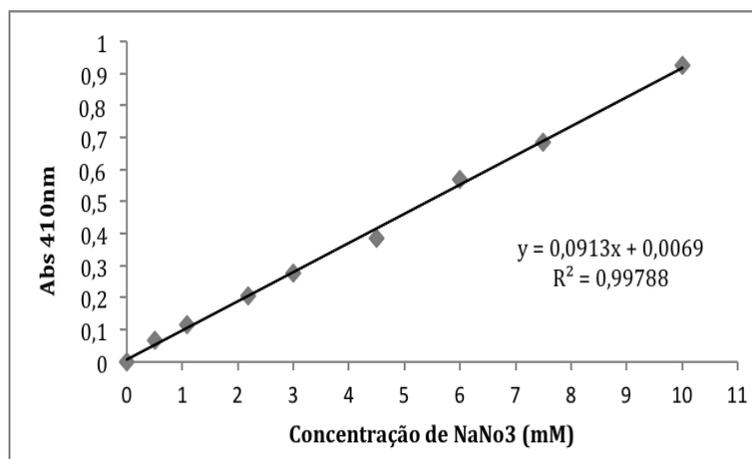


Figura 7: Curva de calibração para a determinação da concentração de nitrato de sódio no cultivo de *N. oleoabundans*

#### 4.13.4. Determinação da concentração de amônia total.

Nos ensaios onde a fonte de nitrogênio era amoniacal, quantificou-se a amônia residual utilizando a metodologia de fenol-hipoclorito (SOLORZANO, 1969). O fenol e o hipoclorito de sódio reagiram com a amônia do meio na presença do catalisador nitroprussiato de sódio, resultando em indofenol. Este produto apresentou coloração azul que foi detectada em espectrofotômetro (FEMTO 700 PI $\mu$ s) a  $\lambda$  de 640 nm. Na Figura 8 está apresentada a curva de calibração utilizada na quantificação de amônia.

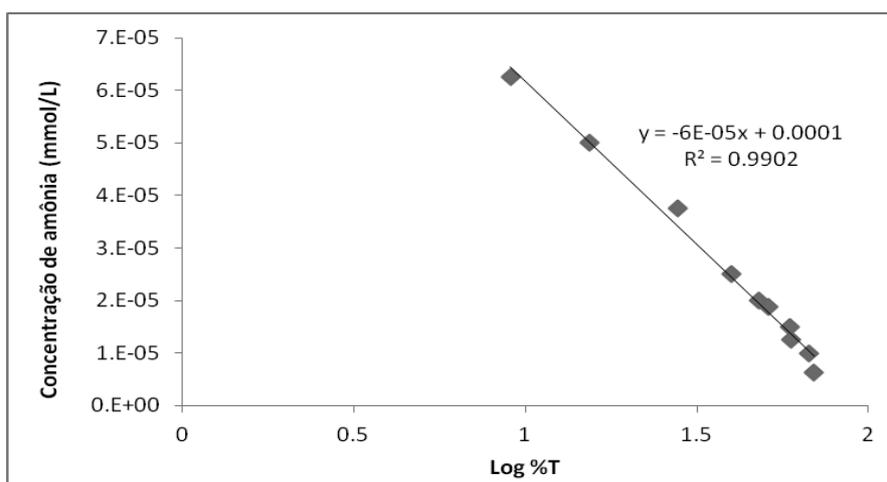


Figura 8. Curva de calibração para determinação da concentração de amônia total.

#### **4.14. Avaliação da biomassa obtida**

No final do cultivo o volume retirado foi centrifugado, a biomassa lavada com água destilada para remoção do sal adsorvido às células e seca com ventilação a 55 °C por 12 horas (PELIZER *et al.*, 1999); após a separação foi avaliado o teor lipídico e proteína da biomassa.

##### **4.14.1. Lipídeos totais**

A fração lipídica total foi obtida por extração com solvente orgânico. A amostra foi triturada em gral e então transferida para um extrator contínuo de Soxhlet com refluxo da mistura de solventes clorofórmio:metanol (2:1 v/v) até o líquido ficar límpido (PIORRECK, 1984, OLGUÍN *et al.*, 2001). A fração lipídica total juntamente com os solventes foram tratados em sistema evaporador rotativo a vácuo. O material obtido reuniu os ácidos graxos, triglicerídeos, fosfolipídios, carotenoides, pigmentos fotossintetizantes, esteroides e hidrocarbonetos, sendo chamados de fração lipídica total (GIOIELLI, 2011).

##### **4.14.2. Proteínas totais**

O teor proteico total na biomassa seca foi determinado pelo clássico método de KJELDAHL, adotando-se o fator de 6,25 para a conversão a partir dos teores de nitrogênio total (OFFICIAL METHODS OF FOOD ANALYSIS, 1984). Para isso, empregou-se a amostra desengordurada, resultante da análise de lipídeos totais, seca e pulverizada. A amostra foi digerida em meio ácido, com adição de catalisador, em bloco digestor a 400°C até que o material se apresentasse límpido. Em seguida, a amostra foi levada a um destilador de nitrogênio, adicionando hidróxido de sódio 60%, e recuperando o nitrogênio na forma amoniacal, em solução saturada de ácido bórico. Esse material foi titulado com HCl 0,02 N, possibilitando o cálculo da porcentagem de proteína na biomassa seca.

#### **4.14.3 Determinação do teor de cinzas**

Incineração de amostras em mufla, até a eliminação completa do carvão (IAL, 1985). Foi pesado aproximadamente 0,5g da amostra desengordurada, resultante da análise de lipídeos totais, seca e pulverizada, a qual foi transferida para os cadinhos previamente tarados e incinerada em mufla, aumentando gradativamente a temperatura até, 600°C. O gradiente de temperatura usado foi 30 minutos a 200°C, 60 minutos a 400°C e 90 minutos a 600°C. Os cadinhos foram transferidos para o dessecador até esfriar e depois foram pesados.

#### **4.14.4 Determinação do teor de carboidratos**

O teor de carboidratos foi determinado através do cálculo da diferença entre as porcentagens dos demais componentes da biomassa.

#### **4.14.5 Determinação da composição dos ácidos graxos**

A composição de ácidos graxos foi determinada após conversão dos ácidos graxos em seus correspondentes ésteres metílicos (HARTMAN e LAGO, 1973). Para esta metodologia foram adicionados 5mL de solução de NaOH 0,50M em metanol no material lipídico recuperado e levado para aquecimento em refluxo por 5 minutos. Em seguida, foram adicionados 15mL do reagente de esterificação (2g de cloreto de amônio, 60mL de metanol e 3mL de ácido sulfúrico concentrado, aquecido por aproximadamente 15 minutos), esta mistura foi aquecida em refluxo por mais 3 minutos e, em seguida, foi transferida para um funil de separação juntamente com 25mL de éter de petróleo e 50mL de água deionizada. Após agitação e separação das fases, foi descartada a fase aquosa. Adicionaram-se 25mL de água deionizada à fase orgânica, agitou-se após a separação das fases, a aquosa foi descartada e o procedimento foi repetido. A fase orgânica

foi coletada, o solvente foi evaporado em banho-maria a 40°C e o resíduo foi removido sob fluxo de nitrogênio gasoso.

Por último, a análise de ésteres metílicos de ácidos graxos foi realizada de acordo com Rodrigues-Ract e Gioielli (2008) para posterior injeção no cromatógrafo a gás, modelo Agilent 7890 CX, com detector de ionização de chama; coluna capilar de sílica fundida (Innowax) com 30m de comprimento, 0,25mm de diâmetro interno e 0,25µm de polietileno glicol dentro da coluna.

#### **4.15. Análise estatística dos resultados**

Foi realizada uma análise ANOVA one-way para verificar se existiam diferenças significativas nos resultados obtidos nos cultivos. Para todos os testes estatísticos foi utilizado um nível de significância igual a 0,05.

## 5. RESULTADOS E DISCUSÃO

### 5.1. Otimização do inoculo

#### 5.1.1. Ensaio em shaker

O cultivo de *N. oleoabundans* nos biorreatores vê-se impedido pela lenta taxa de crescimento do micro-organismo devido a sua velocidade específica de crescimento, de  $0.07 \text{ dia}^{-1}$  (LOPES DA SILVA *et al.*, 2009). Por conseguinte, com o intuito de melhorar o aumento da biomassa necessária para iniciar os ensaios nos fotobiorreatores, foram testadas diferentes concentrações de nutrientes adicionadas, no caso nitrato de sódio e fosfato total.

Com relação ao nitrato de sódio, aumentou-se em 3, 6, 9 e 12 vezes a concentração padrão no meio Bold (2,94mM). As curvas de crescimento de todos os ensaios podem ser observadas na Figura 9, enquanto que as melhores curvas de crescimento são apresentadas na Figura 10.

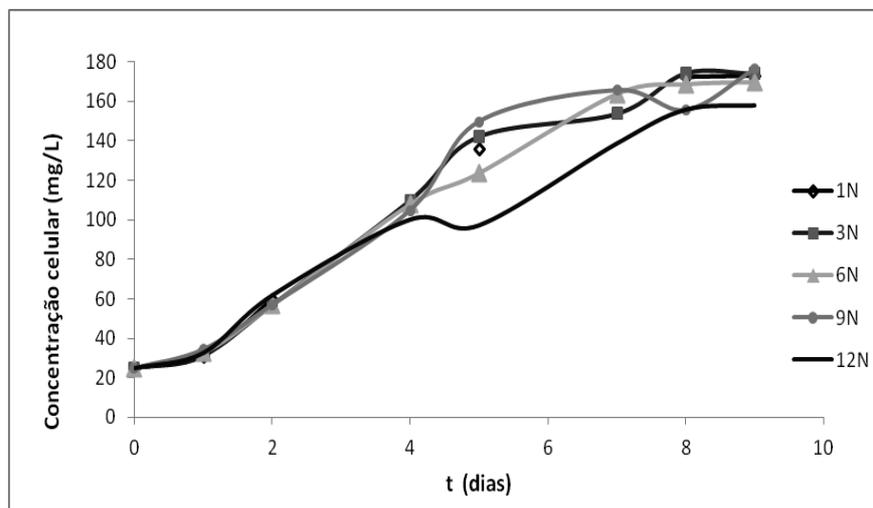


Figura 9. Curvas de crescimento de *N. oleoabundans* sob concentrações 3 (3N), 6 (6N), 9 (9N) e 12 (12N) vezes maiores à concentração de nitrato de sódio no meio padrão (1N).

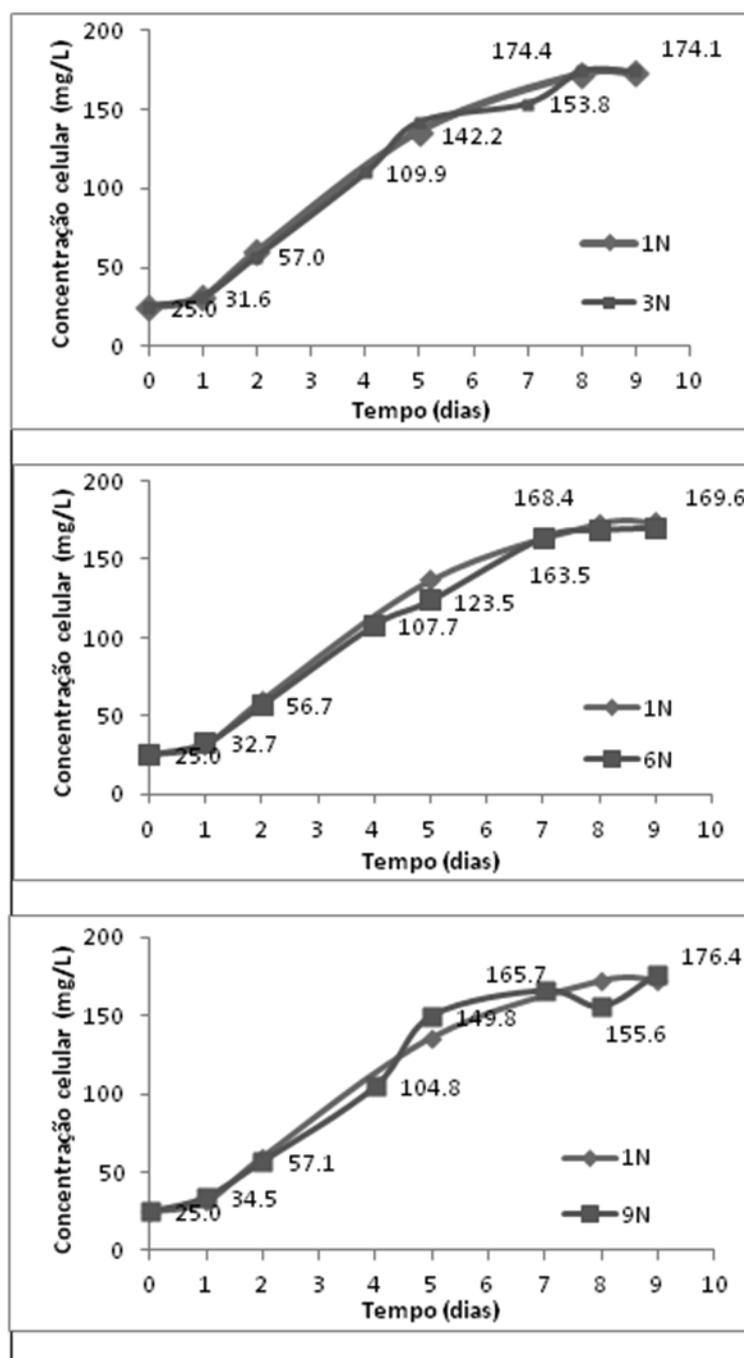


Figura 10. Curvas de crescimento de *N. oleoabundans* sob concentrações (3N), 6 (6N) e 9 (9N) vezes maiores à concentração de nitrato de sódio no meio padrão (1N).

O microrganismo apresentou, nas condições dadas, uma curva de crescimento de comportamento similar com 1, 3, 6 e 9 vezes a concentração inicial de nitrato (N), tendo um maior valor de X, de 176,4 mg/L neste último, estatisticamente igual ao valor máximo obtido com a concentração padrão de

nitrato (173 mg/L). Observou-se também uma desaceleração do crescimento mais ou menos a partir do dia 6, ocorrendo uma estabilização do crescimento da microalga a partir do dia 8 para 1N, 3N e 6N. A curva com 9N foi mais irregular, com maior tempo de adaptação às condições, nos dias 2 a 4 e com crescimento, apresentando maiores valores de concentração celular no final do cultivo.

A curva com 12N teve toxicidade a partir do dia 5, apresentando um crescimento linear e não exponencial, desacelerando a partir do dia 8.

Em relação ao pH (Figura 11) este valor teve um aumento de acordo ao crescimento. O ensaio com a concentração 1N teve uma queda no valor de pH a partir do dia 6, concordando com o observado no crescimento da microalga. O pH das curvas com 3N e 9N tiveram o mesmo padrão de queda com o ensaio 1N, enquanto o pH da curva com 6N aumentou seu valor com respeito ao meio padrão.

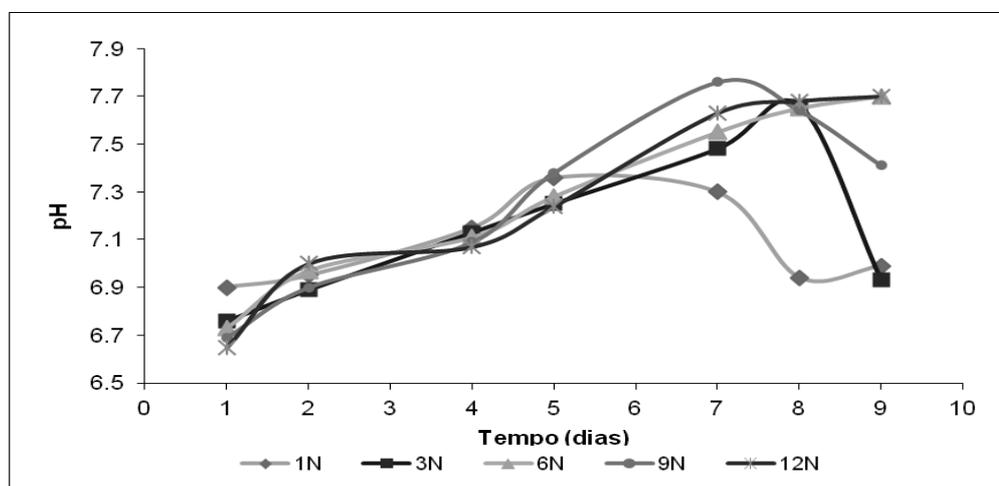


Figura 11. pH em função do tempo para os cultivos de *N. oleoabundans* sob diferentes concentrações de nitrato de sódio.

O crescimento da microalga sob diferentes valores de fosfato total (P) também foi avaliado nas mesmas condições dos ensaios com nitrato. Os resultados podem ser observados na Figura 12.

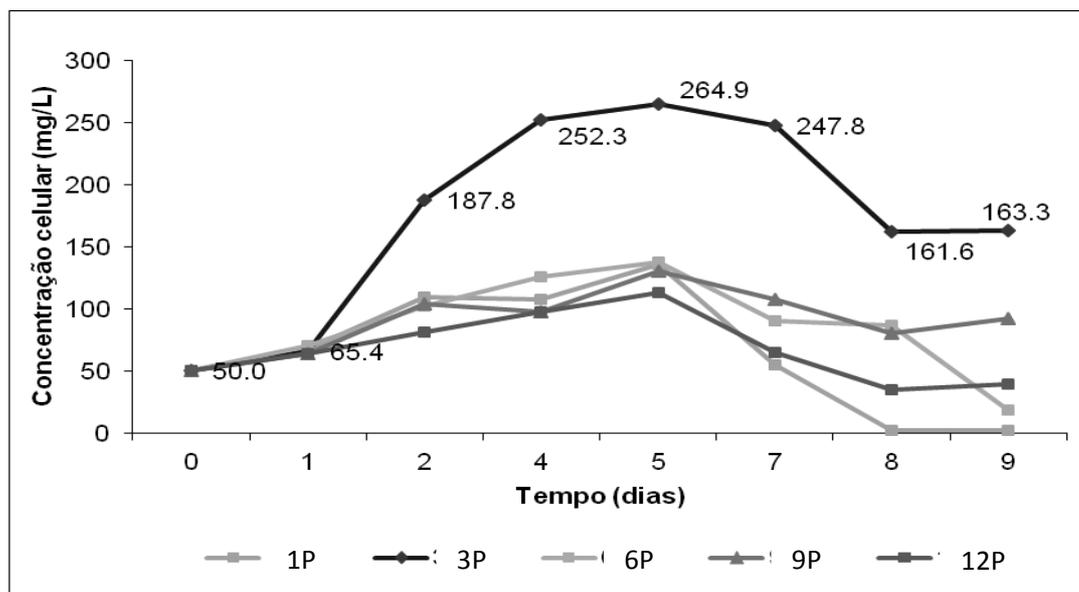


Figura 12: Curvas de crescimento de *N. oleoabundans* sob diferentes concentrações de fosfato total.

