



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA - UFPB
CENTRO DE TECNOLOGIA – CT
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA CIVIL E AMBIENTAL

LUÍS CELSO CARDOSO DE PINA

**AVALIAÇÃO DE UM SISTEMA DE CULTIVO MISTO DE FOTOBIORREATORES
PARA PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE MICROALGAS EM MEIOS DE CULTURA
ALTERNATIVOS**

JOÃO PESSOA – PB

2019

LUÍS CELSO CARDOSO DE PINA

**AVALIAÇÃO DE UM SISTEMA DE CULTIVO MISTO DE FOTOBIORREACTORES
PARA PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE MICROALGAS EM MEIOS DE CULTURA
ALTERNATIVOS**

Monografia apresentada ao curso de Engenharia Ambiental da Universidade Federal da Paraíba como requisito básico para o título de BACHAREL EM ENGENHARIA AMBIENTAL.

Orientador: Prof. Dr. Darlan Azevedo Pereira.

JOÃO PESSOA – PB

2019

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

P646a Pina, Luis Celso Cardoso de.
avaliação de um sistema de cultivo em fotobiorreatores
para produção de biomassa de microalgas / Luis Celso
Cardoso de Pina. - João Pessoa, 2019.
52 f. : il.

Orientação: Darlan Azevedo Pereira.
Monografia (Graduação) - UFPB/CT.

1. Efluentes. 2. Cultura em massa. 3. Tubular vertical.
4. Fotossíntese. I. Pereira, Darlan Azevedo. II. Título.

UFPB/BC

FOLHA DE APROVAÇÃO

LUÍS CELSÓ CARDOSO DE PINA

**AVALIAÇÃO DE UM SISTEMA DE CULTIVO EM FOTOBIOREATORES PARA
PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE MICROALGAS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado em 06/05/2019 perante a seguinte Comissão Julgadora:

Prof. Dr. DARLAN AZEVEDO PEREIRA



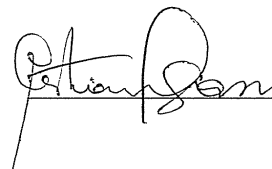
Departamento de Engenharia de Produção do CT/UFPB

Profa. Dra. MARIANA MOURA NOBREGA



Departamento de Engenharia de Produção do CT/UFPB

Profa. Dra. CRISTIANE FRANCISCA DA COSTA SASSI



Departamento de Sistemática e Ecologia do CCEN/UFPB

Profa. Elisângela Maria Rodrigues Rocha
Coordenadora do Curso de Graduação em Engenharia Ambiental

JOÃO PESSOA – PB

2019

Dedico esta monografia...

A meu pai (in memória)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, dedico este trabalho ao meu querido pai (*em memória*), pelo legado deixado de como o ser humano pode dedicar a fazer enorme diferença na vida das pessoas. E à minha mãe Ana, por ser um exemplo de garra e perseverança, uma pessoa que tem um bem no coração. Ela que foi mãe e pai, criando os 8 filhos. E que tenho certeza, que não passou nem sequer uma noite sem rezar por mim.

Eu a amo de verdade. Especial agradecimento aos meus irmãos e irmãs, Augusto, Elisa, Paula, Lucindo, Benvindo, Adilson e Paulino, que apesar da distância estiveram sempre presentes durante todos os momentos de minha vida, dedicando todo o apoio, carinho e preocupação com minha vida. Por sempre acreditar em mim e por compreender os meus momentos de ausência.

A Jordana, Elena, Roberta, Nielson, Gabriel, Clediana, Vilma, Karine, Vania, Bruno, Andressa, Rebeca, Alerson, Vitória, Amanda, Thaciana, Jéssica, Vânia, Vive de Barros, e Vive de Tiburcio, amigos do LARBIM, pelos apoios, ensinamentos, pelo ambiente de trabalho cheio de harmonia e de muita alegria, adoro estar com vocês. Mas os principais agradecimentos são para Evandro e Patrícia, pelo grande apoio. Como sempre digo, você foram e sempre serão uma família para mim.

A Professora Dr. Cristiane Francisca da Costa Sassi, ao meu orientador Darlan Azevedo Pereira e em especial agradecimento ao meu orientador Roberto Sassi, por ter me aceitado no laboratório, por todos conhecimentos científicos e da vida transmitidos, incentivo e estímulo à pesquisa, por ter depositado confiança e por ter sido extremamente paciente e ter compreendido todos os impasses ocorridos em alguns momentos. Quando olho para o futuro, me vejo um pesquisador cheio de ideias, e o fruto desta visão pesquisadora devo muito ao incentivo e estímulo vindo dele. Prometo futuramente dar contribuições importantes nesta área, e levar essa tecnologia de cultivo de microalgas para o meu país. A vocês meus sinceros agradecimentos.

A Diretoria de Agricultura Familiar (DAF), o Cinturão Verde, nas pessoas de André, Raissa, Janine, Pereira e Seu Calistrato, pelo apoio e ensinamentos. Mas os principais agradecimentos são para Suelen Lopes (minha irmã Brasileira), Rose Cruz e Anselmo Rodrigues.

Aos colegas, Rebeca, Maurício, Jopnathas Brito, Jonathas Sampaio, Ícaro, Daniel, Noilda, Jordanna, Gabriela, Verginia (em memória), Natália, Paloma, Eliandro, Erica, Carol. Em especial, Luanny, Grande Túlio, Andressa, Renato, Gustavo, Jonatas Antunis, Eliandro, Sei que vocês não tem noção do quão foram importantes para mim, começando pela ótima recepção, pelas ajudas e principalmente pelos simples gesto e preocupação da maioria nos momentos mais difíceis nesse país, sempre me perguntava “Oiii Luíiiiiis, como está a sua família”, isso me fazia viajar até Cabo Verde, e trazer comigo acumulado energia de toda da minha família, me fazia sentir mais confiante. Academicamente não foi fácil, mas com vocês melhorou. Talvez, Jordana e Noilda estudaram fora, sabem o valor de ser bem acolhido.

A família africana, pelo apoio em especial meus irmãos de coração, Nuno fisioterapeuta preferido, Jailson economista preferido, Mane, João Paulo, Cleyton, Reginaldo e Deolindo meu Sociólogo preferido e a minha namorada Luce, meu crescimento pessoal e social devo muito a vocês. Minha gratidão a todos.

A dona Lourdes, á minha Mainha do Brasil, que me adotou como filho, cuidou de mim por três meses quando fiz a cirurgia, me dando café, almoço e jantar sem cobrar e ainda tirar o tempo dela pra conversar comigo. Uma das pessoas mais incríveis que já conheci em toda a minha vida, prova de que nesse mundo tão racista e preconceituoso ainda tem pessoas que olha para um ser humano e vê um humano, não um Africano, um Americano. A senhora minha especial gratidão.

Aos meus primos (as) e irmãos (as) de infância, Pedro, Claudio, Elsa, Paulo, Lourenço, Walter, Cris, Samuel, Sonia, Henriqueta, muito obrigado por tudo, um dia explico minha ausência.

Aos meus amigos da residência, Marcos, João Tavares, Mustafá, um muito obrigado.

Gratidão à coordenação do curso de Eng. Ambiental, João Paulo e em especial à coordenadora Elizangila, Cinara, Ajuda de vocês foram cruciais.

A Antônio Carlos Jesus de Pina Veiga Pires, Ele que acreditou em mim dando oportunidade de estudar no Brasil assinando meu termo financeiro, sem esse enorme gesto, hoje poderia estar em um outro mundo. Sucesso, paz e saúde para sua família.

Talvez nunca vos permitisse perceber as dimensões dos meus problemas, mas vocês não imaginam quantos meses passei sem ter sequer sono para dormir de tantos problemas que parecia não ter fim, tirando concentração para os estudos. Mesmo assim, não baixei a cabeça porque sabia que a vida vai muito além da universidade.

Eu sou fruto do amor, do conhecimento, do carinho, da paz, da amizade e da ajuda, de cada um de vocês, e o maior sonho desse fruto é um dia encher-vos de orgulho, multiplicando todo vosso amor, conhecimento, carinho, paz, amizade e ajuda para um mundo melhor.

RESUMO

As microalgas são os seres fotossintetizantes mais eficazes existentes no mundo e têm sido foco de grande interesse pelos benefícios que podem oferecer ao meio ambiente devido a sua enorme capacidade de captura e utilização de dióxido de carbono (CO_2) presente na atmosfera como uma das fontes de nutrientes, e a sua conversão em biomassa altamente rica em lipídios, pigmentos, ácidos graxos poli-insaturados, aminoácidos tipo micoporinas, ficocoloides, esteróis, aminoácidos e proteínas, carboidratos. A biomassa produzida é de grande interesse para indústria de produção de energia, alimentícia, farmacêutica e cosméticos. Muitas microalgas também atuam como eficientes biorremediadoras de resíduos domésticos e agroindustriais, de maneira que sistemas integrados de cultivo de microalgas promissoras para a produção de biocombustíveis acoplados ao tratamento de efluentes podem apresentar vários benefícios, como a redução de custos no tratamento de águas residuais com a co-produção de biomassa microalgal, reduzindo os custos com os meios de cultivo, promovendo remoção de nutrientes e minimizando impactos ambientais. Neste contexto, este trabalho teve por objetivo avaliar um sistema de cultivo em *mix* em fotobiorreatores tubular, compondo um sistema de 2000 litros de capacidade efetiva, construído em tubo de acrílico e tanques fechados, e a realização de estudos relacionados ao crescimento da microalga *Selenastrum gracile* (Clorofícea) cultivada no sistema usando meio de cultura alternativo preparado a partir de extrato de biocomposto hortifrútis. O cultivo teve a duração de 14 dias, com fase exponencial do segundo ao oitavo dia. O rendimento máximo de biomassa foi de 20 mg.L^{-1} para uma densidade celular máxima de $5,49 \times 10^3 \text{ células.mL}^{-1}$. Os dados da cinética de crescimento de *S. gracile* no fotobiorreator mostraram valores médios de 0,44 para o μ_{Max} (taxa de crescimento máximo), 0,64 para o k (duplicação celular por dia de cultivo) e 1,64 para o t_g (tempo de geração), na fase exponencial. Medidas da eficiência fotossintética realizadas na fase exponencial, usando um mini-PAM mostrou excelente estado fisiológico da célula, com valor de F_v/F_m (eficiência fotossintética) acima de 0,79. Fotoinibição da fotossíntese foi observada às 13 horas do dia, em situação de luz saturante. Temperatura alta entre por volta das 13:00 as 15:00 horas também reduziram a taxa de fotossíntese. Os transientes OJIP também evidenciam uma diminuição do F_m nos horários de maior iluminação. O meio alternativo utilizado mostrou-se eficaz para o cultivo em massa dessa espécie em fotobiorreator.

Palavra-chave: Efluentes, Cultura em massa, Tubular vertical, Fotossíntese.

ABSTRACT

The Microalgae are the most effective photosynthetic organisms existing in the world and have been a focus of great interest for the benefits they can offer to the environment due to their enormous capacity to capture and use carbon dioxide (CO₂) present in the atmosphere as one of the sources of nutrients, and their conversion into biomass highly rich in lipids, pigments, polyunsaturated fatty acids, amino acids like mycosporins, ficocoloids, sterols, amino acids and proteins, carbohydrates. The biomass produced has great interest for energy, food, pharmaceutical and cosmetics. Many microalgae also act as efficient bioremediation agents for household and agroindustrial waste, so that integrated microalgae culture systems promising for the production of biofuels coupled with effluent treatment can have several benefits, such as reducing costs in wastewater treatment with co-production of microalgal biomass, reducing costs with cultivation media, promoting nutrient removal and minimizing environmental impacts. In this context, the objective of this work was to evaluate a *mix* culture system in tubular photobioreactors, composing a system of 2000 liters of effective capacity³⁶, built in acrylic tube and closed tanks, and studies related to the growth of the microalgae *Selenastrum gracile* (Chlorophyceae) cultivated in the photobioreactor, using alternative culture medium prepared from biocomposite hortifrúti extract. The cultivation lasted 14 days, with an exponential phase from the second to the eighth day. The maximum yield of biomass was 20 mg.L⁻¹ for a maximum cell density of 5.49 x 10³ cells.mL⁻¹. Data on the growth kinetics of *S. gracile* in the photobioreactor showed mean values of 0.44 for μ_{Max} (maximum growth rate), 0.64 for ok (cell doubling per day of culture) and 1.64 for tg (generation time) in the exponential phase. Measurements of the photosynthetic efficiency performed in the exponential phase, using a mini-PAM showed excellent physiological state of the cell, with F_v / F_m value (photosynthetic efficiency) above 0.79. Photoinhibition of photosynthesis was observed at 13 p.m in the day, in a saturating light situation. High temperature between around 13:00 to 15:00 hours also reduced the rate of photosynthesis. OJIP transients also show a decrease in F_m during the hours of greater illumination. The alternative medium used proved effective for the mass culture of this species in photobioreactor

Keyword: Effluent; mass culture, vertical tubular, photosynthesis.

LSTA DE SIGLA

ATP- Adenosina Trifosfato

ADU - Cadeia de Ácidos Graxos

COP 21 - 21º Conferência das Partes

DNA - Ácido Desorribonucleico

EMPASA - Empresa Paraibana de Abastecimento

Fd - Ferredoxina

FNR - Ferredoxina NADP-oxido redutor

ADPH₂-nicotinamida adenina dinucleotídeo

HHV - Poder Calorífico

IV - Valor do Iodo

LARBIM – Laboratório de Ambientes Recifais e Biotecnologia com Macroalgas

ONU – Organização das Nações Unidas

OY - Nível fotossistema II

PEFF - Ponto de Entupimento do Filtro

Ppm- Partes por milhão

RPM- Rotações por minuto

PQ - Aceptor Plastoquímico

PVC- Policloroeteno ou policloreto de vinil

PSET - Transporte de Elétrons fotossintético

RCs - Centro de Reação

Tg - Tempo de geração

UNFCCC - Quadro das Nações Unidas sobre a Mudança do Clima

μMax: velocidade máxima específica de crescimento (h⁻¹)

UV- Ultra Violeta

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: exemplos de espécies de microalgas: (a) <i>arthrospira platensis</i> (Spirulina), (b) <i>Dunaliella salina</i> , (c) <i>Haematococcus pluvialis</i> , (d) <i>Chlorella vulgaris</i> , (e) <i>Acutodesmus obliquus</i> (f) <i>Nannochloropsis sp</i>	19
Figura 2: Esquema do metabolismo de microalgas.	21
Figura 3: Fases do crescimento celular.....	23
Figura 4: Principais produtos das reações nas fases clara e escura da fotossíntese.....	24
Figura 5: Esquema do processo de fotossínteses (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, 2007).....	25
Figura 6: Parque de reservatórios abertas (lagoa <i>raceway</i>).....	32
Figura 7: Sistemas de cultivo de microalgas: (a) fotobiorreator tubular inclinado; (b) fotobiorreator de tubular vertical (c) fotobiorreator tubular horizontal e (d) fotobiorreator de placas.....	33
Figura 8: <i>Selenastrum gracile</i> Reinsch 1866 selecionada junto ao banco de cultura de microalgas do LARBIM/UFPB para o ensaio de produção de biomassa no fotobiorreator usando meio de cultura alternativo.....	34
Figura 9: Diagrama esquemático preparado para subsidiar a montagem do fotobiorreator no Larbim/UFPB.....	36
Figura 10: Cultivos otimizados de <i>S. gracile</i> em frascos mariotes de 20L prontos para serem transferidos ao fotobiorreator.....	37
Figura 11: Variações na intensidade do cultivo de <i>S. gracile</i> no fotobiorreator em 6 dias de cultivo.....	41

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Variações da temperatura e da iluminação durante o desenvolvimento do cultivo no fotobiorreator. A: nos tubos de acrílico; B: nos containers.....	40
Gráfico 2 - Dados de peso seco x densidade celular para <i>S. gracile</i> cultivada no fotobiorreator em meio alternativo constituído a partir de bicomposto hortifrutis.....	42
Gráfico 3 - Parâmetros cinéticos de crescimento durante o cultivo de <i>S. gracile</i> no fotobiorreator: μ_{Max} = ; t_g = e k =.....	42
Gráfico 4 - Eficiência fotossintética de <i>S. gracile</i> (em azul) x intensidade luminosa (em vermelho) em cultivo realizado no fotobiorreator em meio alternativo de baixo custo.....	43
Gráfico 5 - Eficiência fotossintética de <i>S. gracile</i> (em azul) x temperatura em cultivo (em vermelho) realizado no fotobiorreator em meio alternativo de baixo custo.....	44
Gráfico 6 - Variações nos transientes da fluorescência OJIP observadas ao longo do dia no cultivo de <i>S. gracile</i> em fotobiorreator, em meio alternativo de baixo custo.....	44

