



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA



**AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO NA
FOTOFERMENTAÇÃO DA MICROALGA *Chlamydomonas reinhardtii***

LETÍCIA DE MOURA SOUSA

Uberlândia – MG

2016



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA



**AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO NA
FOTOFERMENTAÇÃO DA MICROALGA *Chlamydomonas reinhardtii***

Letícia de Moura Sousa

Orientadora: Profa. Dra. Fabiana Regina Xavier
Batista

Co-orientadora: Profa. Dra. Vicelma Luiz
Cardoso

Dissertação submetida ao Programa de Pós-
Graduação em Engenharia Química da
Universidade Federal de Uberlândia como
parte dos requisitos necessários à obtenção do
título de Mestre em Engenharia Química

Uberlândia – MG

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

L645a Sousa, Letícia de Moura, 1991-
2016 Avaliação das condições de cultivo na fotofermentação da microalga
 Chlamydomonas reinhardtii / Letícia de Moura Sousa. - 2016.
 110 f. : il.

 Orientadora: Fabiana Regina Xavier Batista.
 Coorientadora: Vicelma Luiz Cardoso.
 Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.
 Inclui bibliografia.

 1. Engenharia química - Teses. 2. Biocombustíveis - Síntese - Teses.
3. Álcool - Teses. 4. Biomassa vegetal - Teses. I. Batista, Fabiana Regina
Xavier. II. Cardoso, Vicelma Luiz. III. Universidade Federal de
Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. IV.
Título.

CDU: 66.0

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE LETÍCIA DE MOURA SOUSA SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM ENGENHARIA QUÍMICA, EM 22 DE JULHO DE 2016

BANCA EXAMINADORA



Profª. Drª. Fabiana Regina Xavier Batista

Orientadora (PPGEQ/UFU)



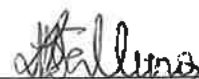
Profª. Drª. Vicelma Luiz Cardoso

Co-orientadora (PPGEQ/UFU)



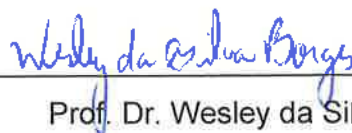
Profª. Drª. Juliana de Souza Ferreira

(FEQUI/UFU)



Profª. Drª. Larissa Nayhara Soares Santana Falleiros

(FEQUI/UFU)



Prof. Dr. Wesley da Silva Borges

(ULBRA)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus pela presença constante em minha vida e por não permitir que desistisse nas lutas mais difíceis.

Aos meus pais, Alfredo e Fátima, pelo amor incondicional e pela lição de amor que me ensinaram durante toda a vida. Obrigada por tudo que fizeram por mim, serei eternamente grata e nada que venha a fazer irá recompensar toda dedicação.

Aos meus irmãos, Guilherme e Leonardo, que serviram de suporte através de uma palavra de incentivo ou um gesto de compreensão.

Ao Luciano, que soube me ouvir e compreender nos momentos que precisei do seu apoio e carinho.

Aos meus familiares e amigos, que acreditaram em meu sucesso e caminharam comigo.

Em especial, gostaria de agradecer aos meus amigos Felipe e Marília pelo convívio diário que muitas vezes amenizaram os difíceis obstáculos, por estar sempre dispostos a me ajudar, mas, sobretudo pela amizade sincera.

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Fabiana Regina Xavier Batista pela confiança em meu trabalho, pelo apoio, carinho, dedicação, paciência, pelos conhecimentos e experiências transmitidas. Obrigada por exercer seu trabalho com profissionalismo e amor. A minha eterna admiração.

À Prof^a. Dr^a. Vicelma Luiz Cardoso pela intensa colaboração que contribuiu no desenvolver deste estudo.

Ao Prof. Dr. Wesley da Silva Borges pela ajuda na manutenção das algas, como também no treinamento dos equipamentos presentes no laboratório.

Aos alunos de iniciação científica Erisson e Gabriela pela ajuda nos experimentos e pelo comprometimento com o trabalho.

A todos os professores, funcionários e colegas do laboratório que também foram os responsáveis pela concretização deste trabalho.

Aos órgãos de fomento CNPq, Fapemig e CAPES pelo apoio financeiro.

Enfim, a todos que colaboraram de forma direta e indireta para o bom desempenho do trabalho.

SUMÁRIO

| | |
|---|------|
| LISTA DE FIGURAS | i |
| LISTA DE TABELAS | iii |
| LISTA DE QUADROS | v |
| ABREVIATURAS | vi |
| RESUMO | viii |
| ABSTRACT | ix |
| 1 - INTRODUÇÃO | 1 |
| 2 - OBJETIVOS | 4 |
| 3 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 5 |
| 3.1. Produção de biocombustíveis: obtenção convencional <i>versus</i> uso de microalgas | 5 |
| 3.1.1. Biodiesel..... | 6 |
| 3.1.2. Biogás..... | 7 |
| 3.1.2.1. Hidrogênio | 8 |
| 3.1.3. Etanol | 9 |
| 3.2. Metabolismo da alga | 13 |
| 3.2.1. Fatores que interferem no cultivo de microalgas na produção de biocombustíveis | 14 |
| 3.3. Bactéria fotossintetizante e sistema híbrido..... | 20 |
| 3.4. Escala de produção de biocombustíveis por algas | 22 |
| 4 - MATERIAL E MÉTODOS | 25 |
| 4.1. Alga verde e meio de cultivo | 25 |
| 4.2. Bactéria e meio de cultivo..... | 27 |
| 4.3. Cultivo do inóculo da alga | 28 |
| 4.4. Cultivo do inóculo da bactéria | 29 |
| 4.5. Condições para a fermentação | 29 |
| 4.5.1. Condições para a fermentação em reatores de 50 mL..... | 29 |
| 4.5.2. Condições para a fermentação em biorreator de 1,5 L..... | 29 |
| 4.6. Produção de etanol por fotofermentação em reatores de 50 mL | 30 |
| 4.6.1. Avaliação das fontes de carbono..... | 30 |
| 4.6.2. Avaliação do sistema híbrido | 31 |
| 4.6.3. Avaliação da supressão de ácido acético..... | 31 |
| 4.7. Produção de etanol por fotofermentação em biorreator de 1,5 L | 31 |
| 4.7.1. Avaliação do sistema híbrido | 31 |
| 4.8. Metodologia Analítica | 34 |
| 4.8.1. Determinação do crescimento celular | 34 |

| | |
|---|----|
| 4.8.2. Determinação da clorofila | 34 |
| 4.8.3. Análises cromatográficas | 36 |
| 4.8.3.1. Determinação de ácidos orgânicos, açúcares e etanol – cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) | 36 |
| 4.8.4. Determinação do teor de carbono total e nitrogênio total | 36 |
| 4.9. Determinação dos parâmetros cinéticos: taxa específica máxima de crescimento, tempo de duplicação e coeficientes de consumo específicos..... | 36 |
| 4.10. Produtividade | 37 |
| 5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO | 38 |
| 5.1. Escala reduzida: Reatores de 50 mL (Frascos de penicilina) | 38 |
| 5.1.1. Avaliação das fontes de carbono | 38 |
| 5.1.2. Avaliação do sistema híbrido | 57 |
| 5.1.3. Avaliação da supressão de ácido acético..... | 62 |
| 5.2. Escala ampliada: Reatores de 1,5 L | 74 |
| 5.2.1. Avaliação do sistema híbrido | 74 |
| 6 - CONCLUSÃO | 86 |
| 7 - SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS | 88 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 3.1 - Síntese de biocombustíveis através de diversas fontes de biomassa com destaque para as algas (Fonte: JONES e MAYFIELD, 2012). | 5 |
| Figura 3.2 - Reação de transesterificação (Fonte: JANAUN e ELLIS, 2010). | 6 |
| Figura 3.3 - Fluxograma básico do processo de produção de etanol e açúcar a partir da cana-de-açúcar (Adaptado de CORTEZ <i>et al</i> , 2010). | 10 |
| Figura 3.4 - Via metabólica de microalgas através de processos intracelulares no escuro. | 12 |
| Figura 3.5 - Diagrama das vias fermentativas da alga <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> (Fonte: Adaptado de PHILIPPS <i>et al.</i> , 2011). | 14 |
| Figura 3.6 - Reações de fotossíntese (Fonte: Modificado de LOPES, 2004). | 15 |
| Figura 3.7 - Sistema de lagoa aberta (Adaptado por BRENNAN e OWENDE, 2010; DEMIRBAS, 2010). | 23 |
| Figura 4.1 - Fluxograma das etapas desenvolvidas no trabalho. | 25 |
| Figura 4.2 - Biorreator de 1,5 L..... | 30 |
| Figura 5.1 - Cinética de crescimento celular do Ensaio 1. | 39 |
| Figura 5.2 - Consumo de glicose do Ensaio 1. | 41 |
| Figura 5.3 - Consumo de lactose do Ensaio 1. | 42 |
| Figura 5.4 - Evolução do ácido acético do Ensaio 1. | 42 |
| Figura 5.5 - Cinética de crescimento celular do Ensaio 2. | 44 |
| Figura 5.6 - Evolução do etanol do Ensaio 2..... | 46 |
| Figura 5.7 - Consumo de glicose do Ensaio 2. | 47 |
| Figura 5.8 - Consumo de lactose do Ensaio 2. | 48 |
| Figura 5.9 - Evolução do ácido acético do Ensaio 2. | 49 |
| Figura 5.10 - Cinética de crescimento celular do Ensaio 3. | 51 |
| Figura 5.11 - Evolução do etanol do Ensaio 3..... | 53 |
| Figura 5.12 - Consumo de lactose do Ensaio 3. | 54 |
| Figura 5.13 - Evolução do ácido acético do Ensaio 3. | 55 |
| Figura 5.14 - Evolução do teor de nitrogênio total do Ensaio 3..... | 56 |
| Figura 5.15 - Evolução do teor de carbono total do Ensaio 3. | 57 |
| Figura 5.16 - Cinética de crescimento celular do Ensaio 4. | 58 |
| Figura 5.17 - Evolução do etanol do Ensaio 4..... | 59 |
| Figura 5.18 - Consumo de glicose do Ensaio 4. | 61 |

| | |
|--|----|
| Figura 5.19 - Consumo de lactose do Ensaio 4. | 61 |
| Figura 5.20 - Evolução do ácido acético do Ensaio 4. | 62 |
| Figura 5.21 - Cinética de crescimento celular do Ensaio 5. | 63 |
| Figura 5.22 - Evolução do ácido acético do Ensaio 5. | 65 |
| Figura 5.23 - Evolução do teor de nitrogênio total do Ensaio 5. | 66 |
| Figura 5.24 - Evolução do teor de carbono total do Ensaio 5. | 66 |
| Figura 5.25 - Cinética de crescimento celular do Ensaio 6. | 67 |
| Figura 5.26 - Consumo de lactose do Ensaio 6. | 70 |
| Figura 5.27 - Evolução do ácido acético do Ensaio 6. | 70 |
| Figura 5.28 - Evolução do teor de nitrogênio total do Ensaio 6 em relação às condições do meio TAP com enxofre. | 72 |
| Figura 5.29 - Evolução do teor de nitrogênio total do Ensaio 6 em relação às condições do meio TAP isento de enxofre. | 72 |
| Figura 5.30 - Evolução do teor de carbono total do Ensaio 6 em relação às condições do meio TAP com enxofre. | 73 |
| Figura 5.31 - Evolução do teor de carbono total do Ensaio 6 em relação às condições do meio TAP isento de enxofre. | 73 |
| Figura 5.32 - Cinética de crescimento celular do Ensaio 7. | 75 |
| Figura 5.33 - Evolução do etanol do Ensaio 7. | 76 |
| Figura 5.34 - Consumo de lactose no Ensaio 7. | 77 |
| Figura 5.35 - Evolução do ácido acético do Ensaio 7. | 78 |
| Figura 5.36 - Cinética de crescimento celular do Ensaio 8. | 79 |
| Figura 5.37 - Evolução do etanol do Ensaio 8. | 80 |
| Figura 5.38 - Consumo de lactose do Ensaio 8. | 81 |
| Figura 5.39 - Evolução do ácido acético do Ensaio 8. | 82 |
| Figura 5.40 - Evolução do teor de nitrogênio total do Ensaio 8. | 83 |
| Figura 5.41 - Evolução do teor de carbono total do Ensaio 8. | 83 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 4.1 - Composição do meio TAP | 26 |
| Tabela 4.2 - Composição da solução TAP sais | 26 |
| Tabela 4.3 - Composição da solução de fosfato | 26 |
| Tabela 4.4 - Composição de traços de elementos..... | 26 |
| Tabela 4.5 - Componentes do TAP sais com a substituição dos sulfatos por cloreto | 27 |
| Tabela 4.6 - Componentes do traço de elementos com a substituição dos sulfatos por cloreto | 27 |
| Tabela 4.7 - Componentes do meio basal RCV originalmente utilizado para cultivo da <i>Rhodobacter capsulatus</i> | 28 |
| Tabela 4.8 - Composições da solução de micronutrientes utilizada no meio basal RCV | 28 |
| Tabela 5.1 - Dados de biomassa final, taxa específica máxima de crescimento e tempo de duplicação do Ensaio 1 | 38 |
| Tabela 5.2 - Quantificação da clorofila no início e no final da fermentação do Ensaio 1..... | 40 |
| Tabela 5.3 - Dados do consumo específico da glicose (q_{GLC}), da lactose (q_{LAC}), do açúcar total (q_{AT}) e do ácido acético ($q_{ác. acético}$) do Ensaio 1 | 41 |
| Tabela 5.4 - Dados de biomassa final, taxa específica máxima de crescimento e tempo de duplicação do Ensaio 2 | 43 |
| Tabela 5.5 - Quantificação da clorofila no início e no final da fermentação do Ensaio 2..... | 45 |
| Tabela 5.6 - Dados de concentração máxima de etanol produzido e respectivas produtividades volumétricas de etanol do Ensaio 2 | 45 |
| Tabela 5.7 - Dados do consumo específico da glicose (q_{GLC}), da lactose (q_{LAC}), do açúcar total (q_{AT}) e do ácido acético ($q_{ác. acético}$) do Ensaio 2 | 47 |
| Tabela 5.8 - Dados de biomassa final, taxa específica máxima de crescimento e tempo de duplicação do Ensaio 3 | 50 |
| Tabela 5.9 - Quantificação da clorofila no início e no final da fermentação do Ensaio 3..... | 52 |
| Tabela 5.10 - Dados de concentração máxima de etanol e respectivas produtividades volumétricas de etanol do Ensaio 3 | 52 |
| Tabela 5.11 - Dados do consumo específico da lactose (q_{LAC}) e do ácido acético ($q_{ác. acético}$) do Ensaio 3 | 54 |
| Tabela 5.12 - Dados de biomassa final, taxa específica máxima de crescimento e tempo de duplicação do Ensaio 4 | 58 |

| | |
|---|----|
| Tabela 5.13 - Dados de concentração máxima de etanol produzido e respectivas produtividades volumétricas de etanol do Ensaio 4 | 59 |
| Tabela 5.14 - Dados do consumo específico da glicose (q_{GLC}), da lactose (q_{LAC}) e do ácido acético ($q_{ác. acético}$) do Ensaio 4 | 60 |
| Tabela 5.15 - Dados de biomassa final, taxa específica máxima de crescimento e tempo de duplicação do Ensaio 5 | 63 |
| Tabela 5.16 - Quantificação da clorofila no início e no final da fermentação do Ensaio 5..... | 64 |
| Tabela 5.17 - Dados do consumo específico do ácido acético ($q_{ác. acético}$) do Ensaio 5 | 65 |
| Tabela 5.18 - Dados de biomassa final, taxa específica máxima de crescimento e tempo de duplicação do Ensaio 6 | 67 |
| Tabela 5.19 - Quantificação da clorofila no início e no final da fermentação do Ensaio 6..... | 68 |
| Tabela 5.20 - Dados do consumo específico da lactose (q_{LAC}) e do ácido acético ($q_{ác. acético}$) do Ensaio 6 | 69 |
| Tabela 5.21 - Dados de biomassa final, taxa específica máxima de crescimento e tempo de duplicação do Ensaio 7 | 74 |
| Tabela 5.22 - Dados do consumo específico da lactose (q_{LAC}) e do ácido acético ($q_{ác. acético}$) do Ensaio 7 | 77 |
| Tabela 5.23 - Quantificação da clorofila do Ensaio 8 | 80 |