Foi evidente que uma concentração de fosfato três vezes maior do que a padrão permitiu um alto valor de biomassa. Os ensaios apresentaram uma curva de crescimento com comportamento similar, tendo uma queda de crescimento a partir do dia 5. No decorrer dos ensaios observaram-se precipitados marrons, provavelmente devido à precipitação abiótica do fósforo (WANG & LAN, 2011), o qual poderia ter impedido a assimilação por parte da microalga e a queda no crescimento.

O pH para os ensaios com diferentes valores de P (Figura 13) demonstram que proporções altas de fósforo, em relação ao nitrogênio, não permitem condições ótimas de crescimento, apresentando faixas de pH distantes da ótima, a qual, segundo os resultados obtidos, está entre 6.5 e 7.5 (ensaio com 1P), concordante com a literatura (TORNABENE et al., 1984; PRUVOST et al., 2009).

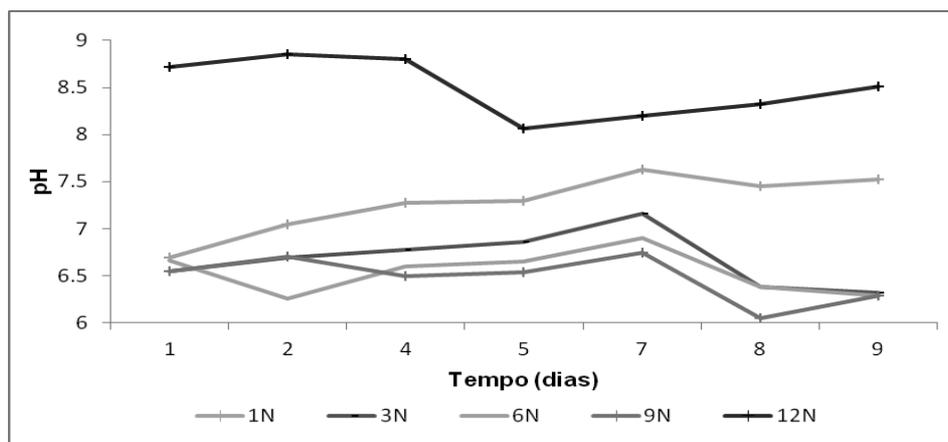


Figura 13: pH em função do tempo para os cultivos de *N. oleoabundans* sob diferentes concentrações de fosfatos.

De acordo com Hu (2004), a pesar de numerosos reportes que afirmam que tanto o crescimento como a composição celular podem ser afetados por um só fator físico ou químico, a efetividade de analisar tão só a influencia de um fator é pouca e o crescimento apresenta-se lento. Nos experimentos relatados nesta parte do trabalho demonstram que há uma interação entre os nutrientes, do meio, neste caso o nitrogênio e o fósforo, interação que afeta o crescimento da microalga, evidente nas baixas concentrações celulares obtidas. Do mesmo modo, a baixa taxa de crescimento vista também pode ter sido causada pela pouca quantidade de carbono fornecido às células, tendo em conta que a concentração de  $\text{CO}_2$  no ar é 0.03-0.04%. Sob baixas concentrações de  $\text{CO}_2$ , as microalgas desenvolvem um mecanismo de acumulação de carbono inorgânico dissolvido, o qual depende da anidrase carbônica e de um sistema de transporte ativo para carbono inorgânico (KURANO *et al.*, 1998), mecanismos que têm um alto custo energético e precisam de células metabolicamente ativas (AIZAWA & MIYACHI, 1986). No entanto, os sistemas de captação de carbono inorgânico não seriam eficientes, toda vez que o meio Bold não apresenta na sua composição nenhum tipo de carbonato. Pode-se inferir então que as condições de crescimento não foram as adequadas devido não só pela deficiência em carbono, mas também pela interação do nitrogênio e do fósforo, que não favoreceu o metabolismo da microalga.

Por conseguinte, a seguinte etapa no processo de otimização foi analisar o aumento dos macronutrientes no meio, sua interação e influencia no crescimento do micro-organismo, fornecendo eficientemente carbono no cultivo.

### **5.1.2. Ensaio com difusão de ar**

Baseados nos resultados em shaker foram testadas as condições de nutrientes que melhor promoveram o crescimento, pelo qual foi empregada uma concentração seis vezes maior de nitrato (6N), uma concentração três vezes maior de fosfatos (3P) e a adição de ar estéril no erlenmeyer, para uma melhor captação do CO<sub>2</sub> do ambiente devido a um maior contato gás-líquido, como resultado da agitação dada pelo fluxo de ar (SILVA & PIRT, 1984). Por outro lado, também foram testadas diferentes concentrações de nitrato e fosfato, para alcançar proporções N:P menores de 1,33, determinado como ponto ótimo de crescimento de *N. oleoabundans* por Wang e Lan (2011a).

Os resultados dos cultivos estão resumidos na tabela 4; na figura 14 são apresentadas curvas de crescimento dos ensaios com três vezes a concentração padrão de nitrato de sódio, bem como o ensaio com a proporção 1N:3P, enquanto que na figura 15 podem ser observadas as curvas de crescimento dos ensaios com 6N. Em ambas as figuras é possível ver a curva de crescimento do ensaio com meio padrão, para efeitos comparativos.

Tabela 4: Parâmetros de crescimento para os cultivos de *N. oleoabundans* sob diferentes proporções de nitrato e fosfato

Ensaio	Proporção	N:P	$X_{max}$ (mg/L)	$P_x$ (mg/L dia)
1	1,12	1:1	436,71 ± 2,0	41,55 ± 0,3
2	0,37	1:3	440,53 ± 8,5	41,88 ± 0,9
3	1,12	3:3	481,52 ± 22,0	46,18 ± 2,3
4	0,56	3:6	366,51 ± 1,4	34,37 ± 0,0
5	0,37	3:9	245,34 ± 17,2	22,45 ± 1,8
6	1,43	6:3	233,19 ± 19,6	21,54 ± 1,91
7	1,07	6:4	402,31 ± 16,9	38,48 ± 1,69
8	0,86	6:5	246,44 ± 39,0	22,88 ± 3,87
9	1,12	6:6	277,96 ± 19,9	26,06 ± 1,92

$X_{max}$ : Concentração celular máxima

$P_x$ : Produtividade em células

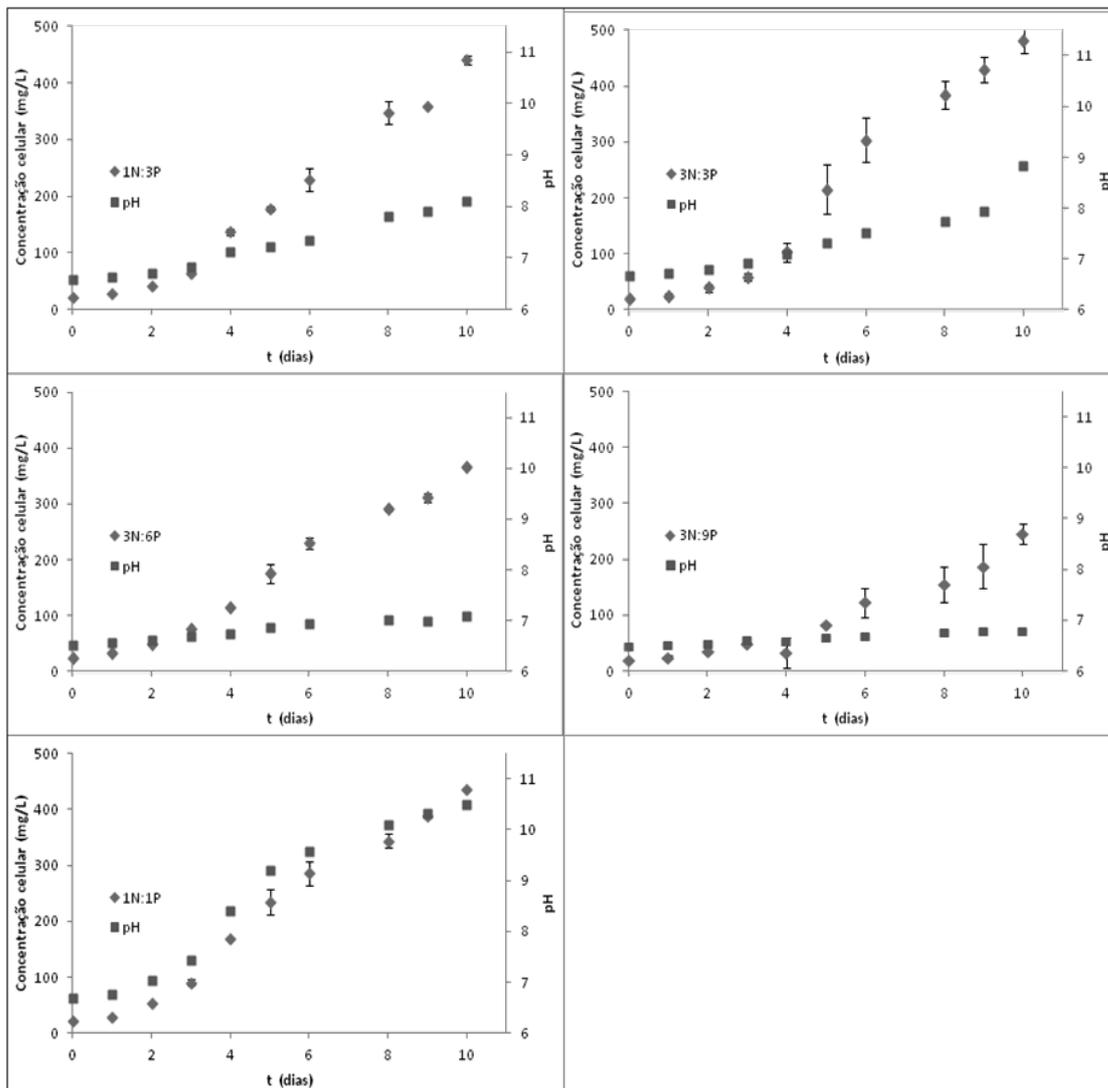


Figura 14: Curvas de crescimento de *N. oleabundans* em Erlenmeyer sob diferentes proporções N:P, tendo fixada a concentração de nitrogênio em 3N.

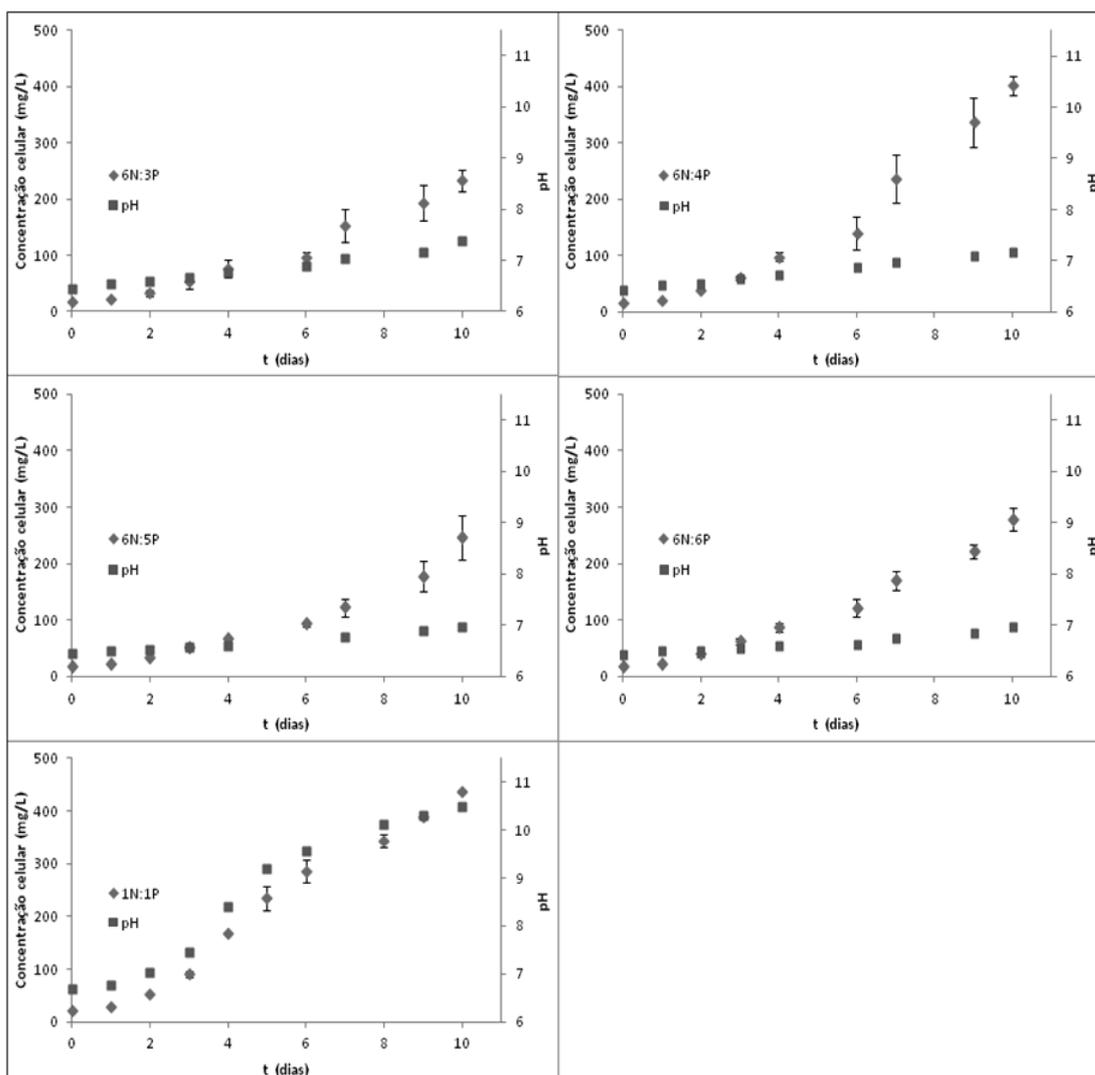


Figura 15: Curvas de crescimento de *N. oleabundans* em erlenmeyer sob diferentes proporções N:P, tendo fixada a concentração de nitrogênio em 6N.

Após 10 dias, os ensaios com 3N atingiram em média maiores valores de concentração celular máxima ( $X_{max}$ ) que os ensaios com 6N, estes últimos com menores valores que o ensaio padrão (436 mg/L). Os três primeiros ensaios (1:1; 1:3 e 3:3) apresentaram maiores valores para ambos os parâmetros, obtendo os valores mais altos tanto de  $X_{max}$  como  $P_x$  no ensaio 3 (3N:3P) (497mg/L e 53mg/L.dia, respectivamente). Analisando o valor das proporções entre os nutrientes, não é possível afirmar que, quanto mais próximo esse valor ao estabelecido como ótimo por Wang e Lan (2011a), o crescimento da microalga foi maior. De fato, proporções iguais, porém com diferentes concentrações N:P, tiveram comportamentos diferentes. Os

ensaios 1 e 3, com proporção 1,12, apresentaram valores de  $X_{max}$  e  $P_x$  próximos ao dobro do que no ensaio 9, com o mesmo valor na proporção; igualmente acontece com os ensaios 2 (1N:3P) e 5 (3N:9P). Esses resultados confirmam a importância da interação entre os nutrientes no cultivo da microalga, somado ao fato que nos ensaios com a concentração 6N, concentração que foi considerada como a de melhor desempenho no shaker, não favoreceu o crescimento como esperado, mesmo aumentando a concentração de fosfato e contando com a adição de  $CO_2$  proveniente do ar.

O consumo de nitrato teve um comportamento de acordo com o esperado, esgotando-se apenas nos ensaios com o valor padrão. Os perfis de consumo indicam que não há uma assimilação adequada do nitrato por parte da microalga nos ensaios com 6N, pois apesar de ter maior nitrogênio disponível, isto não se refletiu em um aumento em  $X_{max}$  e  $P_x$ . De fato, pode-se afirmar que 17mM de nitrato de sódio (6N) inibe o crescimento, pois tanto  $X_{max}$  e  $P_x$  foram menores que o ensaio padrão, confirmando o observado por Li *et. al* (2008), os quais sugerem que uma molaridade acima de 15 mM conduz a uma inibição do crescimento celular. O aumento do fosfato até 6,9mM (4P) permitiu maiores concentrações celulares, porém torna-se inibitório acima desse valor.

Concluindo com a etapa de otimização de nutrientes, pode-se afirmar que as melhores concentrações foram 8,82mM de nitrato de sódio e 5,16mM de fosfato total, correspondentes ao ensaio 3N:3P, sendo necessária a agitação por adição de ar. Contudo, é importante destacar que, para afinar a produção de inoculo para os ensaios de produção de lipídeos por *N. oleoabundans*, outros macro nutrientes, como sais de enxofre e de ferro, apresentam uma interação com o nitrogênio e o fósforo, atuando de maneira conjunta no crescimento da microalga (Wang e Lan, 2011b).