SUMÁRIO

1. JUSTIFICATIVA	17
2. OBJETIVO GERAL	19
2.1 Objetivos Específicos.....	19
3. REFERENCIAL TEÓRICO	20
3.1 Microalgas	20
3.2 Metabolismo	21
3.3 Reprodução	23
3.4 Fotossíntese	24
Figura 5: Esquema do processo de fotossínteses.....	26
Fonte: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (2007).	26
3.5 Medidas de crescimento celular	27
3.5.1 Contagem direto por microscópio	27
3.5.2 Cinética de crescimento de microalgas	27
3.6 Fatores que influenciam nos cultivos	29
3.6.1 Temperatura	29
3.5.2 Luminosidade	29
3.6.3 Aeração	30
3.6.4 Nutrientes	30
3.6.5 pH.....	31
3.7 Sistemas de Cultivo.....	32
3.7.1 Sistemas Abertos	32
3.7.2 Sistemas fechados ou fotobiorreatores	33
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
4.1 Espécies selecionada para o cultivo no fotobiorreator	35
4.2 Montagem do fotobiorreator tubular em área externa ao LARBIM:	36
4.2 Otimização do cultivo da microalga <i>Selenastrum gracile</i> visando aumentar a biomassa para o ensaio no fotobiorreator	37
4.3 Preparo do fotobiorreator para receber as microalgas inoculadas	39
4.4 Monitoramento do pH, da temperatura, e da iluminação dos fotobiorreatores durante o desenvolvimento do cultivo	39

4.5 Atividade Fotossintética	40
5. RESULTADOS	40
5.1 Variações dos parâmetros físicos e químicos durante o cultivo	40
5.2 Desenvolvimento de <i>S. gracile</i> durante o cultivo e parâmetros cinéticos de crescimento.....	42
5.3 Atividade fotossintética de <i>S.gracile</i> durante o cultivo	44
6. DISCUSSÃO GERAL	46
7. CONCLUSÃO FINAL	48
8. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	49

INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas as questões ambientais vêm sendo tratadas com maior preocupação devido à demasiada utilização de recursos naturais em diversos processos produtivos, resultando em elevados níveis de impactos ambientais, segundo BARCELLOS, OLIVEIRA; CARVALHO (2009). Nos dias de hoje a procura cada vez maior por produtos e serviços tem apresentado implicações diretas no aumento drástico das atividades industrial, elevando dessa forma a geração de resíduos e a utilização de recursos naturais, os quais estão se tornando cada vez mais escassos e potencialmente degradados (SCHMITZ; DALMAGRO; COLLA, 2012). Toda essa “máquina” que compõe a cadeia de produção consome de produtos e extração de matéria prima utiliza combustíveis fósseis em massa, são esses combustíveis que sustentam o progresso da maioria das novas economias através de matérias-primas energéticas não renováveis. Um dos resultados negativos é a liberação de dióxido de carbono (CO_2) para a atmosfera durante a sua queima contribuindo para o aquecimento global (GARCIA, 2012).

Diante desses cenários, tornam-se necessários processos produtivos mais sustentáveis, buscando-se aliar medidas práticas de proteção ambiental ao desenvolvimento econômico, desenvolvendo técnicas e alternativas eficientes para minimizar o efeito dos impactos ambientais. As microalgas surgem como uma alternativa remediadora para o problema das emissões atmosféricas, no entanto sua aplicação atende a diversas outras atividades industriais, podendo até mesmo ser transformada em fonte de energia. Autores discutem há décadas a microalga como potencial matéria prima para fontes de energia renovável, como a produção de biocombustíveis (TEBBANI et al., 2014; WASSERMAM, 2011), grande promessa para propósitos de biorremediação (GONÇALVES *et al.*, 2016), possibilidades de aplicação comerciais diversas (MWZZOMO *et al.*, 2010), indústria alimentícias (VANTHOOR-KOOPMANS *et al.*, 2013), farmacêutica (AHMED *et al.*, 2014).

Sua participação em diversos processos de importância ecológica é bastante conhecida, sendo destacado o seu papel na realização de fotossíntese e fixação do CO_2 , contribuindo não apenas para a disponibilidade de oxigênio para a respiração de quase todos os seres vivos do planeta, como também para a redução dos riscos apresentados pelos gases do efeito estufa. Segundo BROWN E ZEILER (1993), estima-se que cada tonelada de biomassa algal produzida em determinado tempo há um consumo de duas toneladas de CO_2 pela fotossíntese, valor este 10 a 20 vezes mais do que o absorvido pelas plantas oleaginosas.

Além disso, algumas microalgas possuem a capacidade de fixar o nitrogênio atmosférico em vida livre ou em associações, o que as coloca numa posição de destaque como microrganismos que participam nos dois processos responsáveis pela manutenção da vida em nosso planeta (DIVA; ARNALDO, 2014).

Com a utilização de CO₂, as microalgas se multiplicam rapidamente, geralmente dobrando a biomassa em um período de 24h e produzem uma série de compostos de interesse, principalmente lipídio com conteúdo médio variando entre 1% e 70%, podendo chegar a 90% do peso seco sob determinadas condições operacionais, proteínas, ácidos graxos e diversos coprodutos. Os ácidos graxos quando extraídos podem ser utilizados como alimento, fármacos ou transformados em biocombustíveis (RADMANN; COSTA, 2008; AMIN, 2009; CHISTI, 2007; MATA *et al.*, 2010; MENG *et al.*, 2009).

Atualmente, muitos estudos estão sendo conduzidos sobre a utilização de microalgas para a produção de biocombustíveis associada à captura de CO₂, especialmente em sistemas fechados denominados de fotobiorreator CHISTI, (2007), com um interesse devido ao fato deles apresentarem como uma fonte sustentável de biocombustíveis, incluindo etanol, bioquerosene e biodiesel. Este último decorre da capacidade das mesmas sintetizarem e acumularem quantidades significativas de lipídios, até cerca de 80% do peso seco em algumas espécies (GRIFFITHS; HARRISON, 2009). A sua importância para biotecnologia destaca-se entre os modernos processos microbiológicos com inúmeros trabalhos e frentes de pesquisas desenvolvidos nas últimas décadas (NAGARAJAN; MARUTHANAYAGRAM; SUNDARAMAM, 2012).

Outras vantagens também justificam o uso das microalgas na produção de biodiesel, tais como: apresentam produção contínua durante o ano; não competem com culturas alimentares por terras aráveis; quando realizados em larga escala representam uma prática sustentável; tem importância social, podendo gerar emprego e renda; e, podem usar águas residuais como meio de cultura, se enquadrando, assim, em um processo de produção sustentável. (VIÊGAS, 2010; MATA *et al.*, 2010).

Visto que as microalgas não necessitam de grandes áreas como no caso da agricultura convencional, nem de terras férteis, podendo, inclusive, serem cultivadas em áreas áridas e locais que não apresentam aptidão agrícola, além de necessitarem de um menor volume de água, elas apresentam alto rendimento tanto em biomassa quanto em produção de óleo. A soja, uma das referências do processo de produção do biodiesel, apresenta baixa

produtividade por hectare e pouco teor de óleo no grão, além de ser uma *commodity* agrícola, indicando que a produção mundial de biodiesel a partir desta oleaginosa pode ocasionar sérios danos ambientais e econômicos, especialmente se sua produção em larga escala for acompanhada da expansão da área cultivada, aumento das fronteiras agrícolas e da ocupação humana através de novos desmatamentos, que inevitavelmente têm consequências diretas à perda de biodiversidade (SUAREZ *et al.*, 2009).

Apesar dessas vantagens ainda não se conseguiu alcançar a viabilidade econômica para a produção de biocombustível de microalgas comparável às indústrias de petróleo ou de bioetanol devido ao elevado custo de produção, principalmente em função da falta de um processo econômico que integra as etapas associadas com a colheita, extração e conversão de biomassa microalgal em biodiesel (KIM *et al.*, 2013). Além disso, como afirma FRANZ *et al.*, (2012), uma das principais barreiras para produção de biodiesel inclui a falta de espécies “elites” de microalgas, que apresentem dentre outras, alta produtividade lipídica, resistências a mudanças climáticas e células fáceis de serem coletadas. Contudo os custos de produção de microalgas podem ainda ser reduzidos se o cultivo for combinado com processos tais como o tratamento de águas residuais e a produção de compostos com alto valor agregado (TEBBANI *et al.*, 2014)

Tendo em vista a necessidade ambiental na produção de energia limpa, este trabalho teve como objetivo de ampliar o conhecimento e o desenvolvimento referente ao cultivo tipo fotobiorreator tubular para produção de biomassa de microalgas em meios alternativos, visando à produção de cepas com elevado potencial para acúmulo de lipídeos.

1. JUSTIFICATIVA

Atualmente o mundo desprendeu um grande esforço para o desenvolvimento de novas formas de produção de energia mais limpas, pois se observou um grande aumento na preocupação com as questões relacionadas à saúde do ser humano e do planeta em geral. Essa preocupação está estritamente voltada para as atividades ligadas ao consumo de combustíveis fósseis (petróleo e os seus derivados, carvão etc.), sendo esse um dos fatores que mais contribuem para o agravamento da poluição dos corpos hídricos, solo e da atmosférica. Sendo o último, um dos maiores causadores do efeito estufa e, consequentemente, do aquecimento global.

Diante disso, um novo acordo global que busca combater os efeitos das mudanças climáticas, bem como reduzir as emissões de gases de efeito estufa, foi assinado. Este documento chamado de Acordo de Paris foi ratificado, em 12 de dezembro de 2015, pelas 195 partes da Convenção - Quadro das Nações Unidas sobre Mudança do Clima (UNFCCC) e pela União Europeia, durante a 21ª Conferência das Partes (COP21). Um dos objetivos é manter o aquecimento global abaixo de 2°C, buscando esforços para limitar o aumento da temperatura a 1,5°C acima dos níveis pré-industriais. O texto final determina no que diz respeito ao financiamento climático, que os países desenvolvidos deverão investir 100 bilhões de dólares por ano em medidas de combate à mudança do clima e adaptação em países em desenvolvimento (ONU BRASIL, 2019).

Isso tem despertado interesse nas pesquisas e na exploração das diversas vias de obtenção de biocombustíveis, porém, a grande demanda mundial de energia faz com que a eficiência das tecnologias, empregadas para produzir energia de forma renovável, deva ser alta, para se evitar efeitos contrários, como por exemplo, desmatamento ou desperdícios energéticos. O etanol, uma vez que o Brasil é autossuficiente na produção desse tipo de álcool, e o biodiesel podem vir a ser fontes alternativas e economicamente promissoras para este fim. (RICHMOND, 2004; TEIXEIRA; MORAIS, 2008; MENG *et al.*, 2009; MONTERO; ARISTIZÁBA; REINA, 2011).

No biodiesel, mais de 80% do custo final de produção é decorrente da matéria-prima (CÁRDENAS, 2013). Com o objetivo de mudar este cenário, nos últimos anos, as microalgas estão sendo visadas como fonte alternativa e economicamente viável para a produção de biodiesel. Os óleos encontrados nas microalgas possuem características físico-químicas similares aos óleos vegetais (FAO, 1997), e os biocombustíveis obtidos a partir dos óleos microalgais têm um retorno energético muito mais elevado do que outros biocombustíveis e atendem simultaneamente tanto as questões ambientais como de demanda e produção, devendo, por isso, ser a única fonte de biodiesel que tem potencial para substituir completamente o diesel. (GROOM *et al.*, 2008).

Entretanto o seu custo de produção atualmente é de 4 a 10 vezes maior do que os combustíveis derivados de petróleo e do biocombustível proveniente das plantas oleaginosas. Contudo, as microalgas têm um rápido crescimento apresentam elevada produtividade de óleo/hectare-ano, podendo produzir até 30 vezes mais quantidade de óleo por unidade de área de terra quando comparadas às plantas terrestres (HUNTLEY; REDALJE, 2007; COLEMAN; ROSEN; SCHWARTZBACH, 1988).

Outro fator importante é o fato de sua colheita não seguir o regime de safras, não requer o uso de herbicidas ou pesticidas, pois apresentam uma ampla tolerância a fatores ambientais extremos e a possibilidade de serem cultivadas de maneira intensiva, mesmo em condições adversas (RODOLFI *et al.*, 2009); WILLIAMS *et al.*, 2009; KURANO *et al.* 1995). Os sistemas de cultivo podem ser montados em áreas impróprias para a agricultura e os cultivos podem ser desenvolvidos em água marinha, de estuários, ou em água proveniente de diversos processos de produção agropecuária, industrial, dejetos domésticos etc. (BIANCHINI *et al.*, 2006; DARZINS; PIENKOS; EDYE, 2010).

2. OBJETIVO GERAL

Avaliação de um sistema de cultivo com um *mix* de fotobiorreatores tubular e de placas paralelas, para produção de biomassa de microalgas com alto teor de lipídio utilizando meio de cultura alternativo.

2.1 Objetivos Específicos

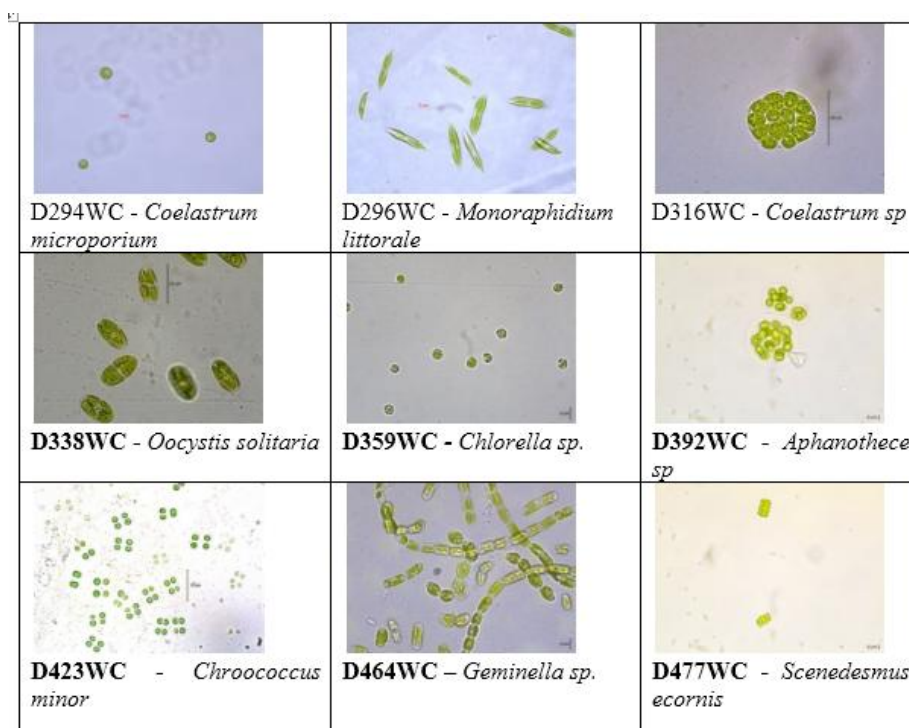
- Selecionar a espécie de microalga do banco de cultura de microalgas do LARBIM/UFPB potencialmente produtoras de lipídios e outros coprodutos de interesse biotecnológico, com a finalidade de avaliar a viabilidade do cultivo em larga escala em condições ambientais do Nordeste brasileiro.
- Estudar, modificar e aprimorar o *design* (protótipo) e o *layout* (posicionamento e equipamentos pertencentes ao sistema), dos fotobiorreatores para a melhor produção de biomassa menor custo energético.
- Monitorar o desenvolvimento dos cultivos por medidas de fluorescência “*in vivo*”, a fim de definir a cinética de crescimento e posteriormente comparar estes resultados com o crescimento em nível laboratorial.
- Analisar a produtividade em termos de produção mensal de biomassa.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Microalgas

As microalgas são organismos unicelulares ou coloniais fotossintéticos que estão naturalmente presentes em diferentes ambientes aquáticos ou úmidos, incluindo rios, lagos, oceanos e solos. As cianobactérias estão incluídas nesta definição, mesmo sendo organismos procariontes. GHOSH *et al.*, (2016); GONÇALVES; PIRES; SIMÕES, (2016); SAWAENGSAK *et al.*, (2014); TERCERO; DOMENICALI; BERTUCCO, (2014); ZHU, (2014). Historicamente o primeiro registro acerca do cultivo de microalgas deve-se ao alemão Ferdinand Cohn em 1850, que manteve viva, em seu laboratório, uma clorofícea flagelada de água doce, pertencente ao gênero *Haematococcus*. No entanto, os primeiros estudos experimentais abordando aspectos do cultivo de microalgas deve-se a Famintzin em 1871, e o primeiro cultivo monoespecífico de *Chlorella vulgaris* (clorofícea) foi obtido por Beijerinck em 1890 (MARTINS, 2014). Ainda hoje a *Chlorella* ocupa o primeiro lugar no uso comercial desses microrganismos.