LISTA DE QUADROS

| | |
|--|----|
| Quadro 3.1 - Vantagens e desvantagens dos sistemas abertos e fechados (BRENNAN e OWENDE, 2010; DEMIRBAS, 2010; RAZZAK <i>et al.</i> , 2013)..... | 24 |
| Quadro 4.1 - Sumarização dos ensaios realizados com suas respectivas condições avaliadas | 32 |
| Quadro 5.1 - Comparação da produção de etanol a partir de diferentes sistemas fermentativos | 84 |

ABREVIATURAS

3-PGA - 3-fosfoglicérico

$\mu_{\text{máx}}$ - Taxa específica máxima de crescimento

ACK - Quinase de etilo

ADH - Álcool desidrogenase

ADH1 - Desidrogenase aldeído/álcool

AT - Açúcar total

CH₄ - Metano

CO - Monóxido de carbono

CO₂ - Dióxido de carbono

COT - Carbono orgânico total

D-LDH - D-lactato desidrogenase

Fd - Ferredoxina

GLC - Glicose

H₂ - Hidrogênio

H₂ease - Hidrogenase

H₂S - Sulfeto de hidrogênio

LAC - Lactose

N₂ - Nitrogênio molecular

NT - Nitrogênio total

O₂ - Oxigênio

PDC - Piruvato descarboxilase

PFL1 - Piruvato formato-liase

PFR1 - Piruvato ferredoxina oxido-redutase

PNS - Púrpura não sulfurosa

Proálcool - Programa de Álcool Brasileiro

PSL - Permeado de soro de leite

PTA - Fosfoacetiltransferase

q_i - Coeficiente de consumo específico

RCV - *Rhodobacter capsulatus* V minimal medium

RuBP - Ribulose-1,5-bifosfato

SF - Sólidos fixos

SL - Soro de leite
ST - Sólidos Totais
SV - Sólidos voláteis
TAGs - Triacilgliceróis
TAP - *Tris Acetate Phosphate*
TAP-AC - TAP isento de ácido acético
TAP-S - TAP isento de enxofre
TAP-S-AC - TAP isento de enxofre e de ácido acético
 t_d - Tempo de duplicação
UV - Luz ultravioleta

RESUMO

Diante do cenário atual de esgotamento de combustíveis fósseis, alterações climáticas, elevados preços do petróleo aliado aos conflitos políticos, econômicos e ambientais, surge à necessidade de se investigar tecnologias sustentáveis para a produção de energia. Neste contexto, a síntese de biocombustíveis, especificamente, o etanol a partir de microalgas tem se destacado. Desta forma, o uso da alga verde unicelular *Chlamydomonas reinhardtii*, que em condições de anaerobiose e associada a outros micro-organismos, tem sido investigada. Neste estudo, culturas de *C. reinhardtii* foram submetidas a fermentações em reatores de 50 mL e 1,5 L mantidas a 25 °C, sob foto-período de 12 horas, nas quais condições operacionais como supressão de enxofre e de ácido acético foram investigadas. A avaliação da influência de fontes de carbono mixotróficas e a utilização de efluente proveniente da fotofermentação bacteriana (sistema híbrido) também foram verificadas. Os resultados em escala reduzida mostraram que o cultivo da alga em meio basal *Tris Acetate Phosphate* (TAP) não resultou na produção de etanol, mesmo quando adicionada glicose e/ou lactose presente no permeado de soro de leite (PSL), ambas na concentração inicial de 1 g/L. No entanto, quando foi utilizado o meio TAP com supressão de enxofre na presença das mesmas fontes de açúcar, houve a produção de etanol, na qual a máxima concentração em escala reduzida atingiu 1189,91 mg/L. Na sequência foi avaliado o uso do meio TAP suplementado com três diferentes fontes de lactose: PSL (70 % de lactose), soro de leite (50 % de lactose) e lactose PA, com uma concentração inicial ajustada para 5 g/L de lactose. A produção de etanol ocorreu nas três condições, sendo que a máxima produtividade foi de 2,31 mmol de etanol/L.dia, verificada no meio contendo PSL. Na avaliação da supressão de ácido acético no meio TAP e no meio TAP isento de enxofre, a produção de etanol foi insignificante, mesmo com a adição de fontes de açúcar. Na etapa da avaliação do sistema híbrido, os resultados em escala reduzida mostraram a produção de etanol na presença de glicose e PSL, adicionadas isoladamente ao efluente da fotofermentação da bactéria fotossintetizante *Rhodobacter capsulatus* (RCV metabolizado) em uma concentração inicial de 5 g/L de glicose ou lactose. Entretanto, uma maior produção de etanol (1357 mg/L) foi observada no reator de 1,5 L, operando com reabastecimentos de meio fresco suplementado com PSL a cada 48 horas.

Palavras-chave: Etanol, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Rhodobacter capsulatus*, sistema híbrido.

ABSTRACT

Regarding the current scenario of fossil fuels depletion, climate change, high oil prices coupled with political, economic and environmental conflicts, the investigation of sustainable technologies for energy production became necessary. In this contest, biofuel (ethanol) synthesis from microalgae has been highlighted. The green alga *Chlamydomonas reinhardtii* under anaerobic conditions and associated with other micro-organisms have been investigated. In the current work, cultures of *C. reinhardtii* were submitted to fermentations using bioreactors (50 mL and 1.5 L of capacity) at 25 °C and 12-hour photoperiod, under operational conditions such as sulphur (TAP-S medium) and acid acetic (TAP-AC medium) depletions. The influence of mixotrophic carbon sources and the use of effluent from the bacterium photo-fermentation (hybrid system) were also verified. The findings in low scale (50 mL) showed that green alga cultivated in basal medium *Tris Acetate Phosphate* (TAP) did not result in ethanol production, since glucose and lactose from milk whey permeate (MWP) have been added, both at 1 g/L. Although, TAP-S medium supplemented with carbon sources resulted in ethanol production, being 1189.91 mg/L maximum ethanol concentration observed in low scale. In the following, TAP medium supplemented with three different sources of lactose was evaluated, being MWP (70 % lactose), MW (50 % lactose) and lactose PA, at initial concentration adjusted to 5 g/L. The ethanol production occurs in all cases. Maximum volumetric productivity was 2.31 mmol ethanol/L.day. It was verified in the medium supplement with MWP. In TAP-S and TAP-AC media the ethanol production was negligible, even with carbon source addition. To hybrid system, the result in low scale showed ethanol production in the presence of glucose and MWP, added alone for the photosynthetic bacterium (*Rhodobacter capsulatus*) medium (metabolized RCV) at 5 g/L. However, the highest ethanol production (1357 mg/L) was observed in the 1.5 L reactor, adding refreshed medium supplemented with MWP every 48 hours.

Keywords: Ethanol, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Rhodobacter capsulatus*, hybrid system.

1 - INTRODUÇÃO

Diante do aquecimento global, do esgotamento dos combustíveis fósseis, dos elevados preços do petróleo e, em conjunto com as instabilidades políticas, econômicas e ambientais, surge a necessidade de se investigar fontes alternativas, sustentáveis e renováveis para a obtenção de biocombustíveis. Entretanto, a proposta para a síntese de biocombustíveis de primeira geração a partir do uso de açúcares, amido, vegetais ou óleos de animais por meio de tecnologia convencional (SINGH e SINGH, 2010) tem como desvantagem a exigência do uso de terras agrícolas, comumente utilizadas na produção de recursos alimentares (ROSEGRANT *et al.*, 2006). Para contornar esta situação, processos de síntese de biocombustíveis classificados como de segunda geração, ou seja, à base do uso de resíduos agrícolas, tais como madeira, palha e folhas têm sido desenvolvidos, ainda que baixos rendimentos tenham sido observados até o momento (WOO *et al.*, 2012). Além disso, a obtenção de biocombustíveis de segunda geração requer tecnologias caras e sofisticadas (BRENNAN e OWENDE, 2010; DRAGONE *et al.*, 2010).

Assim, atualmente, diversos pesquisadores concentram seus esforços no desenvolvimento de processos de obtenção de biocombustíveis de terceira geração com o uso de matéria-prima sustentável. Neste contexto, destaca-se a utilização de micro-organismos diversos, bem como resíduos orgânicos para a produção de hidrogênio, biodiesel e etanol (ÇAKMAK *et al.*, 2014). É importante salientar que o etanol mostra-se como uma excelente escolha de combustível por apresentar uma queima limpa, já que seus produtos da combustão são ambientalmente seguros (KITO-BORSA *et al.*, 1998). Desta forma, tem se tornado crescente o interesse para a produção de etanol a partir da biomassa de algas (BARAS, GACESA e PEJIN, 2002; KIM e DALE, 2003; SÁNCHEZ e CADONA, 2008), uma vez que dentre suas vantagens podem-se mencionar as taxas de crescimento elevadas, facilidade em serem cultivadas com altos rendimentos e custos baixos, além de utilizarem uma fonte inesgotável de energia que é a luz solar (HIRAYAMA *et al.*, 1998; SZE, 1998).

Além disso, as algas podem se reproduzir tanto em água doce como em água salgada, não sendo necessárias terras agrícolas para a produção de sua biomassa (SCOTT *et al.*, 2010). Deve-se citar ainda que as algas possuem a capacidade de adaptar-se na natureza com uma diversidade de condições climáticas (BHARATHIRAJA *et al.*, 2015) e crescem mesmo em águas residuais industriais, municipais e agrícolas (BHARATHIRAJA *et al.*, 2015; DEMIRBAS, 2011).

É necessário destacar que as algas são capazes de absorver os gases de efeito estufa, como também capturar dióxido de carbono (CO₂), convertendo-o em biomassa e liberando oxigênio através da fotossíntese (DEMIRBAS, 2011). Adicionalmente, as algas representam uma fonte de combustível não tóxico, altamente biodegradável (ULLAH *et al.*, 2015) e com rápida biorremediação (BHARATHIRAJA *et al.*, 2015). Destaca-se ainda que os combustíveis produzidos a partir das algas podem promover benefícios como a criação de novos postos de trabalho, além de aliviar os efeitos negativos dos elevados preços de petróleo e reduzir a dependência da sua importação (ZIOLKOWSKA e SIMON, 2014).

Dentre a extensa variedade de microalgas com potencial tecnológico pode-se citar a alga verde unicelular *Chlamydomonas reinhardtii*, conhecida como micro-organismo foto-autotrófico capaz de fixar dióxido de carbono e acumular em suas paredes celulares polissacarídeos, principalmente o amido (HALL e RAO, 1994). Com base em sua rota metabólica, este amido pode ser convertido em piruvato, o qual serve como substrato para a síntese de diversos produtos como o ácido acético, ácido fórmico, etanol, CO₂, hidrogênio (H₂), entre outros (PHILIPPS *et al.*, 2011).

Entretanto, o principal desafio enfrentado pela produção de etanol por algas é garantir uma viabilidade técnico-econômica do processo, tornando-o assim comercialmente viável. Para tal, inovações tecnológicas são necessárias (JOHN *et al.*, 2011). Com base nesta abordagem, alguns pontos devem ser superados como a concorrência de diferentes caminhos para o metabolismo de carbono, incluindo a biossíntese e armazenamento de carboidratos que podem limitar a produção de etanol (DENG e COLEMAN, 1999).

Outro ponto a ser abordado é o cultivo de algas em lagoas, havendo a possibilidade de contaminação e o surgimento de predadores e outras espécies de algas mais adaptadas ao novo ambiente (JOHN *et al.*, 2011). Além disso, a falta de uma política transparente estabelecendo subsídios e incentivo é um fator que desestimula a produção de etanol à base de algas (SINGH, NIGAM e MURPHY, 2011; ZIOLKOWSKA e SIMON, 2014).

Com isso, o presente estudo vislumbrou contribuir com um maior entendimento do comportamento metabólico da *C. reinhardtii* em termos do crescimento celular e síntese de metabólitos, além de investigar novas possibilidades que viabilizem a produção de etanol como a determinação da influência dos parâmetros fontes de carbono, supressão de enxofre e de ácido acético, bem como, diferenciados sistemas de cultivo celular: reatores de 50 mL de capacidade e de até 1,5 L. Por fim, a avaliação do uso de um sistema híbrido utilizando como

INTRODUÇÃO

meio para a alga o efluente proveniente da fotofermentação de bactérias fotossintetizantes para produção de etanol também foi verificada.

2 - OBJETIVOS

O trabalho desenvolvido apresentou como objetivo geral a avaliação da funcionalidade de uma plataforma tecnológica alternativa para a produção de biocombustível (etanol), utilizando como fonte renovável microalgas, mais especificamente, a alga verde unicelular *C. reinhardtii*. Dentre os objetivos específicos destacaram-se:

- Avaliar o potencial produtor de etanol da alga *C. reinhardtii* em termos da variação de parâmetros operacionais como supressão de enxofre e de ácido acético, fontes de carbono (glicose, lactose, permeado de soro de leite e soro de leite).
- Avaliar o uso de um sistema híbrido contemplando a associação da alga verde *C. reinhardtii* e da bactéria fotossintetizante *Rhodobacter capsulatus* para a obtenção do etanol.
- Determinar a cinética de crescimento celular, da síntese de produto e subprodutos visando um maior entendimento do metabolismo dos sistemas fermentativos utilizados.