Do mesmo modo foi evidenciada a associação entre as condições de cultivo e seus efeitos no crescimento celular. Essas condições, como temperatura, intensidade luminosa, salinidade e deficiência de nutrientes podem ser alteradas para variar tanto a obtenção de biomassa como a composição dos ácidos graxos acumulados (CONVERTI *et al.*, 2009)

contribuindo na viabilização do processo e seu possível uso na produção de biocombustível. Conseqüentemente, a otimização do inoculo requer ainda um maior aprofundamento dessas inter-relações e sua influência no crescimento da microalga, como o aumento das intensidades luminosas no cultivo, pois a utilizada para a produção do inoculo poderia ter sido determinante na biomassa obtida.

## **5.2. Cultivo de *N. oleoabundans* em fotobiorreatores com diferentes fontes de nitrogênio**

Na literatura está amplamente difundida a capacidade das microalgas em utilizar diversas fontes de nitrogênio. Em geral, são capazes de assimilar amônio, nitrato, nitrito, aminoácidos, ureia, purinas, pirimidinas e também fixar nitrogênio (GROBBELAAR, 2004). O uso de sais de amônio no cultivo de cianobactérias e microalgas conferem vantagens, como por exemplo, uma redução nos custos, bem como uma assimilação do nitrogênio com maior facilidade (RODRIGUES, 2008). A utilização de sais de amônio permite uma disponibilização direta de amônia à célula, e a assimilação ocorre sem gastos de energia, pois a amônia é a fonte de nitrogênio preferida. O uso de nitrato ou sais de amônio está relacionado com o pH do meio. Assim, o uso de amônia abaixa os valores de pH pela liberação de íons  $H^+$ , enquanto que com o uso de  $NO_3$  ocorre um aumento no valor de pH (GROBBELAAR, 2004).

Nesta etapa do estudo foi avaliado o crescimento celular em fotobiorreatores com dois sais de amônio: sulfato de amônio (Figura 18) e nitrato de amônio (Figura 19). Para efeitos comparativos a microalga foi cultivada com o meio padrão (item 4.2; Figura 16) e com três vezes a concentração padrão (3N; Figura 17). Para os ensaios com sais de amônio se empregaram concentrações que permitiram a mesma quantidade de nitrogênio fornecida no meio Bold 3N (8,82mM), pois esta concentração de nitrato de sódio permitiu maior concentração celular e portanto uma melhor curva de crescimento nos fotobiorreatores. Para ambos os sais a concentração foi 4,47mM.

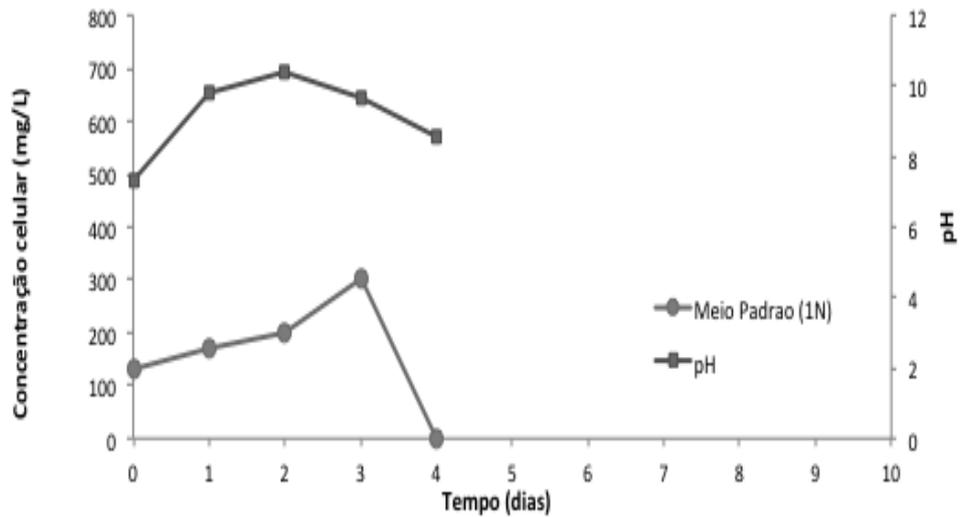


Figura 16: Concentração celular e pH em função do tempo no cultivo em fotobiorreator tubular, com meio padrão.

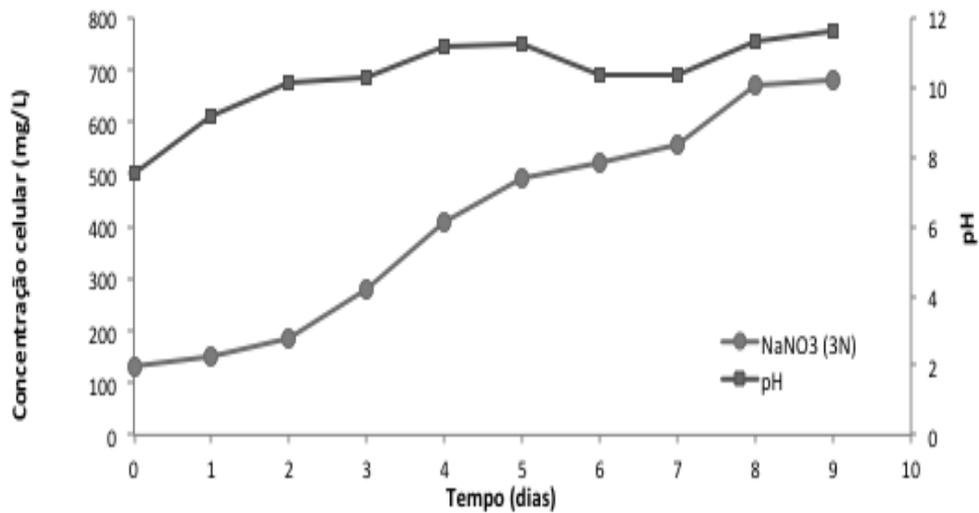


Figura 17: Concentração celular e pH em função do tempo no cultivo em fotobiorreator tubular, com nitrato de sódio (3N:3P).

O crescimento da microalga utilizando meio padrão (Figura 16) apresentou um início mais rápido na fase exponencial do que o comparado com o meio otimizado até o dia 3, porém o crescimento não se manteve e ocorreu a morte celular no dia 4. Isto pode ter acontecido pelo rápido esgotamento do nitrato no meio derivado da alta velocidade de crescimento nessa fase do cultivo. No cultivo com meio otimizado (3N) observou-se um crescimento clássico da microalga, apresentando uma redução no crescimento a partir do dia 5, porém acelerando novamente a partir do dia 7. Ao longo do ensaio foram necessárias três adições diárias de CO<sub>2</sub> (duas horas por adição) para manter o pH em condições adequadas de crescimento, numa faixa entre 7 e 8. Contudo, os dados de pH apresentados são valores tomados antes da adição de CO<sub>2</sub>, aumentando seu valor de acordo com o aumento do metabolismo celular.

A figura 18 apresenta o crescimento da microalga com sulfato de amônio como fonte de nitrogênio. Este sal provou-se inadequado para o crescimento do micro-organismo, o qual não permitiu ver as tradicionais fases de crescimento microbiano. A biomassa celular manteve-se praticamente constante ao longo do cultivo, ocorrendo um amarelamento do meio a partir do dia 6 e morte no dia 8. O pH do meio não teve um aumento, derivado do pouco aumento da biomassa, somado ao fato da liberação de sulfato no meio após a assimilação da amônia, produzindo ácido sulfúrico. Porém, como não se obtiveram valores ácidos durante o cultivo, pode-se afirmar que ocorreu um aumento no pH causado pelo metabolismo da microalga.

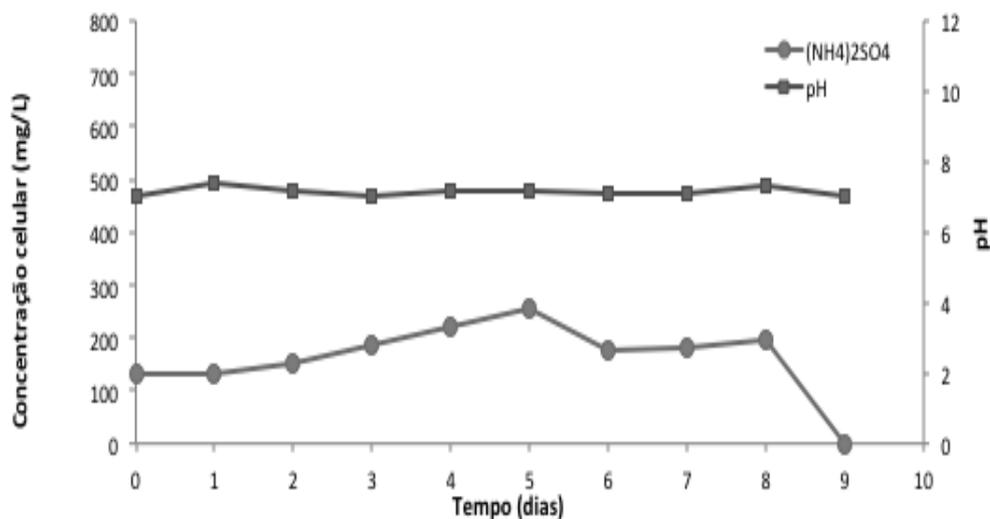


Figura 18: Concentração celular e pH em função do tempo no cultivo em fotobiorreator tubular, com sulfato de amônio (3N:3P).

Na Figura 19 é possível observar o crescimento de *N. oleoabundans* em fotobiorreator com nitrato de amônio como fonte de nitrogênio.

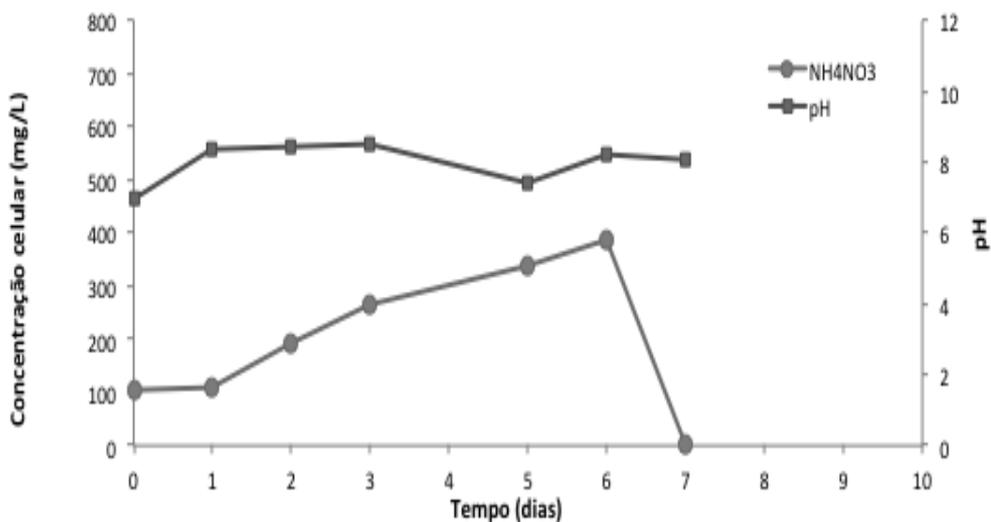


Figura 19: Concentração celular e pH em função do tempo no cultivo em fotobiorreator tubular, com nitrato de amônio (3N:3P).

Na Tabela 5 estão resumidos os parâmetros nos ensaios em fotobiorreatores tubulares, com diferentes fontes nitrogenadas.

Tabela 5: Concentração celular máxima e produtividade em células para os ensaios em fotobiorreatores tubulares, empregando diferentes fontes de nitrogênio.

Fonte de nitrogênio	Tempo de cultivo (dias)	Xmax (mg/L)	Px (mg/L dia)
Padrão			
(NaNO <sub>3</sub> 1N)	3	300.44	56.18
NaNO <sub>3</sub> (3N)	8	671.72	67.44
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	8	197.59	8.38
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	6	387.08	47.41

Xmax: Média da concentração celular máxima

Px: Produtividade em células

O ensaio com nitrato de amônio apresentou um crescimento melhor quando comparado com o sulfato de amônio, porém com biomassa final menor que o ensaio com nitrato de sódio em 3N. Mesmo tendo um aumento no pH, a adição de CO<sub>2</sub> no meio ao longo do cultivo teve uma vazão menor do que quando utilizado o meio otimizado com nitrato de sódio, pois o controle de pH na faixa ótima de crescimento era mais fácil de se atingir. Conseqüentemente, é possível inferir que um aumento na vazão de CO<sub>2</sub> poderia aumentar a biomassa, porém um aumento na adição de gás poderia acarrear um desbalanceamento do pH e afetar a assimilação de nutrientes por parte de microalga.

Foi evidente que o sulfato de amônio é inviável para o crescimento do micro-organismo nos biorreatores. A fonte convencional de nitrogênio apresentou melhores valores de biomassa e produtividade em células. O nitrato de amônio, mesmo tendo quase a metade do valor de Xmax do que com o nitrato de sódio, apresentou uma produtividade alta, o qual tornaria-se uma alternativa para o cultivo de *N. oleoabundans*; do mesmo modo, a

assimilação deste composto não permite valores altos de pH que possam interferir no crescimento do micro-organismo.

### **5.3. Ensaios de adição de CO<sub>2</sub> em fotobiorreatores.**

O sistema de agitação tipo *air-lift* foi desenvolvido empregando ar comprimido, sendo fornecido continuamente aos reatores por um sistema de tubos, que adiciona o ar filtrado em membranas de 0,2 µm pela parte inferior dos biorreatores. Também foi desenvolvido o sistema de dosagem de CO<sub>2</sub> por cilindro para garantir a eficiência na transferência do gás para as microalgas, o qual será adicionado diretamente no meio, tanto para fornecer carbono ao sistema como também para abaixar o pH do cultivo.

Foram realizados cultivos da microalga para estabelecer os valores de fatores críticos do processo de cultivo (Figuras 20 e 21), tais como pH e o valor e a frequência de alimentação com CO<sub>2</sub>, assim como uma análise morfológica do micro-organismo para garantir que a agitação e as condições às quais serão expostas as células não causem atrito que possa levar à lise celular. Estas curvas de crescimento foram feitas no biorreator, cultivando as células em meio Bold padrão.

No ensaio 1 (Figura 20) o CO<sub>2</sub> foi adicionado intermitentemente, começando a ser adicionado duas vezes por dia numa vazão de 4 L/min, sem conseguir controlar o pH do meio a medida que o crescimento do micro-organismo aumentava, atingindo valores acima de 10, os quais poderiam ser inibitórios, sendo portanto necessária uma correção diária para valores de aproximadamente 7,0 nos dias 6 e 7 de cultivo. Tendo em vista que a adição de apenas duas vezes por dia (10 minutos em cada adição) não foi suficiente para manutenção do pH, a partir do dia 8 a adição de CO<sub>2</sub> foi feita seis vezes por dia, conseguindo controlar o pH numa faixa mais estreita. Nesse período, é possível observar uma maior velocidade de crescimento do micro-organismo, indicando claramente que se encontra numa faixa ótima de pH para seu desenvolvimento.

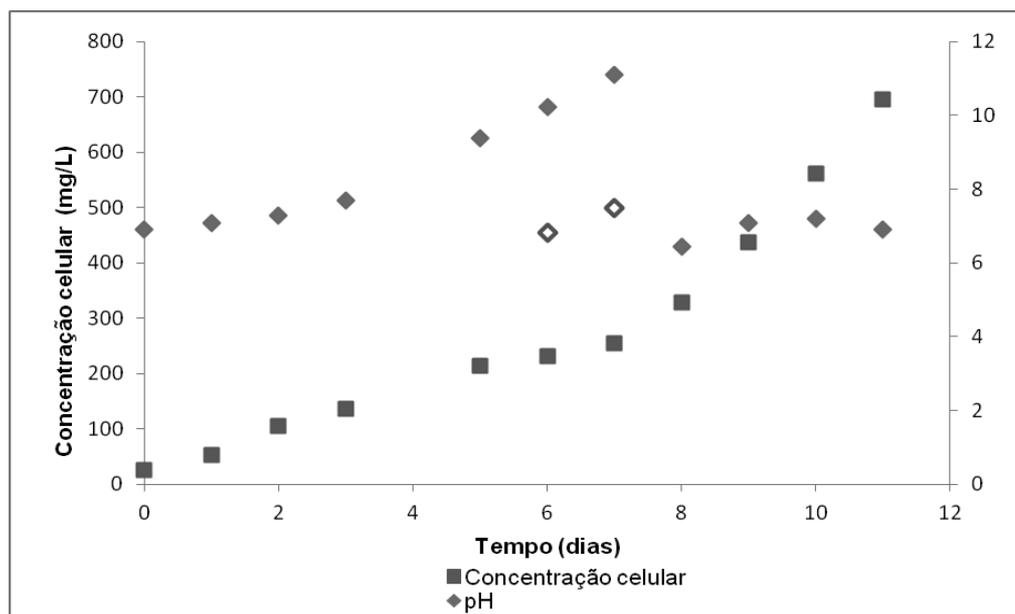


Figura 20: Curva de crescimento de *N. oleoabundans* sob regime de adição intermitente de CO<sub>2</sub> (os losangos abertos correspondem ao valor de pH corrigido diariamente e os fechados correspondem aos valores de pH antes da correção).

Por outro lado, no ensaio 2 (Figura 21) a adição de CO<sub>2</sub> ao sistema foi constante, sendo aproximadamente 0,4 L/min. Não foi observado nenhum efeito no pH empregando este regime de adição do gás, sendo necessária a correção de pH diariamente empregando um maior fluxo de gás até diminuir o valor de pH para o valor de aproximadamente 7,0, acarretando um aumento no volume de gás empregado, o qual, em grande escala, torna-se inviável. Neste ensaio, observou-se que o micro-organismo consegue crescer em uma faixa bastante ampla de pH, pois a biomassa apresenta uma velocidade de crescimento considerável nos dias em que o pH é controlado, a partir do dia 6. É importante destacar que este crescimento só seria possível com o controle diário do pH.