Figura 1: Algumas espécies de microalgas.



Fonte: LARBIM- UFPB, 2019.

O interesse principal nestes dois grupos de organismos fototróficos reside na sua utilização potencial para a produção de biomassa para alimentos, rações e produtos químicos finos usando a energia solar. Devido a sua capacidade de adaptação, desenvolvem-se nos habitats mais variados, crescendo prioritariamente em suspensão de soluções líquidas (BARSANTI; GUALTIERI, 2014). Podem ser encontradas em água doce e água do mar, oceanos profundos, costões rochosos, ambientes ácidos, alcalinos e inclusive fora de ambientes aquáticos, como no gelo e em areia de desertos (TEBBANI *et al.*, 2014), conferindo a esse grupo de microrganismos uma imensa versatilidade metabólica (DIVA; ARNALDO, 2014). Na grande maioria dos habitats apresentam função principal de produtores primários de cadeia alimentar, por conta do processo fotossintético (LEE, 1999).

3.2 Metabolismo

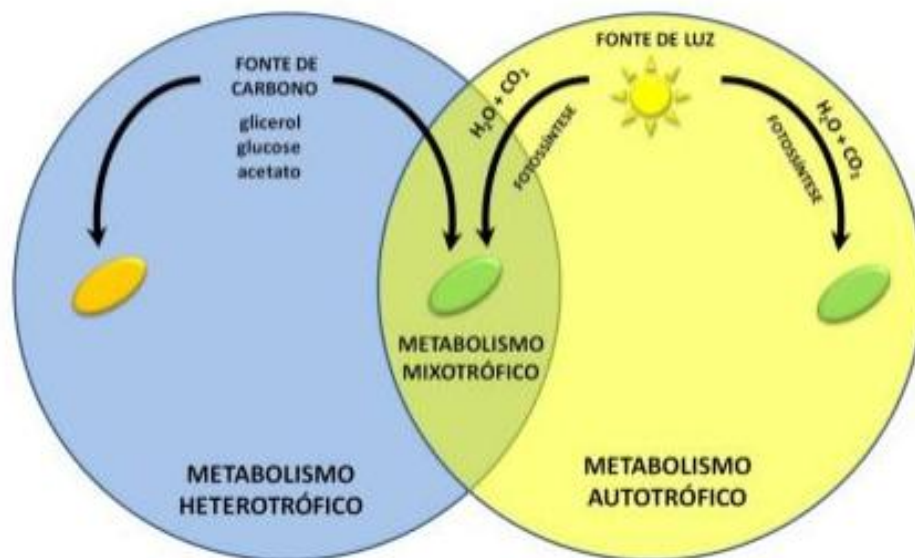
Inúmeros fatores influenciam o crescimento de microalgas: fatores abióticos, como luz (qualidade, quantidade), temperatura, concentração de nutrientes, nitrogénio (N), fósforo(p), silício(Si), vitaminas, metais, etc.), O₂, CO₂, pH, e salinidade; fatores bióticos, como competição por patógenos (bactérias, fungos, vírus, mais frequente em cultivos não salinos) e por outras algas; fatores operacionais, tais como o cisalhamento produzido pela mistura, a taxa de diluição, a penetração de luz, a frequência de colheita e a adição de fontes de carbono orgânicas e inorgânicas (bicarbonato) (BRENNAN & OWENDE, 2010; MATA *et al.*, 2010; CHISTI, 2007).

Fatores de estresse não só afeta a fotossíntese e a taxa de crescimento das algas, mas também influenciam a atividade do metabolismo celular e a composição lipídica VISVIKI; SANTIKUL, (2000). Diversas condições de estresse, limitação de nutriente MORALES-SÁNCHEZ *et al.*, (2013); DEVI *et al.*, (2013); CHANDRA *et al.*, (2014), salinidade KALITA *et al.*, (2011); VENKATA MOHAN; DEVI, (2014) etc. Tem sido utilizada para aumentar o teor de lipídios durante o cultivo de microalgas. Tanto a temperatura como o estresse físico pode desempenhar um papel significativo no metabolismo de algas especificamente para síntese lipídica (JUNEJA *et al.*, 2013).

Para alcançar maior produtividade nos cultivos de microalgas, e que estes sejam rentáveis, é de vital importância a seleção adequada do modo de cultivo. Os três principais modos de produção podem ser utilizados, chamados como autotrófico heterotrófico e

mixotrófico PEREZ-GARCIA; BASHAN, (2015). No cultivo autotrófico, mais especificamente, fotoautotrófico, e mais comumente utilizado, as células obtêm energia da luz e o carbono do CO₂ do ar, produzindo então, através da fotossíntese, suas biomoléculas: polissacarídeos, proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos (Jiang, L.; Luo, S.; Fan, X.; Yang, Z.; Guo, R.; *Appl. Energy* **2011**; CHEN *et al.*, (2011). O crescimento heterotrófico faz utilização apenas de compostos orgânicos como fonte de carbono e energia, desta forma não precisam de luz para o desenvolvimento, seu crescimento é um processo aeróbio, onde a assimilação do substrato orgânico gera energia através da fosforilação oxidativa acompanhado pelo consumo de oxigênio como receptor de elétrons final. Já *mixotrófico* utilizam simultaneamente carbono inorgânico e orgânico como fonte de carbono na presença de luz, sendo fotossíntese a principal fonte de energia, embora compostos orgânicos e CO₂ sejam ambos essenciais. (MARIANO; PEREZ-GARCIA; BASHAN, 2015; WANG, 2014; MATA *et al.*, 2010).

Figura 2. Esquema do metabolismo de microalgas.



Fonte: Mariano *et al.* (2010)

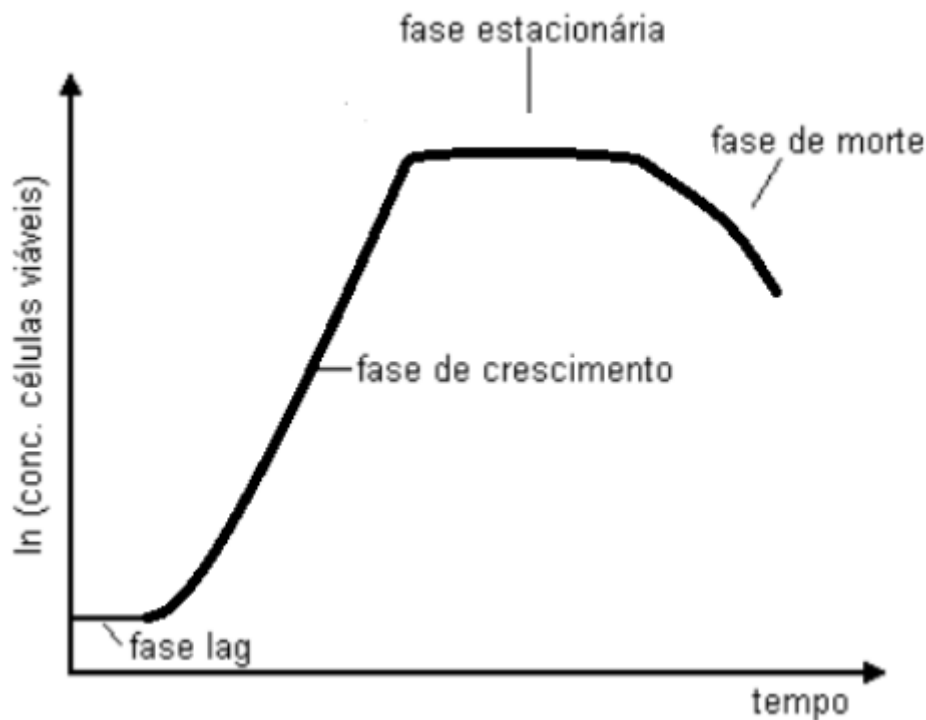
3.3 Reprodução

Um dos aspectos mais importantes no estudo de algas é a existência de padrões reprodutivos marcantes e bastante variados entre os grupos de algas (LOURENÇO, 2006). A divisão celular das microalgas procariotas pode ocorrer por meio de fissão binária, com a constrição de todas as camadas da parede que crescem para dentro, ou invaginação da membrana plasmática e da camada de peptidoglicano, sem o envolvimento da membrana externa. A divisão celular pode também ocorrer por fissão múltipla, levando à formação de esporos internos. Cianobactérias também se reproduzem por fragmentação (hormogônia). Apesar de as cianobactérias não apresentarem reprodução sexuada evidente, recombinação genética por transformação ou conjugação pode ocorrer (RICHMOND, 2004).

No caso de espécies unicelulares, a reprodução vegetativa se manifesta por meio de divisão binária (LOURENÇO, 2006). O ciclo celular em algas eucarióticas envolve duas fases: mitose e interfase. Durante a interfase, a célula cresce e todos os constituintes celulares aumentam em número, de modo que cada célula filha vai receber um conjunto completo da molécula de DNA replicado e cópias suficientes de todos os outros constituintes e organelas. Durante a mitose, a divisão nuclear ocorre. O crescimento microbiano é influenciado por várias condições químicas e físicas. À medida que a concentração de substrato ou outros fatores tornam-se limitante, ou metabólitos tóxicos acumula, a taxa de crescimento diminui.

Na fase de crescimento, muitas vezes ocorre à produção de metabólitos secundários. Contanto que haja um consumo de material de armazenamento, o organismo permanece viável. Quando a energia não é mais produzida para a manutenção da célula, esta morre. Em alguns casos, este processo é acompanhado pela formação de esporos ou estruturas semelhantes, que podem sobreviver e superar as condições adversas que dão origem a novos indivíduos quando as condições favoráveis são retomadas (RICHMOND, 2004). A curva de crescimento (Figura 3) de uma espécie de microalga é compreendida pelas fases: lag, onde não há crescimento, mas uma adaptação da microalga ao meio de cultura; fase de crescimento (ou log ou exponencial), onde ocorre a maior taxa de crescimento; fase estacionária, na qual a taxa de crescimento é igual à taxa de mortalidade; e a fase de declínio, que devido à falta de nutrientes não ocorre crescimento (MORAIS, 2011).

Figura 3: Fases do crescimento celular.

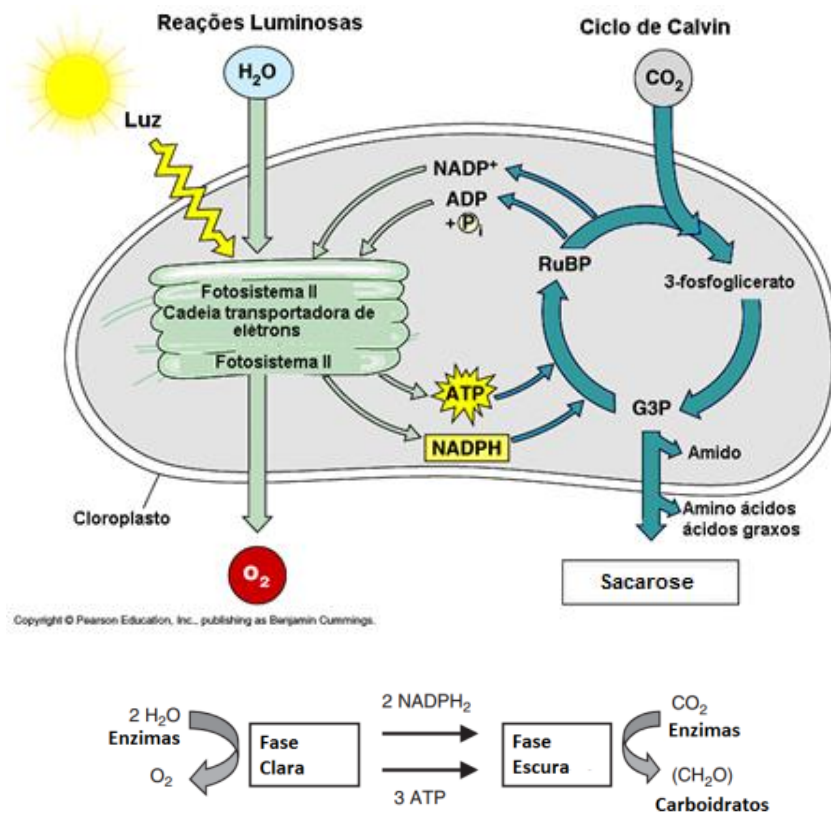


Fonte: MORAIS, 2011

3.4 Fotossíntese

A fotossíntese representa um processo único de conversão de energia luminosa em energia química. Neste processo, os compostos inorgânicos e fótons de luz são convertidos em matéria orgânica por organismos fotoautótrofos. O processo de fotossíntese oxigênica é uma reação redox que acontece nos cloroplastos, especialmente na membrana tilacóide, que se dá pela absorção de luz pelas clorofilas: Carotenoides, e em alguns casos ficobilinas (os sistemas de antenas), onde CO_2 e água são convertidos a carboidratos e oxigênio. A conversão é tradicionalmente dividida em duas etapas, as assim chamadas de fase clara e fase escura. Na fase clara, que ocorre nas membranas fotossintéticas, os fótons de luz são convertidos em energia química gerando um redutor bioquímico, NADPH_2 , e um composto de alta energia, o ATP (Figura 4). Na fase escura, que ocorre no estroma, NADPH_2 e ATP são utilizados na redução bioquímica sequencial de dióxido de carbono em hidrocarbonetos (CROCE; AMERONGEN *et al.*, 2011 MUH; GLOCKNER; HELLMICH; ZOUNI *et al.*, 2012).

Figura 4: Principais produtos das reações nas fases clara e escura da fotossíntese.

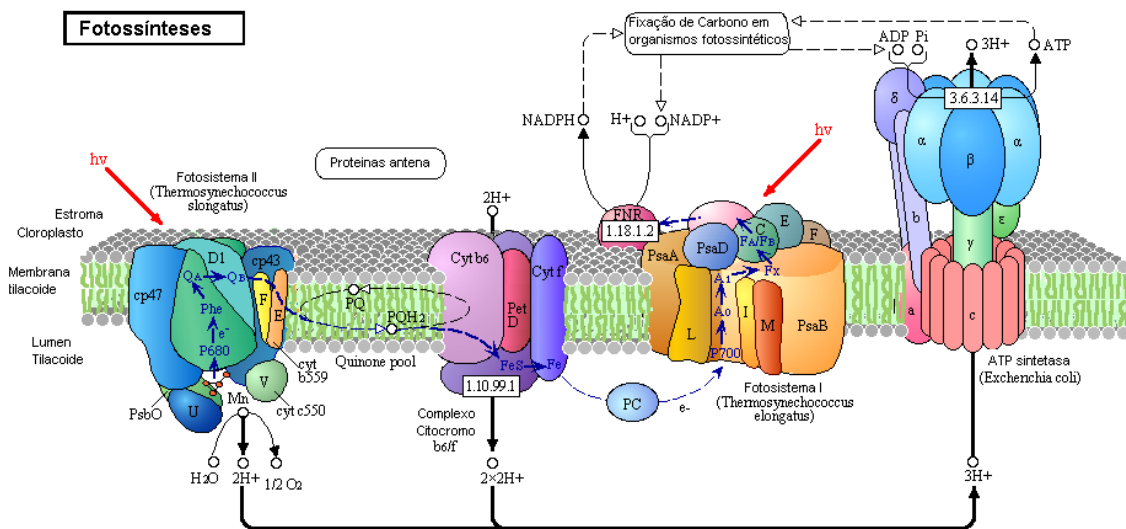


Adaptado de HALL; RAO, 1999.