3 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Produção de biocombustíveis: obtenção convencional *versus* uso de microalgas

A situação atual dos combustíveis fósseis e o esgotamento de suas reservas, bem como as alterações climáticas, o elevado preço do petróleo juntamente com o desgaste ambiental tornaram-se preocupação mundial, pressionando os governos, políticos e pesquisadores a desenvolverem processos sustentáveis nos quais fontes renováveis para a produção de energia fossem verificadas. Neste contexto, a síntese de biocombustíveis a partir de microalgas tem se destacado. Dentre os co-produtos fornecidos por estes micro-organismos podem ser citados o etanol, biodiesel, hidrogênio e biogás (JONES e MAYFIELD, 2012).

Destaca-se que um dos métodos mais econômicos para a produção dos biocombustíveis por meio de algas é a abordagem das biorrefinarias, nas quais vários produtos são processados à base de uma fonte de biomassa. A Figura 3.1 ilustra a versatilidade observada na utilização de algas para a síntese de biocombustíveis quando comparada a outras alternativas.

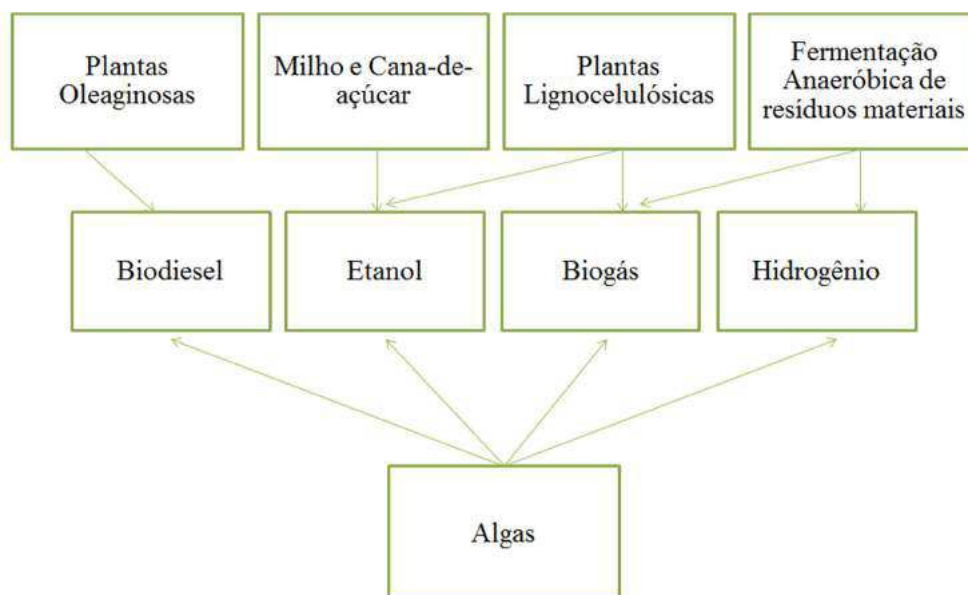


Figura 3.1 - Síntese de biocombustíveis através de diversas fontes de biomassa com destaque para as algas (Fonte: JONES e MAYFIELD, 2012).

As algas se caracterizam como organismos fotossintéticos com capacidade de produzir constituintes com altos rendimentos de óleo e biomassa, podendo ser cultivadas em terras não aráveis, de forma a não competir com os produtos alimentares (HANNON *et al.*,

2010). Entretanto, o principal destaque das algas é sua versatilidade já que estes micro-organismos são capazes de tolerar e adaptar-se a uma diversidade de condições ambientais, além de produzirem uma variedade de fontes de biocombustíveis (Figura 3.1). Nos itens a seguir é possível observar o potencial tecnológico das algas para a produção de biocombustíveis diversos.

3.1.1. Biodiesel

Os lipídios utilizados na síntese de biodiesel são extraídos de matérias-primas tais como sementes oleaginosas, como a soja, palma, amendoim, óleo de girassol, milho e algodão. Contudo, há diversos fatores que influenciam na produção deste combustível, como por exemplo, a disponibilidade de grandes áreas com solo adequado, água, sazonalidade, dentre outros. Em geral, o biodiesel, que pode ser considerado um substituto do diesel convencional, é produzido a partir de um processo de transesterificação ou esterificação (Figura 3.2). A etapa de transesterificação consiste na utilização de fluidos supercríticos, processos enzimáticos e ainda pela catálise por meio ácido ou alcalino (FUKUDA, KONDO e NODA, 2001). Esta reação de transesterificação apresenta como produtos o éster metílico ou etílico e como subprodutos o glicerol (XUAN *et al.*, 2009). Após a etapa de transesterificação o composto final pode ser recuperado por decantação ou centrifugação.

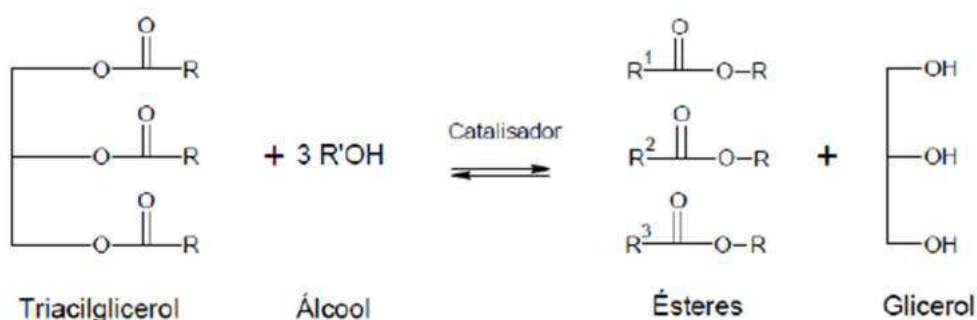


Figura 3.2 - Reação de transesterificação (Fonte: JANAUN e ELLIS, 2010).

A fase mais pesada é composta por glicerina e também excesso de álcool, de água e impurezas provenientes da matéria-prima. A fase composta de álcool e água é destinada ao processo de evaporação, sendo eliminados os compostos voláteis da glicerina que são recuperados por meio da liquefação em um condensador adequado. Os ésteres são submetidos ao processo de centrifugação e desumidificação resultando em um biodiesel com características que atendem as normas técnicas padronizadas para o uso deste combustível em motores de ciclo diesel (MA e HANNA, 1999).

Por outro lado, a biomassa de microalgas tem despertado um crescente interesse uma vez que é considerada uma excelente fonte de lipídios, além de apresentar um elevado rendimento de óleo por hectare quando comparada com culturas oleaginosas tradicionais (MATA, MARTINS e CAETANO, 2010). Dentre as inúmeras espécies de microalgas, o teor de óleo pode alcançar até 80 %, enquanto que os níveis comuns encontram-se em torno de 20 a 50 % (POWELL e HILL, 2009).

Assim como se processa os óleos vegetais, o óleo presente nas microalgas, após ser extraído, pode ser convertido em biodiesel por meio do processo de transesterificação (Figura 3.2), sendo esta a tecnologia mais empregada no processamento de óleos vegetais a fim de produzir ésteres graxos (JANAUN e ELLIS, 2010).

O teor de carbono e hidrogênio é maior em biocombustíveis a partir de microalgas do que em biocombustíveis a partir de plantas, no entanto o teor de oxigênio é menor. A razão molar de H/C e O/C em biocombustíveis a partir de microalgas encontra-se em 1,72 e 0,26 respectivamente, enquanto que para os biocombustíveis a partir de plantas estas relações encontram-se em 1,38 e 0,37, respectivamente (MIAO, WU e YANG, 2004). Deve-se destacar que o alto teor de carbono e hidrogênio juntamente com o baixo teor de oxigênio, permite que os biocombustíveis a partir de microalgas tornem-se mais estáveis do que os biocombustíveis a partir de plantas. A presença de um alto teor de hidrogênio em biocombustíveis a partir de microalgas deve-se a presença de clorofila e proteínas.

Quando se compara os biocombustíveis a partir de plantas e de microalgas, estes apresentam propriedades físico-químicas como poder calorífico maior e viscosidade e densidade baixas, que os tornam mais apropriados do que os biocombustíveis a partir de materiais lignocelulósicos (MIAO, WU e YANG, 2004).

3.1.2. Biogás

Atualmente, as microalgas também têm despertado interesse na produção de biogás via fermentação anaeróbia. O biogás é composto, principalmente, de 55 a 65 % de metano (CH_4), 30 a 45 % de dióxido de carbono (CO_2), concentrações baixas de sulfeto de hidrogênio (H_2S) e vapor de água (COONEY *et al.*, 2007; KAPDI *et al.*, 2005), podendo ainda apresentar pequenas quantidades de hidrogênio (H_2) e monóxido de carbono (CO) (BAILEY e OLLIS, 1986).

A produção de biogás ocorre por meio da digestão anaeróbia, que consegue ser otimizada quando são utilizados compostos com teor de umidade que variam entre 80 a 90 %.

Neste contexto a biomassa das algas é altamente apropriada (BRENNAN e OWENDE, 2010). O processo de digestão anaeróbia consiste em três etapas sequenciais: hidrólise, fermentação e metanogênese. A hidrólise de componentes complexos resulta na quebra de carboidratos em açúcares solúveis. Em seguida, a fermentação compreende a ação das bactérias, as quais convertem a biomassa em álcoois, ácido acético, ácidos graxos pesados e gás contendo em sua composição H_2 e CO_2 , sendo estes, principalmente, metabolizados em CH_4 (60,0 – 70,0 %) e CO_2 (30,0 – 40,0 %) por meio da metanogênese. Ao converter a biomassa de microalgas em biogás, além de se recuperar a energia por meio da extração de lipídios, estes ainda podem ser utilizados para a produção de biodiesel (BRENNAN e OWENDE, 2010).

Entretanto, as microalgas podem elevar a produção de proteínas e com isso reduzir a relação de C/N, o que afeta negativamente a eficiência da digestão anaeróbia. Este problema pode ser solucionado por co-digestão com produtos que apresentam elevado teor da relação C/N (BRENNAN e OWENDE, 2010). Segundo os estudos de YEN e BRUNE (2007), a produção de biogás aumentou quando foram adicionados resíduos a partir da reciclagem de papel para biomassa de microalgas. O resultado desta pesquisa foi a duplicação da produção de biogás (0,57 mL/L.dia), utilizando uma relação de 1:1 de resíduos/biomassa, ao comparar a digestão anaeróbia contendo apenas biomassa de alga.

3.1.2.1. Hidrogênio

Nos últimos anos, a pesquisa de produção de biocombustíveis a partir de algas tem focado na obtenção de combustíveis líquidos como o biodiesel e etanol. No entanto, as algas também se destacam por serem fontes comerciais de hidrogênio, sendo este utilizado na geração de eletricidade e gás combustível (MUSSGUG *et al.*, 2010).

As microalgas fotossintéticas e cianobactérias possuem a capacidade de produzir hidrogênio diretamente através da fotofermentação em processo anaeróbio com a oxidação da ferredoxina por meio da enzima hidrogenase (YACOBY *et al.*, 2011). Com isso, um número expressivo de pesquisas recentes sobre a produção de hidrogênio a partir de microalgas tem focado nas atividades da hidrogenase a fim de compreender sua interação com a ferredoxina. Além disso, a compreensão de alterações genéticas com o objetivo de elevar a eficiência na produção de hidrogênio também tem sido explorada (MEUSER *et al.*, 2009; WECKER *et al.*, 2011; YACOBY *et al.*, 2011).

Microalgas apresentam características genéticas, metabólicas e enzimáticas propensas para fotoprodução de hidrogênio (BRENNAN e OWENDE, 2010). A sua

capacidade de síntese está associada à exposição em condições específicas e sistemas fechados que facilitem a coleta de hidrogênio. Não obstante, a produção de hidrogênio pode ser elevada com base no teor de carbono da biomassa (BENEMANN, 1997).

Através das condições anaeróbias, as microalgas eucarióticas produzem hidrogênio como um doador de elétrons no processo de fixação de dióxido de carbono. Na fotossíntese, as microalgas convertem água em íons de hidrogênio e oxigênio. Os íons de hidrogênio são convertidos em H₂ por meio da enzima hidrogenase (GHIRARDI *et al.*, 2000; HAHN, GHIRARDI e JACOY, 2004). Entretanto, a produção fotossintética de oxigênio (O₂) provoca a rápida inibição da enzima hidrogenase e a produção de H₂ é desfavorecida. Desta forma, conclui-se que a produção de hidrogênio a partir das microalgas deve ser realizada em condições anaeróbias (BENEMANN, 2000; BRENNAN e OWENDE, 2010).

3.1.3. Etanol

Atualmente, espera-se que o biocombustível mais utilizado seja o etanol, uma vez que sua produção pode ocorrer a partir de fontes de biomassa ricas em amido e celulose. Os países que produzem etanol no mundo com forte apelo comercial são Brasil, Estados Unidos e Canadá (CHIARAMONTI, 2007). Este combustível caracteriza-se por ser pouco tóxico, facilmente biodegradável, além de seu uso fornecer menor quantidade de poluentes transportados pelo ar do que os combustíveis à base de petróleo. Assim, a mistura de etanol e gasolina pode contribuir para redução das emissões de gases de efeito estufa. Dentre as aplicabilidades do etanol, pode-se citar a de combustível para geração de energia elétrica, em células de combustível (de ação termo-química) e em sistemas de co-geração de energia, bem como matéria-prima na indústria química (PETROU e PAPPIS, 2009).

É importante destacar que o Brasil foi o país pioneiro em desenvolver um programa para incentivar o uso de um combustível alternativo ao petróleo. Este programa foi criado em 1975, Programa do Alcool Brasileiro (Proálcool), cuja finalidade foi diminuir as importações de petróleo através da produção de etanol utilizando a cana-de-açúcar (MOREIRA e GOLDEMBERG, 1999).

O etanol pode ser produzido por fermentação de diversas fontes de biomassa, como de açúcar ou culturas de amido, incluindo cana-de-açúcar, beterraba, milho e trigo, ou a partir de biomassa lignocelulósica. A matéria-prima mais utilizada no Brasil para a produção de etanol é a cana-de-açúcar, enquanto que nos Estados Unidos e União Europeia utiliza-se milho e beterraba, respectivamente (CHIARAMONTI, 2007).

A configuração industrial empregada no Brasil está representada na Figura 3.3, mostrando que ocorre a produção de etanol juntamente com a produção de açúcar.