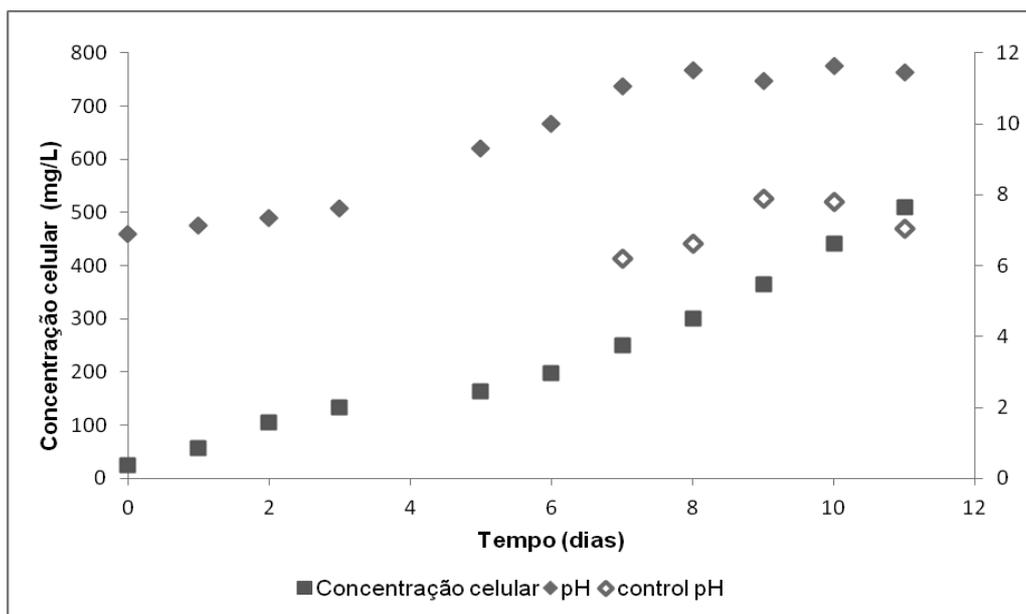


Figura 21: Curva de crescimento de *N. oleoabundans* sob regime de adição constante de CO<sub>2</sub> (os losangos abertos correspondem ao valor de pH corrigido diariamente e os fechados correspondem aos valores de pH antes da correção).

Tendo em conta observado anteriormente, foi instalado um sistema de adição automatizado de CO<sub>2</sub>, o qual consiste em um eletrodo de pH no cultivo conectado com uma válvula solenoide, para assim controlar a entrada intermitente do CO<sub>2</sub> em relação ao aumento de pH, visando um melhoramento das condições de crescimento da microalga. Os ensaios foram realizados em meio Bold 3N. O crescimento nessas condições permitiu maiores valores de biomassa, como pode ser observado na Figura 22 e na Tabela 6.

Tabela 6. Comparação dos parâmetros de crescimento e avaliação da biomassa em fotobiorreator com e sem o sistema de adição de CO<sub>2</sub>.

Tipo de adição	X <sub>max</sub> (mg/L)	X <sub>f</sub> (mg/L)	μ <sub>max</sub> (d <sup>-1</sup> )
Com válvula solenoide	2274,9 ± 97,5	1815,6 ± 83,1	0,59
Sem válvula solenoide	1106,3 ± 102,4	704,6 ± 99,2	0,37

X<sub>max</sub>: concentração celular máxima

X<sub>f</sub>: concentração celular final

μ<sub>max</sub>: velocidade específica de crescimento

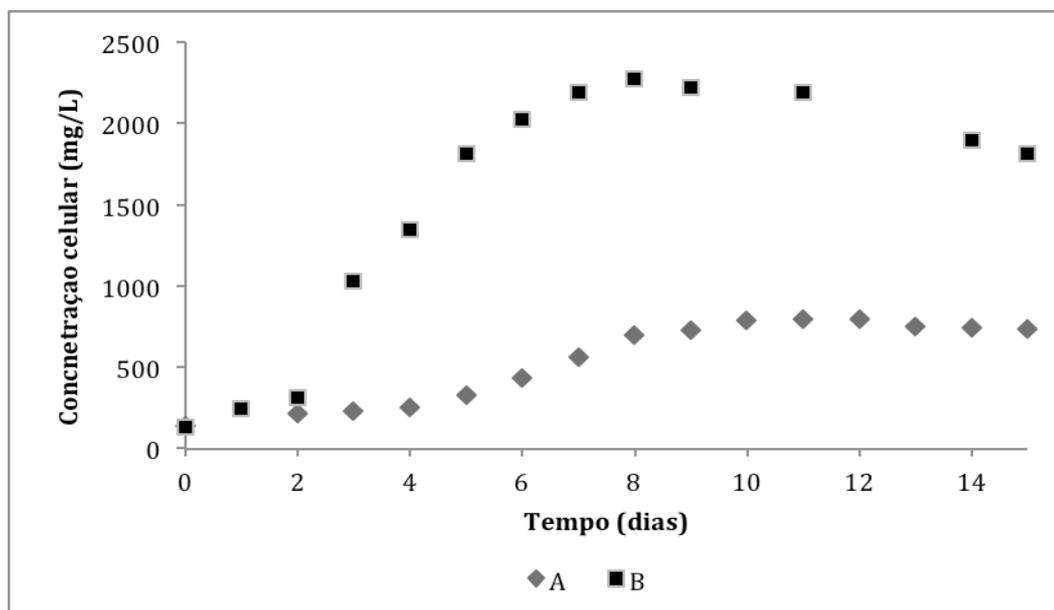


Figura 22. Concentração celular em função do tempo no cultivo *N. oleoabundans* sem (A) e com (B) o sistema automatizado de adição de CO<sub>2</sub>.

Observando tanto as curvas como os parâmetros de crescimento fica evidente que o sistema automatizado de adição de CO<sub>2</sub> é efetivo na produção de biomassa, toda vez que a faixa de pH fica mais estreita e mais adequada à faixa ideal para o micro-organismo (entre 7 e 7.8). Isto permitiu duplicar os valores de concentração máxima obtidos e um aumento na velocidade específica de crescimento do micro-organismo (Tabela 5), otimizando assim os parâmetros de pH e adição da fonte de carbono, condições de cultivo que foram padronizadas para os experimentos posteriores.

#### 5.4. Cultivo de *N. oleoabundans* em foto biorreatores com diferentes regimes de adição de nitrogênio.

Outro parâmetro importante para a otimização do cultivo de microalgas é a adição de nitrogênio no meio e sua assimilação pelo micro-organismo. Por tal motivo foram testados quatro tipos de adição, para obter maiores valores de biomassa e aumentar assim a produtividade dos ensaios. Também é importante ressaltar que a adição de nitrogênio busca estabelecer um crescimento ótimo da microalga, bem como induzir posteriormente um estresse nutricional (no caso carência de nitrogênio) e não gerar excesso no

meio, que possa o bem inibir o crescimento ou inibir o acúmulo de lipídios. As curvas de crescimento com os diferentes regimes de alimentação são apresentados na Figura 23.

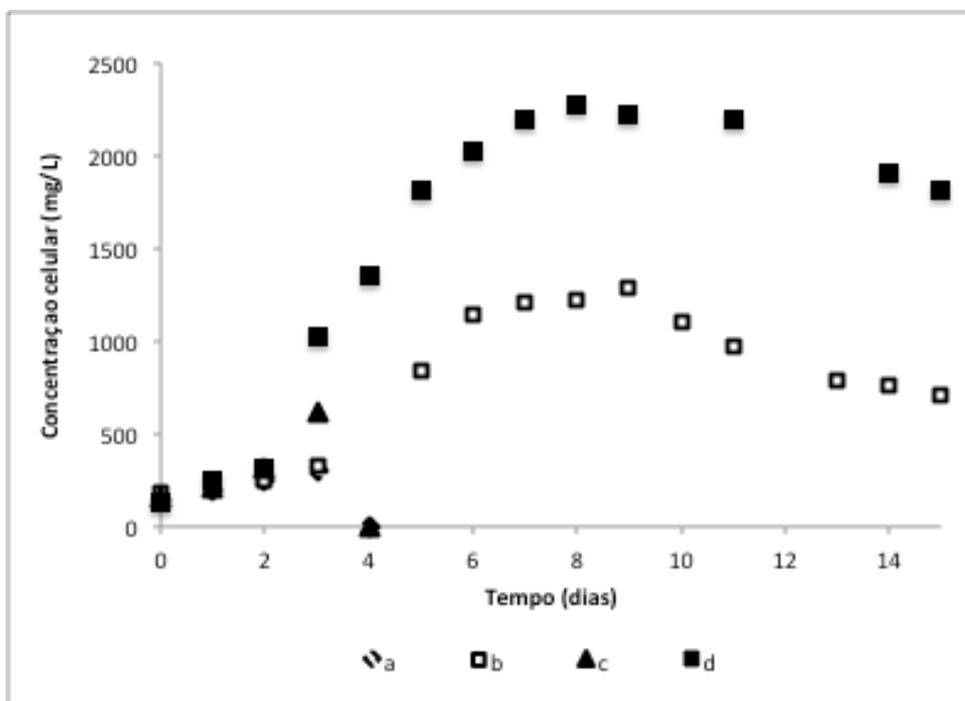


Figura 23. Concentração celular em função do tempo no cultivo de *N. Oleoabundans* sob diferentes regimes de alimentação de nitrogênio. a) Processo descontínuo com meio Bold Padrão (1N); b) Processo descontínuo com meio Bold 3N; c) Processo descontínuo alimentado de acordo com a velocidade específica máxima de crescimento no ensaio b). d) Processo descontínuo alimentado de acordo com a produtividade diária.

Ficou evidenciado que o melhor tipo de alimentação para obter maiores valores de biomassa nos fotobiorreatores é uma alimentação por pulsos diários baseados na produtividade diária em células (ensaio d). O valor de nitrogênio fornecido era calculado tendo em conta que aproximadamente 6,6% da biomassa de microalgas é formada por nitrogênio (GROBELAAR, 2004). Do mesmo modo, quando o nitrogênio foi adicionado de acordo com a velocidade específica máxima de crescimento no reator, em processo descontínuo (ensaio b, item 5.4; ensaio B item 5.3), ocorreu uma inibição por substrato e o micro-organismo morreu em decorrência do excesso de nitrato de sódio; este excesso poderia ter ocorrido porque nos primeiros dias do cultivo o micro-organismo apresenta uma fase *lag* ou de adaptação (Figuras

22 e 23), não tendo um consumo considerável de nutrientes nos dois primeiros dias do processo. Por outro lado, uma concentração inicial 1N (2,94mM) de nitrato de sódio foi insuficiente para manter o crescimento do micro-organismo, ocorrendo a morte após três dias de cultivo. Todavia, é possível iniciar os cultivos com o meio Bold padrão e adicionar posteriormente o nitrato que foi transformado em biomassa, como no caso do ensaio *d*. Este esquema de alimentação foi padronizado para os ensaios subsequentes.

## 5.5. Ensaio em Erlenmeyer com indução de estresse ambiental.

### 5.5.1. Adição de tiosulfato de sódio no cultivo.

Na Tabela 7 se observam os resultados dos experimentos com diferentes tempos de adição do tiosulfato de sódio (2,5mM de acordo com Mandal & Mallick, 2009) no cultivo de *N. oleoabundans*.

Tabela 7. Parâmetros de crescimento e avaliação da biomassa nos cultivos com diversos tempos de adição de tiosulfato de sódio 2.5mM.

Ensaio	Início	Fase de crescimento	Xf mg L <sup>-1</sup>	Px mg L <sup>-1</sup> dia <sup>-1</sup>	%LIP	%PTN
A	dia 7 dia	meio fase log	768,1 ± 28,3	176,8 ± 25,7	41,2	14,3
B	10	final fase log	854,9 ± 21,6	178,4 ± 2,7	52,0	7,7
Controle	-	-	950,8 ± 77,8	101,8 ± 30,5	28,9	15,4

Xf: concentração celular final.

Px: produtividade em células.

%LIP: porcentagem do teor de lipídios totais.

%PTN: porcentagem do teor de proteínas.

A adição do tiosulfato no meio não afetou consideravelmente o crescimento da microalga; no entanto a adição durante a fase exponencial de crescimento (ensaio A) causou um crescimento irregular, refletido na redução da concentração celular final quando comparado com o controle (Tabela 7). Em relação ao teor lipídico acumulado, houve um aumento na porcentagem quando adicionado o agente redutor, comparado com o controle (28.9%); do mesmo modo, foi observado um maior valor no teor quando o tiosulfato era

adicionado no final da fase exponencial do crescimento (ensaio B). Finalmente, o teor de proteínas teve uma redução considerável quando o teor de lipídeos foi alto (ensaio B).

Tendo em conta os resultados anteriores, na seguinte etapa a adição por pulsos das diferentes concentrações de tiosulfato começou no dia 10 até o final do cultivo, permitindo assim o crescimento idôneo do micro-organismo até sua máxima concentração celular, antes de adicionar o agente redutor. As concentrações estudadas (1.2, 2.5 e 3.8 mM), foram atingidas no dia 14 do cultivo e os resultados são apresentados na Tabela 7.

Tabela 8. Parâmetros de crescimento e teor proteico nos cultivos com diversas concentrações de tiosulfato de sódio.

Tiosulfato	Xmax	Xf	Pxmax	
mM	mg L <sup>-1</sup>	mg L <sup>-1</sup>	mg L <sup>-1</sup> dia <sup>-1</sup>	%PTN
0	950,77 ± 64,1	849,0 ± 77,8	52,9 ± 14,8	15,4
1,2	820,55 ± 100,3	820,6 ± 100,3	42,3 ± 15,7	12,0
2,5	897,01 ± 21,6	730,8 ± 107,5	48,6 ± 7,5	7,7
3,8	846,20 ± 127,5	546,2 ± 127,5	32,7 ± 8,5	14,6

Xmax: concentração celular máxima.

Xf: concentração celular final.

Px: produtividade em células.

%PTN: porcentagem do teor de proteínas.

Na Figura 24 são apresentadas as porcentagens de lipídios totais obtidos na massa seca, para os ensaios com diferentes concentrações de tiosulfato de sódio.

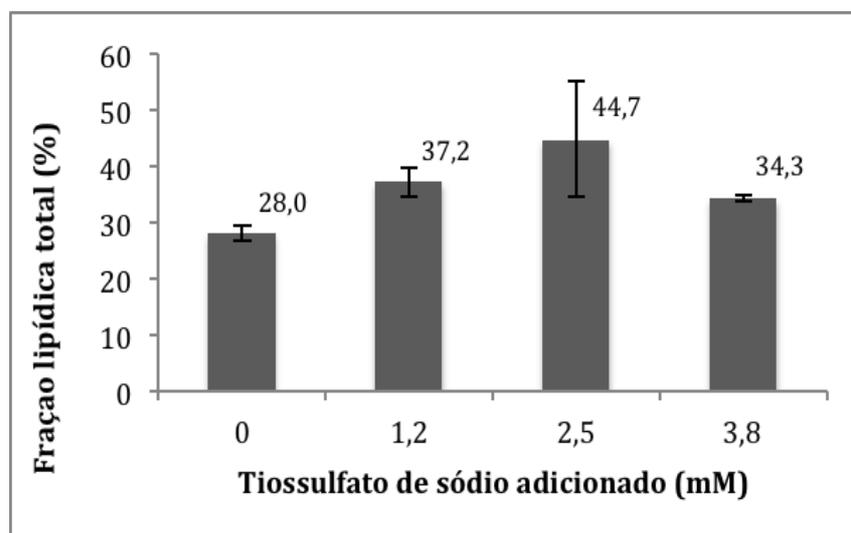


Figura 24. Porcentagem de lipídeos totais em função do tiosulfato de sódio adicionado no cultivo de *N. oleoabundans*

A maior porcentagem obtida de lipídios (44,7%) foi empregando 2,5mM de tiosulfato de sódio, tendo esse ensaio a maior concentração celular (897mg/L). A maior produtividade máxima (192 mg L dia) foi obtida no ensaio com 1,2mM de tiosulfato de sódio. Abaixo de 2,5mM o tiosulfato de sódio não afeta o crescimento celular e permite aumentar o teor de lipídios na biomassa, e a microalga tem uma melhor resposta ao ambiente redutor após a fase exponencial. Acima de 2,5mM o tiosulfato causou uma forte redução na concentração celular (Tabela 7) e menor valor na porcentagem de lipídios comparado com os outros ensaios com tiosulfato, inviabilizando o uso da solução de tiosulfato 3,8mM.

### 5.5.2. Adição de Glicerol

Na Tabela 9 é possível observar os parâmetros de crescimento da microalga sob diferentes concentrações de glicerol, cultivada em Erlenmeyer.

Tabela 9. Parâmetros de crescimento nos cultivos com diversas concentrações de glicerol

Glicerol (M)	Xmax mg L <sup>-1</sup>	Xf mg L <sup>-1</sup>	Pxmax mg L <sup>-1</sup> dia <sup>-1</sup>	%PTN
Controle	950,8 ± 64,1	849,0 ± 77,8	52,9 ± 14,8	15,4
0,34	914,0 ± 65,9	914,0 ± 65,9	57,6 ± 4,3	23,3
0,68	985,0 ± 8,8	973,4 ± 76,6	31,4 ± 5,1	15,6
1,02	926,8 ± 46,9	896,8 ± 46,9	58,6 ± 1,9	14,5
1,36	1257,8 ± 175,3	1145,5 ± 127,6	72,4 ± 8,5	23,6

Xmax: concentração celular máxima.

Xf: concentração celular final.

Px: produtividade em células.

%PTN: porcentagem do teor de proteínas.

De acordo com a densidade ótica, os ensaios feitos com adição de glicerol mantiveram maiores valores de concentração celular no final do cultivo, assim como valores de concentração celular máxima próximos aos valores do controle, tendo um crescimento maior no ensaio com 1,36M de glicerol adicionado (Tabela 9). No entanto, foi possível observar a proliferação de bactérias ao longo do processo, visível pela turbidez do meio de cultivo que aumentava conforme aumentavam os valores de glicerol adicionados. Este crescimento bacteriano poderia ter influenciado na leitura da concentração celular, pelo qual o crescimento observado da microalga não teve uma queda pronunciada, mesmo tendo esgotado a fonte nitrogenada no meio de cultura.