Luz incidente (como quantum de luz, $h\nu$) é absorvida pelos pigmentos associados aos fotossistemas II e I (PSII e PSI), a energia de excitação é transferida de forma eficiente e rápida dentro da antena, até atingir os centros de reação (RCs). No PSII o quantum de energia leva a fotoquímica (ou seja, a separação de carga), que dá origem a um elétron no lado reduzido e a uma carga positiva no lado do doador do PSII. No lado do doador do PSII, um co-fator de manganês extrai os elétrons da água em uma reação de quatro etapas, liberando O_2 e prótons no lado do lúmen da membrana tilacoidal. O elétron no lado reduzido é transferido ao acceptor plastoquinona (PQ). A redução total da PQ a PQH₂ precisa de dois elétrons e é acompanhada pela entrada de dois prótons desde o estroma do cloroplasto. PQH₂ se difunde através da membrana tilacoidal e transfere os elétrons ao citocromo b_6f (cytb₆f), e consequentemente prótons ao lado do lúmen. A força motriz do próton (pmf), isto é, o gradiente do pH (ΔpH) mais o potencial da membrana ($\Delta\Psi$), que é construído através da membrana tilacoide durante o transporte de elétron fotossintético (PSET) é usada na transferência cíclica de elétrons através do complexo b_6f , o ciclo Q, contribui com a

translocação de prótons adicionais através da membrana, incrementando a força motriz de prótons. A absorção da luz pelo PSI resulta numa segunda reação de separação de carga que também libera um elétron no lado redutor e um oxidante no lado do PSI oxidado. Elétrons fluem do complexo cyt_{b_6f} , reduzindo a carga separada do lado oxidado do PSI, em tanto os elétrons liberados pelo lado reduzido do PSI são transferidos a um transportador solúvel, ferredoxina (Fd). Sob as condições de fotossínteses aeróbias, a Fd reduzida é responsável pela conversão de NADP^+ (fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina) a NADPH no estroma do cloroplasto, reação catalisada pela enzima ferredoxina NADP-oxidoreductase (FNR). O NADPH é usado como agente redutor nas reações escuras de fixação de CO_2 e armazenamento de energia solar na forma de carboidratos e amido (Figura 5). Simultaneamente, a força motriz gerada pela translocação dos prótons acoplada à transferência de elétrons fotossintéticos é transformada em ATP pela enzima ATPase. Isso fornece a energia para fixar CO_2 assim como outros consumidores de ATP na microalga. (CROCE; VAN AMERONGEN, 2011, MUH; GLOCKNER; HELLMICH; ZOUNI, 2012, RABINOWITC; GOVINDJEE 1969).

Figura 5: Esquema do processo de fotossínteses.



Fonte: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (2007).

3.5 Medidas de crescimento celular

Microalgas podem crescer rapidamente em cultivo e, à medida que se desenvolvem diversos processos metabólicos ocorrem e põem acarretar alterações nas propriedades químicas das microalgas ou mesmo em sua característica morfológica (por exemplo, alterações de biovolume celular). Para avaliar o desenvolvimento de microalgas, é essencial que o crescimento das populações em cultivo seja acompanhado para determinar o momento ótimo para coleta e utilização da biomassa formada. Seu desenvolvimento pode ser acompanhado por contagem de células, densidade ótica, fluorescência *in vivo*, quantificação do peso seco, concentração de pigmento, principalmente clorofila a. (LOURENÇO, 2006)

3.5.1 Contagem direto por microscópio

É a técnica mais simples usada para quantificar o número de células algália presente em determinada unidade de volume. Para microalgas, Câmara de Fuchs-Rosenthal e um microscópio óptico completo é essencial pra proceder a contagem, sendo dotado de capacidade de aumento, em vários casos, de pelo menos 400X. Nas contagens em microscópios, geralmente a densidade de indivíduos é expressa como número de células por mililitro de cultivo (Cel/ml). Pela contagem outros parâmetros auxiliares podem ser contemplados como avaliação da morfologia das células, percentagem de células em divisão e o seu tamanho. Acompanhamento do crescimento de microalgas em intervalos regulares por meio de contagem permite também caracterizar diferentes fases de crescimento, determinar o ritmo de desenvolvimento e até mesmo prever a densidade de célula que deverão ser atingidas em certo intervalo de tempo (LOURENÇO, 2006).

3.5.2 Cinética de crescimento de microalgas

Os parâmetros cinéticos de crescimento das microalgas são calculados na fase exponencial. Como, nesta fase, a velocidade específica de crescimento (μ_x) é máxima, ela passa a ser chamada velocidade específica de crescimento máximo (μ_{\max}). Segundo Lourenço (2006), a velocidade de crescimento apresenta uma variação diretamente proporcional à concentração X, isto é: a partir da Equação 1, a velocidade específica do crescimento máximo (μ_{\max}) foi determinada, assim como segue:

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{max} X \quad (1)$$

Onde:

$$\frac{dX}{dt}$$

é a velocidade do crescimento microalgal

X - concentração de células (Cel.ml⁻¹)

t - tempo de cultivo (h⁻¹)

Integrando-se a Equação 1, tem-se:

$$\int_{X_i}^X \frac{dX}{X} = \int_{t_i}^t \mu_{max} dt \quad (2)$$

$$\ln X - \ln X_i = \mu_{max} (t - t_i) \quad (3)$$

$$\ln X = \mu_{max} (t - t_i) + \ln X_i \quad (4)$$

A fase exponencial também é caracterizada pelo tempo de geração t_g , que é o tempo necessário para duplicar o valor da concentração celular. Nesse sentido, a Equação (4) pode ser tomada da seguinte forma:

$$\ln \frac{2X_i}{X_i} = \mu_{max} t_g$$

Logo, o valor de t_g pode ser obtido da seguinte equação:

$$t_g = \frac{\ln 2}{\mu_{max}} = \frac{0,693}{\mu_{max}}$$

De acordo com a Equação 4, observa-se que o tempo de geração é inversamente proporcional à velocidade máxima do crescimento da célula.

3.6 Fatores que influenciam nos cultivos

O desenvolvimento das fases de crescimento das microalgas depende de vários fatores limitantes, sendo eles químicos, físicos e biológicos, tais como: o pH, a luminosidade, as taxas de aeração, salinidade, a temperatura e nutrientes.

3.6.1 Temperatura

A temperatura é um dos fatores que mais afetam a taxa metabólica dos organismos. Por isso, a temperatura do ambiente deve ser escolhida em função das necessidades das espécies presentes e da finalidade dos cultivos. É interessante que a temperatura seja constante nos cultivos de microalgas, visando a uma melhor estabilidade, reprodutibilidade e previsibilidade nos experimentos (LOURENÇO, 2006). A porcentagem lipídica é fortemente afetada pela temperatura, dependendo da espécie, ao aumentar a temperatura observa-se o aumento no teor de lipídeos (VERMA et al, 2010). Microalgas da espécie *Chlorella* são boas produtoras de lipídeos quando cultivadas a temperaturas entre 25 a 30°C, embora sejam capazes de crescer em temperaturas a partir de 16°C (SUALI; SARBATLY, 2012).

3.5.2 Luminosidade

A iluminação é um dos pilares do cultivo de microalgas, visto que as microalgas são seres fotossintetizantes, a influência da luz no desenvolvimento das microalgas está relacionada ao fotoperíodo (tempo de exposição à luz) e à intensidade. Em cultivos fotoautotróficos, a quantidade de energia luminosa recebida pelo sistema fotossintético será a quantidade de carbono que pode ser fixado, determinado consequentemente à produção de biomassa e à taxa de crescimento das culturas microalgais (DERNER, 2006; LOURENÇO, 2006). O cultivo sob altas intensidades luminosas é responsável por dois fenômenos prejudiciais: a foto-oxidação, que tem efeitos letais para as células, podendo levar à perda total da cultura e a fotoinibição, provocando um decréscimo no rendimento máximo do crescimento, que também pode ocorrer sob intensidades luminosas moderadas se a taxa fotossintética estiver limitada por fatores estressantes, como baixas temperaturas (SAMUELSSON *et al.*, 1985). No cultivo de microalgas, a demanda por luz aumenta com o passar do tempo. Dessa forma, uma correta suplementação de luz é necessária para um

crescimento adequado das microalgas. Uma alta suplementação luminosa na fase inicial de crescimento pode causar foto-inibição (SOARES, 2010).

3.6.3 Aeração

A aeração dos cultivos, também é um fator limitante, pois impede que as células sedimentem, mantendo-as em suspensão. Ajudando para um melhor contato entre as células se os nutrientes. Além disso, o sistema permanece homogêneo e todas as células são expostas as mesmas condições de cultivo. Essa aeração pode ser realizada por um sistema de agitação mecânico (pás) em sistemas abertos, sistema de bombas recircula e distribuição de bolhas pelo reator fechado. Com a aeração de um gás contendo CO_2 podemos controlar as concentrações de CO_2 no reator fechado, assim como o pH visto que $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} = \text{H}_2\text{CO}_3$ acidificando o meio.

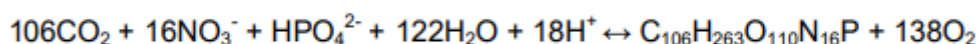
A aeração também ajuda no processo de respiração microbiana, deixando o meio homogêneo facilita a dissociação do O_2 no meio facilitando a troca de gases do microorganismo com o meio. (Borzani, 2001). A otimização da produtividade de biomassa microalgal requer um fluxo turbulento. No entanto, se este fluxo produzido pelo bombeamento for muito alto, pode causar um estresse hidrodinâmico, que resulta em dano celular (cizamento) (SOARES, 2010).

3.6.4 Nutrientes

Um dos pilares fundamentais do cultivo de microalgas é o conhecimento dos nutrientes necessários a seu desenvolvimento. Sendo estes divididos em: macronutrientes (carbono, nitrogênio, oxigênio, hidrogênio, fósforo, cálcio, magnésio, silicato, enxofre e potássio). Dentre os macronutrientes, o nitrogênio é extremamente importante para as algas por ser componente fundamental de classes de substâncias estruturais das células, como ácidos nucleicos e proteínas. A deficiência de nitrogênio no meio de cultivo tende a afetar a síntese e acúmulo de lipídeos totais nas células microalgais (VERMA *et al.*, 2010). Assim como o nitrogênio, o fósforo é considerado um dos principais elementos limitantes às microalgas, estando associado em todos os processos que envolvem trocas energéticas nas células, como síntese de ATP, açúcares fosfatados, ácidos nucleicos e fosfoenzimas (LOURENÇO, 2006).

CO_2

Entre os macronutrientes, o carbono é considerado o mais importante, uma vez que constitui ao redor de 50% da biomassa microalgal, compondo todas as substâncias orgânicas sintetizadas pelas células. O CO₂ absorvido e utilizado, é a principal fonte de carbono para o crescimento fotossintético, autotrófico, das algas (RICHMOND, 1990; GALVÃO *et al.*, 2013). Apesar da composição elementar das células de microalgas variar de acordo com as condições de crescimento e com a espécie, a equação estequiométrica para geração de biomassa pela via fotoautotrófica pode ser, em média, descrita como (COPLIN, 2012):



Portanto, a razão molar dos principais nutrientes (carbono, nitrogênio e fósforo) para geração de um mol de biomassa pode ser considerada em média como C106:N16:P1. A partir dessa razão, observa-se a grande demanda de carbono na produção de microalgas, aproximadamente 50% em massa da biomassa seca, e a importância do seu fornecimento para o meio líquido, seja pela transferência de CO₂ através de interface gás-líquido ou pela adição de sais de bicarbonato. Sabendo que a concentração de CO₂ no ar atmosférico é tão baixa de 0,04% (v/v), traduz uma transferência de uma quantidade de CO₂ para o meio líquido de cultivo também (RICHMOND, 1990; GALVÃO *et al.*, 2013; COPLIN, 2012).

Considerando que a concentração de CO₂(g) fornecida aos cultivos de microalgas não reflete necessariamente a quantidade de CO₂ dissolvido no meio de cultivo. Isto porque, a transferência deste gás para o meio líquido é afetada por fatores como pH(relação inversa), temperatura, tempo de residência do gás no interior do biorreator e configurações dos difusores. Pode-se afirmar que o crescimento das microalgas comumente encontra-se limitado por este composto. (NELSON, 2014; TIMMONS; EBELING, 2013; SCHMIDELL, 2001). A suplementação do cultivo com uma atmosfera enriquecida com CO₂ é uma prática amplamente utilizada para aumentar as velocidades de crescimento de biomassa (COPLIN, 2012).

3.6.5 pH

Em adição a temperatura, o pH é certamente o fator que mais afeta a distribuição de microalgas. A maioria das microalgas são tolerantes a grandes variações do pH. Em geral, microalgas eucarióticas de água doce preferem ambientes levemente ácidos (pH 5-7), enquanto cianobactérias preferem ambientes levemente alcalinos (pH 7-9) (ANDERSEN,

2005; BERENGUEL, 2004.). O pH do meio de cultivo determina a solubilidade de CO₂ e dos minerais, bem como a distribuição das formas inorgânicas de carbono, influenciando direta e indiretamente no metabolismo das microalgas (ARREDONDO-VEGA; VOLTOLINA, 2007).

O incremento do pH em cultivos fotossintéticos ocorre devido à atividade biológica das células que produz uma redução no conteúdo de carbono inorgânico dissolvido através do consumo necessário ao crescimento celular, forçando um deslocamento do equilíbrio carbonato-bicarbonato no sistema tampão. Além disso, o pH do meio de cultivo irá determinar as formas de carbono inorgânico (CO₂, CO₃²⁻ ou HCO₃⁻) dissolvida na fase líquida (Cuaresma *et al.*, 2006). Segundo Lee, Apel & Walton (2006), a elevação do pH em cultivos fotossintéticos é um indicador do consumo de carbono inorgânico devido ao crescimento celular.

3.7 Sistemas de Cultivo

Quanto aos sistemas de cultivo fotoautotróficos, de modo geral, existem duas categorias principais: lagoas abertas (raceways) e fotobiorreatores fechados.

3.7.1 Sistemas Abertos

Nos sistemas abertos (em relação a atmosfera), que compreende lagoas naturais e tanques artificiais, utilizam a luz solar e o CO₂ da atmosfera, e que caracterizam também por uma baixa relação entre a superfície iluminada e o volume do tanque de cultivo (S/V), atualmente é responsável majoritariamente pelo mercado da biomassa produzida. Estes sistemas, embora apresentem menor produtividade, ainda são preferidos em função dos menores custos de instalação e manutenção, apresentando uma variedade de formas e tamanhos possíveis, sendo o tipo comumente usado o *raceway* (tipo pista de corrida). Pelo fato de nenhum material transparente ser necessário na construção de tanques abertos, uma gama muito ampla de materiais pode ser empregado. Esses tanques são também de manutenção relativamente fácil, uma vez que se tem acesso livre para realizar a limpeza do biofilme que se acumula sobre as superfícies. A principal desvantagem dos sistemas abertos é que ocorre evaporação da água a uma taxa similar às culturas terrestres e, também, são mais suscetíveis à

contaminação por espécies indesejáveis. (ANDRÉ *et al.*, 2013; MENG, 2009, LARA *et al.*, 2010).

Figura 6: Reservatórios abertas (lagoa raceway).