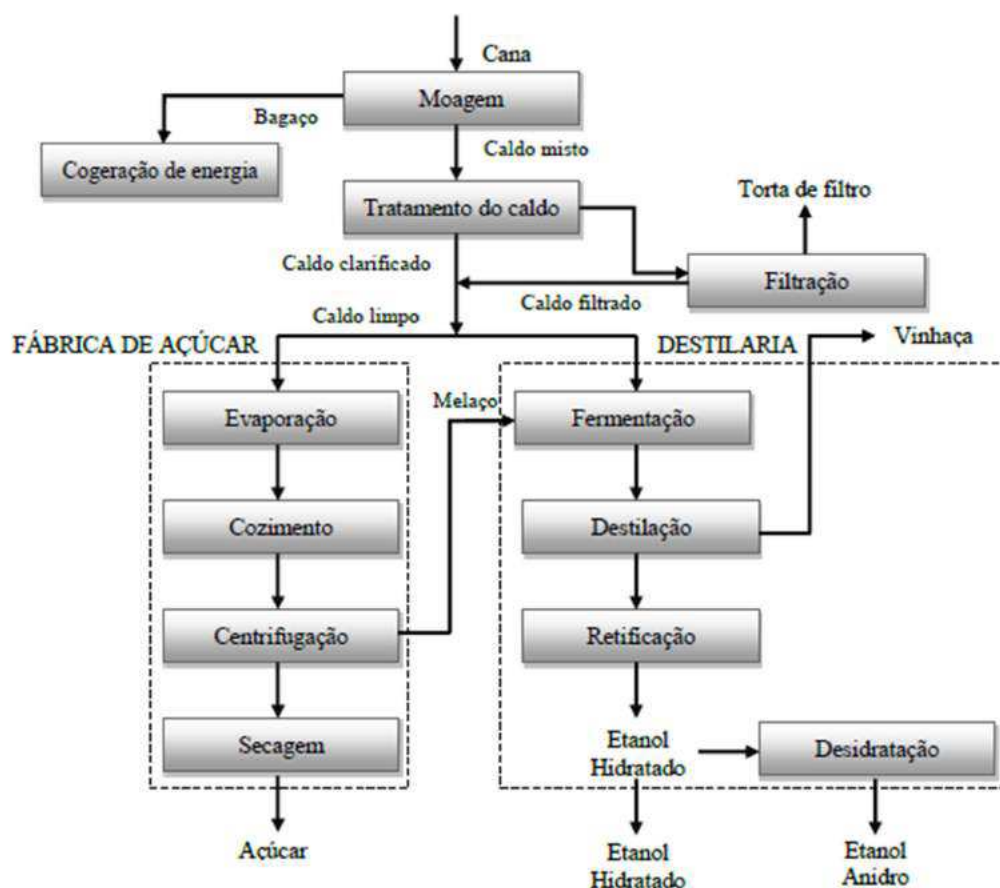


Figura 3.3 - Fluxograma básico do processo de produção de etanol e açúcar a partir da cana-de-açúcar (Adaptado de CORTEZ *et al*, 2010).

Os processos industriais para a fermentação de melaço, beterraba ou de cana-de-açúcar para produção de etanol encontram-se estabelecidos, sendo que a fermentação direta utilizando estas fontes de biomassa consiste em um método menos complexo. Apesar do custo de preparação de etanol à base de açúcares ser baixo, observa-se consideravelmente alto o custo das matérias-primas (JOHN *et al.*, 2011).

Quando se trata da biomassa lignocelulósica rica em amido, resíduos vegetais, ervas, serragem, lascas de madeira e estrume de animal, matérias-primas estas que oferecem baixo custo, um tratamento enzimático deve ser efetuado resultando em hidrolisados tidos como açúcares fermentáveis para uma produção subsequente de biocombustíveis por micro-organismos. Entretanto, a viabilidade para utilização destas matérias-primas é na maioria das vezes limitada em função do baixo rendimento, sendo que o custo final é elevado em relação ao processo de hidrólise por meio das tecnologias atuais (JOHN *et al.*, 2011). Deve-se

mentonar ainda que a lignina presente na biomassa lignocelulósica apresenta dificuldade de ser biologicamente degradada, não podendo ser fermentada (HARUN, DANQUAH e FORDE, 2010).

Outra fonte potencial de substrato fermentável para produção de etanol são as microalgas, devido às condições de crescimento, uma vez que podem apresentar em sua composição níveis elevados de compostos de carbono, sendo diretamente disponíveis para fermentação. Dentre muitas espécies de microalgas que são capazes de produzir etanol por processos fermentativos, destacam-se a *Chlamydomonas sp.*, *Chlorella sp.*, *Oscillatoria sp.*, *Cyanothece sp.* e *S. platensis* (UENO, KURANO e MIYACHI, 1998).

A produção de etanol por algas pode ser realizada por diversos métodos. O método mais convencional engloba o cultivo dos micro-organismos, a coleta das células, a preparação da biomassa, a fermentação e o processo de extração de etanol. A etapa da preparação da biomassa pode ser executada por equipamentos mecânicos ou enzimas que realizam o rompimento das paredes celulares das microalgas, fazendo com que os carboidratos estejam disponíveis, como também podem quebrar moléculas grandes de carboidratos. Ao romper as células, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* é adicionada a biomassa e assim, a fermentação é iniciada. Com isso, o açúcar é metabolizado em etanol por ação das leveduras (AMIN, 2009). Finalmente, o etanol é submetido à destilação com o intuito de remover água e outras impurezas. Logo, o etanol concentrado (95 % de etanol) é extraído e condensado, podendo ser acrescentado aos combustíveis fósseis ou ainda utilizado diretamente como combustível (BRENNAN e OWENDE, 2010; DEMIRBAS, 2001; NIGAM e SINGH, 2010).

Outra forma de produção de etanol por algas ocorre em condições anaeróbias e no escuro, como pode ser verificado nos estudos de HIRANO *et al.* (1997). Observou-se a conversão de amido intracelular em etanol sob condições anaeróbias e de pouca luz em quase todas as cepas testadas. No entanto, os rendimentos de conversão foram diferentes. As taxas mais elevadas de conversão encontraram-se entre 30 e 40 %, com um rendimento teórico de 0,56 g de etanol por 1 g de amido, em cepas de *C. reinhardtii* (UTEX2247) e Sak-1. Foi verificado também que o pH adequado para a produção de etanol por meio da estirpe *C. reinhardtii* foi de 7-8 a uma temperatura entre 25-30 °C. Além disso, conclui-se que a produção de etanol foi diretamente proporcional ao aumento da biomassa.

Quando as microalgas estão na presença de oxigênio e no escuro, seu metabolismo consiste no consumo de amido ou armazenamento de glicogênio nas células, decompondo-os através de oxidação para dióxido de carbono. Contudo, se as condições anaeróbias e no escuro

estão estabelecidas, a reação oxidativa do amido fica incompleta e produtos como dióxido de carbono, etanol, ácido láctico, ácido fórmico, ácido acético e outros são produzidos em proporções variáveis dependendo da microalga utilizada (JOHN *et al.*, 2011).

Com isso, o etanol fornecido por microalgas como produto principal na fermentação anaeróbia e no escuro é direcionado para o processo de purificação e destinado como combustível, enquanto que o dióxido de carbono pode ser reciclado, sendo destinado ao cultivo das microalgas como fonte de nutrientes, diminuindo desta forma emissões de gases de efeito estufa (HARUN, DANQUAH e FORDE, 2010).

Por outro lado, o etanol pode ser diretamente produzido pelas microalgas utilizando a engenharia genética com o objetivo de alterar suas rotas metabólicas para a conversão etanólica. Sumariamente, conforme discutido por JOHN *et al.* (2011), a fotossíntese das algas consiste no ciclo de Calvin em que a ribulose-1,5-bifosfato (RuBP) se combina com CO₂ para a produção de dois ácidos 3-fosfoglicérico (3-PGA), sendo utilizado para a síntese de glicose e outros metabólitos. Com isso, o desafio é redirecionar 3-PGA em etanol pela introdução de genes produtores deste biocombustível.

Ainda segundo ONCEL (2013), o etanol pode ser excretado pelas microalgas por meio de suas paredes celulares em processos intracelulares no escuro, uma vez que a degradação do amido intracelular em piruvato ocorre pelas vias Embden-Meyerhof-Parnas e fosfato pentoses utilizando piruvato descarboxilase e enzimas álcool desidrogenase (Figura 3.4). Em vista do supracitado é possível perceber que o entendimento do metabolismo das algas pode propiciar incrementos na obtenção do biocombustível de interesse.

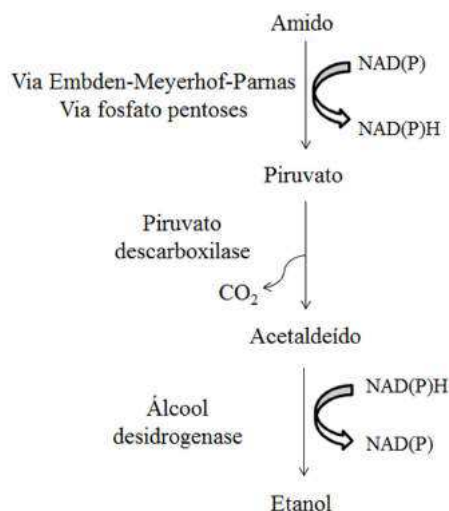


Figura 3.4 - Via metabólica de microalgas através de processos intracelulares no escuro.

3.2. Metabolismo da alga

A alga verde unicelular *C. reinhardtii* tem sido estudada como um sistema modelo em relação à fisiologia, fotossíntese, metabolismo, estrutura flagelar e função (HARRIS, 2001; MERCHANT, PROCHNIK e VALLON, 2007). Segundo MERCHANT *et al.* (2006) e MERCHANT, PROCHNIK e VALLON (2007), as análises sobre a sequência do genoma da célula possibilitaram a verificação de uma homologia entre plantas e animais. Devido a esta característica é possível entender a síntese de diversos produtos de fermentação, tais como o ácido acético, ácido fórmico, etanol, CO₂, H₂, vestígios de glicerol, D-lactato, malato e succinato. Também foram verificadas em outros estudos semelhanças das algas com as bactérias fotossintetizantes, uma vez que em condições anaeróbias aquelas produzem ácido fórmico, etanol e H₂ por meio de vias enzimáticas (KOSOUROV, SEIBET e GHIRARDI, 2003; PHILIPPS *et al.*, 2011).

Outra característica relevante da microalga *C. reinhardtii* deve-se ao fato de que a estequiometria de reação em relação aos produtos finais gerados sofre variação em função das condições de cultivo e a fermentação na qual a alga é submetida. Além disso, a microalga também é capaz de alterar a rota metabólica da piruvato formato-liase, caso esta seja prejudicada por algum motivo (PHILIPPS *et al.*, 2011).

De acordo com o diagrama esquematizado na Figura 3.5, que representa as vias fermentativas da microalga *C. reinhardtii*, pode-se verificar que o piruvato é derivado da oxidação de glicose e é utilizado como substrato para a síntese de diversas enzimas. A piruvato formato-liase (PFL 1) cliva o piruvato, convertendo em acetil-CoA e formiato. A acetil-CoA, por sua vez, é convertida em ácido acético através da ação sucessiva da fosfoacetiltransferase (PTA) e da quinase de etilo (ACK), tendo como resultado a produção de ATP. Além da formação do ácido acético pode ocorrer também a produção de etanol por meio da desidrogenase bi-funcional aldeído/álcool (ADH1), tendo como resultado a oxidação de NAD(P)H. Outra rota metabólica a ser mencionada é a ação da piruvato-descarboxilase (PDC) que descarboxila o piruvato em acetaldeído, sendo ainda convertido em etanol por meio da álcool-desidrogenase (ADH). Pode ocorrer também a produção de D-lactato a partir da ação da D-lactato desidrogenase (D-LDH), sendo que a piruvato ferredoxina oxido-redutase (PFR1) descarboxila o piruvato convertendo em CO₂, acetil-CoA e na redução da ferredoxina (Fd).

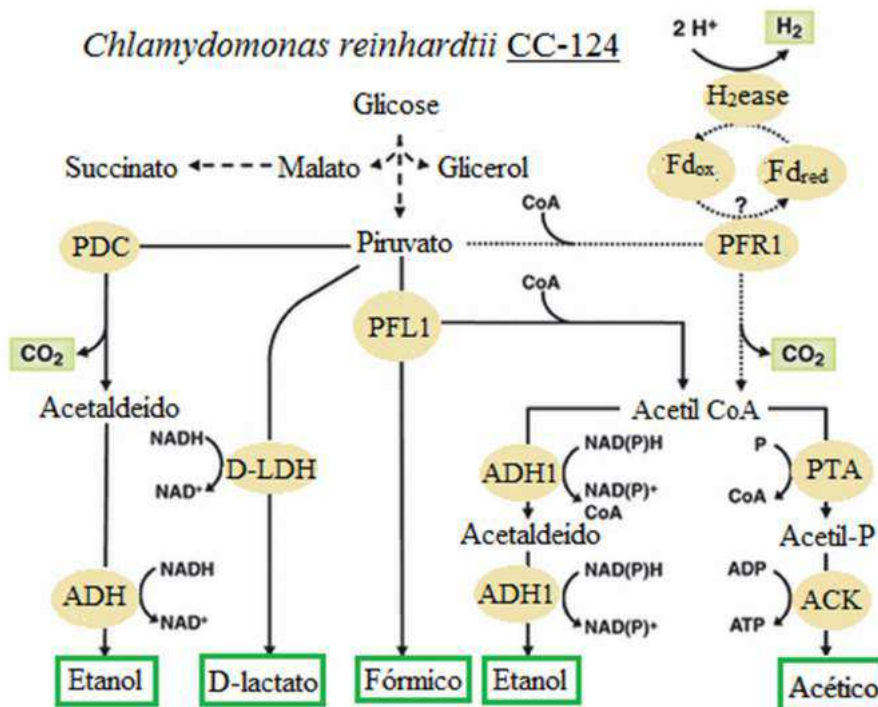


Figura 3.5 - Diagrama das vias fermentativas da alga *Chlamydomonas reinhardtii* (Fonte: Adaptado de PHILIPPS *et al.*, 2011).

Com a redução da ferredoxina, esta é capaz de doar elétrons para a hidrogenase (H₂ase), tendo como resultado a produção de hidrogênio no escuro. Sabe-se que há outras vias metabólicas citadas na literatura que resultam na produção de malato, succinato e glicerol, consideradas produtos de fermentação da *C. reinhardtii* (PHILIPPS *et al.*, 2011).

3.2.1. Fatores que interferem no cultivo de microalgas na produção de biocombustíveis

Inúmeros fatores estão relacionados com a concentração e composição da biomassa das microalgas, podendo ser citados: intensidade luminosa, temperatura, pH, aeração, concentração de nutrientes e CO₂ (CHISTI, 2007). Além disso, deve-se destacar a importância das fontes de carbono, bem como a privação de enxofre como potencial para otimizar a produção de biocombustíveis.