Em relação aos lipídios totais produzidos (Figura 25), houve um aumento desta porcentagem em comparação com o ensaio controle, reduzindo levemente quando o glicerol era 1,36M. Todavia, um aumento na população bacteriana pode danificar o cultivo, acidificando o meio e competindo por nutrientes com a microalga. Por tal motivo foi escolhido 0,68M de adição de glicerol para ser testado em cultivos em foto biorreator tubular.

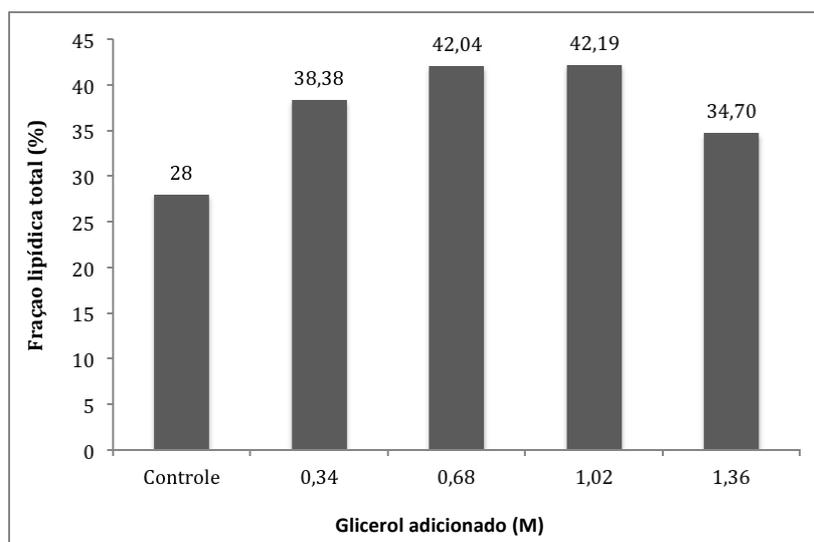


Figura 25. Porcentagem de lipídeos totais em função do glicerol adicionado no cultivo de *N. oleoabundans*

### 5.5.3. Adição de Cloreto de sódio.

Na Tabela 10 são apresentados os resultados referentes aos ensaios com cloreto de sódio

Tabela 10. Parâmetros de crescimento nos cultivos com diversas concentrações de cloreto de sódio.

NaCl mM	Xmax mg L <sup>-1</sup>	Xf mg L <sup>-1</sup>	Px mg L <sup>-1</sup> dia <sup>-1</sup>	%PTN
0	950,8 ± 64,1	849,0 ± 77,8	52,9 ± 14,8	15,4
1	1344,9 ± 134,1	1344,9 ± 134,1	92,1 ± 9,6	20,25
2,2	1102,5 ± 154,8	552,1 ± 150,0	35,3 ± 10,8	8,37
4,5	1169,1 ± 135,6	1169,1 ± 135,6	79,4 ± 9,7	21,3

Xmax: concentração celular máxima.

Xf: concentração celular final.

Px: produtividade em células.

%PTN: porcentagem do teor de proteínas

Foi evidenciado que a adição de NaCl não afetou consideravelmente o crescimento celular. Nesta parte do estudo o ensaio com menor biomassa foi o ensaio com 2,2mM (Tabela 10), porém é o ensaio com o maior teor de lipídios acumulado (Figura 26). Os outros ensaios apresentaram perfis

similares no teor de lipídios quando comparados com o controle. O aumento da concentração celular no ensaio com 4,5mM de NaCl poderia ser explicado como um efeito do aumento no tamanho celular sob altas pressões osmóticas, como anotado por Takagi e colaboradores (2006) em cultivos de *Dunaliella*.

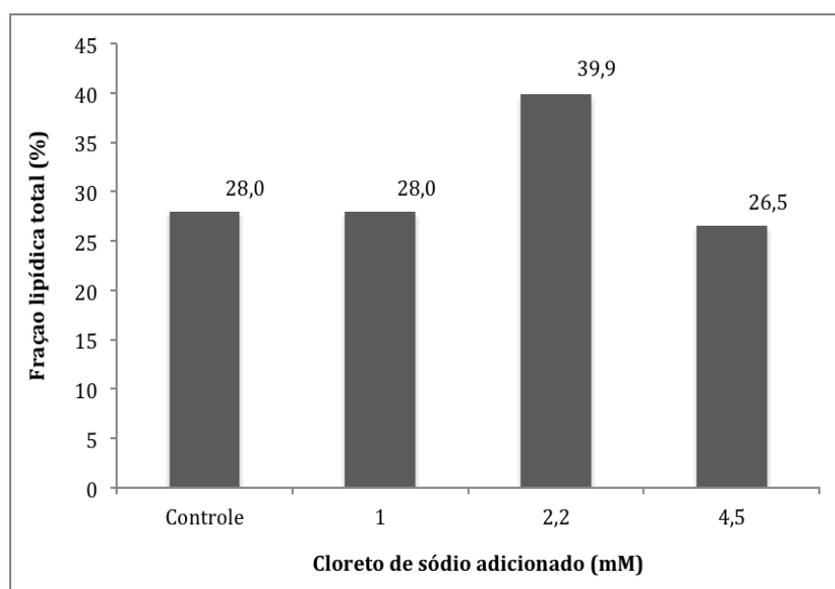


Figura 26. Porcentagem de lipídeos totais em função do cloreto de sódio adicionado no cultivo de *N. oleoabundans*

### 5.6. Cultivo em fotobiorreatores sob condições de estresse ambiental.

Os melhores resultados obtidos na etapa anterior (Tiosulfato de sódio 2,5mM; Glicerol 0,68M e NaCl 2,2mM) foram testados em foto biorreatores tubulares, aplicando a otimização previa do cultivo (itens 5.3 e 5.4). Foi testado também tiosulfato de sódio 1,2mM. Na Tabela 11 é possível observar os parâmetros cinéticos e de crescimento dos cultivos com adição de agente indutor de estresse. As curvas de crescimento com adição de agente redutor são apresentadas na Figura 27, enquanto as curvas de crescimento dos cultivos com adição de agentes que aumentam a osmolaridade do meio estão na Figura 28.

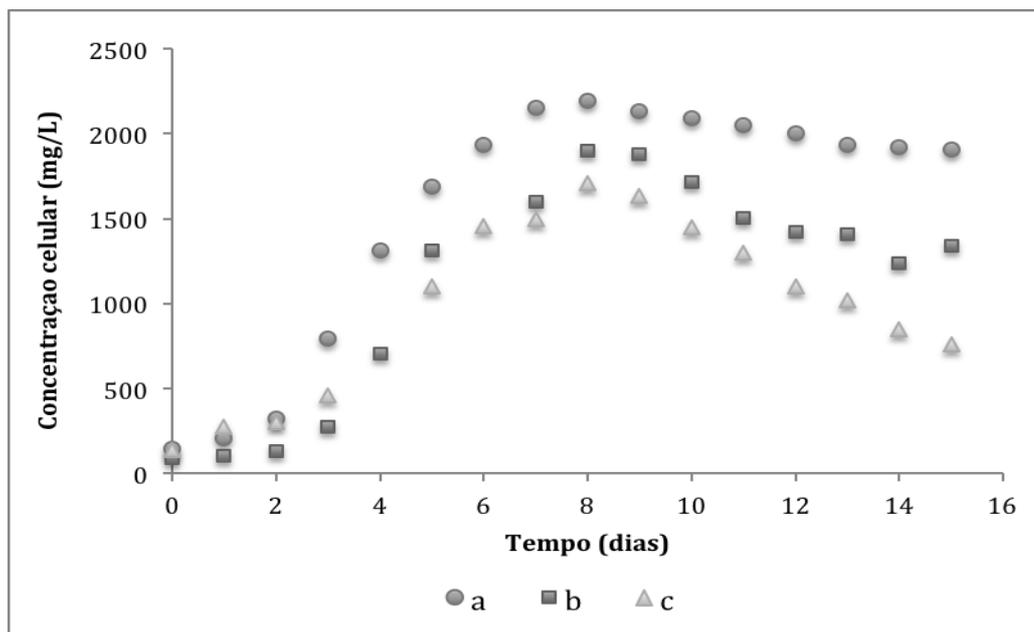


Figura 27. Concentração celular em função do tempo no cultivo de *N. oleoabundans* sob adição de tiosulfato de sódio. a) Controle; b) 1,2mM; c) 2,5mM.

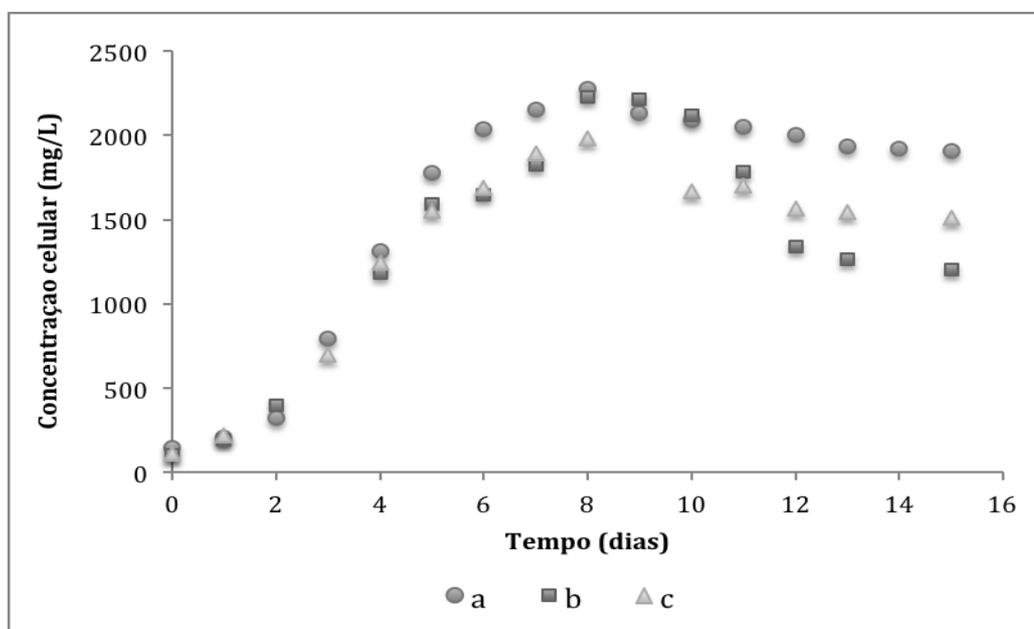


Figura 28. Concentração celular em função do tempo no cultivo de *N. oleoabundans* sob compostos que aumentam a osmolaridade do meio. a) Controle; b) NaCl 2,2mM; c) Glicerol 0,68M.

Tabela 11. Parâmetros de crescimento nos cultivos sob diferentes condições de estresse ambiental.

Agente indutor	Xmax mg L <sup>-1</sup>		Xf mg L <sup>-1</sup>		Px mg L <sup>-1</sup> dia <sup>-1</sup>		Y <sub>X/N</sub> mg mg <sup>-1</sup>
Controle	2192,5 <sup>A</sup> ± 65,5		1902,8 <sup>A</sup> ± 18,1		117,3 <sup>A</sup> ± 2,0		10,3 <sup>A</sup> ± 0,1
Tiosulfato de sódio 1,2mM	1894,6 <sup>A</sup> ± 167,0		1338,6 <sup>AB</sup> ± 123,9		83,0 <sup>AB</sup> ± 8,2		5,3 <sup>B</sup> ± 1,0
Tiosulfato de sódio 2,5mM	1709,9 <sup>A</sup> ± 93,6		757,0 <sup>C</sup> ± 33,9		41,1 <sup>C</sup> ± 2,6		5,3 <sup>B</sup> ± 0,3
Glicerol 0,68M	1976,8 <sup>A</sup> ± 99,8		1511,2 <sup>AB</sup> ± 260,8		93,3 <sup>AB</sup> ± 17,6		8,9 <sup>AB</sup> ± 2,1
Cloreto de sódio 2,2mM	2226,0 <sup>A</sup> ± 164,7		1203,8 <sup>BC</sup> ± 29,8		73,2 <sup>BC</sup> ± 1,9		4,4 <sup>AB</sup> ± 1,9

Xmax: concentração celular máxima

Xf: concentração celular final.

Px: produtividade em células.

Y<sub>X/N</sub>: fator de conversão de nitrogênio em células

Em relação à adição do agente redutor, pode se observar o declínio da concentração celular após a privação de nitrogênio e a adição do tiosulfato de sódio (Figura 27). É evidente que a concentração 2,5mM afetou consideravelmente a microalga, acelerando a morte celular quando comparado com o controle, tendo um valor final de concentração celular de 759mg/L, quase três vezes menor que o ensaio sem tiosulfato (Tabela 11). A toxicidade deste composto é menor quando adicionado 1,2mM na fase de acúmulo de lipídios, evidenciado pela concentração celular final (1338mg/L) e pela produtividade em células (83mg/L.dia), sendo ambos os valores o dobro do que os atingidos com 2,5mM. Trabalhos anteriores demonstraram um efeito negativo do tiosulfato de sódio na produtividade celular em concentrações acima de 2,5mM para *Chlorella* (FENG *et al.*, 2005) e 3,8mM para *Scenedesmus* (MANDAL & MALLICK, 2009) em Erlenmeyer. No presente trabalho esse valor de 3,8mM também resultou tóxico para *N. oleoabundans* cultivada em Erlenmeyer (item 5.5.1); no fotobiorreator o efeito negativo do agente redutor foi mais pronunciado, quiçá devido às condições

próprias do cultivo, como a configuração do fotobiorreator, a iluminação e, principalmente, à privação de nitrato de sódio, fatores que exigem uma adaptabilidade maior da microalga no bioprocesso.

Do mesmo modo, na Figura 28 foi observado que o glicerol e o cloreto de sódio, como agentes que aumentam a osmolaridade do meio, causaram uma redução da concentração celular na fase de carência de nitrogênio, de acordo com os valores de concentração celular final e produtividade em células (Tabela 11); no entanto, a queda desse valor não foi tão acentuada como no ensaio com o tiosulfato em 2,5mM. Do mesmo modo, foi observado que o ensaio com glicerol apresentou melhores parâmetros do que o cloreto de sódio; todavia, não pode se inferir que o glicerol apresenta menor toxicidade que o sal, pois estudos prévios indicam que *N. oleoabundans*, (isolada em uma duna de areia) consegue tolerar e ainda crescer sob condições de salinidade elevadas (POPOVICH *et al.*, 2012; BALDISSEROTTO *et al.*, 2012). De acordo com a análise ANOVA, os ensaios com glicerol são estatisticamente iguais que o controle em termos de concentração celular máxima ( $p=0,1$ ), pelo qual pode se inferir que o choque osmótico causado pelo glicerol não afetou o desenvolvimento da micro alga. No entanto, o maior valor de biomassa final obtido no cultivo com glicerol, quando comparado com o ensaio com cloreto de sódio, pode ter sido influenciado pela própria turvação do meio causada pela maior quantidade de bactérias, que pode ter interferido na leitura da densidade ótica, e também ter causado um alto desvio padrão ( $\pm 260,8$ ). Igualmente não é possível assinalar que o glicerol foi assimilado pela microalga e que isso permitiu um maior crescimento celular, pois já foi relatado que *N. oleoabundans* não utiliza o glicerol como fonte de carbono (MORALES-SANCHEZ *et al.*, 2013).

Eriksen (2008) menciona que diversos fatores influenciam nos resultados obtidos quando é feito o *scaling* up dos cultivos de microalgas, como a adição de CO<sub>2</sub>, o intercâmbio de gases e o volume de trabalho, Portanto, é importante destacar que os estudos mencionados anteriormente, em presença de altas salinidades, não incluíam privação de nitrogênio e seus

cultivos foram feitos em condições ótimas para o crescimento em termos de nutrientes, possíveis razões pelas quais no presente ensaio não se conseguiu manter uma concentração celular maior nos fotobiorreatores tubulares.

Para comparar o efeito da carência de nitrogênio no metabolismo da microalga, foi analisada a biomassa produzida no ensaio controle no final da fase exponencial (dia 10) e após 5 dias de privação de nitrato de sódio (dia 15), no período em que eram adicionados os diferentes agentes estressores nos cultivos. A comparação das duas biomassas controle são apresentadas na Figura 29.

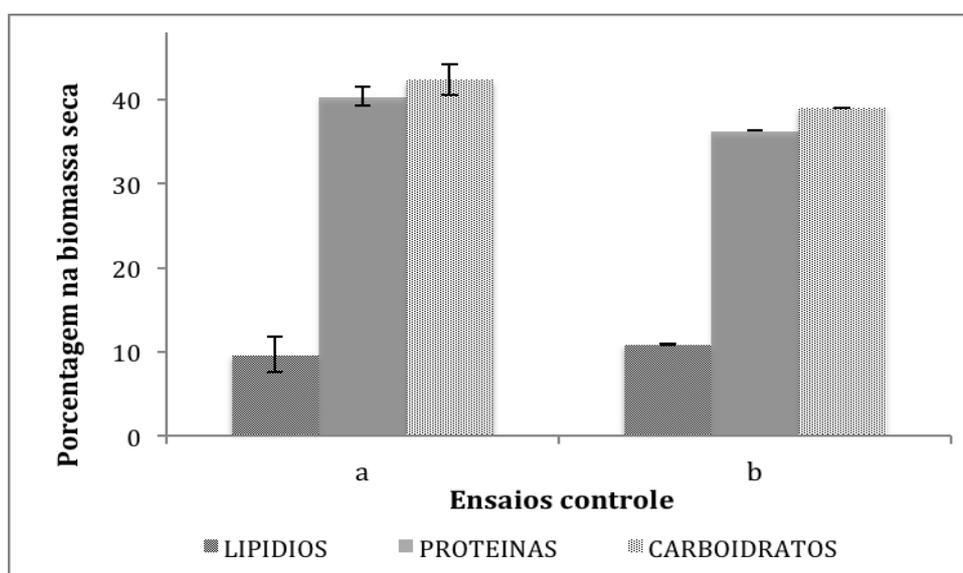


Figura 29. Porcentagem de lipídios totais, proteínas e carboidratos no cultivo sem adição de agente estressor. a) Biomassa no dia 10; b) Biomassa no dia 15.

