

Universidade Federal de São Carlos
Centro de Ciências Exatas e Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPGBiotec)

**Fotobiorreator de iluminação interna para produção de
biomassa algal e seus metabólitos**

Farid Nazih Saadi

São Carlos - SP

2018

Farid Nazih Saadi

**Fotobiorreator de iluminação interna para produção de
biomassa algal e seus metabólitos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos, como requisito à obtenção do título de mestre em Biotecnologia.

Orientação:

Prof.^a Dr.^a Ana Teresa Lombardi

Dr. Artur Placeres Neto

São Carlos - SP

2018



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Farid Nazih Saadi, realizada em 08/09/2018:

Profa. Dra. Ana Teresa Lombardi
UFSCar

Prof. Dr. Clóvis Wesley Oliveira de Souza
UFSCar

Profa. Dra. Sílvia Helena Govoni Brandi
CEQIN

Agradecimentos

À Professora Ana Teresa Lombardi pela confiança e disposição na orientação deste trabalho. Por todos os incentivos, apoio e ensinamentos acadêmicos e pessoais vindos de alguém que foi muito mais que professora: uma segunda mãe!;

À minha família por todo o apoio e incentivo em minha formação;

À Carlos Aparecido Casali, pela boa convivência, amizade, cafés de tarde e suporte na infraestrutura dos experimentos.

À Ademir Aparecido Sertori e Djalma Aparecido Lingari Durici, pelas essenciais colaborações na confecção dos fotobiorreatores desenvolvidos neste trabalho;

À Silvia Helena Govoni Brondi e Clóvis Wesley Oliveira de Souza, membros da banca examinadora, pelo aceite em avaliarem este trabalho;

À Bárbara Denadae, pelo companheirismo e carinho despendido, além da colaboração na realização das análises cromatográficas deste trabalho;

À Jaqueline Carmo, Vinicius Oliveira e Douglas Baracho pela amizade e boa convivência dentro e fora do laboratório;

Aos demais colegas de laboratório pela parceria e boa convivência;

À Moacir Rossi Forim, por disponibilizar a infraestrutura para realização das análises cromatográficas;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo suporte financeiro e concessão da bolsa de mestrado;

À todos os amigos e professores que, direta ou indiretamente, tiveram participação e colaboraram com minha formação.

Sumário

LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE TABELAS.....	13
1. RESUMO.....	15
2. ABSTRACT	17
3. INTRODUÇÃO.....	19
4. OBJETIVOS	31
4.1 Objetivo geral	31
4.2 Objetivos específicos.....	31
5. MATERIAIS E MÉTODOS	32
5.1 Crescimento microalgal em meios de cultura BG11 e WC.....	33
5.2 - Desenvolvimento de fotobiorreator de coluna	36
5.3 Aplicação do fotobiorreator no cultivo de microalgas	38
5.3.1 Cultivo de <i>C. sorokiniana</i> , <i>C. pantanale</i> e Picoplâncton 237	38
5.3.2 – Aumento na concentração de células e nutrientes e teste em <i>C. sorokiniana</i> ...	39
5.4 – Análises cromatográficas.....	40
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
6.1 – Avaliação dos meios de cultivo: BG11 e WC	43
5.2 – Desenvolvimento e aplicação do Fotobiorreator	48
5.3.2 – Melhoramento na concentração de células e nutrientes em <i>C. sorokiniana</i>	53
5.4 – Análise de Ácidos graxos em <i>Chlorella sorokiniana</i> , Picoplâncton 08 e <i>Curvastrum pantanale</i>	59
5.5 – Análise dos compostos orgânicos voláteis em <i>Chlorella sorokiniana</i> , Picoplâncton 08 e <i>Curvastrum pantanale</i>	62
7. CONCLUSÃO	65
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66

Lista de Figuras

- Figura 1** – Reação de decomposição do ácido graxo poliinsaturado (18:2 w-6) resulta no hexanal como um de seus produtos.....22
- Figura 2** – Penetração da luz quando incidida lateralmente por uma única fonte. Em alta densidade celular ocorre o autossombreamento. A coluna d'água refere-se ao caminho óptico, distância entre a fonte luminosa e a extremidade oposta do fotobiorreator.....25
- Figura 3** – Modelos de fotobiorreatores com diferentes geometrias e modos de operação. A: Tubular; B: *Raceway*; C: *Thin Layer*27
- Figura 4** - Enquanto o sistema possui diâmetro de tamanho A, caminho a ser percorrido pela luz será B para todas as direções devido a incidência luminosa distribuída a todos os pontos do fotobiorreator a partir do seu centro.....28
- Figura 5** – Esquema das especificações do PBR em desenvolvimento. Medidas em milímetros. Em A, vista superior mostrando-se a tampa em Nylon®. Em B, vista frontal do fotobiorreator cilíndrico desenvolvido.....37
- Figura 6** – Gráficos do logaritmo natural da concentração de clorofila e da densidade óptica obtida pela absorbância em função do tempo para as 6 espécies algais em meios de cultivo BG11 e WC. Linhas vermelhas: meio BG-11 e linhas pretas: em meio WC. ■: concentração de Clorofila a e +: absorbância em 684 nm. A: *Monoraphidium pseudobraunii*; B: Picoplâncton 237; C: *Curvastrum pantanale*; D: *Ankistrodesmus densus*; E: Picoplâncton 175; F: *Chlorella sorokiniana*.....44
- Figura 7** –Mudança na coloração dos cultivos após 720 h em WC, de verde para amarelo, indicados pelas setas vermelhas46
- Figura 8** - Curvas de crescimento (linha contínua) e rendimento quântico máximo (losangos) em meio BG11 das espécies A: *Raphidocelis subcapitata*; B: *Scenedesmus spinosus*; C: *Kirchneriella aperta*; D: *Hariotina reticulata*; E: *Xanthidium sp*47

Figura 9 – Resultados ao longo do cultivo de *C. sorokiniana* no PBR proposto. A: linha pontilhada indica a intensidade luminosa e a linha contínua a concentração de células. B: rendimento quântico máximo (losangos) e a concentração de clorofila *a* (linha contínua)50

Figura 10 – Resultados do cultivo de Picoplâncton 237 no PBR proposto. A: linha pontilhada indica a intensidade luminosa e a linha contínua a concentração de células. B: rendimento quântico máximo (losangos) e a quantificação de clorofila *a* (linha contínua)51

Figura 11 – Resultados do cultivo de *C. pantanale* no PBR proposto. Em A, a linha pontilhada indica a intensidade luminosa e a linha contínua a concentração de células. Em B, rendimento quântico máximo (losangos) e a quantificação de clorofila *a* (linha contínua)52

Figura 12 – Resultados dos cultivos de *C. sorokiniana* em BG11 convencional e BG11 concentrado duas vezes. Os símbolos □ e ■ representam a abundância celular (A), e concentração de clorofila *a* (B), respectivamente, para BG11 - 1X e BG11 - 2X. Em A, ◇ mostra o rendimento quântico máximo utilizando BG11 - 1X e ♦ utilizando BG11 - 2X54

Figura 13 – Representação gráfica do crescimento de *C. sorokiniana* em meio de cultivo BG11 concentrado 10 vezes. Em A, os losangos mostram o rendimento quântico máximo e a linha contínua a concentração de clorofila *a*. Em B, a abundância celular (linha contínua) e Biomassa seca (barras verticais)55

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Cepas utilizadas para a realização deste estudo. Todas as espécies foram cedidas pelo CCMA-UFSCar.....	33
Tabela 2 - Nutrientes utilizados e suas respectivas concentrações nos meios de cultivo BG11 e WC.....	34
Tabela 3 – Parâmetros aplicados ao Cromatógrafo Gasoso e ao Espectrômetro de Massas para a leitura das amostras e obtenção dos dados de ácidos graxos.....	41
Tabela 4 – Parâmetros aplicados ao Cromatógrafo Gasoso e ao forno para Headspace para leitura das amostras e obtenção dos dados de voláteis.....	42
Tabela 5 - Velocidade de crescimento das cepas em meio BG11 e WC. Estes valores foram calculados pelo logaritmo natural da concentração do pigmento clorofila a.....	45
Tabela 6 - Velocidades de crescimento obtidas a partir das curvas de concentração de clorofila a em meio BG11.....	48
Tabela 7 - Comparação entre as diferentes concentrações de BG11, o número de células e a biomassa seca medida.....	56
Tabela 8 – Comparação da performance dos diferentes fotobiorreatores. Ch: <i>Chlorella sp.</i> ; No: <i>Nannochloropsis oculata</i> ; Ns: <i>Nannochloropsis salina</i> ; Ss: <i>Scenedesmus sp.</i> ; Cv: <i>Chlorella vulgaris</i> ; Cs: <i>Chlorella sorokiniana</i>	57
Tabela 9 – Composição graxa para as espécies <i>Chlorella sorokiniana</i> , Picoplâncton 237 e <i>Curvastrum pantanale</i> . SFA: Ácidos graxos saturados; MFA: Ácidos graxos monoinsaturados; PFA: Ácidos graxos polinsaturados; UFA: Ácidos graxos insaturados totais (MFA + PFA)	59
Tabela 10 – Composição dos compostos orgânicos voláteis de <i>Chlorella sorokiniana</i> , <i>Curvastrum pantanale</i> e Picoplâncton 237. Os dados estão expressos em unidades relativas (%)......	63

1. RESUMO

Microalgas são organismos com potencial aplicação nas indústrias farmacêutica, alimentícia e cosmética devido à capacidade de produzirem biomoléculas de alto valor agregado como ácidos graxos e compostos voláteis. Para seu desenvolvimento fisiológico, as algas dependem da disponibilidade de dióxido de carbono, nutrientes e incidência luminosa suficiente para que ocorra o processo fotossintético. Conforme há o aumento na concentração celular a iluminação interna dos cultivos algais é prejudicada por autossombreamento. A deficiência no fornecimento de luz às células pode provocar queda no rendimento fisiológico, afetando o crescimento e síntese dos biocompostos. Buscou-se neste estudo, desenvolver um novo modelo de fotobiorreator cilíndrico com iluminação interna por LEDs intermediado por um controlador de iluminação, com o intuito melhorar a disponibilidade de luz em todas as fases do cultivo, obter alta produção de biomassa algal e seus metabólitos. O sistema apresenta incidência luminosa máxima de $2775,3 \text{ W m}^{-3}$ e área iluminada de $0,0314 \text{ m}^2$. Definido o meio de cultivo BG11 como padrão para este estudo, testaram-se concentrações crescentes deste meio (BG11 1x, 2x e 10x) no cultivo de *Chlorella sorokiniana*. A saúde celular foi monitorada com medidas de rendimento fotossintético e em todos os tratamentos as células obtiveram rendimento quântico máximo acima de 0,69, ou seja, as condições físico-químicas disponibilizadas pelo fotobiorreator eram satisfatórias, ao menos, para atender as necessidades nutricionais mínimas para o crescimento celular. A concentração celular denotada em biomassa seco não apresentou diferenças entre os meios de cultivo BG11 1x e 2x. No entanto, utilizando BG11 10x, o mesmo número de células apresentou $6,87 \text{ g L}^{-1}$, cerca de 200% mais pesadas que nos demais tratamentos. O cultivo com meio de cultura BG11 10x atingiu a produtividade celular de $0,36 \text{ g L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$. O sistema foi testado para o crescimento de *Curvastrum pantanale* e microalgas picoplanctônicas, e os resultados mostraram a versatilidade do fotobiorreator proposto no cultivo de outras espécies.

Palavras-chave: Biomassa, *C. sorokiniana*, Fotobiorreator, LED, Produtividade.

2. ABSTRACT

Microalgae are organisms with potential applications in the pharmaceutical, food and cosmetic industries due to their ability to produce high added value biomolecules such as fatty acids and volatile compounds. For their physiological development, the algae depend on the availability of carbon dioxide, nutrients and sufficient light for the photosynthetic process to occur. As there is an increase in cell concentration the internal lighting of the algal cultures can be impaired by self-shading. The deficiency in the light supply to the cells can cause a decrease in the physiological yield, affecting the growth and synthesis of the biomolecules. The aim of this study was to develop a new cylindrical photobioreactor with internal LED illumination intermediated by a light intensity controller in order to improve the light availability in all phases and densities of the culture. This would lead to high production of algal biomass and its metabolites that can be used by the various sectors of industry. The system we developed has maximum light incidence of 2775.3 W m^{-3} and an illuminated area of 0.0314 m^2 . Defining the BG11 culture medium as the standard for this study, increasing concentrations of this medium (1x, 2x and 10x BG11) were tested in *Chlorella sorokiniana* cultures. Cellular health was monitored with measures of photosynthetic yield (Phyto-PAM) and the results showed yield of ~ 0.69 in all treatments. This can be considered a confirmation that the physico-chemical conditions provided by the photobioreactor were sufficient to meet the microalgae needs. The cell concentration reported as dry biomass showed that the 1x and 2x BG11 culture media rendered similar biomass, but the 10x BG11 resulted in higher biomass 6.87 g L^{-1} even though similar cell density (cells per mL) were obtained in comparison with BG1x and 2x. This lead to the interpretation that BG11 10x produced 200% heavier cells than the other treatments and a productivity of $0.36 \text{ g L}^{-1} \text{ day}^{-1}$. The system was tested for the growth of *Curvastrum pantanale* and a picoplankton species, and the results confirmed the versatility of the photobioreactor proposed for the cultivation of other species.

Keywords: Biomass, *C. sorokiniana*, Photobioreactor, LED, microalgae Productivity.

3. INTRODUÇÃO

As microalgas são organismos fotossintéticos de crescimento acelerado com requerimento nutricional relativamente simples (Andersen, 2005). São capazes de se multiplicar quanto ao número de células e sintetizar biomoléculas de alto valor agregado. As células algais são uma rica fonte de produtos naturais e as moléculas sintetizadas podem apresentar efeito terapêutico (Thomas e Kim, 2013; Benedetti et al., 2004; Spolaorea et al., 2006; Stolz and Obermayer, 2005). A composição interna das células pode variar conforme as condições do meio de cultivo na qual estão inseridas (Borowitzka 2013) e, portanto a diversidade dos produtos sintetizados por estas células (carboidratos, proteínas, lipídios, vitaminas) pode ser biotecnologicamente manipulada (Chia et al., 2013, 2015). Aplicações das mais diversas têm sido propostas para as microalgas, dependendo do conteúdo de biomoléculas que apresenta, como por exemplo para fins alimentares, farmacêuticos, agrícolas, na produção de biocombustíveis ou na indústria cosmética (Borowitzka, 2013).

O crescimento das microalgas requer recursos minerais que estão presentes no meio. Nutrientes como carbono, nitrogênio, fósforo, hidrogênio, oxigênio e sílica (no caso das diatomáceas) são necessários para manutenção, divisão celular e processos metabólicos. A fonte de carbono inorgânico no meio de crescimento, que fornece CO₂ para a fotossíntese, pode ser o carbonato de sódio (Zarrouk, 1966), que dependendo do pH do meio, estará presente nas formas de CO₂, HCO₃⁻, ou CO₃²⁻. Cálcio, magnésio, enxofre e potássio, que devem estar presentes em quantidades relativamente elevadas, da ordem de 10⁻³ – 10⁻⁵ mol L⁻¹, são chamados de macronutrientes. Já ferro, manganês, cobre, molibdênio e cobalto são exigidos em menor quantidade (~10⁻⁶ – 10⁻⁸ mol L⁻¹) sendo assim chamados de micronutrientes (Guillard, 1975; Graham et al., 2009).

A fotossíntese é o processo responsável pela captação da energia luminosa e conversão da matéria inorgânica disponível no meio em compostos orgânicos. Assim, é fácil de entender a importância destes microrganismos para a manutenção da concentração do gás carbônico na atmosfera, onde quanto maior a população de microalgas – ou qualquer outro organismo fotossintetizante – mais deste gás será

mitigado, e conseqüentemente maior será a produção de matéria orgânica pelo metabolismo algal.

Os compostos orgânicos produzidos pelas microalgas podem ser de natureza dissolvida (compostos extracelulares) ou particulada (compostos intracelulares). Dentre os compostos extracelulares, citam-se os polissacarídeos, macromoléculas constituídas de diferentes unidades monossacarídicas unidas por ligações glicosídicas. Diferem entre si a partir do grau de ramificação, tipo de ligação, tipo de monossacarídeo e o comprimento da cadeia. Estas classificações conferem funções diversas de acordo com o organismo ao qual está inserido (Silva et al., 2006), tais como flutuação, proteção contra dessecação, proteção contra raios UV, movimentação, aquisição de nutriente e atividade antioxidante nas células microalgais (Cumashi et al., 2007; Fedorov et al., 2013; Zhang et al., 2010; Lahaye e Robic, 2007).

Quanto ao conteúdo particulado, isto é, de natureza intracelular, encontram-se os lipídios, moléculas de funções estruturais e de armazenamento. Dentre os lipídios gerados pelas microalgas pode-se citar a síntese de ácidos graxos que no cotidiano se aplicam em importantes segmentos como no enriquecimento de rações para peixes, matéria-prima para produção de biodiesel e fonte de suplementação de ácidos graxos essenciais na dieta humana (Morais et al., 2008). Os ácidos graxos são cadeias de hidrocarbonetos com um radical carboxílico em uma de suas extremidades podendo apresentarem-se na forma saturada (ligações simples), monoinsaturada (uma dupla ligação) e poliinsaturada (duas ou mais ligações duplas). Cada ácido graxo pertencente a uma dessas categorias possui diferentes efeitos biológicos e propriedades físico-químicas (Campbell e Farrel, 2006). O triacilglicerol é um lipídio formado pela ligação de três ácidos graxos a uma molécula de glicerol por meio de ligações éster e possuem a função de reserva de energia armazenados no tecido adiposo. Já os fosfoglicerídeos são formados por dois ácidos graxos, um glicerol e ácido fosfórico e são os principais constituintes das membranas biológicas. Observa-se assim a importância da presença dos ácidos graxos na alimentação animal devido à presença desta gordura na composição de elementos estruturais do organismo, sendo indispensável sua suplementação principalmente tratando-se de ácidos graxos essenciais, ou seja, aqueles não produzidos endogenamente.