Fonte: LARBIM- UFPB

3.7.2 Sistemas fechados ou fotobiorreatores

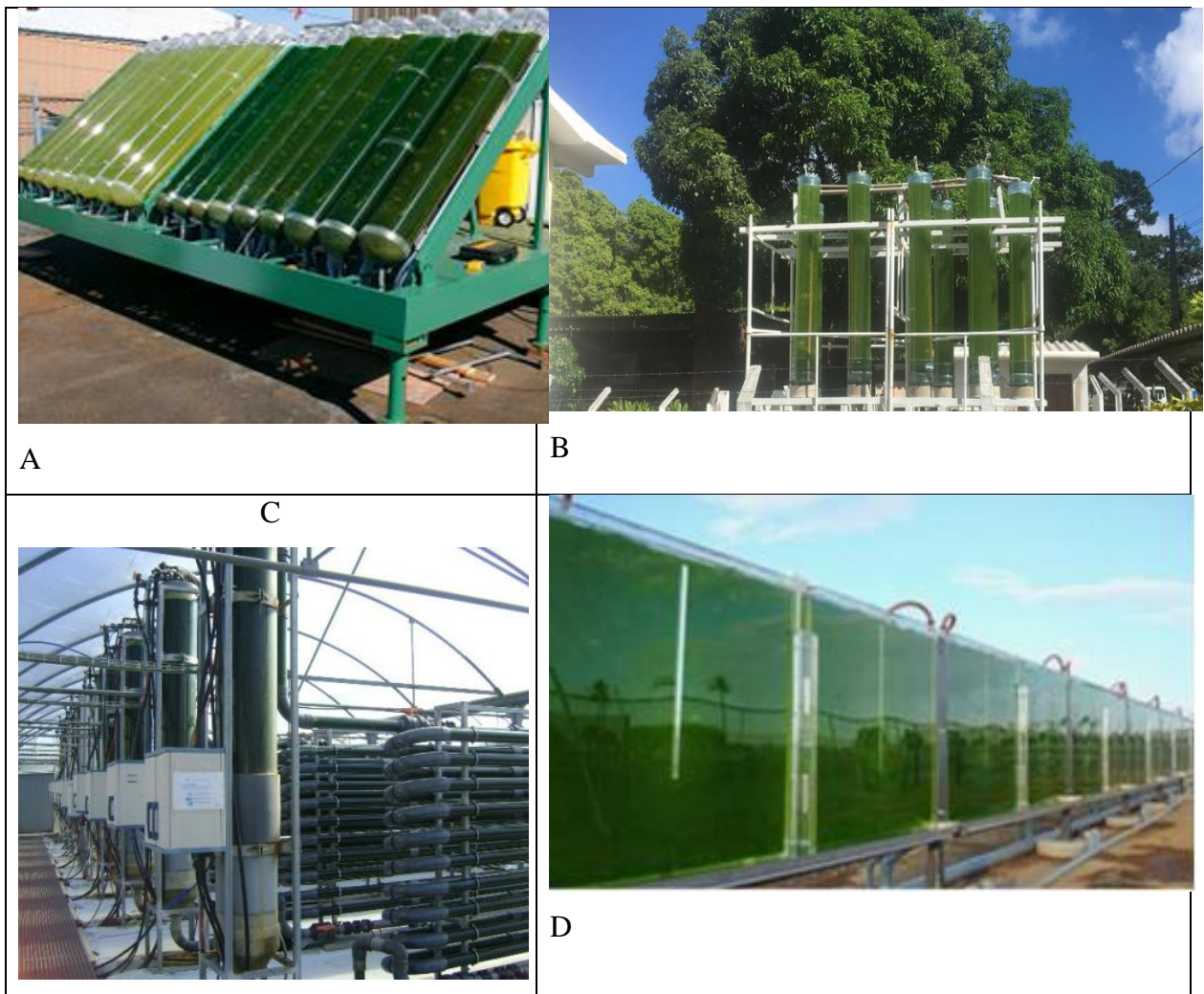
O termo “fechado” diz respeito ao menor contato com o ambiente externo que estes sistemas apresentam em relação aos tanques. Os sistemas fechados são comumente denominados fotobiorreatores e geralmente são utilizados para produção em larga escala, gerando produtos de alto valor comercial. A vantagem comparativa destes sistemas em relação aos sistemas abertos é a obtenção de maiores produtividades de biomassa microalgal, bem como a possibilidade de maior controle das condições de cultivo. Os fotobiorreatores são classificados em “tubulares” e “planares”, de acordo com a geometria do compartimento que encerra a cultura. Assim, são constituídos de tubos ou placas de material transparente à luz visível.

Os sistemas fechados (com elevada relação entre a superfície iluminada e o volume da cultura), diz respeito ao menor contato com o ambiente externo que estes sistemas apresentam em relação aos tanques, são comumente denominados fotobiorreatores e geralmente são utilizados para produção em larga escala, gerando produtos de alto valor comercial. A

vantagem comparativa destes sistemas em relação aos sistemas abertos é a obtenção de maiores produtividades de biomassa microalgal, permite o controle das condições hidrodinâmicas da cultura, a redução do risco de contaminação por microrganismos indesejáveis, diminui o consumo de água, e apresentar elevada capacidade de fixação de CO₂, bem como a possibilidade de maior controle das condições de cultivo.

Os fotobiorreatores são classificados em “tubulares” e “planares”, de acordo com a geometria do compartimento que encerra a cultura. Assim, são constituídos de tubos ou placas de material transparente à luz visível. (TEBBANI, 2014; UGWU *et al.*, 2008; BOROWITZKA, 2007).

Figura 7: Sistemas de cultivo de microalgas: (a) fotobiorreator tubular inclinado; (b) fotobiorreator de tubular vertical (c) fotobiorreator tubular horizontal e (d) fotobiorreator de placas.



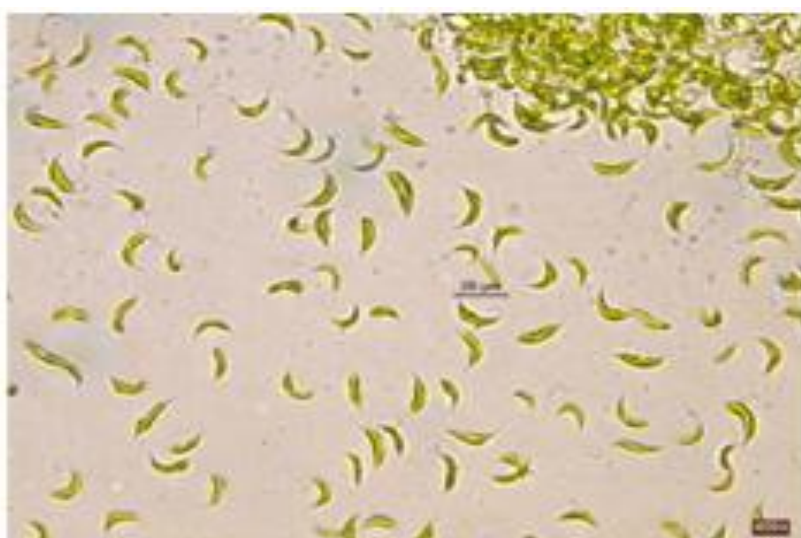
Fonte: LARBIM- UFBB, 2018; Bitog *et al.*, 2011; Estação experimental CAJAMAR. Universidade de Almería – Espanha, 2009.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Espécies selecionada para o cultivo no fotobiorreator

A microalga selecionada para este estudo foi *Selenastrum gracile* Reinsch 1866 (Figura 8), uma clorofícea de água doce isolado do reservatório de Gramame-Mamuaba, PB, mantido em cultivo monoespecífico no banco de cultivo de microalgas do Laboratório de Ambientes Recifais e Biotecnologia com Microalgas(LARBIM/UFPB) sob o código d458wc. Em experimentos prévios realizados em bancadas com esta espécie se constatou que ela cresce muito rapidamente, inclusive em meios alternativos de baixo custo, a exemplo de extrato de biocomposto de hortifrúti, e produz cerca de 23% de lipídios, valor este superior ao encontrado na soja. Além disso, a previsão das propriedades do biodiesel efetuada a partir das composições dos ácidos graxos dessa espécie, utilizando equações descritas na literatura, de acordo com Calixto *et al.*, (2018), incluindo índices de instauração das cadeias de ácidos graxos (ADU), valor do iodo (IV), viscosidade cinemática a 40° C, densidade, número de cetano (CN), ponto de entupimento do filtro a frio (PEFF) e poder calorífico (HHV) indicou que ela se mostra adequada para a produção de biodiesel.

Figura 8: *Selenastrum gracile* Reinsch 1866 selecionada junto ao banco de cultura de microalgas do LARBIM/UFPB para o ensaio de produção de biomassa no fotobiorreator usando meio de cultura alternativo.



Fonte: LARBIM/UFPB, 2019.

4.2 Montagem do fotobiorreator tubular em área externa ao LARBIM:

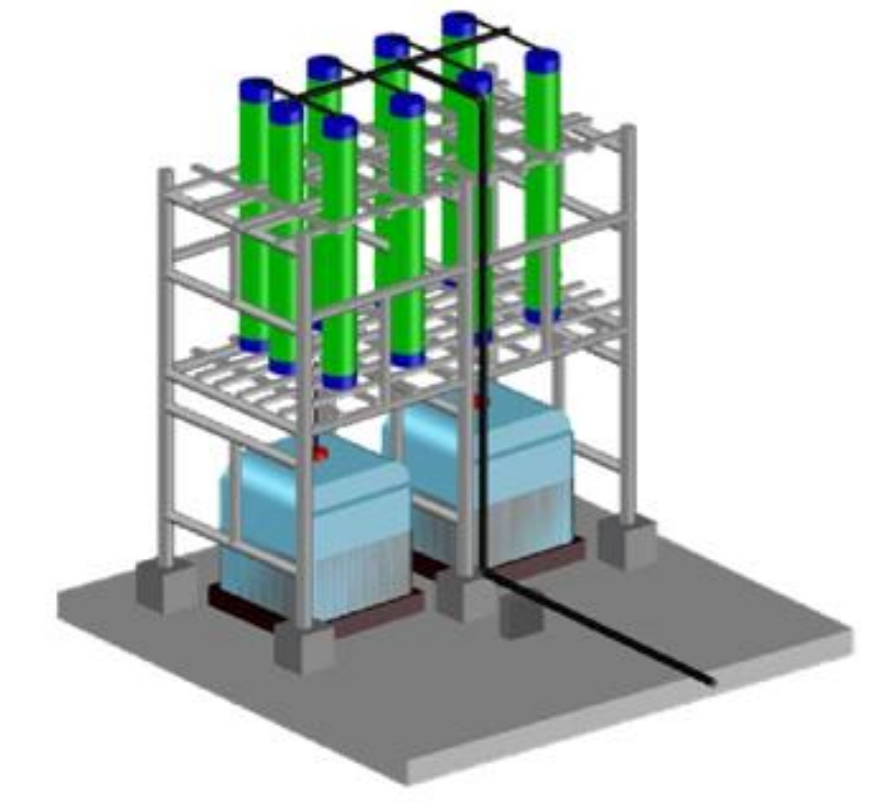
A preparação e montagem do fotobiorreator foi um trabalho artesanal que demandou tanto a aquisição de materiais (tubos, conexões, soldas, ferros etc.) no mercado local e na internet, com pesquisa de preços, inclusive visando reduzir custos. A instalação de sistema hidráulico de circulação e de aeração foi supervisionada pela equipe de pesquisadores do laboratório. A adaptação do espaço externo ao LARBIM onde foi montada planta piloto com o *mix* de fotobiorreatores tem cerca de proteção, piso de concreto e uma casa de máquinas, toda essa obra de infraestrutura foi efetuada pela prefeitura Universitária da UFPB.

O conjunto de fotobiorreator é composto por nove tubos de acrílico com 250 mm de diâmetro e dois metros de altura, tendo uma capacidade de 100L cada, e por duas caixas containers de 1000L cada, resultando em uma capacidade de projeto de 2900L. Apesar de apresentar uma capacidade maior, o volume máximo estipulado é de 2000L (capacidade efetiva), pois durante a realização do cultivo é necessário uma regulação da temperatura e para isso um *head space* nos fotobiorreatores de 20 cm e nos tanques é necessário, sendo assim, de tempo em tempo os tubos são esvaziados para os dois containers visando permitir a mistura, equilibrando assim as temperaturas dos tubos com a temperatura das caixas. A parte estrutural do equipamento (skid) foram utilizados 12 peças de andaimes de construção civil, ocupando uma área de 3 m de comprimento por 1,5m de largura, tendo uma altura total de aproximadamente de 3,5 m. Para fazer o suporte da base de sustentação dos reatores tubulares, foram usados 10 caibros de madeira de 3,5 m de comprimento por 4x5 cm de espessura. O skid foi instalado em uma base de concreto de 4x4m em uma área de constante insolação na UFPB.

Na instalação hidráulica de circulação foram utilizados tubos de PVC de Ø50 mm, ligando as duas caixas, e Ø32 mm ligando as caixas às bombas centrífugas que fazem o recalque do meio de cultivo para os cilindros de acrílico, permitindo, assim, uma mistura em ciclo fechado. Na conexão dos canos de PVC com os tubos de acrílico foram utilizados galões de águas de 20L vedada com borracha de vedação de Ø150 mm. Os galões foram cortados ao meio, sendo que a parte superior foi utilizada na base dos tubos de acrílico e a inferior para fechar a parte superior dos tubos de acrílico. Cada ramal que liga os tubos de acrílico para a circulação tanto na parte superior como na parte inferior contém um registro individual, permitindo o controle da circulação de cada tubo, assim como um registro para cada caixa. Na aeração foram utilizados tubos de Ø60 mm da saída do soprador até o centro e na sua altura máxima do fotobiorreator, a partir deli foi ligado a dois ramais com tubos de Ø50 mm

que por sua vez foram conectados aos tubos de Ø32 mm fazendo assim a distribuição para os tubo de acrílico, cada um contendo o seu registro individual.

Figura -9 Diagrama esquemático preparado para subsidiar a montagem do fotobiorreator.



Fonte: O próprio autor.

O soprador é da marca Aeromack CRE-04 com motor de 4 CV e indução trifásica de alto rendimento (85%). Nas conexões dos canos de circulação e de aeração foram utilizados 30 unidade de colas tubo PVC 75G, 2 joelhos de Ø60mm, 42 joelhos de Ø32mm , 20 T de Ø32mm, 7 T de Ø50 mm, 29 registro de Ø32mm, duas latas de resina de fibra de vidro, 2 m² de manta de náilon, 10 pacotes de massa acrílica, 10 pacotes de durepoxi pastoso de 50g, e 11 registros (válvulas) de plástico.

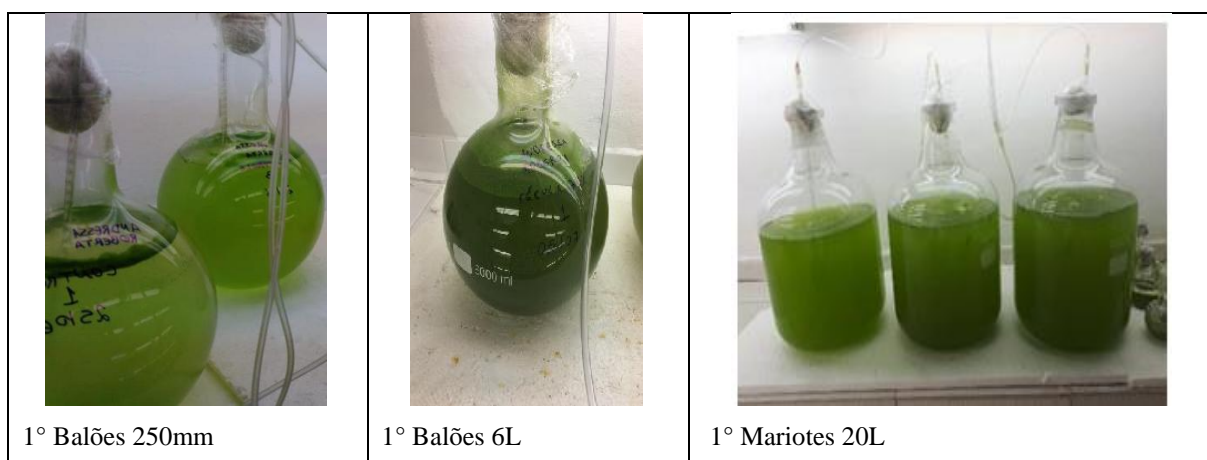
4.2 Otimização do cultivo da microalga *Selenastrum gracile* visando aumentar a biomassa para o ensaio no fotobiorreator

A otimização do cultivo de *S. gracile* foi efetuada partindo-se de balões de 250 ml com meio de cultura preparado a partir de extrato de biocomposto hortifrúti suplementado por nitrato e fosfato. O substrato obtido a partir do resíduo da biocompostagem de frutas e

verduras realizada pela Empresa Paraibana de Abastecimento e Serviços Agrícolas - EMPASA, localizada na cidade de João Pessoa –PB. O material cedido foi transportado, em sacos de náilon com capacidade para 50 kg, ao (LARBIM/UFPB), onde foi diluído em água, autoclavado, filtrado. O resíduo sólido foi descartado e o filtrado foi esterilizado para utilização na composição do meio Erd-Schreiber modificado (Clediana, 2016). O preparo desse meio alternativo teve como base o protocolo estabelecido por GROSS (1937), que desenvolveu pela primeira vez um meio de cultura indefinido para microalgas marinhas, elaborado a partir de extrato de solo enriquecido com nitrato e fosfato. Esses meios indefinidos preparados com extrato de solo são derivados de formulações originais publicadas nos anos 1920 a 1930 e constitui a chamada —família Erd-Schreiber.(LOURENÇO 2006).