Em geral, um dos fatores determinantes que influencia o metabolismo de micro-organismos é a temperatura. Cada espécie é suscetível a uma determinada temperatura, sendo duvidoso fazer generalizações, mesmo de espécies pertencentes à mesma região. Quando a temperatura é mantida constante, uma maior estabilidade pode ser verificada nos experimentos e nos procedimentos de rotina, proporcionando maior reprodutibilidade e previsibilidade nas respostas dos micro-organismos. A temperatura pode ser mantida

constante pelo uso de sistemas de refrigeração, como nas salas de cultivo. Entretanto em sistemas maiores, o controle desta variável de processo é mais difícil (LOURENÇO, 2006).

É recomendável a manutenção da temperatura das cepas em torno de 18 a 22 °C, podendo se utilizar temperaturas inferiores com o objetivo de reduzir a frequência de renovação dos cultivos. Ao se tratar de reprodução, temperaturas mais elevadas são recomendáveis haja vista a aceleração da taxa de crescimento. Entretanto, o limite de tolerância de cada micro-organismo deve ser considerado quando se trata das salas em que as cepas são cultivadas, sendo necessária também a avaliação do sistema de iluminação, uma vez que este produz calor. Logo, o sistema de controle térmico deve ser confiável como um sistema adicional de segurança (SCHMIDT, 2007).

De forma complementar, para alcançar um bom desempenho no cultivo das microalgas é importante um cuidado especial com a iluminação, já que a condição ótima para o crescimento destes micro-organismos depende da intensidade da luz, do comprimento de onda e o tempo em que as células estão expostas. Quando se trata de sistemas pequenos de cultivos é recomendável a utilização de luz artificial, sendo esta controlada com base nas necessidades das culturas. As lâmpadas mais empregadas são as fluorescentes do tipo luz do dia, com comprimentos de onda de 350 a 700 nm, garantindo a fotossíntese.

Sabendo que a fotossíntese consiste em um conjunto de reações (Figura 3.6) que podem ser arranjadas em duas etapas interligadas: a fotoquímica, que é dependente de luz e a química que é independente de luz. Entretanto, a etapa independente de luz é favorecida pela presença dos produtos gerados na etapa fotoquímica (LOPES, 2004).

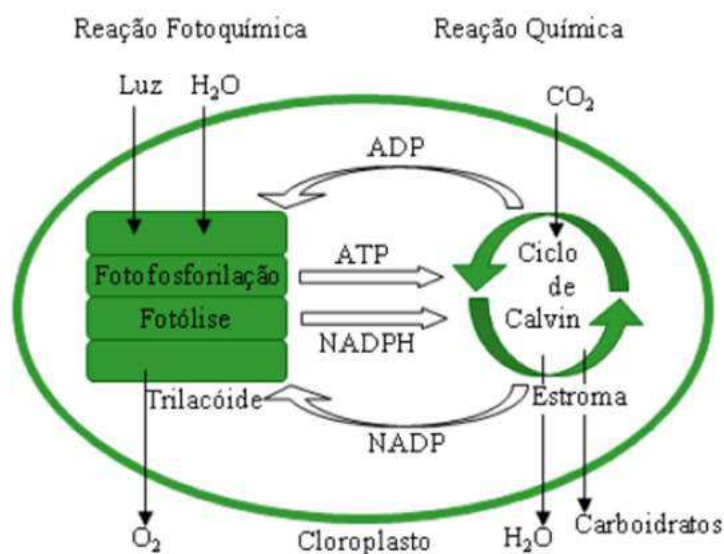


Figura 3.6 - Reações de fotossíntese (Fonte: Modificado de LOPES, 2004).

O fotoperíodo mais comumente utilizado é de 10 horas de luz e 14 horas de escuro ou 12 horas de luz e 12 horas de escuro, porém muitas espécies são capazes de crescer com iluminação contínua. A manutenção do sistema de cultivo celular sob ação de um fotoperíodo é recomendada já que muitas espécies realizam a divisão celular em períodos de escuro (SCHMIDT, 2007).

Já a aeração está relacionada com a demanda de carbono, uma vez que a maioria da composição dos meios de cultivo não é suplementada com agentes carbonados. Além disso, a aeração proporciona a homogeneização, mesmo na presença de espécies móveis, uma vez que a decantação e o acúmulo de células no fundo dos vasos de cultivo podem ser verificados (LOURENÇO, 2006). Vale ressaltar que o dióxido de carbono sob condições controladas pode ser adicionado ao sistema de cultivo promovendo sua aeração. Quando se trata de cultivos de microalgas marinhas e dulcícolas verifica-se o aumento do crescimento em relação à presença de CO₂ até uma determinada taxa. A partir deste ponto, os cultivos não apresentam mais variações até se observar a inibição do crescimento (WIDJAJA, CHIEN e JU, 2009).

O pH está relacionado com a disponibilidade dos compostos químicos, que podem sofrer cristalização ou precipitação. Desta forma, é recomendável a utilização de um pH próximo da neutralidade, assim os elementos presentes no meio poderão ser mais facilmente metabolizados pelas microalgas (LOURENÇO, 2006; SCHMIDT, 2007). Já para o crescimento da biomassa da alga é necessário o consumo de CO₂ dissolvido no meio, promovendo o aumento de pH. Com isso, a elevação acentuada do fornecimento de CO₂ ocasionará a redução de pH, como também a inibição do crescimento de algumas espécies de microalgas (PIRES *et al.*, 2012).

A presença de nutrientes no meio de cultivo afeta diretamente o crescimento das microalgas bem como a síntese de produtos do seu metabolismo. Diversos meios de cultivo com características diferenciadas estão disponíveis comercialmente. No entanto, a literatura é vaga em relacionar tais características com a produção sistematizada de produtos ou subprodutos específicos do metabolismo das algas (PENTEADO, 2010). O carbono é um composto altamente relevante para as algas. Algas marinhas necessitam de uma proporção de consumo de carbono, nitrogênio e fósforo de 106:16:1. De acordo com a taxa de crescimento das microalgas, a disponibilidade de carbono pode ser rapidamente alterada, em função do consumo acelerado, fazendo com este composto seja um fator limitante para a multiplicação celular, além do aumento de pH para valores superiores a 9, caso o meio não seja tamponado (LOURENÇO, 2006).

Além do carbono, o nitrogênio também é importante para o crescimento das microalgas, uma vez que é o componente de inúmeras substâncias do metabolismo primário. A concentração de nitrogênio está diretamente relacionada com as concentrações de proteínas, carotenóides e clorofila presentes nas células, portanto, quando ocorre a limitação do nitrogênio, estas substâncias são reduzidas (LOURENÇO, 2006).

A limitação de nitrogênio no meio de cultivo provoca o aumento do teor lipídico das microalgas (SANTOS, MACEDO e ALEGRE, 2003). Assim, a escassez de nitrogênio faz com que o metabolismo das microalgas seja direcionado para o fornecimento de componentes de reserva, por exemplo, os ácidos graxos, e não mais para o crescimento celular, já que a célula se prepara para o período de privação nutricional (XU *et al.*, 2012). Outro fator que deve ser mencionado em relação à depleção de nitrogênio é a modificação gradual na composição dos lipídios, de ácidos graxos para triglicerídeos (WIDJAJA, CHIEN e JU, 2009).

O fósforo também possui importância no metabolismo das microalgas, uma vez que está envolvido em todos os processos de trocas energéticas e na composição de moléculas estruturais. Dentre os componentes estruturais das microalgas que possuem fósforo estão o ATP, açúcares fosfatados, ácidos nucleicos e fosfoenzimas. O fósforo é assimilado na presença de luz, provavelmente devido à acumulação de energia em ATP. O fósforo assim como o nitrogênio também é considerado um fator limitante para a multiplicação celular. Contudo, as microalgas possuem a capacidade de consumirem elevadas quantidades de fósforo, de 8 a 16 vezes a mais que o limite mínimo do composto, promovendo o crescimento ainda que em períodos de escassez (LOURENÇO, 2006). Na literatura observa-se que a variação da quantidade de fósforo (10; 50; 250 e 500 mg/L) no meio de cultivo da microalga *Arthrospira platensis* não ocasionou alteração no teor lipídico das células. No entanto, verificou-se o aumento de até 60 % no teor de carboidratos para concentrações de 10 mg/L de fósforo. Enquanto que, para as demais concentrações não foram observadas variações significativas (MARKOU, CHATZIPAVLIDIS e GEORGAKAKIS, 2012).

A privação do fósforo no meio afeta o teor lipídico da célula mais intensamente do que a quantidade de lipídios gerados pela biomassa seca. Sabendo que o fósforo integra os fosfolipídios, a deficiência deste composto faz com que o metabolismo da microalga seja voltado para a produção de triglicerídeos saturados e lipídios neutros, além de provocar a redução de ácidos graxos polinsaturados (SIRON, GIUSTI e BERLAND, 1989).

Deve-se destacar que o ferro também é essencial para as algas na sua forma reduzida, pelo fato de estar envolvido em diversas funções, tais como vias biossintéticas da clorofila e dos citocromos, respiração, transporte fotossintético de elétrons, diminuição de nitrato e nitrito, diminuição de sulfato, detoxificação de espécies reativas de oxigênio, fixação de nitrogênio molecular (N_2), além disso, é cofator de muitas enzimas (LOURENÇO, 2006). A privação do ferro pode ocasionar a limitação do crescimento, além de modificar a concentração de clorofila. Para os cultivos da microalga *Cylindrotheca closterium* verificou-se uma redução no crescimento celular de até 60 % com 10 nmol/L de ferro quando comparado com uma concentração de 20 nmol/L e 11,7 μ mol/L de ferro. No entanto, em relação à taxa de clorofila *a* nas células, observou-se variações significativas, proporcionalmente a variação de ferro presente no meio (PANKOWSKI e MCMINN, 2009).

Por outro lado, estudos têm se dedicado em aumentar as taxas de produção de H_2 por meio da privação de enxofre nas culturas de algas. As pesquisas realizadas por YANYUSHIN (1981) foram direcionadas para avaliar a periodicidade da atividade de fotoprodução de H_2 sincronizado nas algas *C. reinhardtii*. Os autores verificaram um pico na síntese deste biocombustível em condições anaeróbias induzido pela atividade da hidrogenase no período das primeiras horas do período escuro, que coincide com o início da degradação do amido. Ressalta-se que a condição de privação de enxofre interfere no funcionamento das algas, uma vez que interrompe o ciclo normal das algas antes do estágio de divisão celular no final do período de luz, originando culturas ricas em células grandes que não se dividem (HASE *et al.*, 1959).

Com a utilização de um sistema de fotobiorreator monitorado por computador, tem sido relatado que as espécies como a *C. reinhardtii* são submetidas a cinco fases fisiológicas bem estabelecidas na ausência de enxofre: uma fase aeróbia, na qual a atividade de evolução fotossintética de O_2 é gradualmente inativada; uma fase de consumo de O_2 que ocorre quando a atividade de evolução fotossintética de O_2 decai abaixo da atividade respiratória das células; uma fase anaeróbia observada depois que todo O_2 do meio de cultura é removido pela respiração; uma fase de produção de H_2 , após o estabelecimento da anaerobiose e a indução da enzima hidrogenase, e por fim, uma fase de término, que ocorre quando toda atividade celular é gradualmente inativada (KOSOUROV *et al.*, 2002).

No trabalho desenvolvido por TSYGANKOV *et al.* (2002) foi estudada a influência do ciclo celular da alga verde *C. reinhardtii* sob privação de enxofre para produção de H_2 . As células das algas foram cultivadas sob fotoperíodo de 12 horas e coletadas em diferentes

períodos de tempo durante o ciclo. Em seguida, foram transportadas para meio fresco privado de enxofre e expostas a iluminação contínua. Verificou-se que as concentrações de proteína e amido foram elevadas durante os estágios iniciais de privação de enxofre, e posteriormente, ocorreu o decréscimo quando se observou a produção de H₂. Tal fato confirmou a ocorrência de degradação de amido e proteína no progresso da produção de H₂ na privação de enxofre. Desta forma, é necessário destacar a importância da degradação de amido e proteína na produção de H₂, pois os mesmos estão envolvidos no estabelecimento e manutenção das condições anaeróbias no fotobiorreator seguido de uma diminuição da atividade de evolução fotossintética de O₂ (KOSOUROV *et al.*, 2002; ZHANG, HAPPE e MELIS, 2002).

A microalga *C. reinhardtii* é capaz de acumular amido e TAGs (triacilgliceróis) quando exposta a condições de tensões, como a privação de nitrogênio, alta salinidade, o esgotamento de enxofre ou ainda submetidos à luz elevada (DOEBBE *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2009; WORK *et al.*, 2010). A partir deste amido acumulado é possível produzir não somente H₂, mas também etanol, uma vez que o piruvato pode ser formado pela decomposição do amido, por conseguinte, convertido em acetaldeído e finalmente reduzido em etanol (Figura 3.5).

Quando se trata de fontes de carbono, cada micro-organismo apresenta sua preferência (LEE e LEE, 2010), desta maneira deve ser realizado com cuidado a seleção destes para obter melhores resultados nas fermentações. Na literatura, os estudos são limitados em relação às fontes de carbono para o cultivo de algas. Os trabalhos de SAHU e ADHIKARY (1981) foram direcionados para o efeito da lactose, frutose, manose, xilose e acetato de sódio sobre as taxas de crescimento e a composição de pigmento por *Anabaena sp.* Não foi verificada a formação de etanol, porém os autores relataram que a fonte de carbono mais adequada para o crescimento das algas foi a lactose. O estudo também indicou que resíduos industriais compostos por este dissacarídeo são considerados um recurso promissor, podendo ser misturado com água e utilizado como substrato para *C. reinhardtii* a fim de produzir etanol.

Com base no trabalho de COSTA *et al.* (2015) pode-se observar que a produção de etanol foi significativa quando o meio de cultivo da *C. reinhardtii* foi suplementado com fontes de carbono, o que não ocorreu quando o meio estava isento de fontes de carbono. As concentrações de etanol alcançaram $9,64 \pm 1,84$ g/L ($0,08 \pm 0,016$ g/L.h), $13,11 \pm 2,57$ g/L ($0,11 \pm 0,02$ g/L.h), $14,94 \pm 6,95$ g/L ($0,12 \pm 0,02$ g/L.h) na presença de 0,1 g/L de acetato de

sódio, 0,1 g/L de permeado de soro de leite e quando os dois compostos estavam presentes na concentração de 0,1 g/L, respectivamente.

O estudo desenvolvido por LEE e LEE (2012) verificou a produção de etanol a partir de várias cepas de levedura como também o efeito de se utilizar como substrato as algas marrons em relação à produção de etanol. Sabe-se que as algas marrons apresentam em sua composição cerca de 30 a 67 % de hidratos de carbono em peso seco, sendo que representa o principal componente de polissacarídeos como alginato, laminarina e manitol. Foram realizados experimentos com 8 cepas de levedura diferentes, que foram cultivados em caldo contendo 20 g/L de glicose e de peptona e 10 g/L de extrato de levedura. Todos os ensaios foram realizados em meio contendo as seguintes fontes: 10,8 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 5 g/L H_2KPO_4 ou 1,1 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. A alga marrom utilizada na fermentação para produção de etanol foi *Laminaria japonica*. A fermentação alcoólica ocorreu em uma incubadora com agitação de 150 rpm a uma temperatura de 30 °C, sob condições anaeróbias e com pH inicial de 7,0. No entanto, não foi efetuada o controle do pH durante a fermentação.