Os ácidos graxos essenciais são aqueles que devem ser advindos da dieta, pois não são produzidos pelo organismo e são necessários ao desenvolvimento saudável. São eles os ácidos poliinsaturados ω -3 e ω -6, importantes para a composição de tecidos e fluidos biológicos e na manutenção de processos vitais (Perini et al., 2010). As principais fontes de ácidos graxos ω -3 na alimentação humana são de peixes de águas frias como o salmão e a sardinha. Por este fato, em alguns países o alto consumo de peixes resultou em impactos ambientais negativos, resultando na escassez e risco de extinção de algumas espécies (Lenihan-Geels et al., 2013). Além disso, o consumo de peixes em uma dieta longínqua pode ser dificultado por ter baixa aceitabilidade pela população devido seu forte sabor, e também em dietas vegetarianas, onde não há o consumo de carnes.

Diretrizes da nutrição humana tradicional temem o alto consumo de ácidos graxos saturados, induzem o uso dos poli-insaturados ω -3 e procuram eliminar os ácidos graxos *trans* para se obter uma melhor qualidade de vida e reduzir as probabilidades de desenvolvimento de doenças coronárias (Gidding et al., 2009; Mozaffarian et al., 2008). No entanto, ainda há controvérsias a respeito das quantidades recomendadas para cada tipo de ácido graxo numa dieta e se, de fato, o consumo de gordura saturada desencadeia doenças cardiovasculares (Siri-Tarino et al., 2010).

Quanto ao consumo de carboidratos, segundo Cassady et al. (2007), dietas ricas neste composto estimulam o aumento do dueto glicose-insulina que circula no plasma sanguíneo, que por sua vez provocam efeitos nos processos metabólicos. Por outro lado, dietas reduzidas em carboidratos tem demonstrado ser uma ferramenta eficaz para promover a perda de peso e melhora do perfil lipídico no plasma. Essas dietas são normalmente baseadas no consumo de carne vermelha, aves, peixes e moluscos, ricos em gordura saturada e insaturada. O consumo de microalgas por seres humanos – se advindas de cultivos descontaminados e processados em ambiente adequado – pode ser uma boa alternativa para a suplementação dos ácidos graxos essenciais na dieta conforme recomendações diárias estabelecidas.

Os compostos orgânicos voláteis (COV) são substâncias alifáticas ou aromáticas de baixo peso molecular e baixas temperaturas de ebulição, sendo os principais responsáveis pela emissão de odores característicos em alimentos,

plantas, tintas e produtos de limpeza. Os COVs são estudados também com possíveis aplicações comerciais na agricultura, perfumaria e alimentação.

Por meio de mecanismos de auto-oxidação de lipídios, em especial os ácidos linoleico e linolênico, sua reação com o oxigênio leva a formação de 9- e 13-hidroperóxidos (Azarbad e Jelen, 2014). A partir da decomposição destes hidroperóxidos são gerados radicais alcoxi precursores para a liberação de hidrocarbonetos voláteis, álcoois ou aldeídos não mais ligados a estrutura do glicerol (Bate et al., 1998). Nesta decomposição também pode-se formar álcoois não voláteis e cetonas. O hexanal é um dos aldeídos majoritariamente produzidos durante a oxidação do ácido linoleico (Elisia e Kitts, 2011) conforme demonstrado pela reação simplificada na Figura 1.

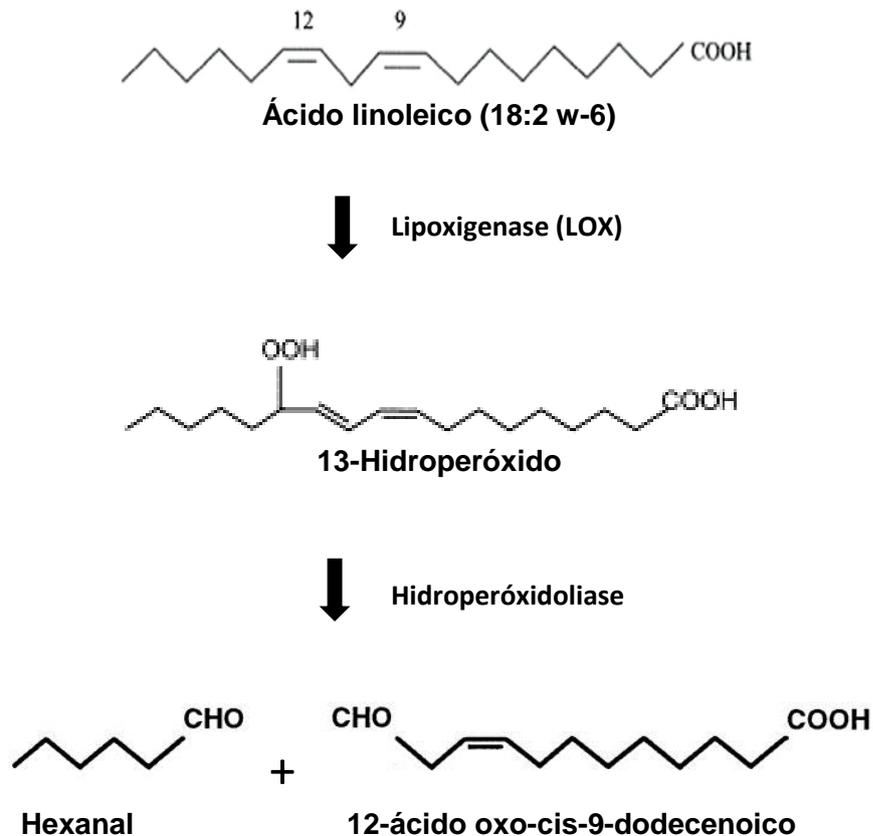


Figura 1 – Reação de decomposição do ácido graxo poliinsaturado (18:2 w-6) resulta no hexanal como um de seus produtos.

É relatado na literatura que mais de 35 mil espécies de algas são causadoras dos odores em ambientes aquáticos (Watson, 2004). Os principais componentes odoríferos provenientes de algas e cianobactérias são, em geral, terpenoides derivados de carotenoides e de ácidos graxos. Portanto, o entendimento das espécies de algas e sua relação com a produção e liberação de odores e os COVs pode contribuir com a síntese de novos compostos a partir da biodiversidade brasileira. O uso deste tipo de composto em produtos comerciais eleva seu valor agregado, além de atribuir a composição de matéria-prima renovável em sua constituição.

Indústrias objetivam alta produção de biomassa em cultivos algais, mas para tanto devem conhecer a ecofisiologia da espécie a ser cultivada. Sabe-se que a produtividade celular é consequência da interação de fatores biológicos – intrínsecos

ao organismo – físicos e químicos do meio (Raven, 2007), fazendo-se necessária a consideração dos parâmetros como luz, temperatura, pH e nutrientes. Nutrientes e iluminação são fatores fundamentais ao crescimento de microalgas fotossintéticas. Os meios de cultivo BG11 (Rippkad et. al, 1979) e WC (Guillard and Lorenzen, 1972) atendem nutricionalmente estes requisitos e o uso de LEDs (*Light Emitting Diodes*) como fonte luminosa são comprovadamente adequados à fotossíntese (Carvalho et al. 2011) e favorecem o crescimento saudável das células algais (Zittelli et al., 2003; Pegallapati et al., 2011; Ryu et al., 2009).

O LED é um modelo de iluminação artificial utilizado em cultivos de microalgas em substituição às lâmpadas fluorescentes, uma vez que estas possuem o espectro de emissão muito amplo, incluindo comprimentos de ondas de baixa atividade fotossintética em algumas espécies. A luz branca trata-se da combinação de todos os comprimentos de onda do espectro de luz visível e é comumente utilizado como fonte de iluminação em cultivos de microalgas. Além disso, o uso de LEDs com emissão de um único comprimento de onda (luz monocromática) também pode ser utilizado a fim de se modificar a composição bioquímica celular. Como exemplos pode-se citar o aumento do conteúdo de ácido eicosapentaenoico em *Nannochloropsis oceanica* em luz vermelha e azul quando comparada a luz branca (Chen et al., 2013); acúmulo de astaxantina em *Haematococcus pluvialis* quando exposta à luz azul (Katsuda et al., 2004); e maior conteúdo de ácido oleico em *Nannochloropsis sp.* cultivada em luz vermelha quando comparada aos cultivos em luz azul, verde e branca (Das et al., 2011).

A radiação fotossinteticamente ativa, do inglês PAR (*Photosynthetically active radiation*) é a quantidade de energia luminosa útil à fotossíntese que alcança uma superfície em uma unidade de tempo. Por meio do PAR é possível realizar o cálculo da energia (W) que incide sobre determinada área (m^2) do reator por volume (m^{-3}) de cultivo, sendo este um parâmetro para avaliar a eficiência do fotobiorreator (FBR).

O sistema antena em microalgas, presente nos centros de reação fotossintéticos de clorofilas a, é um complexo responsável pela absorção de fótons incididos do ambiente. No entanto, em cultivos com alta abundância celular é comum ocorrer o autossombreamento (Figura 2), ou seja, apesar de haver incidência luminosa no cultivo e o sistema antena estar apto a receber luz, as células mais próximas da origem da fonte luminosa bloqueiam a penetração de luz que

deveria atingir as demais células localizadas mais internamente ao fotobiorreator. Esse efeito pode inibir a capacidade fotossintética máxima do cultivo e diminuir o rendimento de biomassa. Elevar a intensidade luminosa pode não significar maior disponibilidade de luz para as células e ainda expõe as células ao risco de problemas como aquecimento do sistema e possibilidade de danificar o metabolismo das algas mais próximas à fonte de luz por fotoinibição (Park e Lee, 2000), além de aumentar o custo de operação.

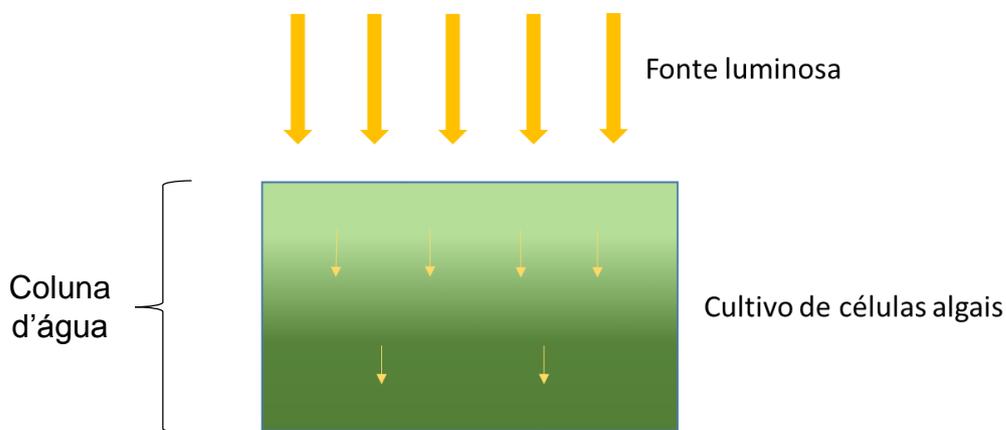


Figura 2 – Esquema ilustrando a penetração da luz quando incidida lateralmente por uma única fonte. Em alta densidade celular ocorre o autossombreamento. A coluna d'água refere-se ao caminho óptico, distância entre a fonte luminosa e a extremidade oposta do fotobiorreator.

Segundo Carvalho et al. (2011), após a concepção de fótons na maquinaria do fotossistema II (PSII), este demora de 1 a 15 ms para se regenerar (oxidar) e estar novamente apto a receber elétrons. A absorção de um fóton é quase que instantânea e, portanto o tempo que uma célula microalgal se mantém na região iluminada do fotobiorreator é o tempo necessário para que um fóton excite os pigmentos do sistema antena. Sendo assim, temos uma correlação entre a incidência de luz, a espessura da coluna d'água dentro do FBR e a quantidade de pigmentos disponíveis para absorção de luz no complexo antena (Kommareddy e Anderson, 2004). O período de tempo em que uma célula fica exposta à luz e à sombra deve ser determinado considerando-se o tempo em que as células levam entre as regiões claras e escuras do FBR, em caso de cultivos com agitação. Esse tempo deve ser projetado para que possua o menor valor possível no claro e no

escuro (Richmond et al., 2003), fator alcançado por meio da agitação do caldo de cultivo.

Problemas na distribuição e no espalhamento da luz dentro do fotobiorreator podem ser resolvidos por meio da elaboração de modelos com diferentes geometrias e modos de operação. Fotobiorreatores cilíndricos são capazes de expor uma grande área de sua superfície à luz, atendendo a principal demanda de cultivos de células fotoautotróficas, como as microalgas. Apesar de mais caros, os fotobiorreatores cilíndricos possuem vantagens sobre modelos como *raceways* (Sompech et al., 2012) e *thin-layer* (Doucha e Livansky, 1995) devido à sua flexibilidade de controlar e fornecer as condições ambientais adequadas ao crescimento celular. Fotobiorreatores *thin layer* e *raceways*, comumente utilizados em larga escala para produção de biomassa, são horizontais, abertos e recebem iluminação solar. Sendo a coluna d'água muito espessa – aproximadamente maior que 10 cm – poderá ocorrer problemas de auto-sombreamento entre as células. Já em casos de coluna d'água menor (~ 1 a 3 cm) esse problema é minimizado, pois todas as células estarão expostas a luz e realizando fotossíntese. Da mesma forma atuam os fotobiorreatores tubulares (Molina et al., 2000), bastante extensos, semelhante a uma serpentina, por onde percorre o cultivo de células que fica exposto a luz solar (Figura 3).

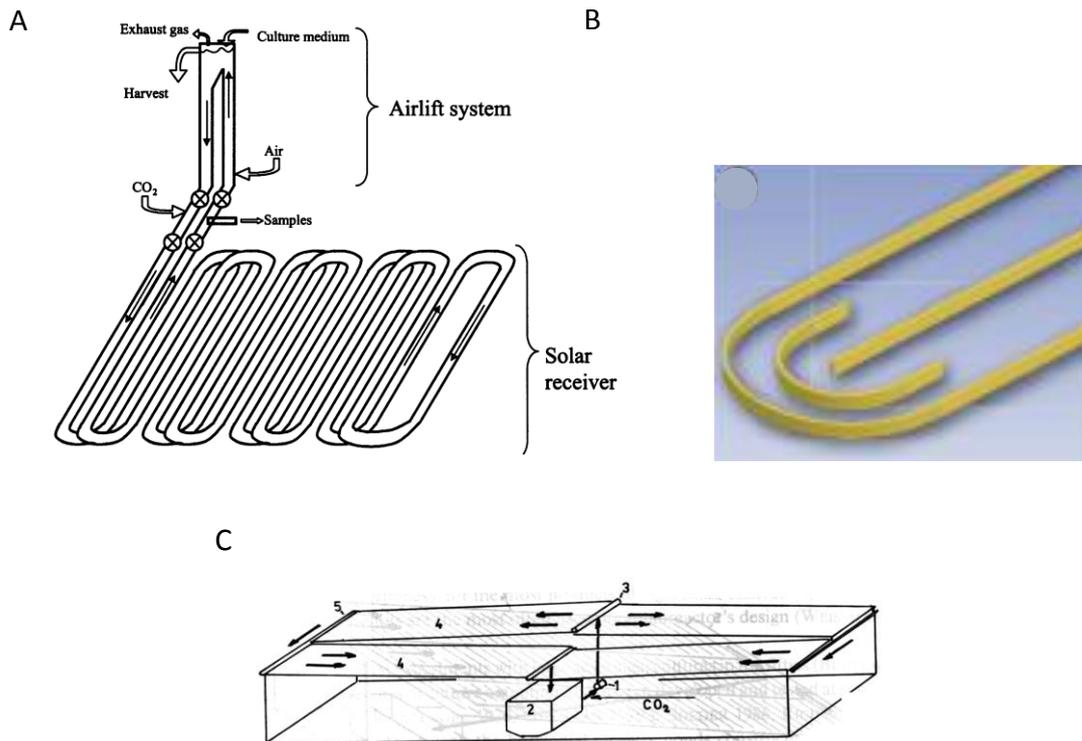


Figura 3 – Modelos de fotobiorreatores com diferentes geometrias e modos de operação. A: Tubular; B: *Raceway*; C: *Thin Layer*

Fotobiorreator cilíndrico (ou *bubble column*) é um modelo bastante utilizado em escala laboratorial e ampliada. Trata-se de um sistema de cultivo fechado, na posição vertical e possui inserção de bolhas de gás a partir de sua base. O diâmetro deste tipo de reator é bastante diversificado, variando desde 4,5 cm (Ryu et al. 2009) até 20 cm (Khoo et al., 2016), bem como também seu comprimento varia de dezenas a centenas de centímetros, mesmo com a fonte luminosa sendo unidirecional, ou seja, emitida em apenas uma das faces do fotobiorreator. Este tipo de FBR é proposto para que a luz, ao iluminar toda a face por toda a extensão do reator, ilumine todas as células do cultivo. No entanto, isto apenas será real caso o diâmetro do reator seja muito pequeno, caso contrário, será inevitável que ocorra o autossombreamento.

Outra forma de se impedir o autossombreamento é promovendo a distribuição da luz internamente ao FBR, ou seja, de dentro para fora. Assim, em um FBR cilíndrico, torna-se mais fácil garantir que todas as células recebam homogeneamente a incidência da luz. Além disso, por se tratar de um mecanismo que ilumina o sistema de dentro para fora, trataremos não mais sobre o diâmetro do

reator, mas sim do caminho óptico percorrido (= raio), uma vez que a iluminação parte do centro para as extremidades (Figura 4). Ou seja, mesmo que o cilindro possua diâmetro acima do convencional verificado na literatura, o que ditará o tamanho da coluna d'água será o raio interno (B) no qual está inserida a fonte luminosa.