A biomassa de *N. oleoabundans*, cultivada em fotobiorreator tubular sob condições favoráveis, apresentou uma composição característica com a distribuição padrão do carbono fixado na fotossíntese, isto é, 8-15% de lipídios, 20-40% de carboidratos e 30-50% de proteínas (HU, 2004). De acordo com a Figura 29, é possível observar que as condições de cultivo no fotobiorreator não permitem um aumento significativo no teor de lipídios após privar a microalga do nitrato de sódio; a porcentagem de proteínas teve uma

leve diminuição após 5 dias de carência de nitrogênio, assim como o conteúdo de carboidratos, indicando que o micro-organismo não teve condições adequadas para o acúmulo de lipídios. No entanto, a redução na síntese de proteínas indica uma possível mudança no fluxo metabólico da microalga, o qual dá uma maior validade à estratégia de adição de agentes que causem estresse no cultivo no fotobiorreator. Desta maneira, são apresentados a seguir os efeitos da adição de tiosulfato de sódio, glicerol e cloreto de sódio na composição da biomassa, nas Figuras 30 e 31.

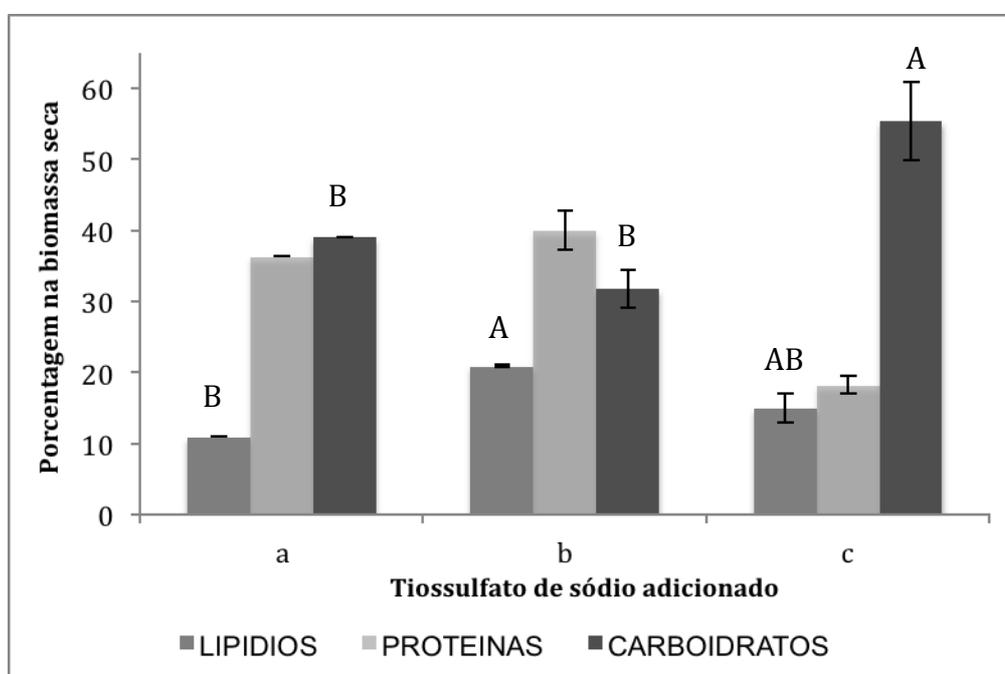


Figura 30. Porcentagem de lipídios totais, proteínas e carboidratos nos cultivos com adição de tiosulfato de sódio. a) Controle; b) 1,2mM; c) 2,5mM.

Analisando as composições das biomassas é possível demonstrar que, em geral, a adição dos agentes nos cultivos permitem um aumento no teor de lipídios produzidos. O tiosulfato de sódio em 1,2mM permitiu um aumento de quase 100% na porcentagem de lipídios totais acumulados (21%), comparado com ensaio controle (11%), sendo estatisticamente diferentes de acordo com a análise de variância; do mesmo modo, na concentração 2,5mM o aumento da fração lipídica foi de 50% comparando-o com o controle, porém não há diferenças estatisticamente significativas para ambos os ensaios, tendo o

ensaio com tiosulfato um acúmulo maior de carboidratos do que o ensaio controle (Figura 30). Este aumento da porcentagem lipídica na biomassa é causado por uma influência direta nas rotas metabólicas da microalga, toda vez que o ambiente redutor causado pelo tiosulfato causa um aumento de NADH, o qual inibe a enzima citrato sintase e permite desviar intermediários metabólicos do Ciclo de Krebs, como acetil-CoA, para malonil-CoA, o qual representa o primeiro passo para a biossíntese de ácidos graxos (FENG *et al.*, 2005; MANDAL & MALICK, 2009; NGANGKHAM *et al.*, 2012).

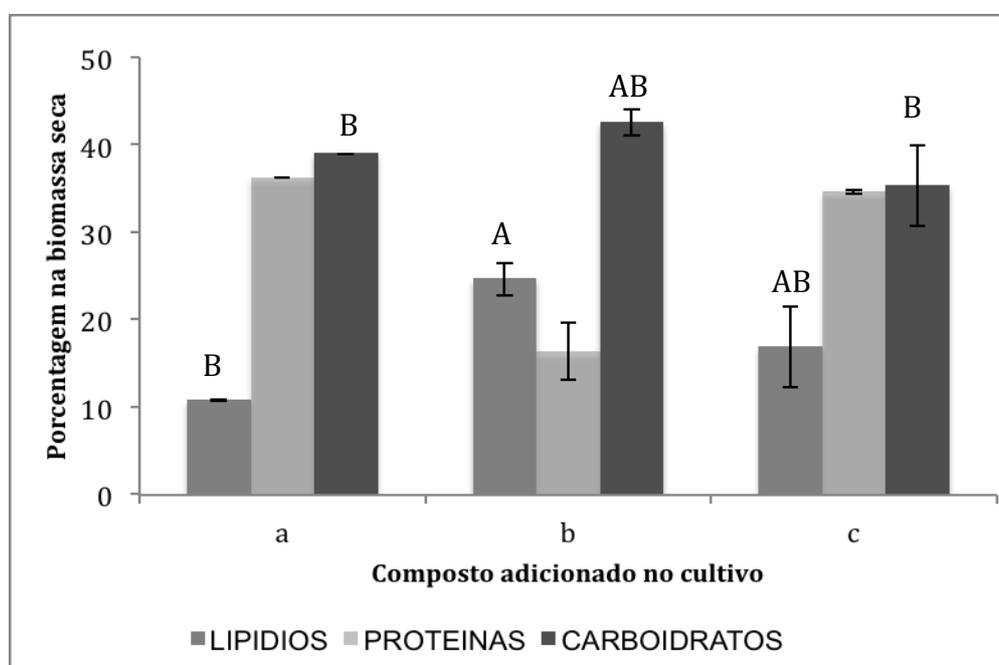


Figura 31. Porcentagem de lipídios totais, proteínas e carboidratos sob diferentes condições de aumento osmótico. a) Controle; b) Cloreto de sódio 2,2mM; c) Glicerol 0,68mM.

Examinando a Figura 31 é possível inferir que o estresse osmótico causado pelos agentes adicionados na fase estacionária do cultivo permite um acúmulo de lipídios na biomassa. O ensaio com adição de cloreto de sódio (b) é estatisticamente diferente ao controle no aumento da fração lipídica, aumentando o teor (25%) quase 130 % em comparação com o ensaio controle (a) (11%), enquanto que a adição de glicerol no meio permitiu um aumento de 50% (17% da massa seca). Os resultados do acúmulo são sustentados por estudos prévios (BALDISSEROTTO *et al.*, 2012; BAND *et al.*,

1992; SANTOS *et al.*, 2012) A porcentagem de proteínas no ensaio *b* indica que o metabolismo da microalga foi de fato direcionado para a biossíntese de lipídios, concordando com o proposto por Wang e colaboradores (2011), em que a biossíntese de ácidos graxos captura os elétrons captados na fotossíntese pela membrana tilacoidal, os quais não podem ser utilizados para a síntese de aminoácidos e ácidos nucleicos, devido à carência de nitrogênio; os mesmos autores indicam que a produção de corpos lipídicos nas microalgas serve como mecanismo de sobrevivência, pois lhes permitiria flutuar para nichos com melhores condições para seu desenvolvimento. Por outro lado, o aumento dos carboidratos no ensaio *b* concorda com o estudo feito pelo grupo de Band (1992), em que advertiram uma produção de sacarose como molécula osmorregulatória em *N. oleoabundans*.

Em relação aos carboidratos produzidos, os altos teores observados nos experimentos com adição de agentes estressores (Figuras 30 e 31) podem ser causados por diversos fatores. Sun e colaboradores (2014) determinaram que o amido também é sintetizado como reserva de energia em condições de carência de nitrogênio por *N. oleoabundans*, com teores entre 40 e 80% da massa seca; o amido é acumulado nos primeiros estágios da privação do nitrogênio devido a que sua síntese é mais econômica e rápida para o metabolismo da microalga, para depois ser direcionado para a biossíntese de triglicerídeos, como um mecanismo de sobrevivência para longos períodos de estresse (SIAUT *et al.*, 2011). Por outro lado, Morales-Sanchez e coautores (2013) obtiveram biomassas com altos teores de carboidratos (54%) na biomassa de *N. oleoabundans* quando cultivada em condições de heterotrofia. Embora no presente trabalho não foi adicionada nenhuma fonte de carbono orgânico assimilável para a microalga, a morte celular na fase de adição do agente estressor pôde ter causado uma alta carga de matéria orgânica no cultivo, que poderia ter sido assimilada pelas células vivas para sua manutenção, processo denominado autofagia (CHEN *et al.*, 2009) e desta maneira contribuir para que os teores de carboidratos tivessem um aumento considerável; também é importante mencionar que o material liberado também pôde ter contribuído a um aumento do nitrogênio disponível para a

microalga da forma orgânica, diminuindo o estresse por carência de nitrogênio e impedindo um maior acúmulo de lipídios.

Para avaliar efetivamente o agente com maior potencial para o acúmulo do teor de lipídios, foi calculada a concentração de lipídios totais produzidos nos ensaios. O cálculo foi feito seguindo a fórmula:

$$LIP_{total} = (\%LIP * X_f) / 100$$

Onde:

$LIP_{total}$ : concentração de lipídios totais produzidos (mg lipídios/L)

%LIP: porcentagem da fração lipídica do ensaio

$X_f$ : concentração celular final (mg célula/L)

Agente indutor	Concentração de lipídios totais (mgLip/L)
Glicerol 0,68M	255,9
Tiosulfato 1,2mM	279,1
NaCl 2,2mM	297,0

Observando os valores fica evidente que o glicerol é o agente estressor que permite um menor acúmulo de lipídios totais. Como os ensaios com tiosulfato de sódio em 1,2mM e com cloreto de sódio apresentaram valores estatisticamente iguais em termos de concentração celular final e teor lipídico, porém menores valores do que os obtidos com o glicerol, pode se concluir que o cloreto de sódio em 2,2mM é o tratamento mais eficiente para acumular lipídios no cultivo em fotobiorreatores, o qual é confirmado por estudos prévios (BALDISSEROTTO *et al.*, 2012; BAND *et al.*, 1992; SANTOS *et al.*, 2012).

### 5.7. Ensaios em fotobiorreatores com diversos regimes de luz

Nesta última fase do estudo foram avaliados diferentes regimes de adição de luz no cultivo em fotobiorreatores tubulares. Decidiu-se escolher um

regime 12:12, sendo 12 horas de luz fluorescente (simulando a luz do dia) e 12 horas com uma condição diferenciada, buscando uma redução no consumo de energia luminosa no cultivo. As curvas de crescimento para os ensaios são exibidas na Figura 32.

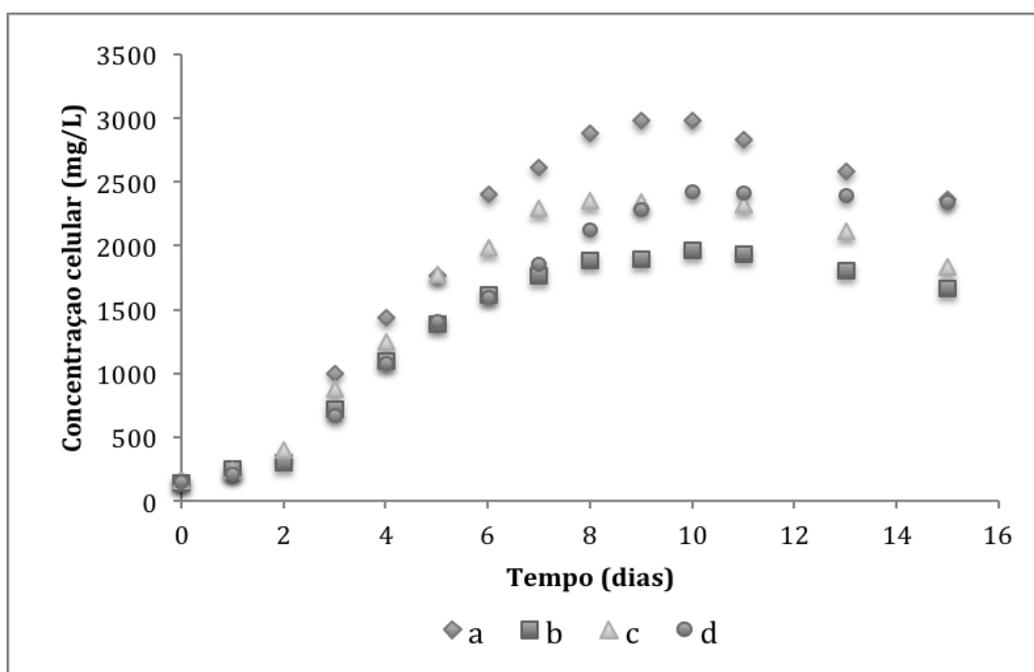


Figura 32. Concentração celular em função no tempo no cultivo de *N. oleoabundans* sob diferentes regimes de luz. a) Controle (24h luz fluorescente). b) 12h luz fluorescente:12h escuridão. c) 12h luz fluorescente:12h luz LED vermelha. d). 12h luz fluorescente:12h luz LED branca.

As curvas de crescimento apresentadas mostram claramente o efeito da mudança do regime de luz. O ensaio controle demonstrou uma maior eficiência no crescimento e não teve impacto nas condições do cultivo. O ensaio *b* teve um maior efeito negativo no crescimento, observando uma redução das concentrações celulares ao longo do cultivo devido ao longo período de escuridão, afetando assim a fotossíntese e consequentemente a divisão celular. O ensaio com luz LED vermelha (*c*) causou um estresse no cultivo, o qual era esperado de acordo com o divulgado por Kula e colaboradores (2014). Finalmente, o ensaio *d*, onde foi empregada luz LED branca, apresentou um crescimento linear, concordando com o sugerido por

Solovchenko e colaboradores (2008), em que baixas intensidades luminosas resultam nesse tipo de crescimento.

Para um maior entendimento do efeito dos modelos de luz no cultivo de *N. oleoabundans* em fotobiorreatores, são apresentados na Tabela 12 os parâmetros de crescimento dos diferentes ensaios.

Tabela 12. Parâmetros de crescimento nos cultivos sob diferentes regimes de luz.

Regime de luz	Xmax mg L <sup>-1</sup>	Xf mg L <sup>-1</sup>	Px mg L <sup>-1</sup> dia <sup>-1</sup>	Y <sub>X/N</sub> mg mg <sup>-1</sup>	μmax dia <sup>-1</sup>
Controle	2981,1 <sup>A</sup> ± 114,7	2360,5 <sup>A</sup> ± 197,3	146,7 <sup>A</sup> ± 12,2	9,3 <sup>A</sup> ± 0,1	0,587
Escuridão	1961,0 <sup>B</sup> ± 28,5	1665,2 <sup>B</sup> ± 17,5	102,0 <sup>B</sup> ± 0,6	10,1 <sup>A</sup> ± 0,1	0,476
LED Vermelha	2350,3 <sup>AB</sup> ± 160,2	1836,2 <sup>AB</sup> ± 58,4	112,3 <sup>AB</sup> ± 6,8	9,1 <sup>A</sup> ± 0,6	0,498
LED Branca	2415,5 <sup>AB</sup> ± 111,6	2335,0 <sup>A</sup> ± 157,9	145,7 <sup>A</sup> ± 10,5	11,5 <sup>A</sup> ± 1,3	0,478

Xmax: concentração celular máxima

Xf: concentração celular final.

Px: produtividade em células.

Y<sub>X/N</sub>: fator de conversão de nitrogênio em células

μmax: velocidade específica de crescimento

Os ensaios com regime diferenciado de luz apresentaram uma velocidade específica de crescimento menor do que o controle, com valores próximos entre si, evidenciando o efeito da luz fornecida no crescimento celular; o ensaio com 12h de escuridão (b) obteve um menor valor de concentração celular máxima, menor valor de concentração celular final e em consequência menor produtividade em células, pois a microalga mudou seu metabolismo de fixação do dióxido de carbono pela fotossíntese a um processo de respiração, onde o carbono fixado é consumido para sua sobrevivência em condições prolongadas de escuridão (CARVALHO *et al.*, 2011). Os ensaios com luz LED obtiveram concentrações máximas similares, porém o ensaio com luz LED vermelha (c) teve uma menor concentração celular final e consequentemente menor produtividade em células do que o ensaio (d) provavelmente devido a que neste último existe a banda espectral de emissão de luz azul, entre 436 e

460nm, faixa favorável para a absorção de luz por parte das clorofilas *a* e *b*, respectivamente (MATTHIJS *et al.*, 1996), o qual permitiu que no ensaio com luz LED branca se obtiveram valores muito similares ao ensaio controle (Tabela 12). Analisando o agrupamento dos dados por meio da ANOVA, foi possível observar que os parâmetros cinéticos dos ensaios com uso da luz LED são estatisticamente iguais com o controle, mesmo tendo uma redução da intensidade luminosa fornecida no cultivo, redução de 25% e 33% para LED branca e vermelha respectivamente, corroborando a eficiência no uso dos diodos emissores de luz quando comparados com a luz fluorescente..