Os balões foram mantidos a $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ em câmara de cultivo climatizada dotada de sistema de iluminação de aproximadamente $150\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ com fotoperíodo de 12 horas. Decorridos cerca de 10 dias os balões já apresentavam uma cultura densa, sendo então transferidos para balões maiores de 6L de capacidade contendo o mesmo meio de cultura preparado com biocomposto e posteriormente para frascos mariotes de 20 litros. A otimização ocorreu nas mesmas condições de luz e temperatura acima referidas, com aeração fornecida por um mini compressor de membrana RESUN AOC2. Após 20 dias os cultivos já se apresentavam bem concentrados, a notar pela intensa coloração verde (Figura 10), sendo nessa fase transferidos para o fotobiorreator.

Figura 10: Cultivos otimizados de *S. gracile* em frascos mariotes de 20L prontos para serem transferidos ao fotobiorreator.



Fonte: O próprio autor.

4.3 Preparo do fotobiorreator para receber as microalgas inoculadas

Procedeu-se, inicialmente, a lavagem dos tubos de acrílico e dos containers utilizando detergente neutro e uma lavadora de alta pressão. Em seguida foram feitas lavagens com água sanitária (água com baixa concentração de hipoclorito) deixando-a circular entre os tubos e os containers durante dois dias com o auxílio de uma bomba centrífuga. Depois, procedeu-se uma lavagem com água salina por um dia e finalmente, lavagem com água corrente. A água usada para receber o inóculo ficou em repouso por três dias a fim de garantir a saída do excesso de cloro. Nessa ocasião adicionou-se ao fotobiorreator o meio de cultura preparado com extrato de biocomposto enriquecido com nitrato e fosfato, preparado conforme procedimento de GROSS (1937). Finalmente, procedeu-se a inoculação da cultura otimizada de *S. gracile*, numa concentração inicial de células da ordem de 20.000 células/ml, sendo nesse momento acionado o motor do soprador para garantir aeração do cultivo.

4.4 Monitoramento do pH, da temperatura, e da iluminação dos fotobiorreatores durante o desenvolvimento do cultivo.

A medição do pH foi feita diariamente durante todo o cultivo usando papel tornassol. A temperatura e a iluminação foram monitoradas a cada 5 minutos durante todo o cultivo, usando um Hobo data logger (<https://www.hobodataloggers.com.au/>) instalado nos tubos de acrílico e no interior dos containers.

O cultivo foi monitorado usando parâmetros de crescimento, incluindo contagem celular em microscopia ótica usando câmaras de Fuchs-Roenthal e medidas de peso seco realizados em dias alternados. Os resultados das contagens foram utilizados nos cálculos dos parâmetros cinéticos de crescimento, cujos valores foram obtidos a partir das equações fornecidas por Lourenço (2006). Nesses cálculos foram considerados a velocidade específica de crescimento (μ_{Max}), o tempo de geração (t_g), considerado o tempo necessário para duplicar o valor da concentração celular, e o k que corresponde à duplicação celular por dia de cultivo. Nas determinações do peso seco procedeu-se a filtração de volumes conhecidos de amostras do cultivo em triplicatas em filtro de fibra de vidro previamente secos em estufa e pesados. Os filtros com o material foram novamente secados e pesados, sendo os valores de peso seco obtidos a partir da diferença dos pesos finais menos iniciais, expressos em $mg.L^{-1}$ de cultivo. Todas as amostras foram efetuadas em triplicata visando garantir segurança estatística.

4.5 Atividade Fotossintética

A eficiência da fotossíntese no nível fotossistema II (QY) assim como todos os outros transientes da fotossíntese da curva OJIP foram medidos quando o cultivo atingiu a fase exponencial, a cada hora, desde as 6h até as 18h, usando um fluorômetro AquaPen AP100 (Photon Systems Instruments, República Tcheca). Antes de cada medição as células foram adaptadas a 10 min no escuro para permitir a abertura de todos os centros de reação do fotossistema II (Strasser *et al.*, 2000). Todas as medidas foram feitas em triplicata. Os resultados foram processados usando o software FluorPen TM (Photon Systems Instruments, República Tcheca).

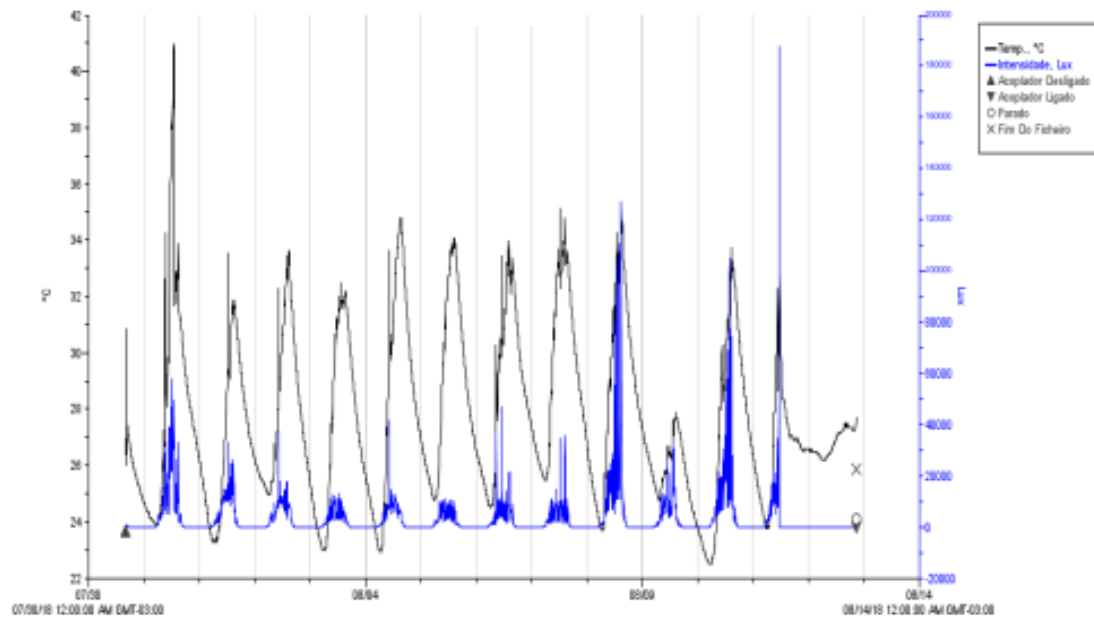
5. RESULTADOS

5.1 Variações dos parâmetros físicos e químicos durante o cultivo

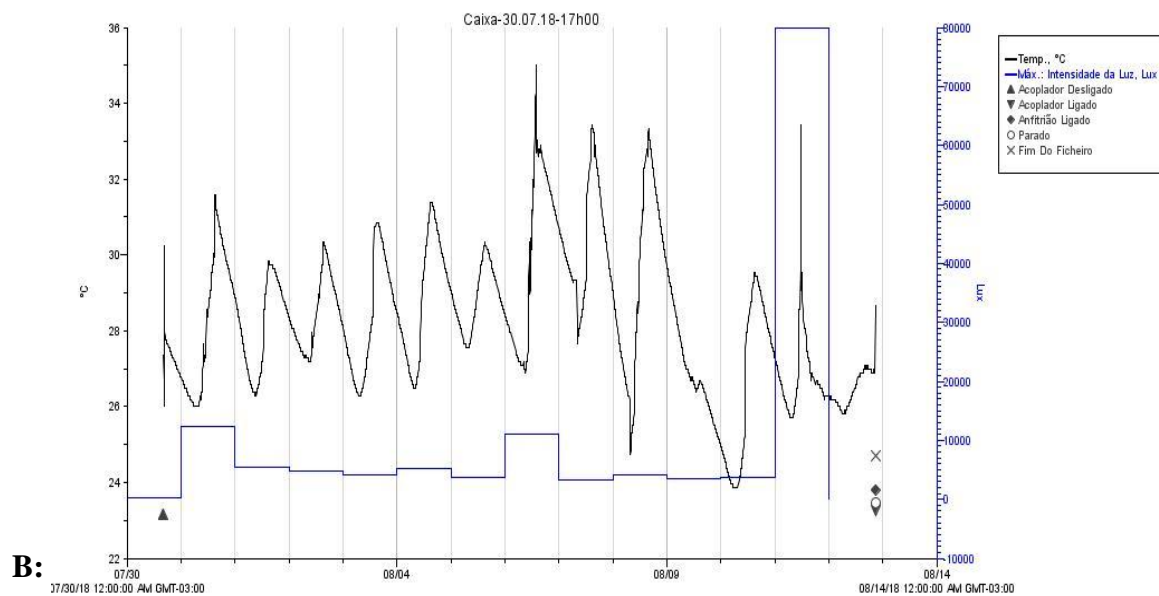
Nos containers a temperatura do cultivo variou de 23,9 °C a 35° C com média de 28,3 °C e desvio padrão de 1,96 °C (N=3800 registros), sendo o maior valor registrado no dia 06/08/2018 às 14h0min19s, e a iluminação variou de 0,0 (zero) a 79.911,6 lux, com média de 10,1 lux e desvio padrão de 20,37 (n= 14 registros), sendo o maior valor registrado no penúltimo dia do cultivo. Já nos tubos de acrílico, a temperatura variou de 41 °C a 22,5° C com média de 27,7 °C e desvio padrão de 3,04 °C (N=3802 registros), sendo o valor máximo registrado no dia 31/08/2018 (2° dia de cultivo), por volta das 13 horas, e a iluminação variou de 0,0 (zero) a 187.379 lux com média de 3.666,6 lux e desvio padrão de 9.547,4 (n= 3802 registros), sendo o maior valor registrado no dia 11/08/2018 (13° dia de cultivo) por volta das 11h23min (último dia do cultivo), sendo este registro, no entanto, único. Picos de iluminação foram registrados também no dia 10/08/2018, às 13h18min38s, com 68.889 lux (12° dia de cultivo) e no dia 08/08/2018 (10° dia de cultivo) com valores entre 93.689 lux às 14:58min38s a 126.756 lux às 14h53min38s. Todos os valores de “0,00” para intensidade luminosa são de registros noturnos registrado pelo sensor (Figura 4).

Com o passar dos dias observou-se um aumento do pH do cultivo na fase exponencial do crescimento, mantendo-se na faixa entre 8,0 e 10,8. Análises da assimilação de CO₂ durante o cultivo, conforme estava previsto no plano de trabalho original, não foi possível de ser realizada devido à demora na montagem do fotobiorreator que inviabilizou a montagem dos sensores e do sistema de injeção de CO₂.

Gráfico 1 - Variações da temperatura e da iluminação durante o desenvolvimento do cultivo no fotobiorreator. A: nos tubos de acrílico; B: nos containers.



A:



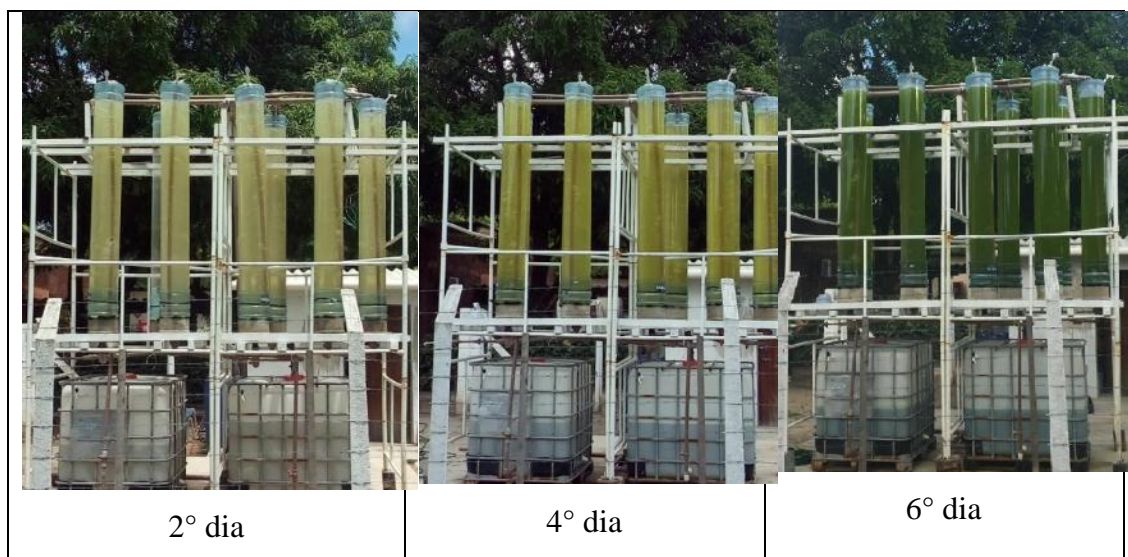
B:

5.2 Desenvolvimento de *S. gracile* durante o cultivo e parâmetros cinéticos de crescimento.

O desenvolvimento de *Selenastrum gracile* no fotobiorreator pode ser visualizado na figura 5. Claramente se observa um crescimento muito rápido dessa espécie nas condições de cultivo em curso, a notar pela mudança de coloração nos tubos de acrílico, que se mostravam verde-claro no segundo dia após a inoculação e passaram progressivamente a um verde escuro bem forte no sexto dia de cultivo, já na fase exponencial.

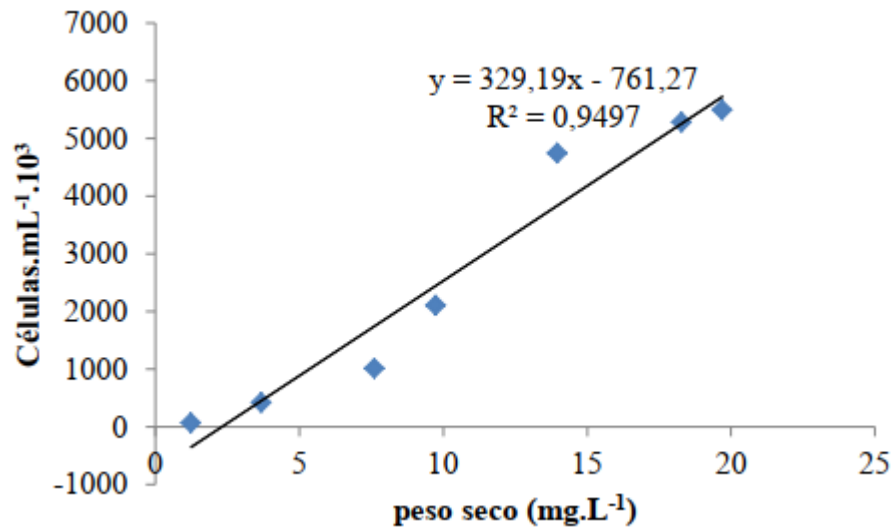
O cultivo durou 14 dias e entrou em fase exponencial no segundo dia, permanecendo nessa fase até o 8º dia, aproximadamente. O inóculo inicial tinha em torno de 20.000 células.mL⁻¹ e ao final do experimento, na fase estacionária, chegou à 5.493.300 células.mL⁻¹. Este valor é considerado como o rendimento máximo do cultivo em termo de densidade celular. O peso da biomassa seca no decorrer do cultivo apresentou uma correlação linear com a densidade celular de 0,946 (Gráfico 2), indicando que tanto um quanto o outro podem se utilizados para avaliar o desenvolvimento do cultivo no fotobiorreator. Ao final do cultivo a biomassa seca chegou a cerca de 20 mg.L⁻¹, sendo este o rendimento final em biomassa.