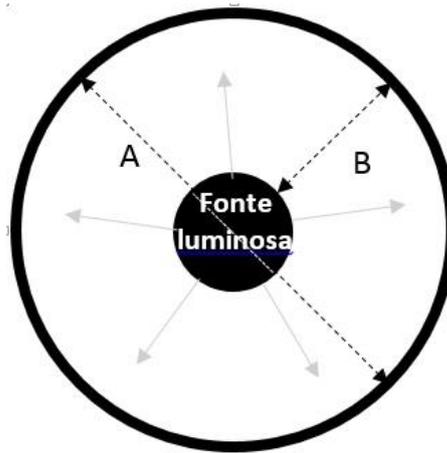


Figura 4 – Vista superior do fotobiorreator proposto. O sistema possui diâmetro interno de 95 mm, no entanto, o caminho a ser percorrido pela luz é de 35 mm para todas as direções devido a incidência luminosa distribuída a todos os pontos do fotobiorreator a partir do seu centro.

Desta forma, a energia despendida na iluminação é direcionada unicamente ao cultivo, ou seja, não se perde energia luminosa para o ambiente. Além disso, esta estratégia cria uma maior homogeneidade no espalhamento da luz em todas as direções do FBR, uma vez que a fonte luminosa está distribuída igualmente por toda sua extensão.

No modelo de fotobiorreator proposto é possível promover alta incidência luminosa em um pequeno espaço e com pouca dissipação térmica, relação que não é atendida por outras formas de iluminação, como lâmpadas halógenas ou fluorescentes (Carvalho et al., 2011). Além das estratégias geométricas dos fotobiorreatores e das fontes de iluminação – para superar o autossombreamento e garantir que todas as células recebam luz – também é frequente a inclusão de

sistemas de agitação que movimentam o caldo de células. Esta agitação pode ser realizada mecanicamente por pás giratórias, pulgas magnéticas, borbulhamento ou ainda em cascata, o que promove o movimento das células das áreas sombrias para as mais iluminadas. O uso de bolhas de ar para agitação permite que pela mesma via seja inserido o gás dióxido de carbono, utilizado como substrato e regulador do pH do cultivo. A vazão de bolhas, seja por ar atmosférico ou CO₂, pode ser realizado por meio de pedras porosas que provocam a convecção do caldo de cultivo, mantendo as células em movimento entre as regiões de claro e de escuro.

Cultivos abertos ao ambiente ficam sujeitos à contaminação por bactérias, fungos e outros organismos, podendo influenciar negativamente na produção de biomassa algal, além de não se garantir um produto final puro. Estes modelos são comuns em cultivos que utilizam líquidos residuais e efluentes como substrato, sendo a aplicação final da biomassa algal destinada a ração animal, fertilizantes, biocombustível, etc. Já quando o destino final dos metabólitos produzidos sejam mais finos, como exemplos, para áreas de suplementação alimentar ou farmacêutica, o cultivo deve ser com meio de cultivo puro apropriado e realizado em ambientes fechados, inibindo a probabilidade de contaminações.

Apontadas as principais variáveis relevantes no desenvolvimento de fotobiorreatores, observa-se que existem vantagens e desvantagens para cada modelo. O excesso de luz e agitação pode ser prejudicial na produtividade celular dependendo da espécie cultivada. FBR coluna de bolhas de iluminação interna por LEDs, como o proposto neste trabalho, possibilita a regulação destes parâmetros, adequando-os conforme as necessidades de cada microalga. Assim sendo, o modelo proposto não é restrito a uma única espécie algal, sendo possível aplicá-lo a diferentes cepas.

Verificadas a eficiência microalgal na fixação do carbono inorgânico – constantemente lançado ao ambiente por interferência humana – e o potencial destas células na produção de compostos de interesse à indústria alimentícia ou farmacêutica, busca-se o aperfeiçoamento no seu manejo visando o alto rendimento na produção de uma biomassa livre de contaminantes químicos ou biológicos. Diante ao problema de autossombreamento nem sempre este é um objetivo facilmente atingido, fazendo-se necessária a construção de um fotobiorreator que reduza estes efeitos.

A produção de microalgas encontra dificuldades tanto na parte de cultivos em larga escala, como também no que se refere à coleta e processamento da biomassa. O uso de fotobiorreatores é proposto para o cultivo de microalgas em escala industrial, quer para o sequestro de CO₂ e uso do efluente como fonte de matéria orgânica em áreas agrícolas, quer para aproveitamento comercial dos subprodutos do metabolismo algal ou mesmo da biomassa para a produção de biodiesel (Andersen 2005). Em escala laboratorial, a produção de biomassa em quantidade é necessária para a prospecção de biomoléculas, sendo importante a qualidade da biomassa produzida, dado que microalgas apresentam plasticidade fisiológica.

Nesta pesquisa, propõe-se melhorar a produção de biomassa de diferentes espécies de microalgas utilizando para isso a geometria cilíndrica em FBRs de vidro e iluminados internamente. O objetivo é a alta produtividade das microalgas em cultivos sem limitação por luz nem de nutrientes em escala de bancada. Com alta produtividade de biomassa é possível realizar a bioprospecção do potencial biotecnológico das algas, em especial para a indústria farmacêutica e de alimentos.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Objetivou-se com este estudo criar um modelo de fotobiorreator versátil em escala laboratorial (3 L) capaz de produzir e sustentar altas densidade de células microalgais de diversas espécies. Por fotobiorreator versátil entendemos que o operador seja capaz de, facilmente, substituir o meio de cultura, a cor da luz, assim como sua intensidade e a agitação do cultivo. Assim, garantidas as condições físicas e químicas ideais neste modelo de fotobiorreator, a meta de alta síntese de biomoléculas e metabólitos secundários será automaticamente atingida. Essa alta produção precede e possibilita o estudo da aplicabilidade destes compostos, além de corroborar com a fixação de CO₂ atmosférico.

4.2 Objetivos específicos

- Comparar os meios de cultura BG11 (Rippka et. al, 1979) e WC (Guillard e Lorenzen, 1972) para o cultivo de microalgas. Serão testadas 11 espécies;
- Obtenção de taxas de crescimento e rendimento quântico de 11 espécies de microalgas;
- Desenvolver um fotobiorreator cilíndrico para alta produtividade algal;
- Aplicar o FBR cilíndrico produzido e verificar sua flexibilidade quanto ao crescimento microalgal;
- Identificar a produção de ácidos graxos e moléculas voláteis na biomassa de três espécies e avaliar sua aplicabilidade na suplementação humana.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi dividido em quatro etapas principais. A primeira delas consta do comparativo entre dois meios de cultura usualmente utilizados, escolhendo aquele mais adequado às diferentes espécies a serem cultivadas por períodos de até 20 dias. A segunda etapa trata do desenvolvimento do fotobiorreator cilíndrico de coluna de bolhas iluminado internamente com recurso de controle de iluminação e agitação. A terceira etapa consta da validação do fotobiorreator proposto/desenvolvido nos cultivos de microalgas. A quarta etapa aborda o estudo do potencial biotecnológico das biomoléculas sintetizadas pelas microalgas cultivadas no FBR e verifica as possíveis aplicações.

As espécies selecionadas para este estudo estão apresentadas na Tabela 1 e foram obtidas da Coleção de Culturas de Microalgas de Água Doce (WDCM 835) da Universidade Federal de São Carlos (CCMA-UFSCar), pertencente ao Laboratório de Ficologia no Departamento de Botânica desta mesma instituição. As cepas selecionadas pertencem ao Phylum Chlorophyta, mas de diferentes classes, como mostrado na Tabela 1.

Tabela 1 - Cepas utilizadas para a realização deste estudo. Todas as espécies foram cedidas pelo CCMA-UFSCar.

No. Acesso	Espécie	Origin/date	Classe	Ordem	Família
062	<i>Scenedesmus spinosus</i>	Lagoa do Infernão (EE Jataí), 1987	Chlorophyceae	Sphaeropleales	Scenedesmaceae
175	Microalga não identificada (picoplâncton)	Lagoa do Infernão (EE Jataí), 1993	Chlorophyceae	cf. Sphaeropleales	cf. Scenedesmaceae
237	Picoplâncton	Represa do "29", 2009	Trebouxiophyceae	não identificado	não identificado
325	<i>Monoraphidium pseudobraunii</i>	Rio Madeira - RO, 2011	Chlorophyceae	Sphaeropleales	Selenastraceae
350	<i>Curvastrum pantanale</i>	Bebedouro Fazenda Santa Cruz, 2011	Chlorophyceae	Sphaeropleales	Selenastraceae
048	<i>Raphidocelis subcapitata</i>	Norsk Institutt for Vannforskning (NIVA)	Chlorophyceae	Sphaeropleales	Selenastraceae
493	<i>Hariotina reticulata</i>	-	Chlorophyceae	Sphaeropleales	Scenedesmaceae
123	<i>Kirchneriella aperta</i>	-	Chlorophyceae	Selenastraceae	Kirchneriella
587	<i>Xanthidium sp</i>	-	Conjugatophyceae	Desmidiales	Desmidiaceae
003	<i>Ankistrodesmus densus</i> ¹	Represa do Broa, 1979	Chlorophyceae	Sphaeropleales	Selenastraceae
-	<i>Chlorella sorokiniana</i>	-	Trebouxiophyceae	Chlorellales	Chlorellaceae

5.1 Crescimento microalgal em meios de cultura BG11 e WC

Visando garantir a suficiência de nutrientes disponíveis em longos períodos nos cultivos das microalgas e testar as cepas selecionadas, esta etapa foi conduzida para comparar dois meios de cultivo tradicionalmente utilizados para o crescimento de microalgas. Os meios testados foram BG11 (Ripka, 1979) e WC (Guillard and Lorenzen, 1972) e as respectivas composições nutricionais estão expostas na Tabela 2. O meio BG11 possui o citrato férrico amoniacal, ácido cítrico, carbonato de sódio e nitrato de sódio como fonte de carbono e nitrogênio, e fosfato dipotássico e sulfato de magnésio fornecendo fósforo e enxofre. O meio WC possui bicarbonato de sódio como fonte de carbono, nitrato de sódio como fonte de nitrogênio, fosfato dipotássico fornecendo fósforo, sulfato de magnésio servindo de fonte de enxofre, e

exclusivamente apresenta silicato de sódio fornecendo sílica para espécies como diatomáceas que possuem este elemento na composição de sua membrana celular. Apesar do fornecimento de alguns componentes serem semelhantes entre os dois meios de cultivo, a concentração final de cada nutriente varia.

Tabela 2 – Componentes e suas concentrações finais (molL^{-1}) nos meios de cultura BG11 e WC.

BG11	Concentração	WC	Concentração
$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$	$3,1 \times 10^{-5}$	NaNO_3	1.00×10^{-3}
$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{Fe}^{3+} \cdot y\text{NH}_3$	$\sim 3 \times 10^{-5}$	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2.50×10^{-4}
NaNO_3	$1,8 \times 10^{-2}$	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.50×10^{-4}
$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	$1,8 \times 10^{-4}$	NaHCO_3	1.50×10^{-4}
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$3,0 \times 10^{-4}$	$\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	1.00×10^{-4}
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$2,5 \times 10^{-4}$	K_2HPO_4	5.00×10^{-5}
Na_2CO_3	$1,9 \times 10^{-4}$	H_3BO_3	1.62×10^{-5}
$\text{MgNa}_2\text{EDTA} \cdot \text{H}_2\text{O}$	$2,8 \times 10^{-6}$	$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1.17×10^{-5}
H_3BO_3	$4,6 \times 10^{-5}$	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1.17×10^{-5}
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	$9,5 \times 10^{-6}$	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	4.01×10^{-8}
$\text{ZnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	$7,7 \times 10^{-7}$	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	7.65×10^{-8}
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	$3,6 \times 10^{-7}$	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	4.20×10^{-8}
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$1,6 \times 10^{-6}$	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	9.10×10^{-7}
$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	$1,7 \times 10^{-7}$	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2.48×10^{-8}

Nesta etapa, os meios de cultivo foram preparados em Erlenmeyers com capacidade para 250 mL, com volume inicial de 100 mL de meio e autoclavados a 120 °C e 1 atm por 20 minutos. Esse procedimento foi realizado 24 horas antes do início do experimento. Foi realizado uma réplica para cada tratamento.

Para a execução desta etapa foram selecionadas seis espécies inoculadas em ambos os meios de cultivos (BG11 e WC) e o crescimento foi monitorado por 240 h. As espécies selecionadas foram *Ankistrodesmus densus* (CCMA-UFSCar 003), *Curvastrum pantanale* (CCMA-UFSCar 350), *Monoraphidium pseudobraunii* (CCMA-UFSCar 325), *Chlorella sorokiniana* e duas cepas picoplanctônicas (CCMA-

UFSCar 237 e CCMA-UFSCar 175) cuja sistemática é ainda desconhecida, portanto não sabemos a qual gênero/espécie pertencem. Este monitoramento envolveu a determinação diária dos parâmetros descritos a seguir.

- Absorbância em 684 nm realizado em espectrofotômetro (Nanocolor® UV/VIS Macherey-Nagel, Alemanha). A clorofila *a* promove maior absorção deste comprimento de onda;

- Clorofila *a* foi determinada pela fluorescência *in vivo* em fluorímetro da marca Turner Designs®, USA (modelo: *Trilogy*), por meio da relação entre a concentração da clorofila *a* extraída de culturas de *Chlorella sorokiniana* em fase exponencial de crescimento e intensidade de fluorescência obtida através das seguintes curvas de calibração:

$$[\text{Clorofila } a] = \frac{\text{Fluorescência} - 50,48}{28165}, \text{ fluorescências até } 2300 \text{ U.A.} \quad (1)$$

$$[\text{Clorofila } a] = \frac{\text{Fluorescência} - 1190,7}{21627}, \text{ fluorescências acima de } 2300 \text{ U.A.} \quad (2)$$

- As velocidades de crescimento máximas foram obtidas plotando-se o logaritmo natural da concentração de clorofila *a* *versus* o tempo de cultivo (horas). Como forma de confirmação, também foi observado a linearidade por meio da absorbância, bem como seu valor final atingido após 240 h.

Definido o melhor meio de cultivo, as demais espécies indicadas na Tabela 1 foram cultivadas em meio BG11 e monitoradas por 240 h. Desta vez, o cultivo foi realizado em Erlenmeyers de 500 mL contendo volume inicial de 300 mL de meio de cultivo. Analisaram-se os parâmetros de produção de clorofila *a* e calculado o rendimento quântico fotossintético máximo. Esta análise quantifica a eficiência máxima na qual a luz absorvida pelo complexo antena coletor de luz do Fotossistema II é convertida em energia química, ou seja, para a etapa fotoquímica. Para isso, cada amostra foi deixada em no escuro por 20 minutos e em seguida foram inseridas no fluorímetro Phyto-PAM Fluorometer Analyser® (Walz, Alemanha). Este equipamento realiza o cálculo da eficiência máxima fotossintética do Fotossistema II que é dada pela diferença entre as fluorescências máxima e mínima, dividida pela máxima fluorescência (Lombardi e Maldonado, 2011).

$$\Phi M = \frac{F_m - F_0}{F_m} \quad (3)$$

Onde:

F_m = fluorescência máxima das células adaptadas ao escuro;

F_0 = fluorescência mínima emitida pelas células adaptadas ao escuro.

Com o desenvolvimento desta etapa, buscou-se avaliar o crescimento populacional de cada cepa e selecionar as de melhor crescimento para serem cultivadas no FBRs.

5.2 - Desenvolvimento de fotobiorreator de coluna

O fotobiorreator desenvolvido (Figura 5) consiste em modelo coluna de bolhas em material vítreo de borossilicato e diâmetro externo de 100 mm com capacidade máxima de 3 L. Possui paredes de 2,5 mm, garantindo maior resistência e fácil manejo e higienização. O topo do FBR é fechado com tampa de Nylon®, com pequenos orifícios feitos sob medida para o encaixe da tubulação de vidro por onde foram inseridas as fontes de iluminação, aeração, alimentação por dióxido de carbono e ainda, um terceiro tubo posicionado para a liberação de gases para o ambiente. Todos os encaixes dos tubos, inclusive a tampa do FBR, possuem vedação por *o-rings* de borracha nitrílica, impedindo o trânsito de gases e partículas, evitando-se a contaminação de origem externa. A dimensão interna do reator de coluna é de 95 mm, no entanto, a coluna d'água exposta à iluminação possui 35 mm (Figura 5A). O sistema conta ainda com duas entradas na tampa superior para inserção de eletrodos de pH e de temperatura, na figura indicados pelos círculos pretos cheios.

A circulação do sistema é dada pela agitação mecânica por meio da injeção de ar atmosférico utilizando-se bombas de ar (Big Air, A.230) com vazão máxima de 1,5 L min⁻¹ injetados através de pedras porosas posicionadas na base do FBR. Acoplado a este mecanismo está a válvula controladora da injeção de dióxido de carbono, que era manualmente acionada sempre que o pH ultrapassasse o valor de ~ 8,0, e somente era desativada quando o pH finalmente atinge o valor ideal para

cada cepa (~ pH 6,5). Esse procedimento era efetuado em geral, duas vezes ao dia, por volta das 11h e 15h. Com este sistema de agitação, o caldo demonstra movimento de convecção internamente, cujas células posicionadas na superfície tendem a submergir, bem como as da base tendem a subir (Figura 5B).