Com base nas fermentações de LEE e LEE (2012) descritas acima foi verificada uma alteração na taxa de produção de etanol devido a utilização de duas concentrações diferentes de fontes de carbono no substrato, sendo que a primeira condição continha 10 g/L de alginato, laminaria e manitol e 20 g/L de *L. japonica* e a outra condição continha cinco vezes mais com 50 g/L de alginato, laminaria e manitol e 100 g/L de *L. japonica*. Uma produção de etanol significativa no meio contendo manitol, para baixas concentrações de substrato da levedura *S. cerevisiae*, foi observada com uma concentração máxima de 2,69 g/L. Enquanto que os demais substratos não converteram a biomassa em etanol, uma vez que este foi afetado pelo aumento do crescimento celular. A máxima produção de etanol alcançada foi de 10,86 g/L utilizando 100 g/L de *L. japonica* com a levedura *D. occidentalis*, em função do aumento da concentração de substrato.

3.3. Bactéria fotossintetizante e sistema híbrido

Além das microalgas, outro sistema fotofermentativo que se destaca na síntese de biocombustíveis é aquele composto por bactérias fotossintetizantes. A classificação das bactérias fotossintetizantes em relação ao consumo de substrato pode ser dividida em

bactérias sulfurosas, as quais consomem compostos à base de enxofre e em bactérias não sulfurosas, sendo aquelas que consomem compostos à base de carbono.

Dentre as bactérias fotossintetizantes podem ser citadas: *Rhodobacter sphaeroides*, *Rhodobacter capsulatus*, *Rhodobacter sulidophilus*, *Rhodopsuedomonas sphaeroides*, *Rhodopsuedomonas palustris*, *Rhodopsuedomonas capsulate*, *Rhodospirillum rubrum*, *Chromatium sp. Miami PSB1071*, *Chlorobium limicola*, *Thiocapsa roseopersicina* e *Halobacterium halobium* (LONGO, LAZZARIN e MIGUEZ, 2009).

As bactérias fotossintetizantes são bastante empregadas em processos híbridos, que consiste na combinação dos processos de fermentação e fotofermentação, com o objetivo de melhorar a produção de H₂. Pode-se verificar este sistema nos estudos desenvolvidos por AVCIOGLU *et al.* (2011), no qual a produção de hidrogênio foi obtida através de um processo híbrido com a utilização do efluente da fermentação escura suplementado com melaço. Posteriormente ocorreu a fotofermentação por *R. capsulatus* em um fotobiorreator sob condições ambientais. Este método obteve como resultado de produtividade máxima 0,50 mmol de H₂/L.h e como conversão 0,50 mol de H₂/mol de substrato.

No entanto, deve-se destacar a existência de outras estratégias de fermentação a partir do uso de sistemas híbridos. Isso pode ser verificado no trabalho realizado por KIM *et al.* (2006), com um processo composto por 3 estágios, sendo que a primeira etapa consistiu na produção de biomassa empregando *C. reinhardtii*, em seguida esta biomassa foi concentrada e destinada como matéria-prima para a fermentação escura com *Clostridium butyricum* produzindo H₂ e ácidos orgânicos. Finalmente, o efluente proveniente da fermentação escura foi direcionado como substrato para fotofermentação com *R. sphaeroides*. É importante ressaltar que os sistemas híbridos também podem ser utilizados como estratégia para otimizar a produção de etanol e não apenas a produção de H₂. Observa-se que no trabalho desenvolvido por COSTA *et al.* (2015), o teor de etanol alcançou 19,94 ± 2,67 g/L (0,17 ± 0,02 g/L.h) por meio da utilização do sistema híbrido, em que o efluente da alga verde *C. reinhardtii* foi composto por ácidos orgânicos empregados como substrato para *R. capsulatus*.

3.4. Escala de produção de biocombustíveis por algas

Existem diversos métodos de cultivo de microalgas podendo ser classificados em sistemas abertos ou fechados, com base nas condições de projeto. Em relação aos sistemas abertos, as microalgas são cultivadas em áreas como lagos, lagoas, canais profundos, entre outros. Enquanto que nos sistemas fechados, as microalgas são cultivadas em recipientes transparentes, expostos a luz solar ou radiação artificial a fim de facilitar a fotossíntese (RAZZAK *et al.*, 2013).

Desta forma, é necessário selecionar o sistema de cultivo ideal para produção de biocombustíveis à base de algas dependendo da espécie, tecnologia e processo de conversão biológico (ZIOLKOWSKA e SIMON, 2014).

Entre os tipos de lagoas abertas empregadas para o cultivo de microalgas podem ser encontrados os “*raceways*”, lagoas rasas ou lagos circulares (MASOJÍDEK *et al.*, 2008). O fornecimento de água e nutrientes para as microalgas ocorre por meio da canalização de água de escoamento nas proximidades de área de terra, água de descarte industrial ou estação de tratamento de água. O sistema aberto mais utilizado é o “*raceway*”, em função da vantagem de produzir elevadas quantidades de microalgas, sendo viável comercialmente. No entanto, uma desvantagem verificada no sistema de “*raceway*” é a dificuldade de se controlar as variáveis em condições ambiente como temperatura, podendo afetar diretamente na produção da biomassa das algas. As microalgas mais usadas neste sistema são *Chlorella sp.*, *Spirulina platensis*, *Haematococcus sp.* e *Dunaliella salina*, sendo encontrado a maior taxa de produção de biomassa com 60-100 mg/L.dia de peso seco (DEMIRBAS, 2010; ZHU, RONG e ZONG, 2013).

No sistema de “*raceway*” (Figura 3.7), a água e os nutrientes encontram-se distribuídos em volta de uma pista de corrida utilizando rodas de pás. Com isso, as microalgas serão mantidas suspensas em água, além de permitir o uso de CO₂ da atmosfera. Como a lagoa é rasa, isto permite a penetração de luz, maximizando o processo de fotossíntese. Outra vantagem de utilizar este sistema é que resíduos de CO₂ podem ser reciclados por meio de borbulhamento de volta para a lagoa. Desta forma, controlando parâmetros como pH e outras condições do ambiente é possível utilizar 90 % de CO₂ injetado (DEMIRBAS, 2010; MASOJÍDEK *et al.*, 2008).

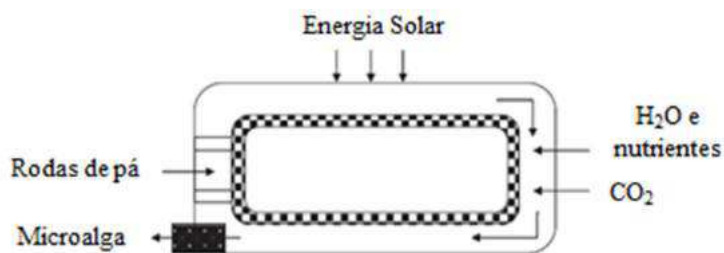


Figura 3.7 - Sistema de lagoa aberta (Adaptado por BRENNAN e OWENDE, 2010; DEMIRBAS, 2010).

Como o sistema de lagoas abertas apresenta algumas limitações, foram desenvolvidos fotobiorreatores para superar estes problemas, permitindo o cultivo de microalgas em um período maior, como também a produção de elevadas quantidades de biomassa de microalgas (CHISTI, 2007; MASOJÍDEK *et al.*, 2008; MENETREZ, 2012).

Dentre os tipos de sistema fechado destacam-se os fotobiorreatores de coluna, tubular e *flat-plate*. Os benefícios encontrados nestes sistemas são o controle eficaz das condições de cultura, como pH, temperatura, concentrações de CO₂, além de serem práticos e produtivos para o cultivo de microalgas, bem como reduzem os riscos de contaminação. Entretanto, deve-se mencionar que os sistemas fechados exigem custos de capital maiores que os sistemas abertos (CHISTI, 2007). Ressalta-se que cada sistema, seja aberto ou fechado, apresenta vantagens e desvantagens conforme detalhado no Quadro 3.1.

Embora pouco utilizado na fotofermentação de algas, o biorreator do tipo tanque agitado também pode representar um ganho tecnológico. Segundo o estudo desenvolvido por SILVA *et al.* (2016), o objetivo do trabalho consistia em produzir H₂ através de um biorreator de 1,5 L sob agitação com a utilização de bactérias fotossintetizantes púrpura não sulfurosa *R. capsulatus*, aplicando efluente de fermentação escura como substrato.

Quando os sistemas híbridos são empregados, necessita-se de uma combinação de fotobiorreatores fechados e sistemas abertos. O primeiro estágio consiste no cultivo de microalgas em fotobiorreatores fechados, com o objetivo de evitar a contaminação. Em seguida, o próximo estágio consiste em transportá-las para os sistemas de lagoas abertas com disponibilidade de nutrientes a fim de facilitar a produção de biomassa (BRENNAN e OWENDE, 2010).

Quadro 3.1 - Vantagens e desvantagens dos sistemas abertos e fechados (BRENNAN e OWENDE, 2010; DEMIRBAS, 2010; RAZZAK *et al.*, 2013)

| Sistemas de cultivo | Vantagens | Limitações |
|----------------------------------|--|---|
| <i>Raceway</i> | <ul style="list-style-type: none"> ➤ Baixo custo de capital; ➤ Baixo custo de operação; ➤ Fácil manutenção; ➤ Sistema simples; ➤ Entrada de pouca energia. | <ul style="list-style-type: none"> ➤ Limitada para algumas espécies de microalgas; ➤ Facilidade de contaminação; ➤ Baixa eficiência de mistura; ➤ Dificuldade de controlar o crescimento. |
| Fotobiorreator Tubular | <ul style="list-style-type: none"> ➤ Elevada quantidade de biomassa de microalgas; ➤ Grande área de superfície de iluminação, sendo menos de 0,1 m de diâmetro, facilitando a entrada de luz. ➤ Facilidade de projetar, instalar e operar; ➤ Menor tempo de colheita. | <ul style="list-style-type: none"> ➤ Alto custo de capital; ➤ Necessidade de fornecimento de ar para operar utilizando bombas; ➤ Elevada concentração de O₂ inibe a fotossíntese; ➤ Incrustação. |
| Fotobiorreator <i>flat-plate</i> | <ul style="list-style-type: none"> ➤ Relativamente barato; ➤ Elevada produtividade de biomassa; ➤ Acúmulo baixo de oxigênio; ➤ Grande área de superfície de iluminação; ➤ Facilidade de limpar e esterilizar. | <ul style="list-style-type: none"> ➤ Limitação de crescimento na região perto da parede; ➤ Foto-inibição pode ocorrer. |
| Fotobiorreator de coluna | <ul style="list-style-type: none"> ➤ Baixo consumo de energia; ➤ Compacto; ➤ Elevada transferência de massa; ➤ Eficiência na mistura com baixa tensão de cisalhamento; ➤ Facilidade de esterilização; ➤ Menor ocorrência de foto-inibição e foto-oxidação. | <ul style="list-style-type: none"> ➤ Relativamente caro; ➤ Elevado custo de manutenção; ➤ Pequena área de iluminação ➤ Material de construção sofisticado; |

4 - MATERIAL E MÉTODOS

Neste tópico foram especificados o material, os procedimentos e as variáveis envolvidas nos processos nos quais o potencial da alga *C. reinhardtii* como produtora de etanol foi estudado. O fluxograma apresentado na Figura 4.1, demonstra a evolução da pesquisa e as práticas experimentais executadas.

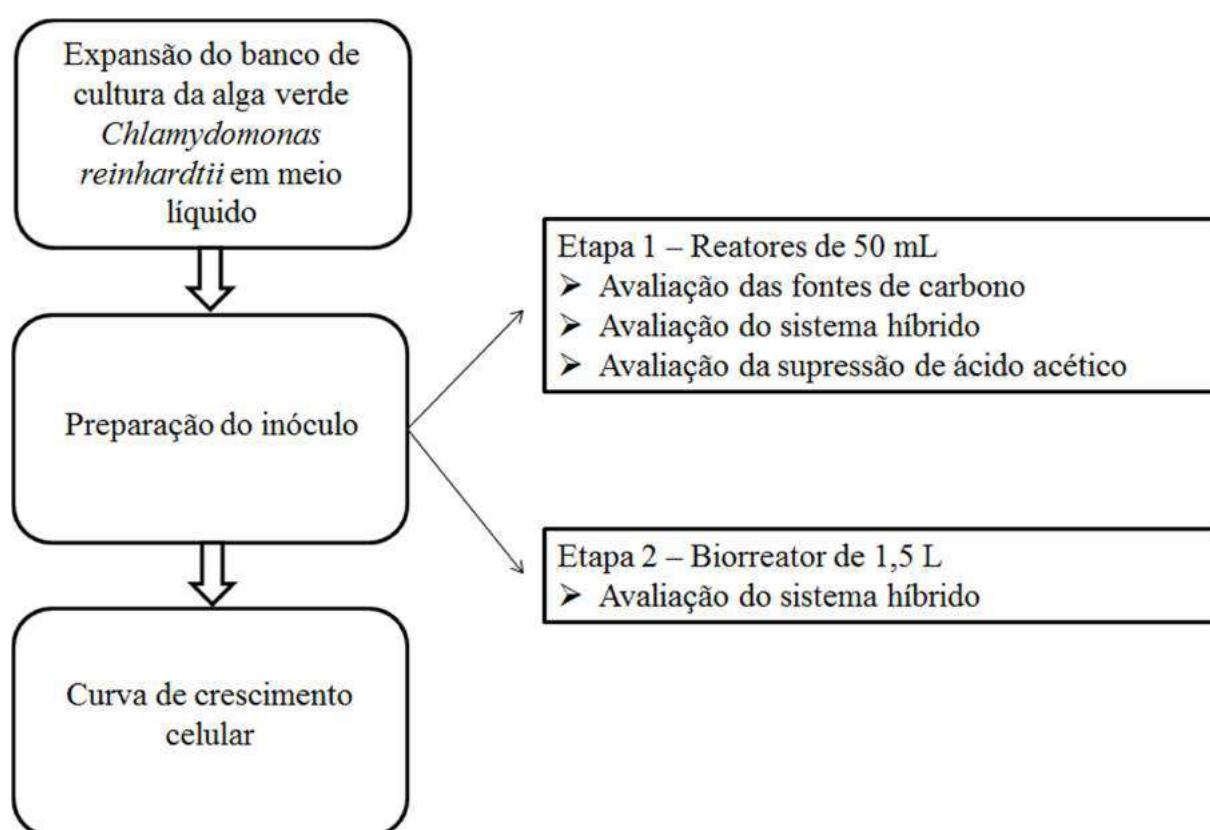


Figura 4.1 - Fluxograma das etapas desenvolvidas no trabalho.