Figura 11 – Variações na intensidade do cultivo de *S. gracile* no fotobiorreator em 6 dias de cultivo



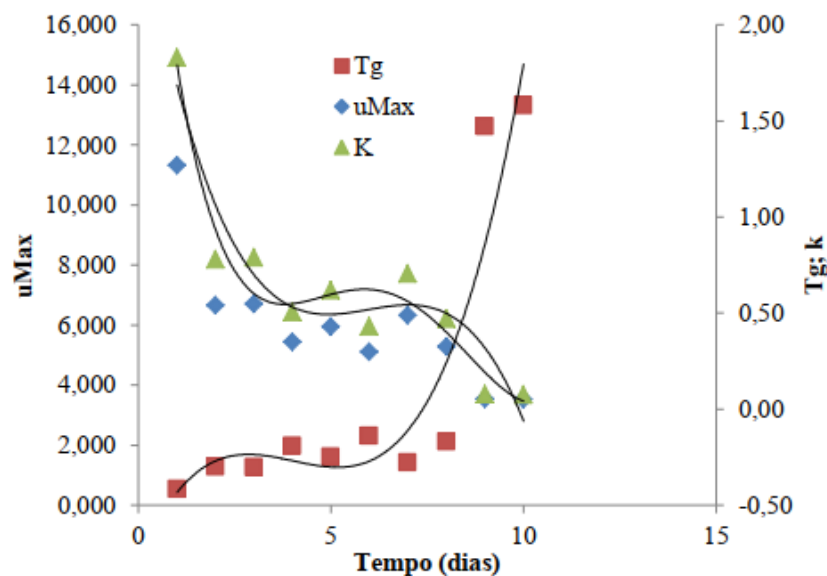
Fonte: O próprio autor.

Gráfico 2 – Dados de peso seco x densidade celular para *S. gracile* cultivada no fotobiorreator em meio alternativo constituído a partir de bicomposto hortifrutis.



Os parâmetros cinéticos de crescimento de *S. gracile* na condição de cultivo do fotobiorreator forneceram valores variando de 0,05 a 1,27 — ou de 0,33 a 0,54 na fase exponencial — para a taxa de crescimento específico (μ_{Max}), de 0,55 a 13,32 — ou de 1,28 a 2,1 na fase exponencial — para o tempo de geração (T_g), e de 0,07 a 1,81 — ou de 0,47 e 0,78 na fase exponencial — para o k (Gráfico 3).

Gráfico 3- Parâmetros cinéticos de crescimento durante o cultivo de *S. gracile* no fotobiorreator: μ_{Max} = ; T_g = e k =.



5.3 Atividade fotossintética de *S.gracile* durante o cultivo

O rendimento fotoquímico máximo do Fotossistema II ($QY=FV/FM$) determinados ao longo de um período de 12 horas na fase exponencial de crescimento de *S. gracile* cultivada no fotobiorreator evidenciou uma excelente eficiência fotossintética, com valores de Fv/Fm superior a 0,79. A redução observada nessa relação às 14 horas é decorrente de fotoinibição da fotossíntese devido ao pico de radiação solar observado às 13 horas (Figura 7). Os maiores valores da atividade fotossintética foram registrados quando a temperatura era mais baixa, especialmente no período da manhã. O aumento da temperatura dos cilindros do fotobiorreator entre 13 e 16 horas resulta em diminuição da eficiência fotossintética do fotossistema II nesse período (Figura 8).

Gráfico 4 – Eficiência fotossintética de *S. gracile* (em azul) x intensidade luminosa (em vermelho) em cultivo realizado no fotobiorreator em meio alternativo de baixo custo.

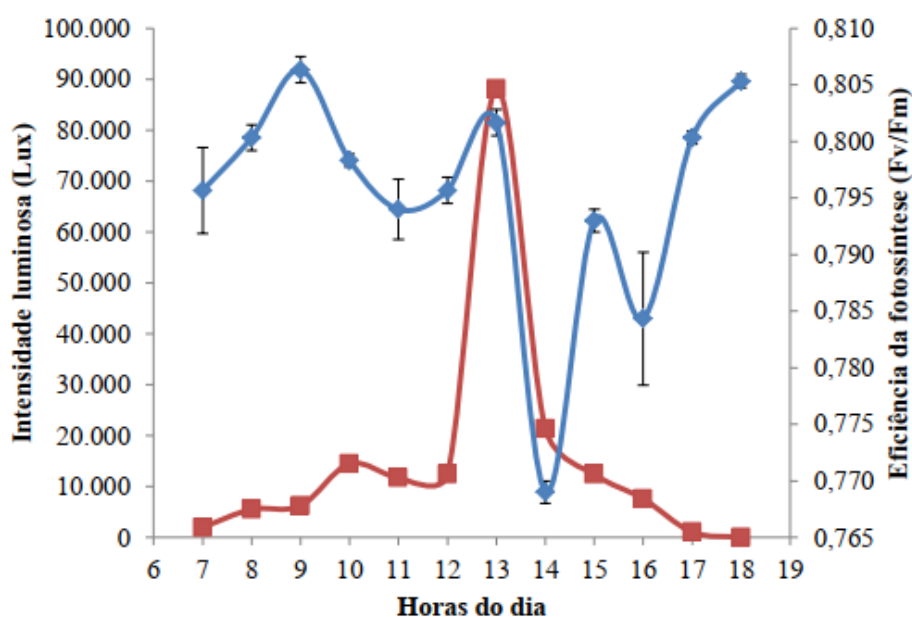
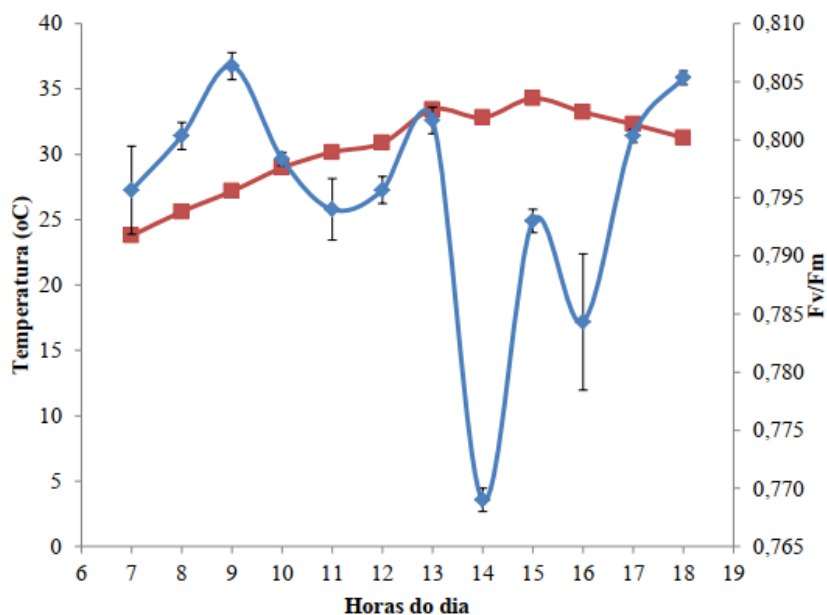
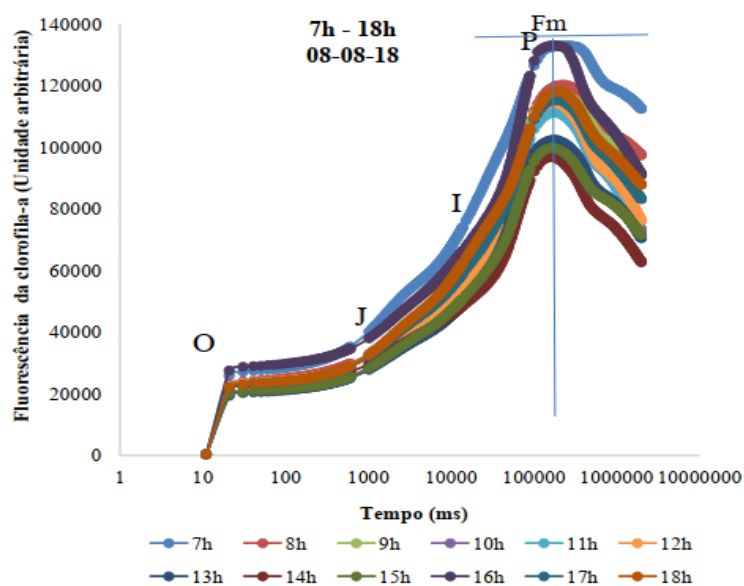


Gráfico 5 - Eficiência fotossintética de *S. gracile* (em azul) x temperatura em cultivo (em vermelho) realizado no fotobiorreator em meio alternativo de baixo custo



A medição *in vivo* dos transientes de fluorescência da clorofila a, realizada com o intuito de avaliar o desempenho fotossintético de *S. gracile* na fase exponencial de cultivo no fotobiorreator, ao longo do dia, permitiu observar a dinâmica do transporte dos elétrons através dos transientes de fluorescência OJIP (Figura 9), evidenciando o mesmo padrão em todos os horários medidos, com menor amplitude de Fm nos horários de maior intensidade luminosa, particularmente entre as 13h e as 15 h.

Gráfico 6 – Variações nos transientes da fluorescência OJIP observadas ao longo do dia no cultivo de *S. gracile* em fotobiorreator, em meio alternativo de baixo custo.



6. DISCUSSÃO GERAL

Os dados obtidos nessa pesquisa indicam excelentes respostas de crescimento e produção de biomassa de *S. gracile* no fotobiorreator com o meio alternativo utilizado, elaborado a partir de extrato de biocomposto, sugerindo que esse tipo de meio seguramente pode ser utilizado para obtenção de biomassa de microalgas em múltiplas aplicações. Reconhecidamente, além do biocomposto hortifrutis outros resíduos agroindustriais e humano tem sido testado como meio alternativo em condições laboratoriais de cultivo, a exemplo de esgoto doméstico (KLIGERMAN, BOUWER, 2015; CALIXTO, 2016), efluente de carnicultura (ZHU *et al.*, 2013), efluentes de produção de celulose (GENTILI, 2014), resíduos de produção de cerveja (FAROOQ *et al.*, 2013), resíduos de processamento do óleo de palma (LAM; LEE, 2011), etc., alguns com excelente resultado, com valores de biomassa produzida acima dos meios controle. O resultado obtido com *S. gracile* no fotobiorreator evidencia claramente ser possível utilizar esses tipos de meio de baixo custo para obter biomassa para inúmeras aplicações, favorecendo, ao mesmo tempo a minimização dos impactos ambientais decorrentes do descarte inadequado de alguns desses resíduos no ambiente.

Selenastrum gracile apresentou excelente desenvolvimento durante o cultivo conforme demonstraram os parâmetros cinéticos de crescimento. A relação direta observada entre as medidas de peso seco e as contagens celulares, durante o desenvolvimento do cultivo, evidencia que as duas técnicas de monitoramento do cultivo no fotobiorreator podem ser adotadas com a mesma eficácia, muito embora a determinação do peso seco seja menos laboriosa. O rendimento máximo celular chegou a $5.493.300 \text{ células.mL}^{-1}$ e a biomassa seca a $19,69 \text{ mg.L}^{-1}$, indicando um desempenho considerável. Considerando o volume total do cultivo a biomassa cultivada chegou a 430 g. Este valor se refere à uma área de cerca de 4,5 m² que é a área ocupada pela planta do fotobiorreator. Realizando-se colheita da biomassa 10 vezes por mês, o que é perfeitamente possível, resultaria em 120 colheitas anuais. Projetando-se este valor para uma área de 1 hectare resultaria num rendimento de cerca de 116,8 tons.ha⁻¹.ano⁻¹ de biomassa seca, valor este que é cerca de 36 vezes maior do que a produtividade média da soja que é de 3,176 tons/ha/ano (CORREA *et al.*, 2017).

As medidas de fotossíntese efetuadas com o mini PAM baseiam-se no fato de que fluorescência da clorofila —in vivo— tem sua origem preponderantemente no fotossistema II (PSII) e toda vez que uma amostra é adaptada a condições de escuro todos os centros de reação do PSII se abrem, de modo que o rendimento da fluorescência será mínimo (F_0)

(SCHREIBER *et al.* 1986). Após aplicação de um pulso de luz saturante os centros de reação do PSII se fecham resultando em aumento da fotossíntese. A diferença nos valores de F_o e F_m é denominada de fluorescência variável (F_v) e através dela é possível determinar-se a eficiência máxima da luz pelo fotossistema II (F_v/F_m).

A medida de OJIP, por sua vez, está associada ao fato de que após um período de adaptação no escuro, a maioria das moléculas QA se acha no estado oxidado (F_o), ocasião em que quase todas as unidades PSII ativas estão —abertas. Durante a iluminação essas unidades são gradualmente reduzidas até o nível P ser alcançado, onde F_m é atingida quando todas as unidades PSII ativas estão —fechadas (DUYSENS; SWEERS, 1963). Desse modo, as inflexões da curva de indução da fluorescência da clorofila refletem mudanças na taxa de redução líquida da molécula de plastoquinona A (QA), que dependem da cinética das reações redox entre os vários componentes do transporte fotossintético de elétrons durante a fotossíntese. Isso permite com que o transiente OJIP possa ser utilizado como um monitor rápido dos lados do doador de elétrons e do receptor de elétrons nesses processos, segundo Strasser (1995; 2004). Na curva OJIP, apresentada numa escala logarítmica STRASSER, 1991; STRASSER, 1992; BANNISTER, (1968), observa-se que as fases O-J, J-I e I-P da onda OJIP (até centenas de milissegundos) tem diferentes cinéticas, estando associadas ao entendimento de que o rendimento de fluorescência é controlado por um receptor de elétrons do PSII que também atua como um supressor —QI de fluorescência (VAN GORKOM *et al.*, 1978). Desse modo, evidencia-se que tanto a análise dos transientes da fotossíntese durante a curva OJIP quanto às medidas de F_o/F_m são muito eficazes para acompanhar o estado fisiológico das microalgas cultivadas em fotobiorreatores como observado no presente estudo com *Selenastrum gracile*, e os efeitos das taxas de iluminação na resposta fotossintética das células cultivadas.

No presente caso, *S. gracile* apresentou-se em excelentes condições fisiológicas durante todo o cultivo, a notar pelos elevados valores da eficiência fotossintética e das rápidas mudanças no gradiente OJIP ao longo do dia, dependentes da luz.

Alguns autores têm observado valores da eficiência fotossintética em culturas de diatomáceas da ordem de 0,83 para *Achnanthes longipes*, 0,71 para *Amphora hybrida*, 0,69 para *Navicula mutica*, entre 0,58 a 0,60 para *A. coffeaeformis* e 0,7 para *Cylindrotheca closterium* RIJSTENBIL, 2003, FORSTER; MARTIN-JÉZÉQUEL, (2005) em experimentos laboratoriais. Em diatomáceas considera-se que valores de F_v/F_m próximos de 0,7 sugerem que as células se encontram em condições fisiológicas ótimas RIJSTENBIL, (2003). No

presente caso a eficiência da fotossíntese esteve acima de 0,79 na maioria das vezes, exceto em uma condição de iluminação extrema quando se observou fotoinibição. Valores de F_v/F_m (acima de 0,70) também foram observados por CHEN *et al.* (2012) em cultura de *Haematococcus pluvialis* (clorofícea).

A redução de F_v/F_m observada por ocasião do pico de radiação solar às 13 horas está associado à uma reação de fotoinibição consequente ao desenvolvimento de mecanismos fotoprotetores associados aos pigmentos acessórios presentes na microalga estudada, induzindo, desse modo, o mecanismo de amortecimento não-fotoquímico mediante dissipação térmica. A rápida recuperação do rendimento quântico efetivo do PSII indica que a resposta de *S. gracile* sob elevadas intensidades luminosas certamente está associada à atividade do PSII visando com isso garantir que não ocorram danos fotossintéticos que possam reduzir a fotossíntese por longos períodos HENLEY *et al.* (1991), OSMOND; GRACE, (1995); JONES; HOEGH-GULDBERG, (2001). Evidencia-se, desse modo, que a rápida recuperação de F_v/F_m está associada ao rápido mecanismo reversível fotoprotetor de dissipação de energia (Q_e) que relaxa em poucos minutos e está associado ao gradiente transtilacoidal de pH (QUICK; HORTON 1984, MÜLLER *et al.*, 2001).