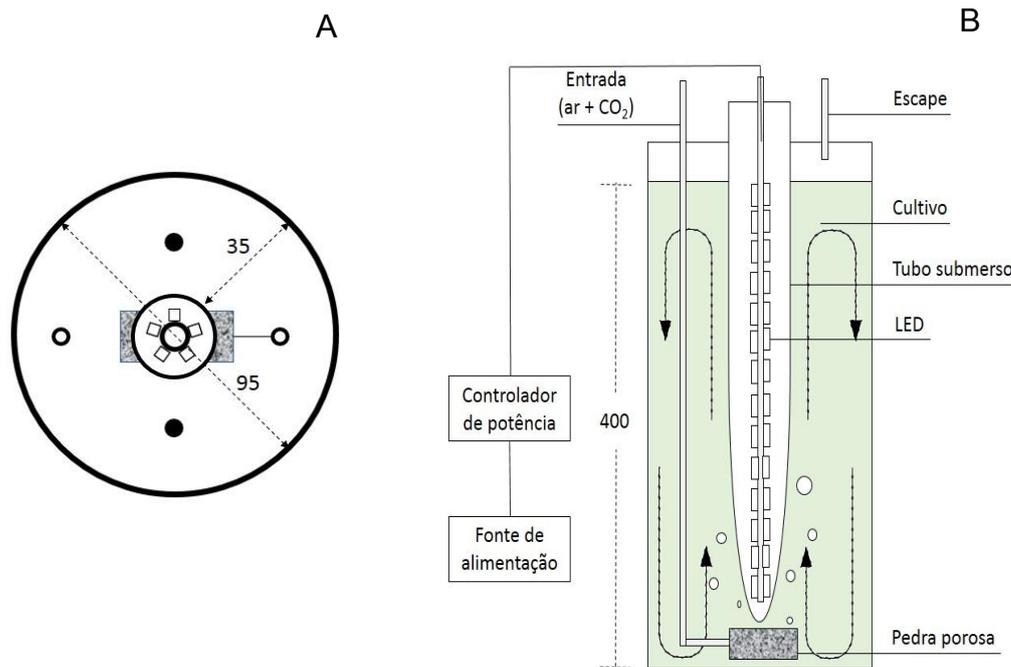


Figura 5 – Esquema das especificações do PBR em desenvolvimento. Medidas em milímetros. Em A, vista superior mostrando-se a tampa em Nylon®. Em B, vista frontal do fotobiorreator cilíndrico desenvolvido.

O FBR possui iluminação emitida de dentro para fora realizada a partir de LEDs uniformemente distribuídos em toda a extensão do cultivo, garantindo que a energia luminosa incidida seja direcionada às células. O sistema suporta cerca de 5 fitas de LEDs (12 V, 2 A m⁻¹, 24 W m⁻¹, 66 LEDs m⁻¹) com até 40 cm de comprimento e 0,5 cm de espessura, de cor branco quente, posicionadas longitudinalmente para todas as direções na parte interna do FBR, dentro de um segundo tubo de vidro conforme mostrado na Figura 5B. Os LEDs são alimentados por conversor de tensão estabilizado de entrada 220 V e saída de 12 V, 30 A e 360 W. Apesar deste estudo ser realizado apenas com fitas de LED de cor branca, o sistema admite a fácil substituição por fitas de qualquer outra cor e durante qualquer etapa do cultivo.

Devido ao fato de ter-se observado que em cultivos menos concentrados em células, a alta incidência luminosa acarretou no desperdício de energia elétrica utilizado na operação da fonte luminosa e pode ter levado à ocorrência da fotorespiração, com perdas para o cultivo pelo excesso de luz, o sistema foi intermediado por um regulador de potência aplicado para regular a intensidade luminosa incidida no sistema. Desta forma, para cultivos com baixa concentração celular, ajustou-se a potência do regulador para baixa luminosidade, ao passo que com o aumento no número de células, a incidência luminosa era gradativamente aumentada. A incidência interna de luz foi quantificada utilizando-se um medidor de quanta esférico (*quanta-meter*) (Walz, Alemanha).

5.3 Aplicação do fotobiorreator no cultivo de microalgas

5.3.1 Cultivo de *C. sorokiniana*, *C. pantanale* e Picoplâncton 237

Para o teste da eficiência do FBR desenvolvido, esta etapa consistiu no cultivo de três cepas na nova condição física (geometria, iluminação, agitação) imposta pelo FBR. *Chlorella sorokiniana*, *Curvastrum pantanale* e Picoplâncton 237 foram as cepas selecionadas para esta etapa. Todas foram cultivadas em meio de cultivo BG11 em culturas unialgais.

O monitoramento deste experimento consistiu na quantificação *in vivo* de clorofila *a* e do rendimento quântico máximo. A concentração celular foi obtida a partir da contagem manual das células em câmara de Fuchs-Rosenthal espelhada sob microscópio óptico (Nikon Eclipse E200, aumento 400 vezes). Além disso, foi realizado um controle na intensidade luminosa incidida no cultivo conforme o aumento na concentração de células. Ao final destes experimentos, os cultivos foram centrifugados por 10 minutos a 4400 rpm (Thermo Scientific, modelo: Legend XTR) e o pellet de biomassa foi separado e pesado para obtenção biomassa úmida de cada cepa, com teor de água de aproximadamente 83%. A biomassa isolada neste procedimento foi congelada em freezer a -22°C para realização de análises posteriores.

5.3.2 – Aumento na concentração de células e nutrientes e teste em *C. sorokiniana*

Devido à alta concentração celular atingida nos FBRs, verificou-se uma certa estagnação dos cultivos na ordem de 10^8 células mL^{-1} . Atribuiu-se isto a falta de nutrientes, uma vez que o meio de cultivo BG11 é normalmente utilizado em cultivos de até 10^7 células mL^{-1} . Assim, a fim de melhorar o desempenho do FBR proposto no presente estudo, a cepa de *C. sorokiniana* foi submetida a testes com o aumento da concentração de nutrientes do BG11, sendo elevadas em uma, duas e 10 vezes a concentração inicial de nutrientes. Estes experimentos foram acompanhados diariamente mensurando-se a concentração de clorofila *a*, abundância celular, rendimento quântico máximo e biomassa seca.

Para a determinação da concentração celular em termos de biomassa seca foram filtradas amostras de 10 mL do cultivo em membrana de fibra de vidro (Sartorius, diâmetro de 47 mm e poros 0,7 μm). Após a filtração, as membranas foram secadas por 24 h em estufa a 40 °C e então pesadas em balança de precisão analítica. Como parte das análises de validação do FBR, calculou-se a produtividade volumétrica de biomassa diária, tal como proposto por Ryu et al., (2009):

$$P = \frac{C_f - C_i}{t} \quad (4)$$

Onde:

C_f e C_i : concentrações final e inicial, respectivamente, da biomassa seca (g L^{-1});

t : tempo do cultivo (dia).

Além disso, para se verificar a eficiência do processo como um todo, foi possível quantificar a energia luminosa fornecida pelo sistema (El) ao volume de cultivo, que pode ser entendido como o potencial de iluminação específico, conforme proposto por Ogbonna et al., (1995) por meio da equação:

$$El = \frac{(0,221 I_0 A)}{V} \quad (5)$$

Onde:

Io: incidência luminosa ou PAR ($\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$);

A: \u00e1rea de incid\u00eancia da luz (m^2);

V: volume do cultivo (m^3).

O valor obtido nesta equa\u00e7\u00e3o trata-se do quanto de energia em forma de PAR (luz) o sistema \u00e9 capaz incidir por volume de cultivo para cada tipo de l\u00e2mpada utilizada, e n\u00e3o do quanto de energia el\u00e9trica \u00e9 consumido. Como mencionado anteriormente, as fitas de LED s\u00e3o capazes de fornecer maior quantidade de energia luminosa consumindo menos energia el\u00e9trica quando comparada a outras fontes de ilumina\u00e7\u00e3o.

5.4 – An\u00e1lises cromatogr\u00e1ficas

As an\u00e1lises cromatogr\u00e1ficas foram realizadas no Laborat\u00f3rio de Produtos Naturais do Departamento de Qu\u00edmica da Universidade Federal de S\u00e3o Carlos. A biomassa das microalgas *C. pantanale*, Picopl\u00e2ncton 237 e *C. sorokiniana* adquirida a partir dos cultivos realizados nos fotobiorreatores foi mantida congelada a -22°C , e \u00e0s v\u00e9speras de sua an\u00e1lise foi liofilizada. As an\u00e1lises de identifica\u00e7\u00e3o dos \u00e1cidos graxos que comp\u00f5em a biomassa de cada esp\u00e9cie foram feitas em cromat\u00f3grafo a g\u00e1s (modelo: GC 2010 Plus) acoplado a espectr\u00f4metro de massas (modelo: MSTQ 8030) e Auto injetor comb-PAL (modelo: AOC-5000 Plus) todos da marca Shimadzu. Primeiramente foi realizado o processo de derivatiza\u00e7\u00e3o das amostras liofilizadas por transesterifica\u00e7\u00e3o direta baseado no proposto na literatura (Satish e Sims, 2012; Ehimen et. al, 2010; Gong e Jiang, 2011). Os lip\u00eddios extra\u00eddos pelo m\u00e9todo de transesterifica\u00e7\u00e3o direta s\u00e3o identificados na forma de \u00e9steres met\u00edlicos de \u00e1cidos graxos, compostos mais vol\u00e1teis e detect\u00e1veis pelo CG-EM do que seu composto de origem (Antoniosi-Filho, 1995).

Adicionou-se 1 mL de solu\u00e7\u00e3o de \u00e1cido sulf\u00farico 5% em metanol (V/V) a 100 mg da microalga liofilizada. Aqueceu-se a 90°C por 30 minutos em banho seco. Em seguida, adicionou-se 5 mL de hexano e mais uma vez submetida ao aquecimento de 90°C por 15 minutos. Coletou-se a fase org\u00e2nica que posteriormente foi injetada ao cromat\u00f3grafo. Os par\u00e2metros do equipamento foram configurados seguindo o

proposto por MIDI (1990) com adaptações para a metodologia no espectrômetro de massas (Tabela 3):

Tabela 3 – Condições cromatográficas aplicadas ao cromatógrafo gasoso e ao espectrômetro de massas para a leitura das amostras e obtenção dos dados de ácidos graxos.

Cromatografia gasosa		Espectrômetro de massas	
Coluna	Rtx-5MS	T_{fonte de íon}	280°C
T_{injetor}	280°C	T_{interface}	280°C
Gás carreador	Hélio		
Pressão	81.8 kPa		
Fluxo total	40.2 mL/min		
Fluxo da coluna	1.20 mL/min		
Velocidade linear	40.0 cm/sec		
Fluxo de purga	3.0 mL/min		
Split	30.0		
Programação			
Velocidade (°C/min)	T_{final} (°C)	Hold time (min)	
-	60.0	1.00	
20.00	140.0	5.00	
4.00	280.0	5.00	

A partir dos cromatogramas gerados, interpretou-se os dados e dispôs-se em uma tabela com os ácidos graxos identificados e sua quantidade relativa com a quantidade total. Somente foram considerados nesta avaliação os picos referentes aos metil ésteres de ácidos graxos. Demais compostos identificados pelo equipamento foram descartados e não considerados na contagem total das áreas dos picos.

Para a identificação dos compostos voláteis das três espécies selecionadas foi utilizado o equipamento HS-CG-EM, cujos parâmetros (TABELA 4) foram

adaptados aos encontrados na literatura (Chen et al., 2016; Nakamura et al., 2016; Wu et al., 2016).

Tabela 4 – Parâmetros aplicados ao Cromatógrafo Gasoso e ao forno para Headspace para leiteira das amostras e obtenção dos dados de voláteis.

Headspace		Cromatografia gasosa	
V _{injetado}	1.0 mL	Coluna	Rtx-5MS
T _{incubação}	110°C	T _{injetor}	280°C
t _{incubação}	20 min	Gás carreador	Hélio
v _{agitação}	500 rpm	Pressão	34.3 kPa
T _{seringa}	110°C	Fluxo total	14.2 mL/min
Limpeza seringa	10 min	Fluxo da coluna	0.70 mL/min
Espectrômetro de massas		Velocidade linear	30.2 cm/seg
T _{fonte de íon}	250°C	Fluxo de purga	3.0 mL/min
T _{interface}	250°C	Split	15
		Velocidade (°C/min)	T _{final} (°C)
			Hold time (min)
		-	40
		8	280
			0
			1

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 – Avaliação dos meios de cultivo: BG11 e WC

No estudo relativo a comparação sobre a produtividade e a velocidade de crescimento máxima das espécies algais em meios de cultivo distintos, das seis cepas pré-selecionadas, Picoplâncton 237 e *Curvastrum pantanale* (Figura 6) apresentaram as maiores velocidades de crescimento celular em meio de cultivo BG11 em comparação ao meio WC (Tabela 5). Para as espécies *Monoraphidium pseudobraunii* e Picoplâncton 175, a diferença entre as velocidades de crescimento não foi expressiva considerando os dois meios de cultivo. No entanto, nota-se que *M. pseudobraunii* em BG11 teve maior acúmulo de clorofila *a* após 240 h, ao contrário do ocorrido para Picoplâncton 175, cujo maior acúmulo do pigmento foi obtido em meio WC.

A espécie *Ankistrodesmus densus* não teve crescimento em meio WC e *Chlorella sorokiniana* foi cultivada apenas em meio BG11, portanto os dados apresentados destas cepas referem-se somente à quantificação da clorofila *a* e curva da absorbância em 684 nm e em meio BG11.

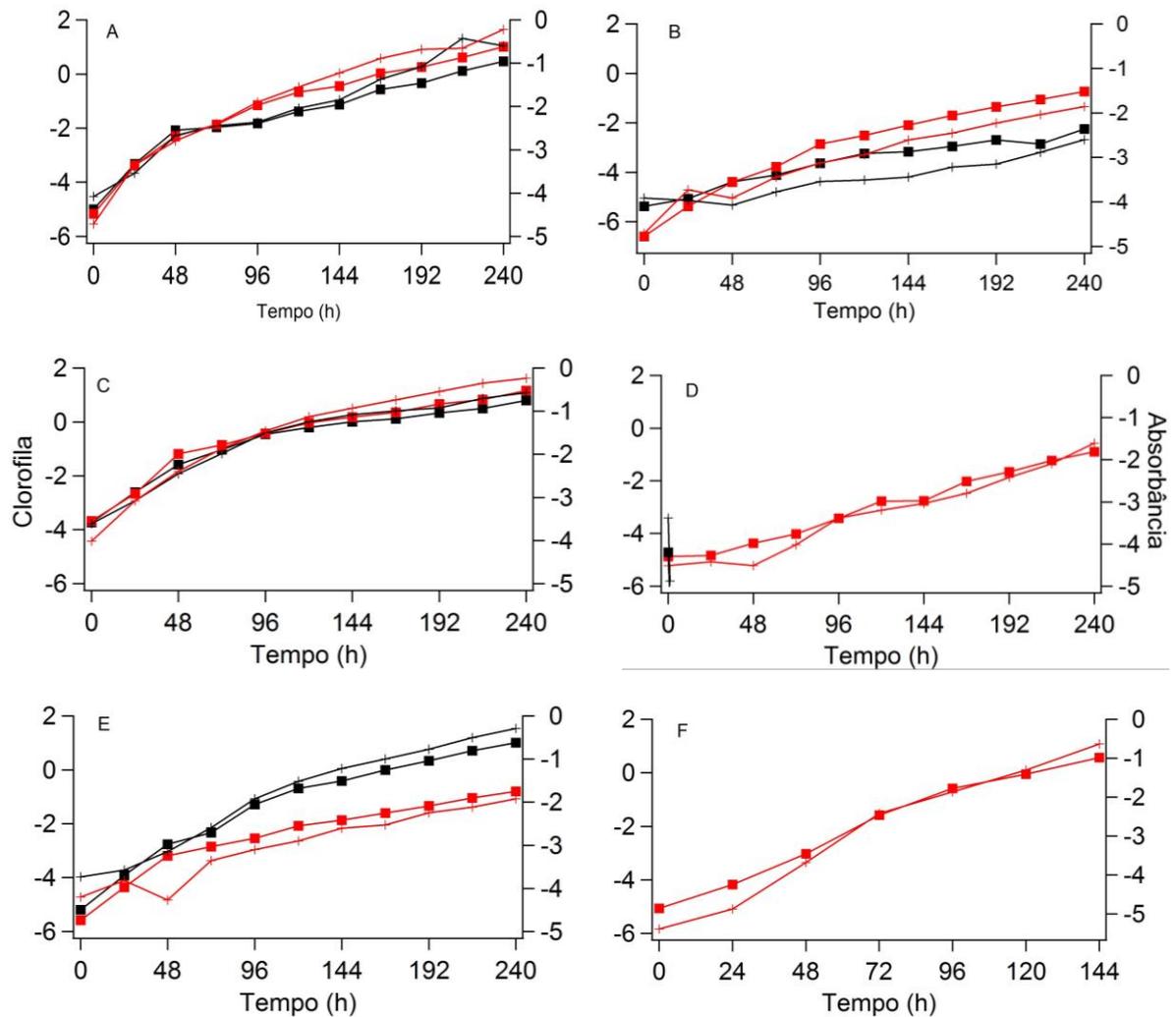


Figura 6 – Gráficos representando as curvas de crescimento dos vários cultivos algais. Eixo Y (esquerdo) representa o logaritmo natural da concentração de clorofila a [LN (mg L⁻¹)] e o eixo Y (direito) a densidade óptica obtida pela absorbância em 684 nm [LN (R. U.)]. Todos os gráficos são plotados em função do tempo de cultivo para 6 espécies algais em meios de cultivo BG11 e WC. Linha vermelha: meio BG-11 e linha preta: meio WC. Símbolos: ■ concentração de Clorofila a; + absorbância em 684 nm. A: *Monoraphidium pseudobraunii*; B: Picoplâncton 237; C: *Curvistrum pantanale*; D: *Ankistrodesmus densus*; E: Picoplâncton 175; F: *Chlorella sorokiniana*.

Tabela 5 - Velocidade de crescimento das cepas em meio BG11 e WC. Estes valores foram calculados pelo logaritmo natural da concentração do pigmento clorofila *a*.

Velocidade de crescimento em LN [Clorofila <i>a</i> (mg . mL ⁻¹)](dia ⁻¹)						
	Picoplâncton 175	Picoplâncton 237	<i>A.</i> <i>densus</i>	<i>M.</i> <i>pseudobraunii</i>	<i>C.</i> <i>sorokiniana</i>	<i>C.</i> <i>pantanale</i>
BG11	1,19	1,10	0,25	1,44	1,30	1,25
WC	1,22	0,50	-	1,46	-	0,58

Jezberová e Komárková (2007), em estudo comparativo entre os meios de cultivo BG11 e WC aplicados a três cepas da cianobactéria *Synechococcus* observaram que para avaliação do biovolume celular e da velocidade de crescimento, os maiores valores foram obtidos utilizando-se BG11. Ainda, Sobczuk e Chisti (2010), utilizando meio BG11 relataram o acúmulo de 2020,0 mg L⁻¹ em biomassa de *Choricystis minor* var. *minor*, enquanto Menezes et al. (2016), mostraram ter atingido apenas 984,3 mg L⁻¹ em meio BBM e 525,7 mg L⁻¹ em meio WC cultivando a mesma espécie algal. Portanto, baseado nas informações da Figura 6, Tabela 5 e dados da literatura, conclui-se que, de modo geral, as espécies apresentam crescimento melhor (ou igual) em meio BG11 em comparação com o meio WC, possivelmente devido a maior disponibilidade de nutrientes nesse meio. Além disso, os experimentos foram mantidos sob iluminação até completarem 720 h. Como notado na Figura 7, a coloração final dos meios de cultivos se alteraram.