4.1. Alga verde e meio de cultivo

Neste estudo utilizou-se a alga verde unicelular *C. reinhardtii* CC-124 proveniente do banco canadense *Chlamydomonas Resource Center*. As algas foram mantidas em meio basal *Tris Acetate Phosphate* (TAP) conforme proposto por ANDERSEN (2005), sendo que sua formulação está detalhada na Tabela 4.1.

A composição do meio inclui soluções como TAP sais, solução de fosfato e traços de elementos que basicamente são combinações com outras substâncias e estão especificadas nas

MATERIAL E MÉTODOS

Tabelas 4.2, 4.3 e 4.4. Deve-se observar que no meio também há presença de ácido acético, cuja concentração é de 17,4 mmol/L.

Tabela 4.1 - Composição do meio TAP

| <i>Reagentes</i> | <i>Quantidade adicionada em 1000 mL</i> |
|---|--|
| Tris-base $\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$ | 2,42g |
| TAP Sais | 25,00 mL |
| Solução de fosfato | 1,00 mL |
| Traço de elementos | 1,00 mL |
| Ácido Acético | 1,00 mL |

Tabela 4.2 - Composição da solução TAP sais

| <i>Reagentes</i> | <i>Concentração (g/L)</i> |
|---|----------------------------------|
| NH_4Cl | 15,00 |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 4,00 |
| $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 2,00 |

Tabela 4.3 - Composição da solução de fosfato

| <i>Reagentes</i> | <i>Concentração (g/100mL)</i> |
|--------------------------|--------------------------------------|
| K_2HPO_4 | 28,80 |
| KH_2PO_4 | 14,40 |

Tabela 4.4 - Composição de traços de elementos

| <i>Reagentes</i> | <i>Concentração (g/100mL)</i> |
|--|--------------------------------------|
| $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 5,00 |
| $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 2,20 |
| H_3BO_3 | 1,14 |
| $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ | 0,50 |
| $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0,50 |
| $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | 0,16 |
| $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ | 0,16 |
| $(\text{NH}_4)_6\text{MoO}_3$ | 0,11 |

O meio foi preparado em câmara de fluxo laminar utilizando os reagentes mencionados na Tabela 4.1, dissolvendo-os em água deionizada, com pH ajustado em $7 \pm 0,10$. Em seguida, o meio foi esterilizado a uma temperatura de $121 \pm 1^\circ\text{C}$, a 1 atm por 20 minutos. Deve-se destacar que as vidrarias utilizadas para a preparação do meio foram previamente esterilizadas.

MATERIAL E MÉTODOS

Para determinados ensaios, fontes de carbono foram adicionadas ao meio basal a fim de incrementar os resultados. Nos experimentos que utilizaram meio TAP isento de enxofre, os reagentes que continham em sua composição enxofre foram substituídos por sais de cloreto, e suas concentrações foram devidamente ajustadas. Com isso, foi necessário determinar a equivalência do número de mols a fim de não faltar íons para atividade da alga. As Tabelas 4.5 e 4.6 apresentam claramente estas modificações.

Tabela 4.5 - Componentes do TAP sais com a substituição dos sulfatos por cloreto

| <i>Reagentes</i> | <i>Concentração (g/L)</i> |
|--------------------------------------|----------------------------------|
| NH ₄ Cl | 15,00 |
| MgCl ₂ .6H ₂ O | 3,29 |
| CaCl ₂ .2H ₂ O | 2,00 |

Tabela 4.6 - Componentes do traço de elementos com a substituição dos sulfatos por cloreto

| <i>Reagentes</i> | <i>Concentração (g/100mL)</i> |
|---|--------------------------------------|
| Na ₂ EDTA.2H ₂ O | 5,00 |
| ZnCl ₂ .7H ₂ O | 2,12 |
| H ₃ BO ₃ | 1,14 |
| MnCl ₂ .4H ₂ O | 0,50 |
| FeCl ₂ | 0,50 |
| CoCl ₂ .6H ₂ O | 0,16 |
| CuCl ₂ .2H ₂ O | 0,11 |
| (NH ₄) ₆ .MoO ₃ | 0,11 |

4.2. Bactéria e meio de cultivo

A bactéria fotossintetizante púrpura não sulfurosa *R. capsulatus* foi adquirida do banco alemão DSMZ e mantida em meio basal RCV (WEAVER, WALL e GEST, 1975). O meio RCV (*Rhodobacter capsulatus* V minimal medium) é composto pelos reagentes apresentados nas Tabelas 4.7 e 4.8.

MATERIAL E MÉTODOS

Tabela 4.7 - Componentes do meio basal RCV originalmente utilizado para cultivo da *Rhodobacter capsulatus*

| Reagentes | Concentração (g/L) |
|---|---------------------------|
| Ácido málico | 4,02 |
| KH ₂ PO ₄ | 0,60 |
| K ₂ HPO ₄ | 0,90 |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 0,12 |
| CaCl ₂ .2H ₂ O | 0,075 |
| Na ₂ EDTA.2H ₂ O | 0,02 |
| Micronutrientes | 1 mL |
| Tiamina | 0,001 |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 1,00 |

Tabela 4.8 - Composições da solução de micronutrientes utilizada no meio basal RCV

| Reagentes | Concentração (g/L) |
|---------------------------------------|---------------------------|
| H ₃ BO ₃ | 2,80 |
| MnSO ₄ .H ₂ O | 1,59 |
| NaMoO ₄ .2H ₂ O | 0,75 |
| ZnSO ₄ .7H ₂ O | 0,24 |
| CaCl ₂ .2H ₂ O | 0,075 |
| CuCl ₂ .2H ₂ O | 0,05 |

O meio foi preparado utilizando os reagentes especificados na Tabela 4.7, dissolvendo-os em água deionizada, com pH ajustado em 6,8. Em seguida, o meio foi esterilizado a uma temperatura de 121 ± 1 °C, a 1 atm por 20 minutos. Deve-se destacar que as vidrarias utilizadas para a preparação do meio foram previamente esterilizadas.

4.3. Cultivo do inóculo da alga

Foram realizados repiques sucessivos em *erlenmeyers* de 500 mL a fim de se obter uma quantidade satisfatória para a realização das fotofermentações. O procedimento dos subcultivos consistiu em adicionar 250 mL de meio TAP fresco em 250 mL de suspensão de algas em um intervalo de 10 dias, realizado no fluxo laminar. As algas foram incubadas em estufa germinadora a 25 ± 1 °C sob um sistema de fotoperíodo de 12 horas.

MATERIAL E MÉTODOS

4.4. Cultivo do inóculo da bactéria

Os repiques realizados da bactéria fotossintetizante púrpura não sulfurosa *R. capsulatus* foram realizados no fluxo laminar a cada 10 dias. O procedimento consistiu em centrifugar as células a 8000 rpm durante 15 minutos. Posteriormente o sobrenadante foi descartado e o sedimento obtido foi ressuspenso em meio fresco. Em seguida, o gás argônio foi borbulhado por 3 minutos no inóculo para garantir a anaerobicidade. Os frascos foram mantidos em câmara de germinação a 30 ± 1 °C, sob iluminação de 2200 lux a luz contínua.

4.5. Condições para a fermentação

Em todos os ensaios realizados foi fixada a concentração inicial de inóculo de alga em 0,10 g/L. A biomassa da alga foi reativada em reatores de 50 mL (frascos de penicilina) e em reator STR de 1,5 L. Para garantir a condição anaeróbia nas fermentações foi purgado gás nitrogênio em um período de 3 minutos após a coleta das amostras. Além disso, as fermentações foram analisadas por 10 dias e submetidas a um sistema de fotoperíodo de 12 horas a temperatura de 25 °C. Por fim, vale ressaltar que o inóculo de alga utilizado ocorreu logo após o processo de repique, enquanto que o inóculo da bactéria *R. capsulatus* foi utilizado após 5 dias o procedimento de repique.

4.5.1. Condições para a fermentação em reatores de 50 mL

Foram utilizados frascos de penicilina de 50 mL como reatores, que foram devidamente selados com septo de silicone e lacrados com alumínio para serem esterilizados a uma temperatura de 121 ± 1 °C, a 1 atm por 20 minutos. Após a esterilização dos reatores e das vidrarias, a preparação das fermentações ocorreu em câmara de fluxo laminar, sendo que o volume útil foi de 40 mL. Em seguida, os reatores foram mantidos em estufa germinadora a 25 ± 1 °C sob um sistema de fotoperíodo de 12 horas. A coleta das amostras ocorreu a cada 48 horas a um volume de 5 mL, sabendo que a análise da clorofila ocorreu no início e no final da fermentação com volume de 20 mL. Os experimentos foram realizados em duplicata.

4.5.2. Condições para a fermentação em biorreator de 1,5 L

Utilizou-se reator anaeróbico STR de volume 1,5 L, sendo que o volume útil foi de 700 mL. O reator foi lavado com álcool 70 % e, em seguida, com água deionizada

MATERIAL E MÉTODOS

esterilizada. Após a esterilização dos reatores e das vidrarias, a preparação das fermentações ocorreu em câmara de fluxo laminar. A fermentação foi mantida sob intensidade luminosa de 5000 lux, com agitação de 120 rpm e fotoperíodo de 12 horas. Foram coletadas amostras de 10 mL a cada 24 horas, porém no intervalo de tempo que foi analisado a clorofila as amostras coletadas foram de 20 mL.

A Figura 4.2 mostra como as fermentações foram conduzidas utilizando Módulo Fermentador Tec-Bio-Flex, Tecnal[®] equipado com agitador mecânico e com controle de temperatura e fotoperíodo.



Figura 4.2 - Biorreator de 1,5 L

4.6. Produção de etanol por fotofermentação em reatores de 50 mL

4.6.1. Avaliação das fontes de carbono

Foram utilizadas fontes de carbono a fim de potencializar a produção de etanol. No Ensaio 1, o meio TAP foi suplementado com fontes de carbono: glicose e permeado de soro de leite (contendo cerca de 70 % de lactose), individualmente e simultaneamente, com concentração inicial de 1 g/L de glicose e/ou lactose. No Ensaio 2 foram utilizadas as mesmas fontes de carbono e com a mesma concentração inicial de glicose e/ou lactose, no entanto, estas fontes foram adicionadas no meio TAP isento de enxofre.

Complementarmente no Ensaio 3 foram realizados experimentos com três fontes de lactose: permeado de soro de leite (PSL), soro de leite (contendo cerca de 50 % de lactose) e a lactose PA. Neste ensaio o meio TAP foi suplementado com estas fontes de lactose

MATERIAL E MÉTODOS

individualmente, na concentração de 5 g/L, com o objetivo de avaliar a fonte mais adequada para a alga *C. reinhardtii*.

4.6.2. Avaliação do sistema híbrido

Neste quarto ensaio (Ensaio 4) foi avaliado o efluente proveniente da fotofermentação da bactéria fotossintetizante púrpura não sulfurosa (PNS) *R. capsulatus* (RCV metabolizado) como meio de fermentação para a alga verde unicelular *C. reinhardtii*. O sobrenadante proveniente da fotofermentação da bactéria *R. capsulatus* foi adquirido após 5 dias do procedimento de repique. Este meio foi esterilizado para garantir a ausência de bactéria e o pH foi ajustado em 7. Em algumas condições este meio foi suplementado com glicose e PSL individualmente com concentração inicial de 5 g/L de glicose ou lactose.

4.6.3. Avaliação da supressão de ácido acético

No Ensaio 5 foi avaliada a retirada de ácido acético do meio TAP, uma vez que o meio apresenta originalmente em sua composição este ácido (Tabela 4.1), como também no meio TAP isento de enxofre. No Ensaio 6 o meio TAP e o meio TAP isento de enxofre na ausência de ácido acético foram suplementados com PSL iniciando com 5 g/L de lactose.

4.7. Produção de etanol por fotofermentação em biorreator de 1,5 L

4.7.1. Avaliação do sistema híbrido

No Ensaio 7 foi avaliado o efluente proveniente da fotofermentação da bactéria fotossintetizante *R. capsulatus* (RCV metabolizado) como meio de fermentação para a alga verde *C. reinhardtii*. O sobrenadante proveniente da fotofermentação da bactéria *R. capsulatus* foi adquirido após 5 dias do procedimento de repique. Este meio foi esterilizado para garantir a ausência de bactéria e o pH foi ajustado em 7. Em outra condição este meio foi suplementado com PSL com concentração inicial de 5 g/L de lactose. Deve-se esclarecer que as condições controle (meio TAP e meio TAP isento de enxofre) também foram avaliadas, e somente nestas condições que houve controle de pH em torno de 7 ao longo da fermentação.

Foi realizado também um experimento (Ensaio 8) com o efluente da fotofermentação da bactéria fotossintetizante *R. capsulatus* (RCV metabolizado) suplementado com PSL na concentração inicial de 5 g/L de lactose como meio de fermentação para a alga *C. reinhardtii*.

MATERIAL E MÉTODOS

O sobrenadante proveniente da fotofermentação da bactéria *R. capsulatus* foi adquirido após 5 dias do procedimento de repique. Este meio foi esterilizado para garantir a ausência de bactéria e o pH foi ajustado em 7. No entanto, a cada 48 horas foi removido um terço do volume útil do biorreator, incluindo as células da alga, e reabastecido com meio fresco (RCV metabolizado) suplementado com PSL para a concentração de lactose alcançar novamente 5 g/L. A coleta das amostras ocorreu após a adição de meio fresco e foi realizado o controle de pH em torno de 7 ao longo da fermentação.

De acordo com o Quadro 4.1 é possível obter uma melhor compreensão dos ensaios realizados bem como suas respectivas condições avaliadas.