Os perfis da composição da biomassa obtida nos ensaios com regimes de luz são apresentados na Figura 33.

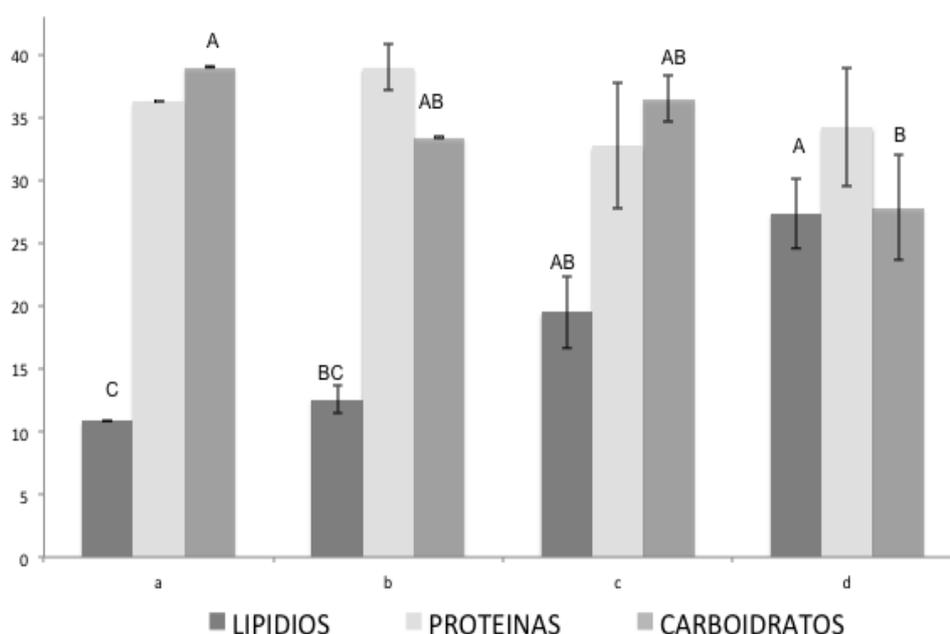


Figura 33. Porcentagem de lipídeos totais, proteínas e carboidratos sob diferentes regimes de luz. a) 24h de luz fluorescente. b) 12h luz fluorescente:12h escuridão. c) 12h luz fluorescente:12h luz LED vermelha. d) 12h luz fluorescente:12h luz LED branca.

A figura 33 põe em evidência que o uso de luz LED aumenta o teor de lipídios produzidos na biomassa da microalga quando comparados com o controle, sendo estatisticamente diferentes dele, obtendo o maior valor de

fração lipídica no ensaio *d* (27%). Isto pode ter acontecido devido a um maior estímulo do fotossistema por causa da banda espectral azul presente na luz branca (KULA *et al.*, 2014; OKUMURA *et al.*, 2014), o qual, em condições de privação de nitrogênio, poderia ter derivado em uma maior biossíntese de lipídios como mecanismo para canalizar a energia luminosa recebida e o CO<sub>2</sub> capturado; isto concorda com o trabalho de Olguin e colaboradores (2001), onde determinaram um aumento no teor de lipídios na biomassa de *Spirulina* sp sob baixas intensidades luminosas. O teor de lipídios acumulados no ensaio *b* foi estatisticamente igual ao controle, provavelmente devido a que organismos fototróficos cultivados em ciclos de luz:escuridão mostram uma pronunciada assimilação e desassimilação dos carboidratos, enquanto que e os valores de proteínas permanecem constantes (MATTHIJS *et al.*, 1996). Finalmente, o ensaio com luz LED vermelha duplicou o teor de lipídios quando comparado com o ensaio controle e aparentemente não tem um efeito regulatório no metabolismo de proteínas e carboidratos, como sugerido pelo grupo de Matthijs (1996).

Do mesmo modo, foi calculada a concentração de lipídios totais produzidos nos ensaios, seguindo a formula:

$$\text{LIP}_{\text{total}} = (\% \text{LIP} * \text{Xf}) / 100$$

Regime de luz	Concentração de lipídios totais (mgLip/L)
Controle	255,7 <sup>C</sup>
LED vermelha	356,4 <sup>B</sup>
LED branca	636,8 <sup>A</sup>

Os valores obtidos da concentração de lipídios totais acumulados nos experimentos demonstram que há uma diferença estatisticamente significativa entre o controle e os ensaios com luz LED, pois o uso dessa luz branca

duplicou o valor do controle, enquanto que a luz vermelha aumentou em 100mg o valor obtido com o regime de 24h de luz fluorescente. Estudos feitos com *Arthrospira* mostraram cultivos com melhores crescimentos e rendimentos quando era usada luz LED vermelha (CHEN *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2007). Okumura e colaboradores (2014) observaram que a luz LED azul apresentava melhoras na velocidade específica de crescimento na microalga *B. braunii*. Entretanto, no presente trabalho foi determinada uma maior eficiência da luz LED branca, tanto em parâmetros cinéticos como em composição da biomassa para *N. oleoabundans*, o que sugere que existe uma especificidade no tipo de luz usado para cada micro organismo fotossintetizante, o qual é certamente influenciado pelo tipo de biorreator. Pode se concluir que, de acordo com o grupo de Carvalho (2011) LEDs brancos são os mais eficazes, uma vez que funcionam de forma semelhante às lâmpadas fluorescentes; sua alta eficiência surge das temperaturas de cor similares (muitas vezes acima de 5.000 K) que produzem uma luz azulada fria, adequada para o cultivo de *N. oleoabundans* em fotobiorreatores tubulares.

### 5.8. Perfil de ácidos graxos

São apresentados a seguir (Tabelas 13 a 15) os perfis de ácidos graxos analisados pela cromatografia gasosa, para cada conjunto de ensaios.

Tabela 13. Perfil de ácidos graxos na biomassa de *N. oleoabundans* nos cultivos com Tiosulfato de sódio

Acido Graxo (%) <sup>a</sup>	Controle	Tiosulfato 1,2mM	Tiosulfato 2,5mM
C11:0	-	1,46 ± 0,05	1,17 ± 0,00
C12:0	-	5,50 ± 2,10	
N.I	-	1,93 ± 0,15	
C16:0	21,39 ± 0,52	19,02 ± 0,31	21,01 ± 0,17
N.I	6,05 ± 0,11	6,71 ± 0,39	4,03 ± 0,46
C16:1	-	4,01 ± 0,11	
N.I	5,48 ± 0,11	5,55 ± 0,39	2,73 ± 0,46
C17:1	7,57 ± 0,40	3,83 ± 0,59	6,21 ± 1,13
C18:1n9c	10,01 ± 0,49	19,22 ± 0,76	22,79 ± 0,02
C18:2n6c	35,09 ± 0,10	24,08 ± 1,63	15,56 ± 1,71
C18:3n6	14,42 ± 0,17	8,71 ± 1,05	24,52 ± 0,80

<sup>a</sup> Porcentagem de ácidos graxos em relação ao total (massa/massa)

N.I Composto nao identificado, ausente no MIX de 37 padroes

C11:0 ácido undecanoico; C 12 ácido decanoico; C16:0 ácido palmítico;  
 C16:1 ácido palmitoleico; C17:1 ácido cis-10-heptadecenoico; C18:0  
 ácido estearico; C18:1n9c ácido oléico; C18:2n6c ácido linoleico; :3n6  
 ácido γ-linolênico;

Tabela 14. Perfil de ácidos graxos na biomassa de *N. oleoabundans* nos cultivos com cloreto de sódio e glicerol

Acido Graxo (%) <sup>a</sup>	Controle		NaCl 2,2mM		Glicerol 0,68M	
C11:0	-	-	-	-	-	-
C12:0	-	-	3,43 ±	0,04	-	-
N.I	-	-	-	-	-	-
C16:0	21,39 ±	0,52	23,74 ±	0,06	25,47 ±	1,57
N.I	6,05 ±	0,11	3,76 ±	0,02	8,63 ±	1,99
C16:1	-	-	-	-	-	-
N.I	5,48 ±	0,11	4,96 ±	0,01	-	-
C17:1	7,57 ±	0,40	4,87 ±	0,01	9,86 ±	0,63
C18:1n9c	10,01 ±	0,49	16,88 ±	0,03	10,77 ±	0,04
C18:2n6c	35,09 ±	0,10	31,96 ±	0,08	28,10 ±	1,99
C18:3n6	14,42 ±	0,17	10,43 ±	0,00	21,02 ±	0,82

a Porcentagem de ácidos graxos em relação ao total (massa/massa)

N.I Composto nao identificado, ausente no MIX de 37 padroes

C11:0 ácido undecanoico; C 12 ácido decanoico; C16:0 ácido palmítico;  
 C16:1 ácido palmitoleico; C17:1 ácido cis-10-heptadecenoico; C18:0 ácido estearico; C18:1n9c ácido oléico; C18:2n6c ácido linoleico; :3n6 ácido  $\gamma$ -linolênico;

Tabela 15. Perfil de ácidos graxos na biomassa de *N. oleoabundans* nos cultivos com diferentes regimes de luz.

Acido Graxo (%) <sup>a</sup>	Controle	A	B	C
C11:0	-	-	-	-
C12:0	-	-	-	-
N.I	-	-	-	-
C16:0	21,39 ± 0,52	18,05 ± 0,14	17,77 ± 0,81	14,46 ± 0,0
N.I	6,05 ± 0,11	5,56 ± 0,81	10,64 ± 0,18	9,23 ± 0,0
C16:1	-	-	-	-
N.I	5,48 ± 0,11	5,98 ± 0,13	7,41 ± 0,08	8,42 ± 0,0
C17:1	7,57 ± 0,40	9,65 ± 0,23	9,72 ± 0,21	8,39 ± 0,0
C18:1n9c	10,01 ± 0,49	8,89 ± 0,79	3,17 ± 0,03	12,84 ± 0,0
C18:2n6c	35,09 ± 0,10	34,73 ± 1,46	33,44 ± 1,22	24,99 ± 0,1
C18:3n6	14,42 ± 0,17	17,23 ± 0,39	16,31 ± 0,07	16,02 ± 0,1

<sup>a</sup> Porcentagem de ácidos graxos em relação ao total (massa/massa)

N.I Composto não identificado, ausente no MIX de 37 padrões

A 12h luz fluorescente:12h escuridão

B 12h luz fluorescente:12h luz LED vermelha

C 12h luz fluorescente:12h luz LED branca

C11:0 ácido undecanoico; C 12 ácido decanoico; C16:0 ácido palmítico; C16:1 ácido palmitoleico; C17:1 ácido cis-10-heptadecenoico; C18:0 ácido estearico; C18:1n9c ácido oléico; C18:2n6c ácido linoleico; :3n6 ácido γ-linolênico;

Os lipídios produzidos por as microalgas podem ser classificados em polares e neutros, onde são encontrados componentes de membranas (na forma de fosfolipídios e glicolipídios), carotenóides, tri, di e monoacilgliceróis. Estes são utilizados nas reações de esterificação para a produção de alquil ésteres de ácidos graxos. A composição dos lipídios da biomassa das microalgas é composta de geralmente por glicerol, açúcares ou bases esterificadas e ácidos graxos contendo entre 12 e 22 carbonos, que podem ser saturados, mono ou poliinsaturados (SCHMITZ *et al*, 2012).

A composição dos ácidos graxos na biomassa das microalgas pode diferir significativamente dependendo das fases de crescimento (logarítmicas e estacionárias); além disso, as concentrações podem mudar com variações na concentração de nutrientes, temperatura, salinidade, pH, intensidade de luz.

Assim, as condições de cultivo e o término do cultivo em fases específicas de crescimento pode permitir mudanças na composição lipídica das microalgas, para ser adaptado para fins específicos (DUNSTAN *et al.*, 1993)

Os resultados apresentados mostram uma predominância do ácido palmítico e oleico, em concordância com o trabalho de Tornabene *et al.*, (1983) e Santos *et al.*, (2012). Foi observado uma alta porcentagem do C17:1 ácido cis-10-heptadecenoico, o qual tinha sido reportado por Tornabene em menores concentrações. O ensaio com tiosulfato 1,2mM apresentou ácidos graxos de cadeia curta, provavelmente como mecanismo rápido de captura do excesso de elétrons disponíveis da fotossíntese, causados pelo ambiente redutor. Também teve um aumento no ácido oleico quando comparado com o controle, embora a maior mudança tenha ocorrido com a proporção do ácido graxo  $\gamma$ -linolênico, que no cultivo com 2,5 mM de tiosulfato aumentou aproximadamente 70 % em relação ao cultivo padrão. Em relação às porcentagens de ácidos graxos saturados e insaturados, os ensaios com tiosulfato de sódio em 1,2mM aumentou 8% a porcentagem de saturados quando comparado com o controle (32,9%), enquanto que em 2,5mM houve uma redução de 9% desse valor; os ensaios com agentes que aumentam a osmolaridade do meio (cloreto de sódio e glicerol) não apresentaram grandes diferenças em relação ao ensaio controle. Finalmente, em relação aos ensaios com diferentes regimes de luz, os ensaios com luz LED aumentaram a porcentagem de ácidos graxos saturados, chegando a 37%. Esses valores permitem o uso das frações lipídicas obtidas para a produção de biodiesel, toda vez que óleo de soja, a matéria-prima mais comum na produção do biocombustível, apresenta até 18% de ácidos graxos saturados, pelo qual os lipídios acumulados pela microalga favoreceriam a qualidade do biodiesel produzido.

## 6. CONCLUSOES

Foram avaliadas diferentes concentrações de nitrogênio e fósforo, observando que há uma interação entre as proporções desses nutrientes e o crescimento celular; confirmou-se que a melhor concentração de nitrato de sódio foi 8,82mM e 5,16mM de fosfato total, para cultivos em Erlenmeyer.

A otimização das condições de cultivo em fotobiorreatores tubulares determinaram que para obter maiores concentrações celulares é preciso uma adição intermitente de CO<sub>2</sub> acoplada com o aumento do pH; a fonte nitrogenada adequada para o desenvolvimento da microalga foi o nitrato de sódio e sua adição no cultivo deve ser por pulsos diários de acordo com a produtividade diária.

Foi evidenciado o efeito do tiosulfato de sódio como agente redutor no acúmulo de lipídios, mostrando que uma concentração de 2,5mM é adequada para os ensaios em Erlenmeyer, porém inibitória em fotobiorreator; nestes últimos uma concentração de 1,2mM permitiu um acúmulo do teor de lipídios de 21% da massa seca e uma concentração celular final de 1338,6±124 mg/L.

Os ensaios com agentes causadores de choque osmótico em fotobiorreator permitiram obter teor de lipídios de 25% usando cloreto de sódio 2,2mM, com uma concentração celular final de 1203,8±30 mg/L; também foi observado um acúmulo de carboidratos como moléculas osmorreguladoras. O glicerol permitiu um excessivo crescimento bacteriano, inviabilizando seu uso no fotobiorreator.

Foi avaliado o emprego de luz LED no cultivo em fotobiorreatores sob regime 12:12, determinando que a luz branca foi a mais eficiente para a obtenção de maiores concentrações celulares finais, 2335±158 mg/L, e porcentagem de lipídios, 27%.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS (ANP). **Resolução no 42**. Brasil, 2005.

AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS (ANP). **Resolução no 4**. Brasil, 2010

AIZAWA, K. MIYACHI, S. Carbonic anhydrase and CO<sub>2</sub> concentrating mechanisms in microalgae and cyanobacteria. **FEMS Microbiology Reviews** 39, p 215-233, 1986

ARCHIBALD, P. The genus *Neochloris* Starr (Chlorophyceae, Chlorococcales). **Phycologia**. v.12, p. 187-193. 1973.

BALDISSEROTTO C., FERRONI L., GIOVANARDI M., BOCCALETTI L., PANTALEONI L. AND PANCALDI S. Salinity promotes growth of freshwater *Neochloris oleoabundans* UTEX 1185 (Sphaeropleales, Chlorophyta): morphophysiological aspects. **Phycologia** 51: 700–710. 2012.

BALLONI, W.; TOMASELLI, L.; GIOVANNETTI, L.; MARGHERI, M.C. Biologia fondamentale del genere *Spirulina*. In: **Atti del Convegno: Prospettive della coltura di Spirulina in Italia**, p.49-82, 1980.

BECKER, E. W. **Microalgae – Biotechnology and Microbiology**. New York: Cambridge University Press, 1994. 293p

BELAY, A. Mass culture of *Spirulina* outdoors: the earthrise farms experience. In: VONSHAK, A. (Ed.). **Spirulina platensis (Arthrospira): physiology, cell-biology and biotechnology**. London: Taylor and Francis, Cap. 8, p. 131-158. 1997.

BENSON, E. Cryopreservation of Phytodiversity: A Critical Appraisal of Theory & Practice. **Critical Reviews in Plant Sciences**, 27:141–219, 2008

BOUSSIBA, S.; RICHMOND, A.C. Phycocyanin as a storage protein in blue-green algae. **Archives in Microbiology**, v.125, p.143-147, 1980.

CARVALHO, A.; SILVA, S.; BAPTISTA, J.; MALCATA, F. Light requirements in microalgal photobioreactors: an overview of biophotonic aspects. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 89: 1275-1288. 2011

CARVALHO, J.C.M. FRANCISCO, F.R.; ALMEIDA, K.A.; SATO, S.; CONVERTI, A. Cultivation of *Spirulina platensis* by fed-batch process at exponentially-increasing feeding rate of ammonium chloride. **Journal of Phycology**, v.40, p. 589-597, 2004.

CATALDO, D. HAROON, M. SCHRADER, L. YOUNGS, V. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. **Commun. Soil Science and Plant Analysis**, v. 6. Pp: 71-80. 1975

CHANTANACHAT, S. & BOLD, H.C. Phycological studies. II. Some algae from arid soils. **University of Texas Publications** 6218: 1-74. 1962.