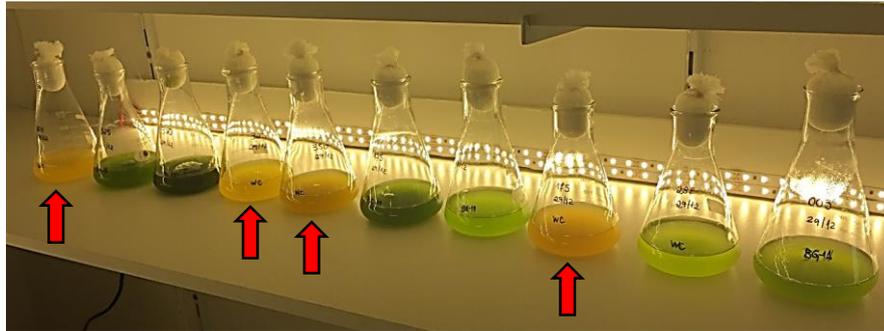


Figura 7 –Mudança na coloração dos cultivos após 720 h em WC, de verde para amarelo, indicados pelas setas vermelhas.

A alteração na coloração ao final dos cultivos sugere concentração de nutrientes inferior à necessária para a manutenção das células. Este foi um indício de que, em cultivos a longos, o meio WC não seria adequado para manter as cepas saudáveis, sendo necessária a constante reposição de nutrientes durante o período de experimento. Assim sendo, optou-se por seguir o objetivo deste estudo utilizando apenas o meio de cultura BG11.

As demais algas pré-selecionadas (vide Tabela 1) foram cultivadas em meio de cultura BG11 e as respectivas curvas de crescimento (clorofila *a*) são mostradas na Figura 8. O rendimento quântico máximo diário para cada espécie foi obtido e também são apresentados.

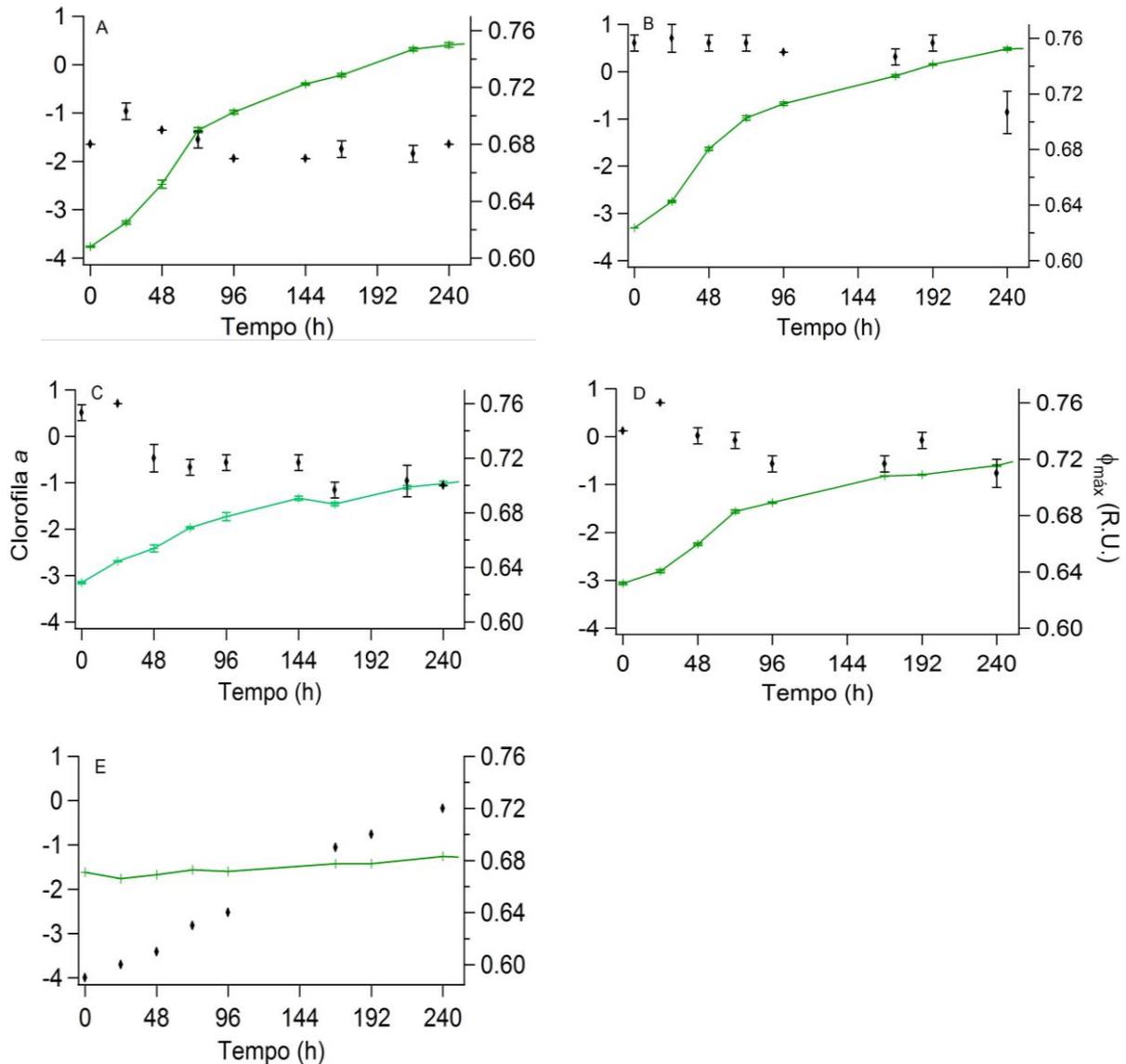


Figura 8 - Curvas de crescimento (linha contínua) obtidas a partir do logaritmo natural da concentração de clorofila a e rendimento quântico máximo (losangos) em meio BG11 das espécies A: *Raphidocelis subcapitata*; B: *Scenedesmus spinosus*; C: *Kirchneriella aperta*; D: *Hariotina reticulata*; E: *Xanthidium sp.*

Com relação ao rendimento quântico máximo, tem-se que valores próximos a 0,70 ou maior representam condição fisiológica saudável para células algais (Lombardi e Maldonado, 2011). Nota-se que durante as 240 h de experimento, *R. subcapitata*, *H. reticulata*, *K. aperta* e *S. spinosus* apresentavam condições saudáveis. *Xanthidium sp.* apresentou valores abaixo do esperado durante as primeiras 192 h, atingindo seu rendimento máximo no último dia de experimento. Segundo Kromkamp e Peene (1999), a disponibilidade excessiva ou insuficiente de luz e/ou nutrientes pode acarretar em queda do rendimento quântico máximo.

Xanthidium sp. pode ter apresentado este comportamento devido a algum estresse luminoso nas primeiras horas de experimento. Como esta espécie tem crescimento lento, a alta incidência luminosa em cultivo pouco denso pode ter afetado sua fisiologia e, conforme houve o aumento na abundância celular, a luz incidida deixou de ser inibitória.

A partir das curvas de concentração de clorofila *a* foram calculadas as velocidades de crescimento (Tabela 6). Destas cinco espécies cultivadas, *R. subcapitala* e *S. spinosus* apresentaram as maiores taxas de replicação, no entanto, ainda inferiores às apresentadas por Picoplâncton 175, Picoplâncton 237, *M. pseudobraunii*, *C. pantanale* e *C. sorokiniana* mensuradas anteriormente.

Tabela 6 - Velocidades de crescimento obtidas a partir das curvas de concentração de clorofila *a* em meio BG11.

Velocidade de crescimento (dia ⁻¹)			
<i>H. reticulata</i>	0,62	Picoplâncton 175	1,19
<i>K. lunaris</i>	0,38	Picoplâncton 237	1,10
<i>R. subcapitala</i>	0,80	<i>A. densus</i>	0,25
<i>S. spinosus</i>	0,96	<i>M. pseudobraunii</i>	1,44
<i>Xanthidium sp.</i>	0,04	<i>C. sorokiniana</i>	1,30
		<i>C. pantanale</i>	1,25

5.2 – Desenvolvimento e aplicação do Fotobiorreator

O desenvolvimento de um FBR de iluminação interna em escala laboratorial teve como objetivo a produção de elevada biomassa para a prospecção de biomassa microalgal quanto à síntese de biomoléculas. Realizaram-se vários testes operacionais para validação do modelo de FBR proposto. Trata-se de um modelo ‘*bubble column*’ com capacidade máxima de 3 L em formato cilíndrico, iluminação interna por fitas de LED e aeração por compressores de ar atmosférico e CO₂ por meio de pedras porosas. Desta forma, manteve-se o cultivo homogêneo, com as células em circulação garantindo que todas fossem expostas à luz. De fácil manejo,

o FBR desenvolvido permite uma fácil regulação da intensidade luminosa, vazão de agitação e também admite a substituição das fitas de LED por cores específicas a qualquer momento durante o andamento do cultivo, conforme o interesse de produção.

O início dos testes no FBR que se desenvolveu foram testadas as microalgas *Chlorella sorokiniana*, *Curvastrum pantanale* e Picoplâncton 237 variando-se a intensidade luminosa incidida (figuras 9A, 10A e 11A) através de um regulador para isso projetado. Assim, conforme houve o aumento no número de células, a energia luminosa incidida também foi aumentada de forma que houvesse luz o suficiente para a realização da fotossíntese pelas células em todo o FBR.

Analisando o crescimento de *C. sorokiniana* (Figura 9B), o rendimento quântico máximo até o fim do experimento manteve-se em níveis considerados saudáveis, ou seja, não houve fotolimitação tampouco fotoinibição durante as 384 h e a fotossíntese ocorreu de forma eficiente. A velocidade de crescimento atingiu $1,12 \text{ dia}^{-1}$. Foram inoculadas no primeiro dia do experimento $1,30 \times 10^5 \text{ céls mL}^{-1}$ e após as 384 h o cultivo atingiu a ordem de $2,02 \times 10^8 \text{ células mL}^{-1}$. A biomassa final foi mensurada e atingiu $1,41 \text{ g L}^{-1}$ de biomassa seca, e $8,16 \text{ g L}^{-1}$ na pesagem da biomassa úmida.

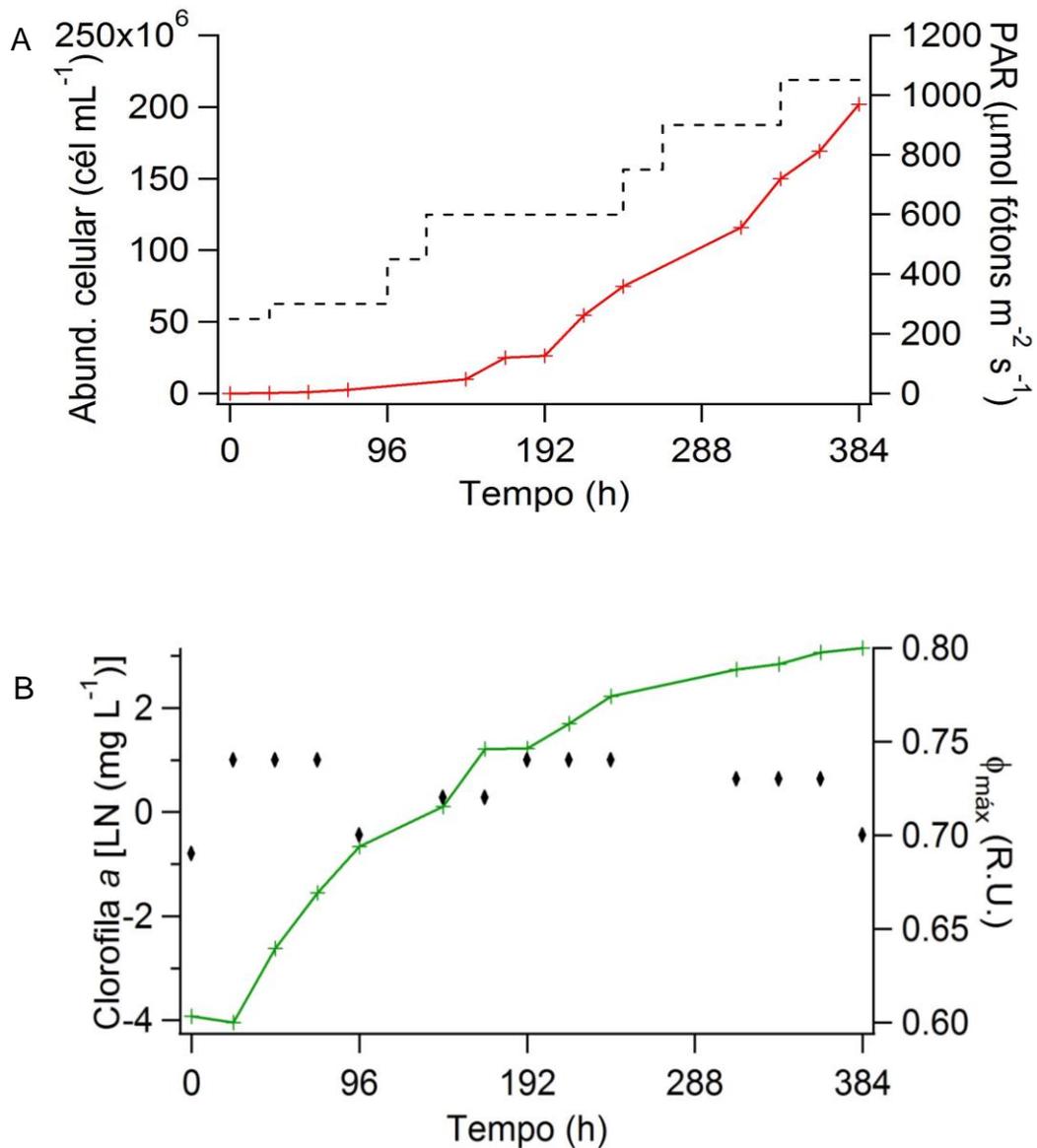


Figura 9 – Parâmetros do crescimento de *C. sorokiniana*. A: linha pontilhada indica a intensidade luminosa incidente e a linha contínua a concentração de células. B: rendimento quântico máximo (losangos) e a concentração de clorofila a (linha contínua).

No experimento com Picoplâncton 237 (Figura 10) foram inoculadas $1,30 \times 10^5$ células mL⁻¹ e, ao final haviam acumulado $1,20 \times 10^8$ células, mL⁻¹, revelando taxa máxima de crescimento (fase exponencial) de $1,51 \text{ dia}^{-1}$. Após centrifugação, pesou-se a biomassa úmida, que alcançou $6,67 \text{ g L}^{-1}$. Observando o gráfico, nota-se o estado fisiológico saudável das células durante todo o experimento, assim como também ocorreu com *C. sorokiniana* (figura 9 B).

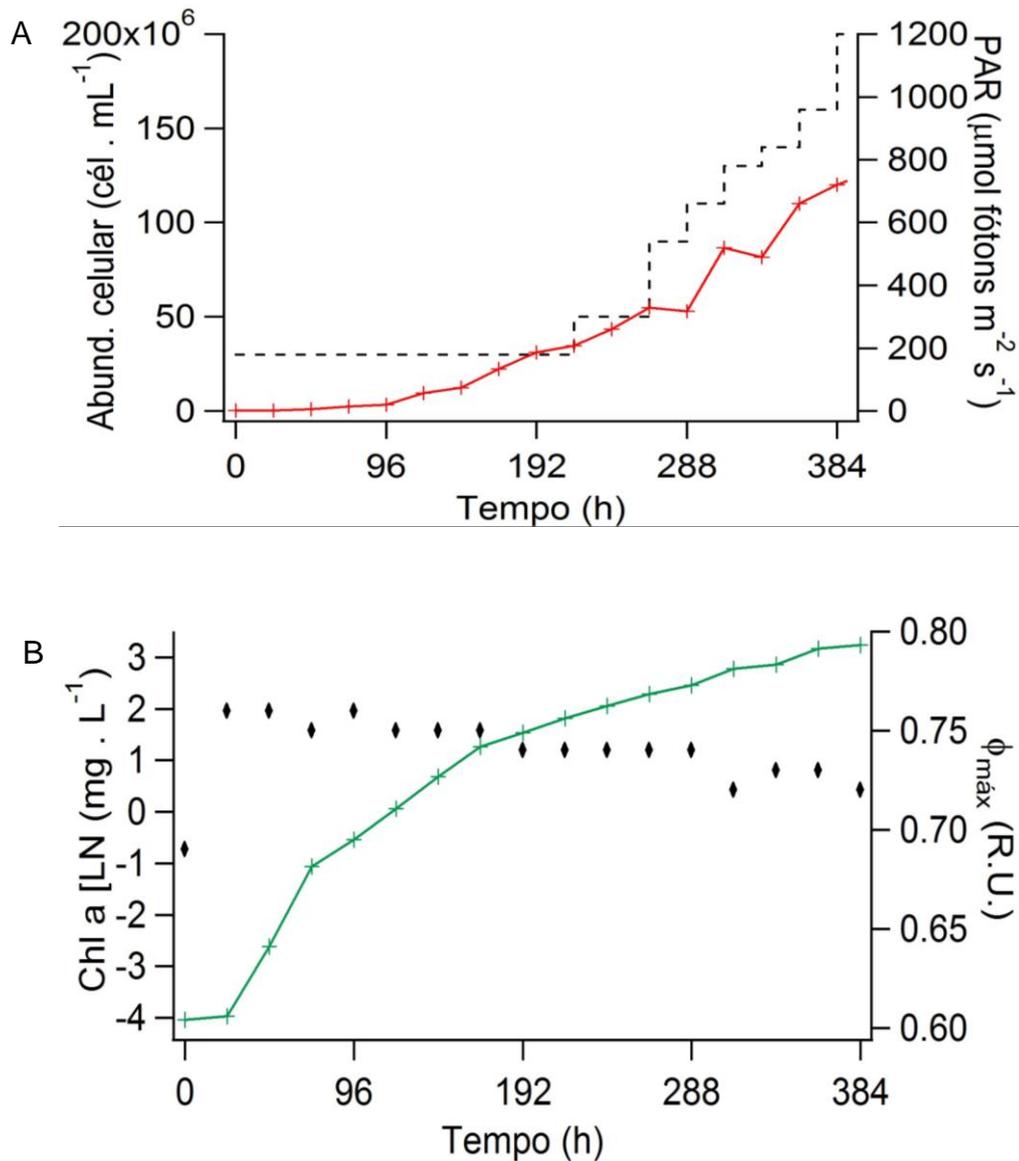


Figura 10 – Resultados do cultivo de Picoplâncton 237 no PBR proposto. A: linha pontilhada indica a intensidade luminosa e a linha contínua a concentração de células. B: rendimento quântico máximo (losangos) e a quantificação de clorofila a (linha contínua).