7. CONCLUSÃO FINAL

O cultivo da microalga *Selenastrum gracile* no fotobiorreator apresentou excelente desempenho, com fase exponencial de 8 dias e tempo de cultivo de 14 dias. Uma excelente relação foi observada entre a concentração celular e o peso seco, evidenciando que qualquer um desses parâmetros pode ser utilizado para monitorar as respostas de crescimento da espécie cultivada. O meio de cultura alternativo utilizado, preparado a partir de extrato de biocomposto hortifrútis, mostrou-se muito eficaz para o cultivo em massa dessa espécie, demonstrando ser possível desenvolver cultivos em massa com meios alternativos de baixo custo. A espécie cultivada apresentou excelentes condições fisiológicas durante todo o cultivo, evidenciadas pela elevada eficiência fotossintética ao longo do dia. Fotoinibição da fotossíntese foi registrada por volta das 13 horas quando ocorreu um pico extremamente elevado na taxa de iluminação, resultando numa diminuição da eficiência fotossintética. Evidenciou-se, também, que temperaturas mais elevadas, observadas a partir desse horário e até por volta das 15 horas, também reduzem a fotossíntese.

8. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Variar parâmetros de cultivo como temperatura, sombreamento e disponibilidade de nutrientes (testar efluentes), visando uma situação de estresse para que a microalga acumule mais lipídeos.
- Testar com outras espécies de microalgas de água doce e salina.
- Fazer análise de carboidrato lipídeos ácidos graxos, antioxidantes das biomassas, a fim de agregar maior valor econômicos.
- Trabalhar a eficiência energética a fim de minimizar os custos com o consumo da energia e torná-lo ainda mais sustentável.

9. REFERÊNCIAS

Algae: Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology BARSANTI, L. & GUALTIERI, P. 2006. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, USA, 301 pp. US\$119.95. ISBN: 0-8493-1467.-4

Autotrophic production of biodiesel from microalgae: TERCERO, E. A. R. DOMENICALI, G.; BERTUCCO, A. Journal article; Energy (Oxford) 2014 Vol.76pp.807-815 ref.49.

AHMED, F.*et al.* Profiling of carotenoids and antioxidant capacity os microalgae from subtropical coastal and brackish water. **Food Chemistry**, v. 165, p. 300-306, 2014.

AMIN, S. Review on biofuel and gas production processes from microalgae. **Energy Conversion and Mangement**, v.50, p. 1834-1840, 2009.

ANDERSEN, R.A. **Algal Culturing Techniques**. Elsevier Academic Press. 2005. 578 p.

ARREDONDO-VEGA, B.O.; VOLTOLINA, D. **Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal**. Centro de Investigaciones del Noroeste – CIBNOR(México). La Paz. 2007. 97 p.

BARCELLOS, F.C.; OLIVEIRA, J.C.; CARVALHO, P.G.M. **Investimento ambiental em indústrias sujas e intensivas em recursos naturais e energia**. Revista Iberoamericana de Economia Ecológica, v. 12, p. 33-50, 2009.

BERENGUEL, M.; RODRIGUEZ, F.; ACIÉN, F.G.; GARCIA, J.L. Model predictive control of pH in tubular photobioreactors. *Journal of Process Control*.n.14.p.377-387, 2004.

BRENNAN, L.; OWENDE, P. **Biofuels from microalgae a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and coproducts**. Renewable and Sustantable. Energy Reviews, v.14, p. 557-577, 2010.

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

CÁRDENAS, D. A. V. **Produção de biodiesel de óleo de macaúba** (acromia aculeata) via hidroesterificação. Rio de Janeiro, 2013. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Biocombustíveis e Petroquímica)- Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

CHANDRA, R.; ROHIT, M.V.; SWAMY, Y.V.; VENKATA MOHAN, S., Regulatory function of organic carbon supplementation on biodiesel production during growth and nutrient stress phases of *mixotrophic* microalgae cultivation. **Bioresour. Technol.** 165, 279–287. 2014.

CHEN, C.-Y.; YEH, K.-L.; AISYAH, R.; LEE, D.-J.; CHANG, J.- S. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review. **Bioresource Technology**, Elsevier BV, v. 102, n. 1, p. 71–81, jan 2011.

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

COLEMAN, L. W.; ROSEN, B. H.; SCHWARTZBACH, S. D. Environmental control of carbohydrate and lipid synthesis in *Euglena*. *Plant Cell Physiol*, 29, 423 – 432, 1988.

COPLIN, L. G. (Ed.). **Sustainable development of algal biofuels in the United States**. Washington: The National Academies Press, 2012.

CROCE, R., and VAN AMERONGEN, H. J. **Photochem. Photobiol. B**, 104, 142-153. 2011

CROCE, R., and VAN AMERONGEN, H. J. **Photochem. Photobiol. B**, **104**, 142-153.2011

CUARESMA, M.; GARBAYO, I.; VEGA, J.M.; VÍLCHEZ, C. Growth and photosynthetic utilization of inorganic carbon of the microalga *Chlorella* sp. DFLGRSKLOD isolated from Tinto river. *Enzyme and Microbial Technology*.n.40.p.158-162, 2006.

DARZINS, A.; PIENKOS, P.; EDYE, L. **Current status and potential for algal biofuels production. BioIndustry Partners & NREL**, Bioenergy, Task 39, 6 August, 2010.

DERNER, R.B., et al. (2006) Microalgae, Products and Applications. Microalgas, produtos e aplicações. **Revista Ciência Rural**, 36, 1959-1967.

DEVI, M.P.; SWAMY, Y.V.; VENKATA MOHAN, S., Nutritional mode influences lipid accumulation in microalgae with the function of carbon sequestration and nutrient supplementation. **Bioresour. Technol.** 142, 278–286. 2013.

DIVA, S.; ARNALDO, C., **Produção de Microalgas e Coprodutos**, Londrina. COPEL. 2014

FALKOWSKI, PG.; JA RAVEN. Aquatic Photosynthesis. Oxford. **Blackwell Scientific Publishers**. 374p. 1997.

FAO. Renewable biological systems for alternative sustainable energy production. 1997.

FRANZ, A.; LEHR, F.; POSTEN, C.; SCHAUB, G. Modeling microalgae cultivation productivities in different geographic locations-estimation method for idealized photobioreactors. **Biotechnology Journal**. 4, 546–557, 2012.

GALVÃO, R.M. *et al.* **Modeling of biomass production of Haematococcus pluvialis**. *Appl. Math.*, v.4, n.8A, p.50-56, 2013.

GARCIA L. A.; TORRI C.; SAMORI C.; BRILMAN D.W. **Hydrothermal Treatment (HTT) of Microalgae**: Evaluation of the Process As Conversion Method in an Algae Biorefinery Concept. *Energ. Fuels*. v. 26(1) p.642-57. 2012.

GHOSH, A.; KHANRA, S.; MONDAL, M.; HALDER, G.; TIWARI, O. N.; SAINI, S.; BHOWMICK, T. K.; GAYEN, K. Progress toward isolation of strains and genetically engineered strains of microalgae for production of biofuel and other value added chemicals. **Energy Conversion and Management**, v. 113, p. 104-118, 2016.

GONÇALVES, A. L.; PIRES, J. C. M.; SIMÕES, M. Biotechnological potential of *Synechocystis salina* co-cultures with selected microalgae and cyanobacteria: Nutrients removal, biomass and lipid production. **Bioresource Technology**, v. 200, p.279-286, 2016.

GRIFFITHS, M.J.; HARRISON, S.T.L. Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. *J Appl Phycol* 21: 493-507. 2009.

GROOM M J, GRAY E.M, TOWNSEND P.A. Biofuels and biodiversity: principle for creating better policies for biofuel production. *Conserv Biol*;22:602–9, 2008.

<https://repositorio.ufpb.br/jspui/handle/tede/9210>

HUNTLEY, M., REDALJE, D. CO₂ mitigation and renewable oil from photosynthetic microbes: a new appraisal. *Mitig. Adapt. Strategies Glob. Change* 12, 573–608, 2007.

Jiang, L.; Luo, S.; Fan, X.; Yang, Z.; Guo, R.; *Appl. Energy*, 88, 3336; Ohse, S.; Derner, R. B.; Ozório, R. A.; Braga, M. V. C.; Cunha, P.; Lamarca, C. P.; dos Santos, M. E.; *Biotemas* 2008, 21, 7 2011.

JUNEJA, A.; CEBALLOS, R.M.; GANTI, S., **Murthy effects of environmental factors and nutrient availability on the biochemical composition of algae for biofuels production: a review.** *Energies* 9, 4607–4638. 2013.

KALITA, N.; BARUAH, G.; GOSWAMI, R.C.D.; TALUKDAR, J., KALITA, M.C., *Ankistrodesmus falcatus*: A promising candidate for lipid production, its biochemical analysis and strategies to enhance lipid productivity. *J. Microbiol. Biotech. Res.* 1, 148–157. 2011.

KIM, J.; YOO, G.; LEE, H.; LIM, J.; KIM, K.; KIM, C. W.; PARK, M. S.; YANG, J. W. **Methods of downstream processing for the production of biodiesel from microalgae.** *Biotechnology Advances*. 31, 862–876, 2013.

KURANO, N.; IKEMOTO, H.; MIYASHITA, H.; HASEGAWA, T.; HATA, H.; MIYACHI, S. Fixation and utilization of carbon dioxide by microalgal photosynthesis. *Energy convers. Mgmt.* Vol. 36, nº 6-9: 689-692. 1995.

LEE, B.D.; APEL, W.A.; WALTON, M.R. **Screening of cyanobacterial species for calcification.** *Biotechnology Progress*.n.20.p.1345-1351, 2004.

LEE, R. E. **Phycology.** Cambridge University Press, 1999.

LOURENÇO, S. O. **Cultivo de Microalgas Marinhas - Princípios e Aplicações.** São Carlos: Editora RiMa. 606 p. 2006

MARIANO, A. B.; RAMOS, L. P.; VARGAS, J. V. C; PULLIAN, R.; BALMANT, W.; MORAIS, K. C. C.; DZUMAN, M. J.; ARANTES, A. C. C. **Comparação de meios de cultivo autotróficos, mixotróficos e heterotróficos para produção de biomassa de microalga com foco em biocombustíveis e coprodutos.** In: 5º Congresso Internacional de Bioenergia, 2009,. 5º Congresso Internacional de Bioenergia; 1º Congresso Brasileiro de Geração Distribuída e Energias Renováveis, Curitiba 2010.

MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Portugal, v. 14, pp. 217-232, May. 2009.

MENG, X. *et al.* **Biodiesel production from oleaginous microorganisms,** *Renewable Energy*, 34, 2009.

MEZZOMO, N.; SAGGIORATO, A.G.; SIEBERT, R.; TATSCH, P.O.; LAGO, M.C.; HEMKEMEIER, M.; COSTA, J.A.V.; BERTOLIN, T.E.; COLLA, L.M. Cultivation of microalgae *Spirulina platensis* (*Arthrospira platensis*) from biological treatment of swine wastewater. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 1, p. 173-178, 2010.

MONTERO, M.F.; ARISTIZÁBAL, M.; REINA, G.G. Isolation of High-Lipid Content Strains of the Marine Microalgae *Tetraselmis suecica* for Biodiesel production by Flow Cytometry and Single-Cell Sorting, **Journal of Applied Phycology**, v. 23, p. 1053-1057, 2011.

MORALES-SÁNCHEZ, D.; TINOCO-VALENCIA, R.; KYNDT, J.; MARTINEZ, A., Heterotrophic growth of *Neochloris oleo abundans* using glucose as a carbon source. **Biotechnol. Biofuels** 6, 100. 2013.

MUH, F., GLOCKNER, C., HELLMICH, J., and ZOUNI, A. **Biochim. Biophys. Acta**, **1817**, 44-65.2012

MUH, F., GLOCKNER, C., HELLMICH, J.e ZOUNI, A. **Biochim. Biophys. Acta**, 1817, 44-65. 2012.

NELSON, N. and YOCUM, C. F. **Annu Rev Plant Biol**. 2006. Biology and biochemistry of glucosinolates. **57**:303-33.

ONU BRASIL. Acordo global sobre mudança do clima é adotado em Paris. Disponível em: <<https://nacoesunidas.org/cop21/>> Acessado em: março/2019

PÉREZ, H.E.B. **Biodiesel de microalgas**. Disponível em: <www.energiaverde.com.br>; Acesso em: 10/01 2011.

PEREZ-GARCIA, O.; BASHAN, Y. **Microalgal heterotrophic and mixotrophic culturing for bio-refining: From metabolic routes to techno-economics**. In: *Algal Biorefineries*. Springer Science + Business Media, 2015. p. 61–131. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-20200-6_

RABINOWITCH, E., and GOVINDJEE **Photosynthesis**, Wiley, N. Y.1969

RADMANN, E.M.; COSTA, J.A.V. Conteúdo lipídico e composição de ácidos graxos de microalgas expostas aos gases CO₂, SO₂ e NO. **Química Nova**, vol.31, n.7, p. 1609-1612. 2008.

RAVEN, P. H., R. F. EVERT, AND W. H. EICHHORN. **Biology of Plants**. San Francisco. W. H. Freeman. 2005

RICHMOND, A. **Hanbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. Oxford: Blackwell Science, 2004.

RICHMOND, A. **Handbook of microalgal mass culture**. Boston: C.R.C. Press. ISBN 0-8493-3240-0,1990.

RICHMOND, A. In: **Handbook of Algal Mass Culture**; Richmond, A., ed.; CRC Press: USA, 1986.

RODOLFI, L. *et al.* Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnol Bioeng.*, 102, 100–112, 2009.

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

SIVA KIRAN, R.R.; MADHU, G.M.; SATYANARAYANA, S.V.; BINDIYA, P. Bioaccumulation of Cadmium in Blue Green Algae *Spirulina* (*Arthrospira*). **Journal of Bioremediation and Biodegradation**, v. 3, n. 3, p. 1-4, 2012.

SOARES, D. **avaliação do crescimento celular e daprodutividade de lipídeos de microalgas marinhas em diferentes regimes de cultivo** - 2010. 107p. Dissertação de mestrado Universidade federal do Paraná Curitiba 2010.

SUAREZ, P. A. Z.; SANTOS, A. L. F.; RODRIGUES, J. P.; ALVES, M. B.; *Quim. Nova* 32, 768.2009.

TALBOT, P., LENCKI, R. W.; LA NOUIE, J. **Carbon dioxide absorption characterization of abioreactor for biomass production of *Phormidium bohneri*: comparative study of three types of diffuser.** *Journal of Applied Phycology*, 2, p. 341-350, 1990.

TEBBANI, S.; LOPES, F.; FILALI, R.; DUMUR, D.; PAREAU, D. CO₂ biofixation. In: **CO₂ Biofixation by Microalgae**. [S.l.]: WileyBlackwell, 2014. p. 23–32.

TEIXEIRA, C.M.; MORALES, E. **Microalga como matéria-prima para a produção de biodiesel. Biodiesel o novo combustível do Brasil**, p.91-96, Brasília. 2008.

Ugwu, C., Aoyagi, H., and Uchiyama, H. Photobioreactors for mass cultivation of algae. *Bioresource Technology*, 99(10):4021–4028. 2008

VANTHOOR-KOOPMANS, M.; WIJFEELS, R. H.; BARBOSA, M, J.; EPPINK, M. H. M. Biorefinery of microalgae for food and fuel. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 142-149, 2013.

VANTHOOR-KOOPMANS, M.; WIJFEELS, R. H.; BARBOSA, M, J.; EPPINK, M. H. M. Biorefinery of microalgae for food and fuel. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 142-149, 2013.

VARFOLOMEEV, S. D.; WASSERMAN, L. A.; Microalgae as source biofuel, food, fodder, and medicines, **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 47, n. 9, p. 789-807, 2011.

VERMA, N. M.; MEHROTRA, SHAKTI.; SHUKLA, A.; MISHRA, B. N. Prospective of biodiesel production utilizing microalgae as the cell factories: A comprehensive discussion. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 10, p 1402-1411, 2010.

VIÊGAS, C. V. **Extração e caracterização dos lipídeos da microalga *Chlorella pyrenoidosa* visando à produção de ésteres graxos.**73 f. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2010.

VISVIKI, I.; SANTIKUL, D., The pH tolerance of *Chlamydomonas applanata* (Volvocales, Chlorophyta). **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, 147–151. 2000.

WANG, B., LI, Y., WU, N., LAN, C.Q. CO₂ bio-mitigation using microalgae. **Appl. Microbiol. Technol.** 79: 707-718.2008

WILLIAMS, P. R. D. *et al.* **Environmental and sustainability factors associated with next-generation biofuels in the U.S.: what do we really know?** Environ Sci Technol., 43, 4763–4775, 2009.