CHEN, F. & ZHANG, Y. High cell density mixotrophic culture of *Spirulina platensis* on glucose for phycocyanin production using a fed-batch system. **Enzyme and Microbial Technology**, v.20, p.221-224, 1997.

CHEN, C.N., CHEN, H.R., YEH, S.Y., VITTORE, G., HO, T.H. Autophagy is enhanced and floral development is impaired in AtHVA22d RNA interference Arabidopsis. **Plant Physiology**. 149: 1679-1689. 2009.

CHEN, H.; WU, J. WANG, C. FU, C.; SHIEH, C.; CHEN, C.; WANG, C.; LIU, Y.; Modeling on chlorophyll a and phycocyanin production by *Spirulina platensis* under various light-emitting diodes. **Biochemical Engineering Journal**, 53: 52-56. 2010

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

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae beats bioethanol. **Trends in Biotechnology**. V. 26, P. 126-131, 2008

CHOI, S.L.; SUH, I.S.; LEE, C.G. Lumostatic operation of bubble column photobioreactors for *Haematococcus pluvialis* cultures using a specific light uptake rate as a control parameter. **Enzyme and Microbial Technology**, v.33, p.403–409, 2003.

CHRISTOFF, P. **Produção de biodiesel a partir do óleo residual de fritura comercial. Estudo de caso: Guaratuba, litoral paranaense**. 2006. 82p  
Dissertação de Mestrado - Instituto de Tecnologia para o Desenvolvimento – LATEC e Instituto de Engenharia do Paraná – IEP, Curitiba..

COLLOS, Y. MORNET, F. SCIANDRA, A. WASER, N. LARSON, A. HARRISON, P.J. An optical method for the rapid measurement of micromolar concentrations of nitrate in marine phytoplankton cultures. **Journal of Applied Phycology** 11, p 179–184, 1999.

CONVERTI, A. CASAZZA, A. ORTIZ, E. PEREGO, P. DEL BORGHI, M. Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**. v.48. p. 1146–1151. 2009.

da SILVA, F. **Produção de ésteres metílicos utilizando catalisadores à base de bismuto**. 2009, 105p. Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Química. Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

DÖRMANN, P. BENNING, C. Galactolipids rule in seed plants. **Trends in Plant Science**, v 7:3. Pp. 112-118. 2002.

DUNSTAN, G.A.; VOLKMAN, J.K.; BARRETT, S.M.; GARLAND, C.D. Changes in the lipid composition and maximization of the polyunsaturated fatty acid content of three microalgae grown in mass culture. **Journal of Applied Phycology**, 5:1, p. 71-83, 1993

EUROPEAN BIODIESEL BOARD, 2004, Biodiesel Production Statistics. Available from: <<http://www.ebb-eu.org/stats.php>>, Acesso: 27/05/2010.

ERIKSEN N.T. The technology of microalgal culturing. **Biotechnology Letters** 30: 1525–1536. 2008.

FLORETO, E. A. T.TESHIMA, S. ISHIKAWA, M. Effects of nitrogen and phosphorus on the growth and fatty acid composition of *Ulva pertusa* Kjellman (Chlorophyta). **Botanica Marina**. v 39, 1-6. p 69–74. 1996.

GAROFALO, R. (coord.). TREDICI, M. LEU, S. MARTINELLI, L. 2009. *Algae and aquatic biomass for a sustainable production of 2nd generation biofuels – AquaFUELS. Coordination Action*. EU Commission project within the VII Framework Programme for Research and Development. Disponível em: <[http://www.aquafuels.eu/attachments/079\\_Merged%20reports%20-Taxonomy\\_Biology%20&%20Biotechnology.pdf](http://www.aquafuels.eu/attachments/079_Merged%20reports%20-Taxonomy_Biology%20&%20Biotechnology.pdf)>. Acesso em: 28 jun 2012.

GATENBY, C., ORCUTT, D., KREEGER, D., PARKER, B. JONES, V., NEVES, R. Biochemical composition of three algal species proposed as food

for captive freshwater mussels. **Journal of Applied Phycology**. v.15. p.1–11, 2003.

GIOIELLI, J.A. **Modificação Industrial de óleos e gorduras**. Curso de pós-graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, São Paulo, 2011.

GOUVEIA, L.; MARQUES, A.; da SILVA, T.; REIS, A. Neochloris oleabundans UTEX #1185: a suitable renewable lipid source for biofuel production. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. v.36, p.821–826. 2009.

GOUVEIA, L. OLIVEIRA, A. Microalgae as a raw material for biofuels production. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v 36: 269-274. 2009

GROBBELAAR, J. Algal Nutrition: Mineral Nutrition. In: RICHMOND, A., ed. **Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology**. Iowa, EUA: Blackwell Publishing Ltd. 2004, p 97-115.

HARTMAN, L. LAGO, R.C.A. *Rapid preparation of fatty acids methyl esters*. **Laboratory Practice**, v.22, 475-476, 1973

Hu, Q. Environment effects on cell composition. In: RICHMOND, A., ed. **Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology**. Iowa, EUA: Blackwell Publishing Ltd. 2004, p 83–93.

HU, Q. SOMMERFELD, M. JARVIS, E. GHIRARDI, M. POSEWITZ, M. SEIBERT, M. DARZINS, A. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. **The Plant Journal**, v54:621–639. 2008.

HUANG, G. CHEN, F. DONG WEI, D. ZHANG, X. CHEN, G. Biodiesel production by microalgal biotechnology. **Applied Energy** 87, P 38–46. 2010.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ (IAL). **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. V. 1: métodos químicos e físicos para análise de alimentos**, 4 ed, 1 ed. Digital. São paulo: IMESP, p. 105- 106, 1985.

JAEGER, WILLIAM; SIEGEL, R. 2008. Economics Of Oilseed Crops And Their Biodiesel Potential In Oregon's Willamette Valley. **Special Report 1081**. Agricultural And Resource Economics, Oregon State University.

KHOTIMCHENKO, S.V.; YAKOVLEVA, I.M. Lipid composition of the red alga *Tichocarpus crinitus* exposed to different levels of photon irradiance. **Phytochemistry**, v.66, p.73–79, 2005.

KHOZIN-GOLDBERG, I. COHEN, Z. The effect of phosphate starvation on the lipid and fatty acid composition of the fresh water eustigmatophyte *Monodus subterraneus*. **Phytochemistry** 67. p 696–701. 2006

KURANO, N. SASAKI, T. MIYACHI, S. Carbon dioxide and microalgae. In T. Inui, M. Anpo, K. Izui, S. Yanagida, T. Yamaguchi (Editors) *Advances in Chemical Conversions for Mitigating Carbon Dioxide*. **Studies in Surface Science and Catalysis**, v. 114. 1998.

KULA, M., RYS, M., MOŹDŹEŃ, K. SKOCZOWSKI, A. Metabolic activity, the chemical composition of biomass and photosynthetic activity of *Chlorella vulgaris* under different light spectra in photobioreactors. **Engineering in Life Sciences**, 14: 57–67. 2014

LEE, C.-G., PALSSON, B. High density algal photobioreactors using light-emitting diodes. **Biotechnology and Bioengineering** 44. p. 1161-1167. 1994.

LI, Y. HORSMAN, M. WANG, B. WU, N. LAN, C.Q. Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochloris oleoabundans*. **Applied Microbiology and Biotechnology** 81:629–636. 2008

LIN, Q., GU, N., LI, G., LIN, J., HUANG, L., TAN, L., Effects of inorganic carbon concentration on carbon formation, nitrate utilization, biomass and oil accumulation of *Nannochloropsis oculata* CS 179, **Bioresource Technology**. v 111. p. 356-359. 2012.

LOPES DA SILVA, T. REIS, A. MEDEIROS, R. OLIVEIRA, A. GOUVEIA, L. Oil Production Towards Biofuel from Autotrophic Microalgae Semicontinuous Cultivations Monitorized by Flow Cytometry. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 159, p 568–578. 2009

MANDAL, S.; MALLICK, N. Microalga *Scenedesmus obliquus* as a potential source for biodiesel production. **Applied Microbiology and Biotechnology** v 84:281–291. 2009.

MARTINEZ, M.E. JIMENEZ, J.M. ELOYOUSFI, F. Influence of phosphorous concentration and temperature on growth and phosphorous uptake by the

microalga *Scenedesmus obliquus*. **Bioresource Technology**, 67. p, 233-240. 1999.

MATA, T. MARTINS, A. CAETANO, S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. **Renewable and sustainable energy reviews**, v 14: 217-232. 2010

MATTHIJS, H., BALKE, H., VAN HES, U., KROON, B., MUR, L., BINOT, R. Application of light-emitting diodes in bioreactors: Flashing light effects and energy economy in algal culture (*Chlorella pyrenoidosa*). **Biotechnology and Bioengineering**, v. 50. p 98–107. 1996

McCOY, M., An unlikely impact. **Chem. Eng. News** 83 (8), 19, 2005

MURRAY, K.; HEALY, F.; MCCORD, R.; SHIELDS, J. Biomass production and nutrient uptake by *Neochloris oleoabundans* in an open trough system. **Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**. v.90, p. 8-95. 2011

NELSON, D. Cox, M. Principles of Biochemistry. EUA. W H Freeman. 2008.

NGANGKHAM, M. RATHA, S. PRASANNA, R. SAXENA, A. DHAR, D. SARIKA, C. PRASAD, R. Biochemical modulation of growth, lipid quality and productivity in mixotrophic cultures of *Chlorella sorokiniana*. **SpringerPlus** 1:33. 2012.

OLIVEIRA, M.; VASCONCELOS, Y. Revolução no canavial, **Revista Pesquisa FAPESP**, nº. 122. Abril de 2006.

OFFICIAL METHODS OF FOOD ANALYSIS. Williams, S. (editor). Association of official analytical chemistry Inc., 14 th edition, Arlington, p.1141, 1984.

OLGUÍN, E.J.; GALICIA, S.; HERNÁNDEZ, E. ANGULO, O. The effect of low light flux and nitrogen deficiency on the chemical composition of *Spirulina* sp. growth on pig waste. **Bioresource Technology**, v. 77, p. 19 - 24, 2001.

OHLROGGE, J. & BROWSE, J. 1995 Lipid biosynthesis. **Plant Cell**, v. 7, p. 957–970.

OKUMURA, C., SAFFREENA, N., RAHMAN, M. A., HASEGAWA, H., MIKI, O. TAKIMOTO, A. Economic efficiency of different light wavelengths and intensities using LEDs for the cultivation of green microalga *Botryococcus braunii* (NIES-836) for biofuel production. **Environmental Progress and Sustainable Energy**. 2014. doi: 10.1002/ep.11951

PARK, J., SEO, J., KWON, E. Microalgae Production Using Wastewater: Effect of Light-Emitting Diode Wavelength on Microalgal Growth. **Environmental Engineering Science**, v. 29, p. 995-1001. 2012.

PARENTE, E. J. S. Biodiesel: uma aventura tecnológica num país engraçado. Fortaleza: **Tecbio**, 2003. 68 p.

PELIZER, L.H.; SASSANO, C.E.; CARVALHO, J.C.M.; SATO, S.; GIOIELLI, L.A.; MORAES, I.O. Padronização do método de secagem da biomassa de *Spirulina platensis*. **Farmácia e Química**, v.32, n.1, p.37-40, 1999

PIERCE, W. C., HAENISCH, E. L. **Quantitative Analysis**, 3ed., John Willey & Sons Inc., New York, 1948.

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

POPOVICH C.A.; DAMIANI C.; CONSTENLA D.; MARTINEZ A.M.; FREIJE H.; GIOVANARDI M.; PANCALDI S.; LEONARDI P.I. *Neochloris oleoabundans* grown in enriched natural seawater for biodiesel feedstock: evaluation of its growth and biochemical composition. **Bioresource Technology** 114: 287–293. 2012.

PRUVOST, J. VAN VOOREN, G. COGNE, G. LEGRAND, J. Investigation of biomass and lipids production with *Neochloris oleoabundans* in photobioreactor. **Bioresource Technology** 100: 5988–5995. 2009

PULZ, O. GROSS, W. Valuable products from biotechnology of microalgae. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 65, 635–648, 2004.

RANGEL, C. O. **Influência da luz e uréia no crescimento e conteúdo de clorofila da biomassa de *Spirulina platensis***. São Paulo, 2000, 132p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

RICHMOND, A.; QIANG, H. Principles for efficient utilization of light for mass production of photoautotrophic microorganisms. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, n. 63/65, p. 649–658, 1997.

RODRÍGUES, M. **Avaliação do cultivo de *Spirulina platensis* utilizando simultaneamente nitrato de potássio e cloreto de amônio como fontes de nitrogênio**. 2008. 149p. Dissertação de mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

RODRIGUES-RACT, J.; GIOIELLI, L.A. Lipídios modificados obtidos a partir de gordura do leite, óleo de girassol e ésteres de fitosteróis para aplicação em spreads. **Química Nova**, v. 31, p. 1960-1965, 2008.

SCHUCHARDT, U., SERCHELI, R., VARGAS R. M. Transesterification of vegetable oils: a review. **Journal of Brazilian Chemical Society** 9:199-210,1998.

SANTOS, A.M.; JANSSEN, M.; LAMERS, P.P.; EVERS, W.A.C.; WIJFFELS, R.H. Growth of oil accumulating microalga *Neochloris oleoabundans* under alkaline-saline conditions. **Bioresource Technology**. v.104, p. 593-599. 2012.

SIAUT, M., CUINE, S., CAGNON, C., FESSLER, B., NGUYEN, M., CARRIER, P., BEYLY, A., BEISSON, F., TRIANTAPHYLIDES, C., LI-BEISSON, Y.H., PELTIER, G. Oil accumulation in the model green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: characterization, variability between common laboratory strains and relationship with starch reserves. **BMC Biotechnology** 11,7. 2011

SILVA, H. PIRT, J. Carbon dioxide inhibition of photosynthetic growth of *Chlorella*. **Journal of General Microbiology**, 130: 2833-2838. 1984.

SCHMITZ, R.; DAL MAGRO, C.; COLLA, L.M. Aplicações ambientais de microalgas. **Revista CIATEC-UPF**, 4:1, p. 48-60, 2012.

SOLOVCHENKO, A.E. KHOZIN-GOLDBERG, I. DIDI-COHEN S. COHEN, Z. MERZLYAK, M. N. Effects of light intensity and nitrogen starvation on growth, total fatty acids and arachidonic acid in the green microalga *Parietochloris incisa*. **Journal of Applied Phycology**, v 20:245-251. 2008

SUAREZ, P. É possível utilizar qualquer óleo ou gordura para produzir Biodiesel? Disponível em:

<[http://www.biodieselbr.com/colunistas/suarez/possivel-utilizar-oleo-gorduraproduzir-](http://www.biodieselbr.com/colunistas/suarez/possivel-utilizar-oleo-gorduraproduzir-biodiesel-20-11-07.htm)

[biodiesel-20-11-07.htm](http://www.biodieselbr.com/colunistas/suarez/possivel-utilizar-oleo-gorduraproduzir-biodiesel-20-11-07.htm)>. Acesso em: 22 jul 2012.

SUN, X. CAO, Y. XU, H. LIU, Y. SUN, J. QIAO, D. CAO, Y. Effect of nitrogen-starvation, light intensity and iron on triacylglyceride/carbohydrate production and fatty acid profile of *Neochloris oleoabundans* HK-129 by a two-stage process, **Bioresource Technology**, 155, p. 204-212. 2014

TAKAGI M., WATANABE K., YAMABERI K., YOSHIDA T. Limited feeding of potassium nitrate for intracellular lipid and triglyceride accumulation of *Nannochloris sp.* UTEX LB1999. **Applied Microbiology and Biotechnology** 54:112–117. 2000

THOMAS W.H, TORNABENE T.G, WEISSMAN J. **Screening for lipid yielding microalgae: activities for 1983.** SERI/STR-231-2207. 1984.

TORNABENE, T. G., HOLZER, G. LIEN, S. BURRIS, N. Lipid composition of the nitrogen starved green alga *Neochloris oleoabundans*. **Enzyme Microbiology and Biotechnology**, 5: 435-440. 1983

TROTTA, P. A simple and inexpensive system for continuous monoxenic mass culture of marine microalgae. **Aquaculture**, v. 22, n. 4, p. 383-387, 1978.

TSUZUKI, M. OHNUMA, E. SATO, N. TAKAKU, T. KAWAGUCHI, A. Effects of CO<sub>2</sub> Concentration during Growth on Fatty Acid Composition in Microalgae. **Plant Physiology**, 93, p 851-856. 1990.

UTEX. The Culture collection of algae. University of Texas at Austin. <<http://www.sbs.utexas.edu/utex/default.aspx>> Acesso: 27/05/2010

VONSHAK, A.; BOUSSIBA, S.; ABELIOVICH, A.; RICHMOND, A. Production of *Spirulina* Biomass: maintenance of monoalgal culture outdoors. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 25, n. 2, p. 341-9, 1983.

WAN, B. LAN, C (a). Biomass production and nitrogen and phosphorus removal by the green alga *Neochloris oleoabundans* in simulated wastewater and secondary municipal wastewater effluent. **Bioresource Technology**, 102, p 5639-5644. 2011

WAN, B. LAN, C (b). Optimising the lipid production of the green alga *Neochloris oleoabundans* using Box-Behnken experimental design. **Canadian Journal of Chemical Engineering**, 89. p, 932-939. 2011

WANG, S-T.; PAN, Y.; LIU, C.; CHUANG, L.; CHEN, C. Characterization of a green microalga UTEX 2219-4: Effects of photosynthesis and osmotic stress on oil body formation. **Botanical Studies**, 52. p. 305-312. 2011

WANG, C.; FU, C.; LIU, Y. Effects of using light-emitting diodes on the cultivation of *Spirulina platensis*, **Biochemical Engineering Journal**, 37: 21-25. 2010

WU, N., LI, Y., LAN, C. Production and rheological studies of microalgal extracellular biopolymer from lactose using the green alga *Neochloris oleoabundans*. **Journal of Polymers and the Environment**. v. 19, p.935–942. 2011.