No teste com *Curvistrum pantanale* (figura 11), foram inoculados $1,12 \times 10^5$ células mL⁻¹ e após 384 h o cultivo continha cerca de $6,95 \times 10^7$ células mL⁻¹, e sua biomassa úmida 8,47 g L⁻¹. A velocidade máxima de crescimento foi de 0,35 dia⁻¹ e, segundo os dados de rendimento quântico máximo, as condições fisiológicas foram favoráveis durante todo o experimento.

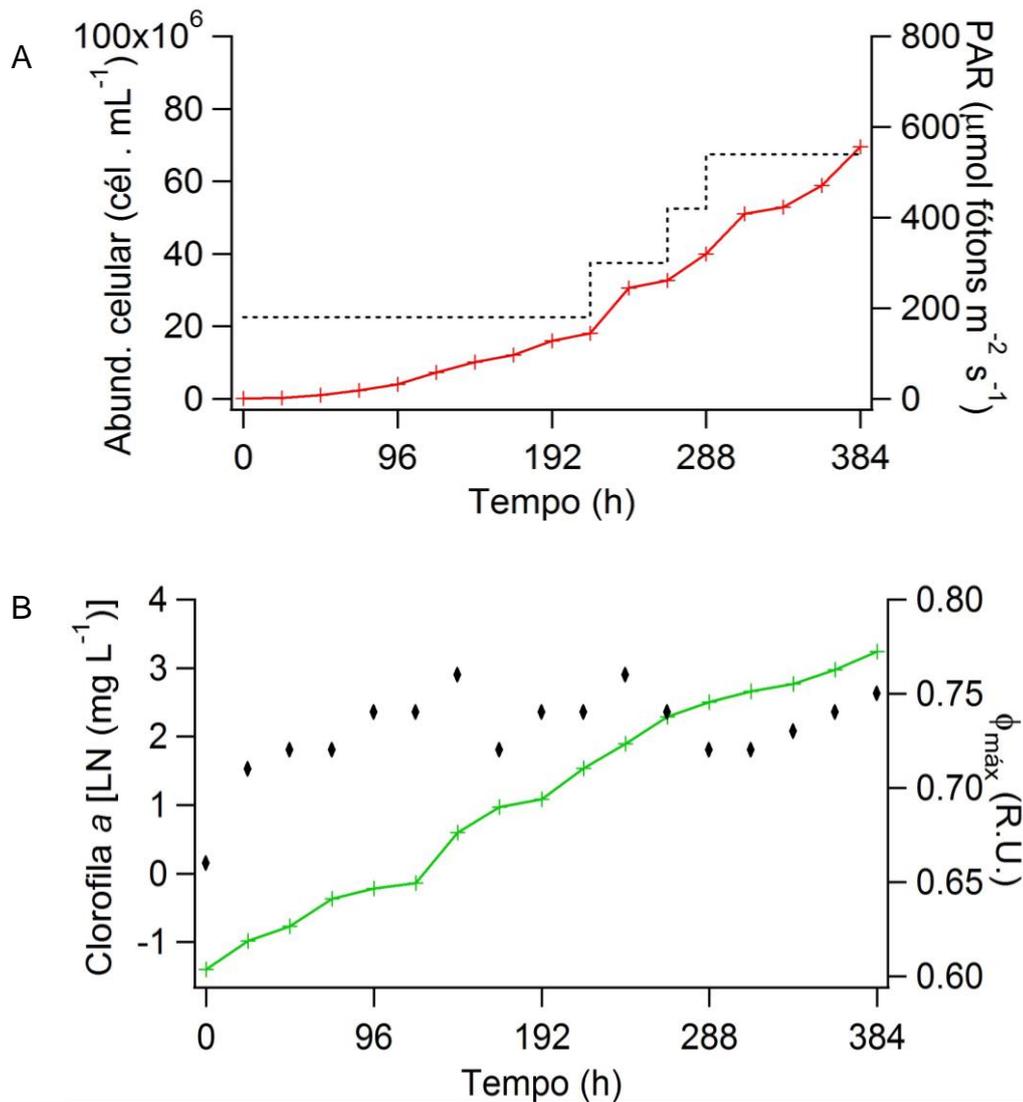


Figura 11 – Resultados do cultivo de *C. pantanale* no PBR proposto. Em A, a linha pontilhada indica a intensidade luminosa e a linha contínua a concentração de células. Em B, rendimento quântico máximo (losangos) e a quantificação de clorofila a (linha contínua).

Considera-se que o modelo de fotobiorreator proposto no presente estudo com base nos citados na literatura, possibilitou elevada densidade populacional, sendo possível ainda relatar alguns destaques positivos e exclusivos: material vítreo em borossilicato admite exposição a agentes físicos e químicos diversos; permite procedimentos de esterilização e lavagem; cultivo fechado livre de contaminações externas; regulação no fluxo de ar; regulação da intensidade luminosa; e fácil substituição de fitas LED por diferentes cores em qualquer período do cultivo conforme o produto almejado.

5.3.2 – Melhoria na concentração de células e nutrientes em *C. sorokiniana*

C. sorokiniana, é amplamente estudada em função de sua robustez. Dentre as principais vantagens em usar esta microalga estão seu rápido crescimento, capacidade de acumular alta concentração de biomassa, além de compostos como lipídios, pigmentos, proteínas e metabólitos secundários (Junttila et al., 2015). Visto sua alta velocidade de crescimento e plasticidade fisiológica, optou-se por utilizar *C. sorokiniana* como cepa-teste para o aprimoramento da produtividade de biomassa, pois observou-se uma estagnação de produção de células na ordem de 10^8 células mL^{-1} . Para tanto, a concentração de nutrientes no meio BG11 foi aumentada em duas e dez vezes, junto ao aumento na densidade inicial de células, que foi de $6,6 \times 10^7$ células mL^{-1} e intensidade luminosa incidente. Esses resultados são mostrados na Figura 12 e indicam que não houve diferença entre os tratamentos. Para BG11 – 1X a velocidade de crescimento foi $0,27 \text{ dia}^{-1}$ e a concentração final de células de $3,83 \times 10^8$ células mL^{-1} . No cultivo em BG11 – 2X a velocidade de crescimento foi $0,33 \text{ dia}^{-1}$ e acumulou $3,5 \times 10^8$ células mL^{-1} . Ao final das 144 h, o acúmulo de biomassa seca foi de $2,31 \text{ g L}^{-1}$ para BG11 – 1X e de $2,25 \text{ g L}^{-1}$ em BG11 – 2X.

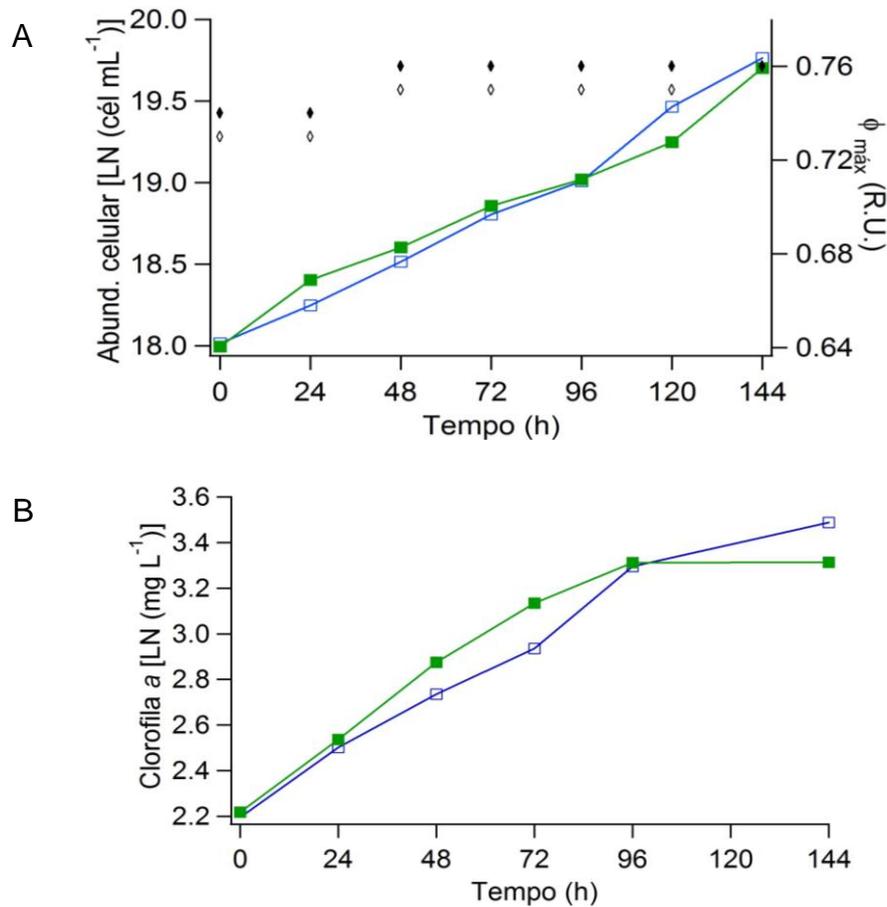


Figura 12 – Resultados dos cultivos de *C. sorokiniana* em BG11 convencional e BG11 concentrado duas vezes. Os símbolos □ e ■ representam a abundância celular (A), e concentração de clorofila *a* (B), respectivamente, para BG11 - 1X e BG11 - 2X. Em A, ◇ mostra o rendimento quântico máximo utilizando BG11 - 1X e ◆ utilizando BG11 - 2X.

No experimento com BG11 – 10x, os cultivos foram iniciados com $2,09 \times 10^8$ células mL⁻¹ e passadas 144 h observou-se o acúmulo de $4,05 \times 10^8$ células mL⁻¹ (Figura 13), correspondendo à velocidade de crescimento máxima de $0,40 \text{ dia}^{-1}$. Pesou-se diariamente a biomassa seca para aferição da produtividade média diária. No instante do inóculo haviam $4,69 \text{ g L}^{-1}$, atingindo no último dia de cultivo a marca de $6,87 \text{ g L}^{-1}$.

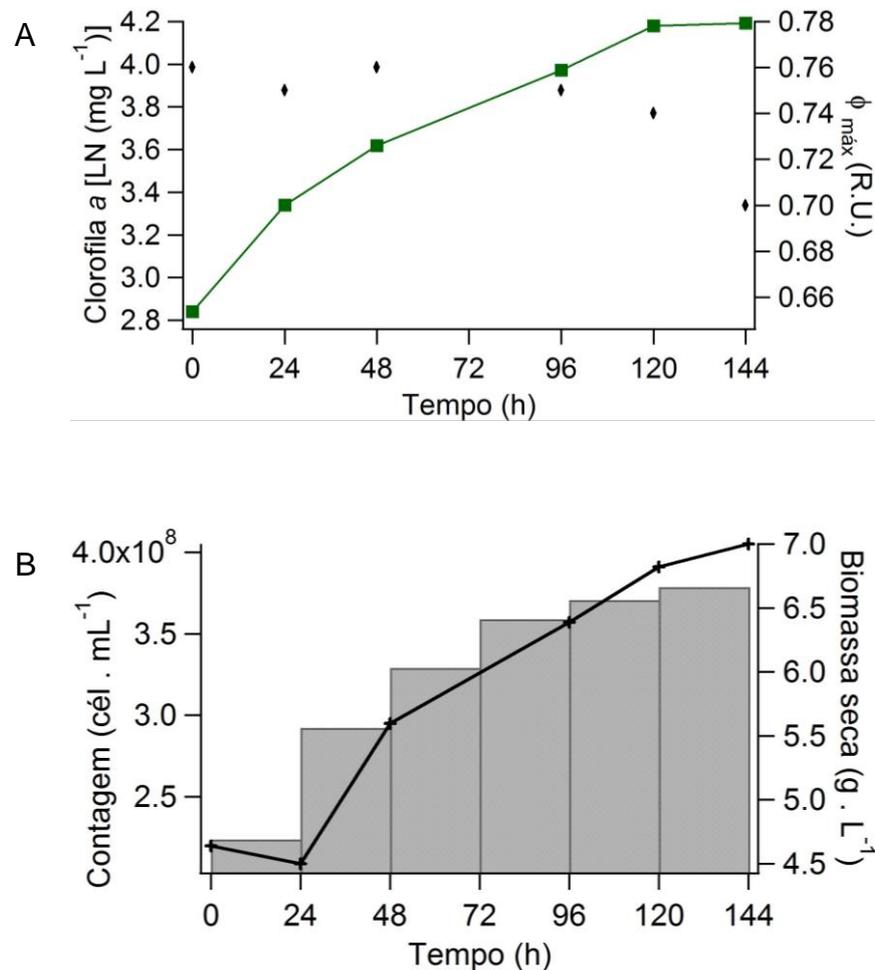


Figura 13 – Representação gráfica do crescimento de *C. sorokiniana* em meio de cultivo BG11 concentrado 10 vezes. Em A, os losangos mostram o rendimento quântico máximo e a linha contínua a concentração de clorofila *a*. Em B, a abundância celular (linha contínua) e biomassa seca (barras verticais).

Nota-se que os cultivos em BG11 – 1X, BG11 – 2X e BG11 – 10X atingiram a mesma ordem de 10^8 células mL^{-1} , entretanto, mesmo havendo a mesma concentração de células por mL^{-1} , verificou-se diferença considerando o peso da biomassa seca (Tabela 7). BG11 – 1X e BG11 – 2X tiveram massa próximas entre si, porém, para BG11 – 10X, a biomassa seca final foi três vezes maior. Isso sugere que houve maior disponibilidade de nutrientes no meio BG11 – 10X, o que permitiu que as células os absorvessem para uso metabólico, acumulando-se no conteúdo intracelular e tornando as células mais pesadas.

Tabela 7 - Comparação entre as diferentes concentrações de BG11, o número de células e a biomassa seca medida.

[BG11]	Células (mL ⁻¹)	Biomassa seca (g L ⁻¹)
1x	3,8 x 10 ⁸	2.31
2x	3.5 x 10 ⁸	2.25
10x	4.0 x 10 ⁸	6.87

A fim de comparar nossos resultados com os da literatura, serão considerados os resultados mensurados do cultivo em BG11 – 10X realizado no presente estudo (Tabela 8). A produtividade diária de um cultivo é a relação entre a biomassa seca final descontada a biomassa seca inicial em função do número de dias de cultivo. Com esta relação inferimos quanto aumentou a concentração de células no cultivo, sendo reportado em g L⁻¹ dia⁻¹. Neste estudo, tratando-se da produtividade em BG11 – 10X obtivemos 0,36 g L⁻¹ dia⁻¹ com incidência energética sob forma de luz de 2775,3 W m⁻³. Nossos resultados assemelham-se aos de Ryu et al. (2009), que em FBR vertical cilíndrico com capacidade de 600 mL atingiram 0,33 g L⁻¹ dia⁻¹ com *Chlorella sp.* utilizando lâmpadas fluorescentes externas com emissão de 1215,5 W m⁻³. Relativamente próximo, mas com menor rendimento, Hsieh e Wu (2009) desenvolveram um FBR modelo câmara retangular transparente dividido em quatro compartimentos que somados possuem 10,5 L de volume e incidência luminosa de 694,6 W m⁻³ com lâmpadas halógenas e tiveram produtividade de 0,30 g L⁻¹ dia⁻¹ em sistema semi-contínuo e posterior adição de metais traço. Chiu et al. (2008) em experimento com *Chlorella vulgaris* em sistema batelada, obteve produtividade diária de 0,50 g L⁻¹ dia⁻¹ em incidência luminosa (lâmpada fluorescente) de 5385,9 W m⁻³ com FBR *bubble column* de 800 mL. Resultados obtidos por Pegallapati et al. (2012) quando cultivada *Nannochloropsis salina* em fotobiorreator de coluna de bolhas de 18 L em sistema batelada obtiveram produtividade de 0,16 g L⁻¹ dia⁻¹ com 1157,3 W m⁻³ de incidência luminosa.

Em outro estudo, Pegallapati et al. (2011) desenvolveu o fotobiorreator de iluminação interna semelhante ao do presente estudo, no entanto a iluminação foi realizada por lâmpadas fluorescentes em sistema semi-contínuo. Nesse, os autores mostraram produtividade de $0,40 \text{ g L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ com *Scenedesmus sp.* cuja a emissão de energia luminosa foi de $276,4 \text{ W m}^{-3}$.

Tabela 8 – Performance dos diferentes fotobiorreatores. Ch: *Chlorella sp.*; No: *Nannochloropsis oculata*; Ns: *Nannochloropsis salina*; Ss: *Scenedesmus sp.*; Cv: *Chlorella vulgaris*; Cs: *Chlorella sorokiniana*.

Espécie	FBR	Fonte de iluminação	Área incidente (m ²)	PAR (μmol fótons m ⁻² s ⁻¹)	Potencial de iluminação (W m ⁻³)	Produt. diária (g L ⁻¹ dia ⁻¹)	Autor	$\frac{A_{inc}}{V}$ (m ² L ⁻¹)	$\frac{Produt.}{V}$ (g m ⁻² dia ⁻¹)
Ch	Cilíndrico 0,6 L	Fluorescente (externo)	0.03	100	1215.5	0.33	Ryu et al. (2009)	0,0500	6,6
No	Coluna de bolhas 0,8 L	Fluorescente (externo)	0.07	300	5385,9	0.42	Chiu et al. (2009)	0,0875	4,8
Ns	Coluna de bolhas 18,0 L	Fluorescente (externo)	0.06	79	1157.3	0.16	Pegallapati et al. (2012)	0,0033	48,0
Ss	FBR II* 18,0 L	Fluorescente (interno)	0.25	91,4	276.4	0.40	Pegallapati et al. (2012)	0,0139	28,8
Cv	Coluna de bolhas 0,8 L	Fluorescente (externo)	0.07	300	5385.9	0.50	Chiu et al. (2008)	0,0875	5,7
Cs	FBR II 3,0 L	LED (interno)	0.03	1200	2775.3	0.36	Presente estudo	0,0100	36,0

A área iluminada é outro fator considerado nos estudos. Essa área refere-se à porção do FBR que está diretamente exposta aos raios de luz. Hsieh e Wu (2009), Ryu et al. (2009) e Chiu et al. (2008), cuja iluminação do sistema foi externa ao reator, obtiveram variação da área iluminada de 0,03 a 0,07 m², intervalo dentro do modelo do presente trabalho, 0,0314 m². O modelo com iluminação interna proposto por Pegallapati et al. (2012) cuja área iluminada foi de 0,25 m², valor oito vezes maior ao do presente trabalho, não mostrou aumento proporcional na produtividade de biomassa. A maior produtividade obtida nos estudos citados foi de Chiu et al. (2008), cuja área iluminada foi de 0,07 m². A variação observada entre área iluminada e rendimento de biomassa sugere que há outros fatores contribuindo para

o rendimento, tais como velocidade de crescimento intrínseca da microalga e, eventualmente a disponibilidade de nutrientes, além dos volumes entre os trabalhos serem distintos. Para minimizar a influência do tamanho dos cultivos sobre sua produtividade, realizaram-se cálculos desconsiderando seu volume, conforme mostrado na Tabela 8. Ou seja, foi realizada a razão entre a área iluminada pelo volume de cultivo. O produto desta equação foi o denominador na divisão com a produtividade diária por litro calculada anteriormente, e assim temos a produtividade em relação a área iluminada ($\text{g m}^{-2} \text{ dia}^{-1}$). Desta forma, notamos que os cultivos realizados em pequenos volumes (0,6 e 0,8 L) apesar de terem apresentado produtividade diária satisfatória anteriormente, ao ser equalizado o volume com os demais trabalhos, notamos que estes apresentaram os menores rendimentos. Destaca-se então a dificuldade da escalabilidade dos fotobiorreatores, cujos cultivos menores são mais produtivos devido ao fácil controle das variáveis enquanto que em volumes maiores estes ajustes são dificultados.

A produtividade calculada após o rearranjo da equação mostra que FBR do presente estudo e de Pegallapati et al. (2012) apresentaram rendimentos melhores aos encontrados por Ryu et al. (2009), Chiu et al. (2009) e Chiu et al. (2008). Em modelo semelhante ao proposto neste estudo, Pegallapati et al. (2012) obtiveram rendimento de $28 \text{ g m}^{-2} \text{ dia}^{-1}$ cultivando *Scenedesmus* sp. em modelo semi-contínuo, enquanto que o FBR proposto neste estudo obteve $36 \text{ g m}^{-2} \text{ dia}^{-1}$ com *C. sorokiniana* em sistema batelada. Outro cultivo realizado por Pegallapati et al. (2012) com *Nannochloropsis salina* em reator cilíndrico de 18 L, obteve produtividade de $48 \text{ g m}^{-2} \text{ dia}^{-1}$.

Nota-se na literatura que tão diverso quanto os modelos de FBR existentes, são os resultados sobre a eficiência do sistema. O modelo desenvolvido no presente estudo rendeu mediana produtividade diária em comparação com os citados da literatura. A vantagem do modelo proposto neste trabalho é a utilização de lâmpadas LED acoplada ao controlador de potência. Deste modo, a incidência luminosa pode ser ajustada para que haja redução na energia (W m^{-3}) emitida ao FBR em baixa densidade algal.

Avaliando os resultados obtidos neste estudo com relatos na literatura quanto à área de incidência luminosa, o FBR proposto pode ainda ser ajustado com intuito

de render mais biomassa, no entanto, já apresenta resultados bastante expressivos quando observada sua vasta funcionalidade e fácil operação.

5.4 – Análise de Ácidos graxos em *Chlorella sorokiniana*, Picoplâncton 08 e *Curvastrum pantanale*

A composição de ácidos graxos das microalgas *Chlorella sorokiniana*, Picoplâncton 237 e *Curvastrum pantanale* é apresentada na Tabela 9.

Tabela 9 – Composição de ácidos graxos para as espécies *Chlorella sorokiniana*, *Picoplâncton 237* e *Curvastrum pantanale*. SFA: Ácidos graxos saturados; MFA: Ácidos graxos monoinsaturados; PFA: Ácidos graxos polinsaturados; UFA: Ácidos graxos insaturados totais (MFA + PFA).

Ácido graxo	<i>C. sorokiniana</i>	<i>C. pantanale</i>	Picoplâncton 237
C6:0	0.13 ± 0.02	-	-
C14:0	0.38 ± 0.04	0.42 ± 0.03	-
C16:2 ω 6	10.57 ± 0.57	2.50 ± 0.09	6.99±1.99
C16:3 ω 6	-	4.66 ± 0.25	-
C16:3 ω 3	6.26 ± 0.33	-	17.28±1.55
C16:4 ω 3	-	6.76 ± 0.22	-
C16:1 ω 7	-	1.15 ± 0.00	1.18±0.37
C16:1 ω 9	-	0.92 ± 0.21	0.79±0.23
C16:0	33.09 ± 1.10	29.38 ± 1.73	22.22±2.43
15-Me-C17:0	0.88 ± 0.02	-	1.73±0.51
C18:2 ω 6	30.66 ± 1.40	19.93 ± 1.01	16.05±1.64
C18:3 ω 3	16.09 ± 0.70	30.00 ± 1.66	32.58±3.00
C18:3 ω 6	-	0.88 ± 0.03	-
C18:4 ω 3	-	1.98 ± 0.08	-
C18:1 ω 7	0.59 ± 0.06	0.36 ± 0.06	0.76±0.14
C18:0	1.36 ± 0.17	0.75 ± 0.02	0.41±0.05
C24:0	-	0.20 ± 0.01	-
C26:0	-	0.13 ± 0.07	-
SFA	35.83 ± 1.36	30.88 ± 1.86	24.36 ± 2.98
MFA	0.59 ± 0.06	2.43 ± 0.27	2.73 ± 0.74
PFA	64.17 ± 2.99	66.71 ± 3.34	72.91 ± 8.18
UFA	64.76 ± 3.04	69.13 ± 3.61	75.64 ± 8.92

A quantidade relativa dos ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poli-insaturados totais foram somados e estão representados ao final da tabela 9 para cada espécie.

Para as três espécies avaliadas os ácidos graxos majoritariamente sintetizados foram o ácido 7,10-Hexadecadienoico (C16:2 ω 6), ácido palmítico (C16:0), ácido linoleico (C18:2 ω 6) e ácido alfa-linolênico (C18:3 ω 3), no entanto, em diferentes proporções. O ácido 7,10,13-Hexadecatrienoico (C16:4 ω 3) foi detectado somente em *C. pantanale*. No conteúdo das três espécies também foram produzidos mais ácidos graxos insaturados do que saturados numa proporção de aproximadamente 3:1, o que é um indicativo de saúde celular. A composição bioquímica das microalgas é influenciada por parâmetros ambientais relativos aos cultivos. Especificamente, os níveis lipídicos e graus de instauração dos ácidos graxos dependem da temperatura, nível de irradiância, salinidade e nutrientes (Berge et al., 1995). Sabe-se, por exemplo, que o aumento na saturação de ácidos graxos ocorre em situação de estresse fisiológico microalgal em exposição à metais (Chia et al., 2013).

No presente estudo, os teores de ácido palmítico contidos nas espécies analisadas foram de 33% em *C. sorokiniana*, 29% em *C. pantanale* e 22% na Picoplâncton 237, sendo este o ácido graxo saturado majoritário e de valores expressivos, uma vez que os demais SFA detectados (C6:0, C14:0, C18:0, C24:0 e C26:0) possuem teor menor que 1%. Renaud et al. (2002) mostraram que o aumento de 8°C na temperatura de cultivo de *Rhodomonas* sp. elevou a concentração dos seus SFA de 25% para 40%. Em cultivo com *Chlorella vulgaris*, o estudo de Petkov e Garcia (2007) determinou que o ácido palmítico estava contido em 26% do conteúdo total de ácidos graxos, também sendo o SFA majoritariamente sintetizado nesta cepa. Sabe-se que o ácido palmítico é o ácido graxo saturado mais comum, responsável por 20-30% do total de ácidos graxos no corpo humano, sendo fornecido pela dieta ou sintetizado endogenamente. Harris et al. (2007), em uma meta-análise de 25 estudos verificou que a ingestão de ácido linoleico foi inversamente associada ao risco de doença coronariana e que o ácido araquidônico não possui qualquer relação com esta enfermidade, ou seja, o maior consumo de ácido linoleico reduz os riscos de doenças cardiovasculares. Assim, as microalgas

podem ser potenciais contribuidoras à dieta humana visando-se ao equilíbrio de ácidos graxos.

O consumo de ácido graxo ômega-6 na dieta humana é ainda bastante discutido, mas estudos indicam que sua ingestão traz benefícios e reduz o risco de doenças coronarianas (Cassady et al., 2007; Harris et al., 2007). Salienta-se que a *European Commission* e a *Food and Agriculture Organization* sugerem o consumo de 4% a 8% de ácidos graxos ômega-6 em relação valor energético total da dieta, e as microalgas podem ser organismos promissores no fornecimento deste ácido graxo em dietas humanas. Seu principal representante é o ácido linoleico (C18:2 ω -6) que não é sintetizado em seres humanos e por isso é necessária sua ingestão. Neste estudo, o conteúdo de ácido linoleico representa 31% do conteúdo total de ácidos graxos de *C. sorokiniana*, 20% em *C. pantanale* e 16% em Picoplâncton 237. Petkov e Garcia (2007), apesar de não especificarem a posição de instauração, relataram que 24% de C18:2 foi produzido por *Chlorella vulgaris*.

O ácido graxo ômega-3 é a outra classe de ácidos graxos essenciais que o ser humano é incapaz de sintetizar sendo portanto, necessária sua obtenção pela dieta. O ácido alfa-linolênico (AAL), com cadeia de 18 carbonos e três insaturações é o ômega-3 mais abundante na dieta, sendo facilmente obtido em óleos vegetais como da linhaça, canola ou soja. Nas microalgas *C. sorokiniana*, *C. pantanale* e Picoplâncton 237, este ácido graxo compõe 16%, 30% e 33% respectivamente, o conteúdo total de ácidos graxos detectados. Petkov e Garcia (2007), detectaram 20% de ácido alfa-linolênico em seus estudos com *Chlorella vulgaris* e 17% quando submetida a alga a privação de nitrogênio.

Spijkerman e Wacker (2011), em estudo com estresse químico em microalgas verdes mostrou significativo aumento no teor de ácidos graxos ω -3 quando expostas a quantidades suficientes de fosfato, enquanto que, em condições baixas deste nutriente, houve um aumento de ácidos graxos saturados e monoinsaturados (Chia et al., 2013). O estresse físico submetido às espécies *Rhodomonas* sp., *Cryptomonas* sp. e do gênero Prymnesiophyte quando expostas a um aumento de temperatura de cultivo levou a maior síntese de ácidos graxos saturados e monoinsaturados, enquanto que quando cultivadas em sua temperatura ótima, estas espécies apresentaram até 19% maior teor de PFA (Renaud et al., 2002).

O teor de ácidos graxos poli-insaturados totais detectados neste estudo foram de 64% em *C. sorokiniana*, 67% em *C. pantanale* e 73% em Picoplâncton 237, demonstrando que a concentração de saturações e monoinsaturações é minoritária, o que pode indicar que não houveram estresses físico-químicos (Berge et al., 1995; Chia et al., 2013) ao serem cultivados no fotobiorreator proposto neste trabalho.

5.5 – Análise dos compostos orgânicos voláteis em *Chlorella sorokiniana*, Picoplâncton 08 e *Curvastrum pantanale*

Quanto aos COVs analisados, o composto expressivamente identificado nas três espécies analisadas foi o Hexanal (Tabela 10), compondo 54% do conteúdo volátil de *Chlorella sorokiniana* e 31% em Picoplâncton 237. Este composto, conforme citado anteriormente, está diretamente relacionado a auto-oxidação de ácido linoleico, tendo como produto o hexanal. Já a acetona, presente em 21% dos COVs totais de *Curvastrum pantanale*, também é produto decomposição de ácidos graxos poli-insaturados. Além destes, o éter metil vinil também é produzido em altas proporções por *C. sorokiniana* (11%) e Picoplâncton 237 (34%), além do etanol produzido por *C. pantanale*.

Tabela 10 – Composição relativa (%) dos compostos orgânicos voláteis detectados em *Chlorella sorokiniana*, *Curvastrum pantanale* e Picoplâncton 237.

VOCs	<i>Chlorella sorokiniana</i>	<i>Curvastrum pantanale</i>	Picoplâncton 237
Etanol	4.66 ± 1.06	25.32 ± 2.35	-
Metil vinil éter	10.78 ± 0.73	-	33.99 ± 3.62
Acetona	-	21.13 ± 3.45	-
Isobutiraldeído	-	5.54 ± 1.32	-
Ácido acético	6.01 ± 0.24	6.18 ± 3.37	-
Isovaleraldeído	1.41 ± 0.28	7.16 ± 0.65	5.68 ± 0.72
Butiraldeído	-	3.15 ± 0.08	-
Etil vinil carbinol	2.43 ± 0.21	5.78 ± 0.50	5.50 ± 0.47
Valeraldeído	6.31 ± 0.31	5.37 ± 2.47	2.32 ± 0.77
1-Pentanol	2.40 ± 0.18	2.22 ± 0.14	2.10 ± 0.23
2-Penten-1-ol (Z)	0.40 ± 0.07	-	-
Hexanal	54.91 ± 3.18	8.13 ± 0.83	31.05 ± 1.32
2-Hexenal	1.30 ± 0.44	-	-
9-Octadeceno	-	-	4.55 ± 2.33
2-Heptanona	1.08 ± 0.24	-	-
Furan-2-pentil	3.88 ± 0.68	5.90 ± 1.11	-
Heptadecano	4.44 ± 0.91	4.12 ± 0.22	14.81 ± 2.91

Estes compostos podem ser úteis em diversas aplicações comerciais, gerando produtos manufaturados a partir de moléculas de origem vegetal renovável. Como exemplo, Kumar et al. (2018) aplicou o hexanal em cultivos de nectarinas antes de sua colheita e verificou que, apesar de ser um fruto climatérico, a nectarina tratada resistiu a mudanças na temperatura, retardando a incidência de lesões por frio e ainda manteve os frutos mais firmes que os não tratados por até 38 dias.

As microalgas são ricas fontes de carboidratos, tanto estruturais quanto de reserva como celulose e amido e esses polissacarídeos são de grande interesse industrial para produção de bioetanol. No entanto, o processo convencional para a geração do etanol envolve reações de sacarificação e fermentação (Matsumoto et al., 2003), etapas demoradas e custosas. Na tentativa de eliminar estas etapas,

busca-se a modificação genética de cepas para que produzam o etanol diretamente a partir de seu metabolismo (John et al., 2011), eliminando etapas no processamento do carboidrato. A cepa de *C. pantanale* analisada no presente estudo apresentou em sua composição volátil 25% de etanol e *C. sorokiniana*, 5%. Ambas devem receber atenção especial, uma vez que, mesmo sem passarem por transformações gênicas controladas, estas cepas ou são produtoras naturais de etanol ou sofreram alguma mutação genética ocasional e podem ser candidatas promissoras na área da bioenergia.

7. CONCLUSÃO

O meio de cultura BG11 mostrou-se mais promissor e permitiu maior densidade de biomassa em cultivos batelada mais prolongados em comparação ao meio WC.

Desenvolveu-se nesta pesquisa um fotobiorreator versátil e que resulta em culturas de microalgas com alta produtividade; permite ainda o cultivo de diferentes espécies de microalgas. Pela razão SFA:UFA demonstramos que o fotobiorreator proposto resulta em microalgas saudáveis.

Quanto ao potencial biotecnológico relacionado à síntese de biomoléculas, todas as microalgas investigadas nesta pesquisa produziram ácidos graxos saturados e também insaturados. *C. sorokiniana*, *C. pantanale* e Picoplâncton 237 apresentaram majoritariamente ácidos graxos com cadeias poli-insaturadas, características de cultivos não estressados fisiologicamente.

Quanto à produção de compostos orgânicos voláteis, *C. pantanale* apresentou em sua composição volátil 25% de etanol e torna-se por isso uma cepa promissora na área da bioenergia.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSEN, R. A. **Algal Culturing Techniques**. 2006. USA: Elsevier Academic Press.

ANTONIOSI-FILHO, N. R. **Análise de óleos e gorduras vegetais utilizando métodos cromatográficos de alta resolução e métodos computacionais**. 1995. 339 p. Tese de Doutorado. Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo.

AZARBAD, M. H.; JELEN, H. **Determination of Hexanal—an Indicator of Lipid Oxidation by Static Headspace Gas Chromatography (SHS-GC) in Fat-Rich Food Matrices**. Food Analytical Methods. 2015. V.8, 1727-1733 p. DOI: 10.1007/s12161-014-0043-0.

BATE N. J. et al. **Molecular characterization of an Arabidopsis gene encoding hydroperoxide lyase, a cytochrome P-450 that is wound inducible**. Plant Physiology. 1998. v.117, 1393-1400 p. DOI: 10.1104/pp.117.4.1393.

BENEDETTI, S.; BENVENUTI, F.; PAGLIARANI, S.; FRANCOGLI, S.; SCOGLIO, S.; CANESTRARI, F. **Antioxidant properties of a novel phycocyanin extract from the bluegreen alga Aphanizomenon flos-aquae**. Life Sciences. 2004. v.75, 2353–2362 p. DOI: 10.1016/j.lfs.2004.06.004

BERGE, J. P.; GOUYGOU, J. P.; DUBACQ, J. P.; DURAND, P. **Reassessment of lipid composition of the diatom Skeletonerna costatum**. Phytochemistry. 1995. v.39, 1017-1021 p. DOI: 10.1016/0031-9422(94)00156-N.

BOROWITZKA, M.A. **High-value products from microalgae—their development and commercialisation**. Journal of Applied Phycology. 2013. v.25, 743-756 p. DOI: 10.1007/s10811-013-9983-9

BURDGE, G. C.; JONES, A. E.; WOOTTON, S. A. **Eicosapentaenoic and docosapentaenoic acids are the principal products of alpha-linolenic acid metabolism in young men**. British Journal of Nutrition. 2002. v.88(4), 355-363 p.

CAMPBELL, M. K.; FARREL, O. S. **Biochemistry**. 11. ed. Florence, KY: Cengage Learning, 2006.

CAPRA, V. et al. **Eicosanoids and Their Drugs in Cardiovascular Diseases: Focus on Atherosclerosis and Stroke**. Medicinal Research Reviews. 2013. v.33, 364-438 p. DOI: 10.1002/med.21251

CARTA, G.; MURRU, E.; BANNI, S.; MANCA, C. **Palmitic Acid: Physiological Role, Metabolism and Nutritional Implications**. Frontiers in Physiology. 2017. v.8, 902 p. DOI:10.3389/fphys.2017.00902.

CARVALHO, A.P.; SILVA S.O.; BAPTISTA, J.M.; MALCATA, F.X. **Light requirements in microalgal photobioreactors: an overview of biophotonic aspects**. Applied Microbiology and Biotechnology. 2011. 1275-88 p. DOI: 10.1007/s00253-010-3047-8.

CASSADY, B. A. et al. **Effects of low carbohydrate diets high in red meats or poultry, fish and shellfish on plasma lipids and weight loss**. Nutrition & Metabolism. 2007. V.4, 23 p. DOI:10.1186/1743-7075-4-23.

CHEN, C-Y. *et al.* **Engineering strategies for enhancing the production of eicosapentaenoic acid (EPA) from an isolated microalga *Nannochloropsis oceanica* CY2**. Bioresource Technology. 2013. V.147, 160-167 p. DOI: 10.1016/j.biortech.2013.08.051

CHIA, M. A.; LOMBARDI, A. T.; MELAO, M. D. G. G.; PARRISH, C. C. **Lipid composition of *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae) as a function of different cadmium and phosphate concentrations**. Aquatic Toxicology. 2013. v.128, 171-182 p. DOI: 10.1016/j.aquatox.2012.12.004.

CHIA, M. A.; LOMBARDI, A.T.; MELAO, M.D.G.G.; PARRISH, C.C. **Combined nitrogen limitation and cadmium stress stimulate total carbohydrates, lipids, protein and amino acid accumulation in *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae)**. Aquatic Toxicology. 2015. v.160, 87-95 p. DOI: 10.1016/j.aquatox.2015.01.002

CHIA, M.A.; LOMBARDI, A.T.; MELAO, M.D.G.G. **Growth and biochemical composition of *Chlorella vulgaris* in different growth media**. Anais da Academia

Brasileira de Ciencias. 2013. v.85, 1427-1438 p. DOI: 10.1590/0001-3765201393312.

CHIU, S-Y.; KAO, C-Y.; CHEN, C-H.; KUAN, T-C.; ONG, S-C.; LIN, C-S. **Reduction of CO₂ by a high-density culture of *Chlorella sp.* in a semicontinuous photobioreactor.** Bioresource Technology. 2008. v.99, 3389–3396 p. DOI: 10.1016/j.biortech.2007.08.013

CUMASHI, A.; USHAKOVA, N.A.; PREOBARZHENSKAYA, M.E.; D'INCECCO, A.; PICOLLI, A.; TOTANI, L.; TINARI, N.; MOROZEVICH, G.E.; BERMAN, A.E.; BILAN, M.I.; et al. **A comparative study of the anti-inflammatory, anticoagulant, antiangiogenic, and antiadhesive activities of nine different fucoidans from brown seaweeds.** Glycobiology. 2007. v.5, 541–552 p. DOI: 10.1093/glycob/cwm014

DAS, P. *et al.* **Enhanced algae growth in both phototrophic and mixotrophic culture under blue light** Bioresource Technology. 2011. v.102, 3883-3887 p. DOI: 10.1016/j.biortech.2010.11.102

DOUCHA, J.; LIVANSKY, K. **Novel outdoor thin-layer high density microalgal culture system: Productivity and operational parameters.** Algolog Studies. 1995. V.76, 129-147 p.

ELISIA, I.; KITTS, D. D. **Quantification of hexanal as an index of lipid oxidation in human milk and association with antioxidant components.** Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition. 2011. v.49(3), 147-152 p. DOI:10.3164/jcbtn.10-142.

FEDOROV, S.N., et al. **Anticancer and Cancer Preventive Properties of Marine Polysaccharides: Some Results and Prospects.** Marine Drugs. 2013. v.11, 4876-4901 p. DOI: 10.3390/md11124876

FORSYTHE, C. E. et al. **Comparison of low fat and low carbohydrate diets on circulating fatty acid composition and markers of inflammation.** Lipids. 2008. v.43(1), 65-77 p. DOI: 10.1007/s11745-007-3132-7

GIDDING, S. S. et al. **Implementing American Heart Association pediatric and adult nutrition guidelines: a scientific statement from the American Heart**

Association nutrition Committee of Council on Nutrition, Physical Activity and Metabolism, Council on Cardiovascular Disease in the Young, Council on Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology, Council on Cardiovascular Nursing, Council on Epidemiology and Prevention, and Council for High Blood Pressure Research. *Circulation*. 2009. v.119, 1161-1175 p. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.191856

GRAHAM, L. E.; GRAHAM, J. M.; WILCOX, L. W. **Algae**. 2 ed. Pearson Benjamin Cummings. 2009.

GUILLARD, R. R. L. **Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. Culture of Marine invertebrates Animals.** Smith, W. L. & Chanley, M. H., eds. Plenum Publishing. 1975. 29-60 p. DOI: 10.1007/978-1-4615-8714-9_3

GUILLARD, R. R. L.; LORENZEN, C. J. **Yellow Green algae with chlorophyllid-c.** *Journal of Phycology*, 1972. v.8, 10-14 p. DOI: 10.1111/j.1529-8817.1972.tb03995.x

HARRIS, W. S. et al. **Omega-6 Fatty Acids and Risk for Cardiovascular Disease.** *Circulation*. 2009. V.119, 902-907 p. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.191627

HARRIS, W. S.; POSTON, W. C.; HADDOCK, C. K. **Tissue n-3 and n-6 fatty acids and risk for coronary heart disease events.** *Atherosclerosis*. 2007. V.193, 1-10 p. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2007.03.018

HSIEH, C.H.; WU, W.T. **A novel photobioreactor with transparent rectangular chambers for cultivation of microalgae.** *Biochemical Engineering Journal*. 2009. v.46, 300–305 p. DOI: 10.1016/j.bej.2009.06.004

HULLAT, C.J.; THOMAS, D.N. **Productivity, carbon dioxide uptake and net energy return of microalgal bubble column photobioreactors.** *Bioresource Technology*. 2011. v.102, 5775-87 p. DOI: 10.1016/j.biortech.2011.02.025

ISSO, H. et al. **Linoleic acid, other fatty acids, and the risk of stroke.** *Stroke*. 2002. v.33, 2086–2093 p. DOI: 10.1161/01.STR.0000023890.25066.50

JEZBEROVÁ, J.; KOMÁRKOVÁ, J. **Morphological transformation in a freshwater *Cyanobium* sp. induced by grazers.** Environmental Microbiology. 2007. v.9, 1858–1862 p. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2007.01311.x

JEZBEROVÁ, J.; KOMÁRKOVÁ, J. **Morphometry and growth of three *Synechococcus*-like picoplanktic cyanobacteria at different culture conditions.** Hydrobiologia. 2007. v.578, 17–27 p. DOI 10.1007/s10750-006-0429-0

JOHN, R. P.; ANISHA, G. S.; NAMPOOTHIRI, K. M.; PANDEY, A. **Micro and macroalgal biomass: a renewable source for bioethanol.** Bioresource Technology. 2011. V.102(1), 186–193 p. DOI: 10.1016/j.biortech.2010.06.139

JUNTILA, D.J.; BAUTISTA, M.A.; MONOTILLA, W. **Biomass and lipid production of a local isolate *Chlorella sorokiniana* under mixotrophic growth conditions.** Bioresource Technology. 2015. v.191, 395-398 p. DOI: 10.1016/j.biortech.2015.03.098

KATSUDA, T. *et al.* **Astaxanthin production by *Haematococcus pluvialis* under illumination with LEDs.** Enzyme and Microbial Technology. 2004. v.35, 81-86 p. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2004.03.016

KHOO, C. G.; LAM, M. K.; LEE, K. T. **Pilot-scale semi-continuous cultivation of microalgae *Chlorella vulgaris* in bubble column photobioreactor (BC-PBR): hydrodynamics and gas–liquid mass transfer study.** Algal Research. 2016. v.15, 65–76 p. DOI: doi.org/10.1016/j.algal.2016.02.001

KROMKAMP, J; PEENE, J. **Aquatic Ecology.** 1999. 101 p. DOI: 10.1023/A:1009900124650

LAHAYE, M.; ROBIC, A. **Structure and Functional Properties of Ulvan, a Polysaccharide from Green Seaweeds.** Biomacromolecules. 2007. v.8, 1765–1774 p. DOI: 10.1021/bm061185q

LENIHAN-GEELS, G.; BISHOP, K. S.; FERGUSON, L. R. **Alternative sources of omega-3 fats: can we find a sustainable substitute for fish?** Nutrients. 2013 v.5(4), 1301– 1315 p. DOI: 10.3390/nu5041301.

LOMBARDI, A.T.; MALDONADO, M.T. **The effects of cooper on the photosynthetic response of *Phaeocystis cordata***. *Photosynthesis Research*. 2011. v.108, 77-87 p. DOI: 10.1007/s11120-011-9655-z

MATSUMOTO, M.; YOKOUCHI, H.; SUZUKI, N.; OHATA, H.; MATSUNAGA, T. **Saccharification of marine microalgae using marine bacteria for ethanol production**. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2003. v.105–108, 247–254 p.

MENEZES, R.S. et al. **Culture medium influence on growth, fatty acid, and pigment composition of *Choricystis minor* var. *minor*: a suitable microalga for biodiesel production**. *Journal of Applied Phycology*. 2016. v.28, 2679-2686 p. DOI: 10.1007/s10811-016-0828-1

MERCCHERI, F.S. **Diversidade e possíveis aplicações quimi taxonômicas dos polissacarídeos extracelulares de microalgas verdes cocoides**. 2016. Tese de Doutorado pelo Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais da Universidade Federal de São Carlos.

MORAIS, M. G. de; COSTA, J. A. V. **Perfil de ácidos graxos de microalgas cultivadas com dióxido de carbono**. *Ciência e Agrotecnologia*. 2008. v.32(4), 1245-1251 p. DOI: 10.1590/S1413-70542008000400032.

MOZAFFARIAN, D.; WILSON, P. W.; KANNEL, W. B. **Beyond established and novel risk factors for cardiovascular disease**. *Circulation*. 2008 v.117, 3031-3038 p. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.107.738732

MUTTER, S.T. et al. **Conformational dynamics carbohydrates: Raman optical activity of D-glucuronic acid and N-acetyl-D-glucosamine using a combined molecular dynamic and quantum chemical approach**. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2015. v.17, 6016-6027 p. DOI: 10.1039/C4CP05517A

PARK, K-H.; LEE, C-G. **Optimization of Algal Photobioreactors Using Flashing Lights**. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 2000. v.5, 186-190 p. DOI: 10.1007/BF02936592

PEGALLAPATI, A.K.; NIRMALAKHANDAN, N. **Energetic evaluation of an internally illuminated photobioreactor for algal production.** Biotechnology Letters. 2011. v.33, 2161-2167 p. DOI: 10.1007/s10529-011-0691-8

PEGALLAPATI, A.K; ARUDCHELVAM, Y.; NIRMALAKHANDAN, N. **Energy-efficient photobioreactor configuration for algal biomass production.** Bioresource Technology. 2012. v.126, 266-273 p. DOI: 10.1016/j.biortech.2012.08.090

PERINI, J. A. L. et al. **Ácidos graxos poli-insaturados n-3 e n-6: metabolismo em mamíferos e resposta imune.** Revista Nutrição. 2010. v.23(6), 1075-1086 p. DOI: 10.1590/s1415-52732010000600013.

PETKOV, G.; GARCIA, G. **Which are fatty acid of the green alga Chlorella?** Biochemical Systematics and Ecology. 2007. v.35, 281-285 p. DOI: 10.1016/j.bse.2006.10.017

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHORN, S. E. **Biologia Vegetal.** Editora Guanabara Koogan. 2007. 7 ed.

RENAUD, S. M.; THINH, L.; LAMBRINIDIS, G.; PARRY, D. L. **Effect of temperature on growth, chemical composition and fatty acid composition of tropical Australian microalgae grown in batch cultures.** Aquaculture. 2002. v.211, 195-214 p. DOI: 10.1016/S0044-8486(01)00875-4.

REYNTJENS, W. G. S.; GOETHALS, E. J. **Controlled cationic polymerization of methyl vinyl ether with a semi-continuous process.** Designed Monomers and Polymers. 2001. v.4(2), 195-201 p. DOI: 10.1163/156855500300203403

RIPKA, R.; DERUELLES, J.; WATERBURY, J.B.; HERDMAN, M.; STAINER, R.Y. **Generic assignment, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria.** Journal of General Microbiology. 1979. v.111, 1-61 p. DOI: 10.1099/00221287-111-1-1

RYU, H. J.; OH, K. K.; KIM, Y. S. **Optimization of the influential factors for the improvement of CO₂ utilization efficiency and CO₂ mass transfer rate.** Journal

of Industrial and Engineering Chemistry. 2009 v.15, 471–475 p. DOI: 10.1016/j.jiec.2008.12.012.

SILVA, M. L. C. et al. **Caracterização química de glucanasfúngicas e suas aplicações biotecnológicas.** Quimica Nova. 2005. v.29, 85-92 p. DOI: 10.1590/S0100-40422006000100017

SIMOPOULOS, A. P. **Essential fatty acids in health and chronic disease.** Am J Clin Nutr. 1999. v.70, 560-569 p.

SIRI-TARINO, P. W.; SUN, Q.; HU, F. B.; KRAUSS, R. M. **Meta-analysis of prospective cohort studies evaluating the association of saturated fat with cardiovascular disease.** The American Journal of Clinical Nutrition. 2010. v.91, 535-546 p. DOI: 10.3945/ajcn.2009.27725

SOBCZUK, T. M.; CHISTI, Y. **Potential fuel oils from the microalga *Choricystis minor*.** Journal of Chemical Technology and Biotechnology. 2010. v.85, 100-108 p. DOI: 10.1002/jctb.2272

SOMPECH, K.; CHISTI, Y.; SRINOPHAKUN, T. **Design of raceway ponds for producing microalgae.** Biofuels. 2012. v.3, 387-397 p. DOI: 10.4155/bfs.12.39

SPIJKERMAN, E.; WACKER, A. **Interactions between P-limitation and different C conditions on the fatty acid composition of an extremophile microalga.** Extremophiles. 2011. V.15, 597–609 p. DOI: 10.1007/s00792-011-0390-3.

SPOLAOREA, P. et al. **Commercial applications of microalgae.** Journal of Bioscience and Bioengineering. 2006. v.101, 87–96 p. DOI: 10.1263/jbb.101.87

STOLZ, P.; OBEMAYER, B. **Manufacturing microalgae for skin care.** Cosmetics & Toiletries. 2005. v.120, 99–106 p.

THOMAS, N. V.; KIM, S. K. **Beneficial effects of marine algal compounds in cosmeceuticals.** Marine Drugs. 2013. v.11, 146–164 p. DOI: 10.3390/md11010146

VOLEK, J. S. et al. **Carbohydrate restriction has a more favorable impact on the metabolic syndrome than a low fat diet.** Lipids. 2009. v.44(4), 297-309 p. DOI: 10.1007/s11745-008-3274-2

VONSHAK, A. **Spirulina platensis (Arthrospira) physiology, cell-biology and biotechnology.** Taylor & Francis. 1997. 233 p.

WATSON, S. B. **Aquatic taste and odor: a primary signal of drinking-water integrity.** Journal of Toxicology and Environmental Health. 2004. v.67, 20-22 p, 1779-1795 p. DOI: 10.1080/15287390490492377

WOLFE, M. S.; PARKS, J. S.; MORGAN, T. M.; RUDEL, L. L. **Childhood consumption of dietary polyunsaturated fat lowers risk for coronary artery atherosclerosis in African green monkeys.** Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology. 1993. v.13, 863–875 p.

ZARROUK, C; **Contribution à l'étude d'une cyanophycée. Influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthèse de Spirulina maxima.** Setch. Et Gardner. Geitler. 1966.

ZHANG, Z. et al. **Extraction of the polysaccharides from five algae and their potential antioxidant activity in vitro.** Carbohydrate Polymers. 2010. v.82, 118-121 p. DOI: 10.1016/j.carbpol.2010.04.031