Quadro 4.1 – Sumarização dos ensaios realizados com suas respectivas condições avaliadas

| <i>Ensaio</i> | <i>Condições</i> |
|-------------------------------|---|
| Ensaio 1 (Escala reduzida) | Condição 1: Meio TAP (Condição controle) |
| | Condição 2: Meio TAP suplementado com PSL (Concentração inicial de 1 g/L de lactose) |
| | Condição 3: Meio TAP suplementado com GLC (Concentração inicial de 1 g/L de glicose) |
| | Condição 4: Meio TAP suplementado com PSL e GLC (Concentração inicial de 1 g/L de lactose e 1 g/L de glicose) |
| Ensaio 2 (Escala reduzida) | Condição 5: Meio TAP isento de enxofre (Condição controle) |
| | Condição 6: Meio TAP isento de enxofre suplementado com PSL (Concentração inicial de 1 g/L de lactose) |
| | Condição 7: Meio TAP isento de enxofre suplementado com GLC (Concentração inicial de 1 g/L de glicose) |
| | Condição 8: Meio TAP isento de enxofre suplementado com PSL e GLC (Concentração inicial de 1 g/L de lactose e 1 g/L de glicose) |
| Ensaio 3 (Escala reduzida) | Condição 9: Meio TAP (Condição controle) |
| | Condição 10: Meio TAP suplementado com PSL (Concentração inicial de 5 g/L de lactose) |
| | Condição 11: Meio TAP suplementado com soro de leite (Concentração inicial de 5 g/L de lactose) |
| | Condição 12: Meio TAP suplementado com lactose PA (Concentração inicial de 5 g/L de lactose) |

MATERIAL E MÉTODOS

Continuação do Quadro 4.1.

| | |
|-------------------------------|--|
| Ensaio 4 (Escala reduzida) | Condição 13: Meio TAP (Condição controle) |
| | Condição 14: Meio RCV metabolizado |
| | Condição 15: Meio RCV metabolizado suplementado com PSL (Concentração inicial de 5 g/L de lactose) |
| | Condição 16: Meio RCV metabolizado suplementado com GLC (Concentração inicial de 5 g/L de glicose) |
| Ensaio 5 (Escala reduzida) | Condição 17: Meio TAP (Condição controle) |
| | Condição 18: Meio TAP isento de ácido acético |
| | Condição 19: Meio TAP isento de enxofre (Condição controle) |
| | Condição 20: Meio TAP isento de enxofre e ácido acético |
| Ensaio 6 (Escala reduzida) | Condição 21: Meio TAP (Condição controle) |
| | Condição 22: Meio TAP suplementado com PSL (Concentração inicial de 5 g/L de lactose) |
| | Condição 23: Meio TAP isento de ácido acético suplementado com PSL (Concentração inicial de 5 g/L de lactose) |
| | Condição 24: Meio TAP isento de enxofre (Condição controle) |
| | Condição 25: Meio TAP isento de enxofre suplementado com PSL (Concentração inicial de 5 g/L de lactose) |
| | Condição 26: Meio TAP isento de enxofre e ácido acético suplementado com PSL (Concentração inicial de 5 g/L de lactose) |
| Ensaio 7 (Escala ampliada) | Condição 27: Meio TAP (Condição controle) |
| | Condição 28: Meio TAP isento de enxofre (Condição controle) |
| | Condição 29: RCV metabolizado |
| | Condição 30: RCV metabolizado suplementado com PSL (Concentração inicial de 5 g/L de lactose) |
| Ensaio 8 (Escala ampliada) | Condição 31: Fermentação com corte - RCV metabolizado suplementado com PSL com reabastecimentos a cada 48 horas (Concentração de 5 g/L de lactose) |

GLC: glicose; PSL: permeado de soro de leite.

MATERIAL E MÉTODOS

4.8. Metodologia Analítica

4.8.1. Determinação do crescimento celular

O procedimento da concentração de sólidos voláteis (SV) foi realizado pelo método gravimétrico. Para a construção da curva de calibração, a análise de absorbância foi determinada em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 665 nm (DO_{665}), e, consequentemente convertida em g/L pela equação de correlação entre DO_{665} e g de SV/L (CLESCERI, EATON e GREENBERG, 1998). A primeira etapa consistiu na centrifugação de uma amostra de inóculo de 20 mL a 8000 rpm durante 20 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o sedimento obtido lavado por duas vezes com água destilada e centrifugado após cada lavagem. Posteriormente, o sedimento celular foi transferido para as cápsulas de porcelana (cadinho), as quais foram previamente calcinadas e pesadas, tendo P_0 (mg). Por conseguinte, estas cápsulas foram mantidas na estufa a uma temperatura de 110 ± 1 °C, até a estabilidade do peso. Após esta etapa, as cápsulas foram destinadas a um dessecador para esfriarem, e a partir daí foram pesadas novamente, determinando P_i (mg). A próxima etapa consistiu em calcinar a amostra celular em mufla a uma temperatura de 550 ± 1 °C por um período de 30 minutos. Posteriormente as amostras foram levadas a um dessecador para seu resfriamento, sendo novamente pesadas obtendo P_f (mg). As Equações 4.1, 4.2 e 4.3 representam a quantificação dos sólidos totais (ST), voláteis (SV) e fixos (SF). A curva de calibração construída relacionou a absorbância observada a 665 nm e a concentração de sólidos voláteis.

$$ST \left(\frac{g}{L} \right) = \frac{(P_i - P_0)}{V} \quad (4.1)$$

$$SV \left(\frac{g}{L} \right) = \frac{(P_i - P_f)}{V} \quad (4.2)$$

$$ST \left(\frac{g}{L} \right) = \frac{(P_f - P_0)}{V} \quad (4.3)$$

4.8.2. Determinação da clorofila

Para a quantificação da clorofila, uma suspensão de 20 mL de algas foi centrifugada a 8000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante descartado e o sedimento obtido ressuspense em

MATERIAL E MÉTODOS

acetona (90 %) a um volume de 10 mL. Após isso, a lise celular foi verificada através do uso de esferas de vidro. O processo de abrasão foi realizado em agitador tipo vórtex utilizando esferas de vidro, 1,1 g de esfera de vidro com diâmetro entre 0,6 e 0,8 mm para cada mililitro de suspensão celular. A suspensão foi agitada por 40 minutos, com intervalos de 2 minutos de repouso em banho de gelo a cada 5 minutos de agitação, obtendo-se o extrato bruto com células. Em seguida, a clorofila foi quantificada através de análise espectrofotométrica, método de JEFFREY e HUMPHREY (1975) modificado (MOHSENPOUR, RICHARDS e WILLOUGHBY, 2012). Como branco utilizou-se uma solução de acetona a 90 %. As concentrações de clorofila *a*, *b* e *c* foram calculadas de acordo com as Equações 4.4, 4.5 e 4.6 (JEFFREY e HUMPHREY, 1975), enquanto que a clorofila total foi obtida pela soma das clorofilas *a*, *b* e *c*, representada pela Equação 4.7.

$$\begin{aligned} \text{clorofila } a \left(\frac{mg}{m^3} \right) = & (11,85 * (DO_{664} - DO_{750}) - 1,54 * (DO_{647} - DO_{750}) - 0,08 * \\ & (DO_{630} - DO_{750})) * \left(\frac{V_e}{L * V_f} \right) \end{aligned} \quad (4.4)$$

$$\begin{aligned} \text{clorofila } b \left(\frac{mg}{m^3} \right) = & (-5,43 * (DO_{664} - DO_{750}) + 21,03 * (DO_{647} - DO_{750}) - 2,66 * \\ & (DO_{630} - DO_{750})) * \left(\frac{V_e}{L * V_f} \right) \end{aligned} \quad (4.5)$$

$$\begin{aligned} \text{clorofila } c \left(\frac{mg}{m^3} \right) = & (-1,67 * (DO_{664} - DO_{750}) - 7,60 * (DO_{647} - DO_{750}) + 24,52 * \\ & (DO_{630} - DO_{750})) * \left(\frac{V_e}{L * V_f} \right) \end{aligned} \quad (4.6)$$

$$\text{clorofila total} \left(\frac{mg}{m^3} \right) = (\text{clorofila } a) + (\text{clorofila } b) + (\text{clorofila } c) \quad (4.7)$$

Nas quais, DO a densidade ótica, L a espessura da cubeta, V o volume de extração e V_f o volume de filtrado (suspensão celular). A absorbância verificada a 750 nm foi a correlação para a turbidez.

MATERIAL E MÉTODOS

4.8.3. Análises cromatográficas

4.8.3.1. Determinação de ácidos orgânicos, açúcares e etanol – cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

As concentrações de ácidos, açúcares e etanol foram analisadas por cromatografia líquida de alto desempenho HPLC (*Shimadzu* modelo LC-20A proeminência, Supelcogel, coluna C-610H), sendo que os compostos de açúcares e etanol foram detectados pelo índice de refração, enquanto que os compostos de ácidos orgânicos foram determinados por luz ultravioleta (UV) no comprimento de onda de 210 nm. As amostras foram diluídas e posteriormente filtradas através de um filtro 0,22 µm. A temperatura da coluna manteve-se a 32 °C e uma solução aquosa de H₃PO₄ (0,1 %) foi utilizada como fase móvel para a eluição a 0,5 mL/min. O volume da amostra injetada no HPLC foi de 20 µL.

4.8.4. Determinação do teor de carbono total e nitrogênio total

As amostras foram caracterizadas em relação ao carbono orgânico total (COT) e nitrogênio total (NT) por meio da técnica de combustão catalítica a alta temperatura, utilizando o aparelho analisador Total Organic Carbon Analyzer TOC-L CPH/CPN da Shimadzu.

4.9. Determinação dos parâmetros cinéticos: taxa específica máxima de crescimento, tempo de duplicação e coeficientes de consumo específicos

A taxa específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) foi determinada durante a fase de crescimento exponencial através do coeficiente angular da reta ajustada para a variação do logaritmo neperiano da densidade celular com o tempo, conforme mostrado na Equação 4.8.

$$\mu_{\text{máx}} = \frac{\Delta(\ln X)}{\Delta t} \quad (4.8)$$

O tempo de duplicação celular (t_d) foi determinado pela razão entre o logaritmo neperiano de 2 e $\mu_{\text{máx}}$ como mostra a Equação 4.9.

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu_{\text{máx}}} \quad (4.9)$$

MATERIAL E MÉTODOS

Os coeficientes de consumo específicos (q_i) de glicose, lactose, açúcar total e ácido acético foram determinados durante a fase de crescimento exponencial através da Equação 4.10.

$$q_i = \frac{\left(\frac{dS_i}{dt}\right)}{\left(\frac{dX_v}{dt}\right)} * \mu_{m\acute{a}x} \quad (4.10)$$

Sendo S_i a concentração do substrato i (glicose, lactose, açúcar total ou ácido acético), X_v a concentração de células viáveis, $\mu_{m\acute{a}x}$ a taxa específica máxima de crescimento e t o tempo.

4.10. Produtividade

O cálculo da produtividade, em relação ao etanol produzido foi obtido conforme apresentado na Equação 4.11.

$$Produtividade = \frac{mmol\ de\ etanol}{volume\ reacional * tempo} \quad (4.11)$$

5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste tópico foi abordado o detalhamento dos resultados obtidos em escala reduzida (reatores de 50 mL) e em escala ampliada (biorreator de 1,5 L), avaliando a variação de parâmetros operacionais como fontes de carbono, supressão de ácido acético e de enxofre, além do uso de sistema híbrido, a fim de se obter uma melhor compreensão do metabolismo da microalga *C. reinhardtii*.

5.1. Escala reduzida: Reatores de 50 mL (Frascos de penicilina)

5.1.1. Avaliação das fontes de carbono

No primeiro ensaio (Ensaio 1) o meio TAP, utilizado como meio de fermentação para a microalga *C. reinhardtii*, foi suplementado com fontes de açúcar, sendo utilizados a glicose e o PSL (70 % de lactose) individualmente e simultaneamente, com concentrações iniciais de 1 g/L de glicose e/ou lactose. A Tabela 5.1 apresenta a densidade celular final e os resultados dos parâmetros de taxa específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) e tempo de duplicação (t_d), enquanto que a Figura 5.1 apresenta a cinética de crescimento celular ao longo da fermentação.

Tabela 5.1 - Dados de biomassa final, taxa específica máxima de crescimento e tempo de duplicação do Ensaio 1

| Condições | Biomassa final (g/L) | $\mu_{\text{máx}}$ (h ⁻¹) | t_d (h) |
|-------------------|-------------------------|--|--------------|
| TAP | 1,14 | 0,025 | 28 |
| TAP com PSL | 2,08 | 0,023 | 29 |
| TAP com GLC | 2,03 | 0,016 | 43 |
| TAP com PSL e GLC | 2,28 | 0,023 | 29 |

PSL: permeado de soro de leite; GLC: glicose

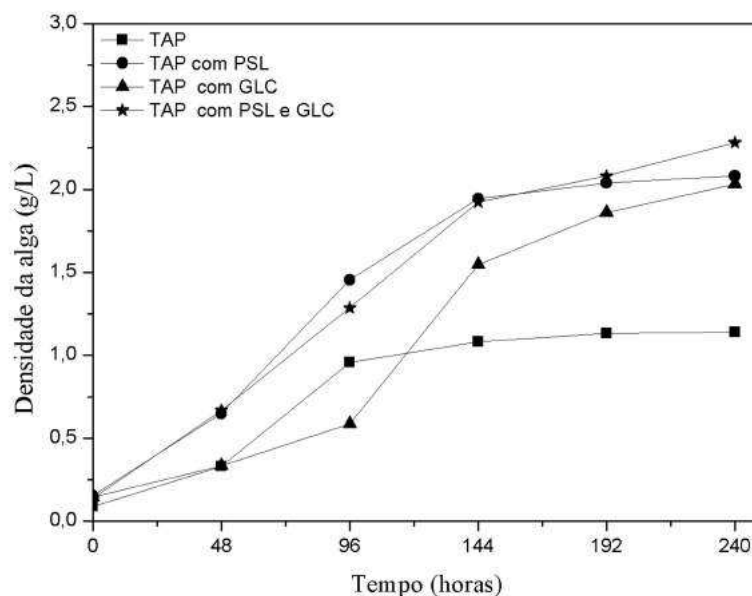


Figura 5.1 - Cinética de crescimento celular do Ensaio 1.

Observa-se pela Figura 5.1 que foi verificado crescimento celular ao longo da fermentação, atingindo uma densidade algal final de 2,28 g/L no meio suplementado com PSL e glicose (Condição 4). No meio suplementado apenas com PSL (Condição 2) a densidade algal final foi de 2,08 g/L e no meio suplementado apenas com glicose (Condição 3) a densidade algal final alcançou 2,03 g/L, enquanto que no meio TAP (Condição controle/ Condição 1), a densidade da alga atingiu 1,14 g/L. No meio TAP suplementado apenas com PSL (Condição 2), como também no meio TAP suplementado com glicose e PSL (Condição 4) simultaneamente, o comportamento foi semelhante, apresentando um crescimento exponencial nas 144 horas iniciais, além dos valores obtidos para a taxa específica máxima de crescimento e tempo de duplicação serem de $0,023 \text{ h}^{-1}$ e 29 horas, respectivamente (Tabela 5.1). Já na condição controle (Meio TAP), a fase exponencial foi verificada nas 96 horas iniciais, após este período manteve-se praticamente constante até o término da fermentação.

No meio TAP suplementado com glicose (Condição 3), o crescimento celular no início da fermentação foi mais lento que os demais e a fase exponencial foi verificada após 96 horas. Isso demonstrou uma maior adaptação da microalga *C. reinhardtii* ao uso da lactose presente no PSL. Segundo MARKOU e GEORGAKAKIS (2011) as algas azuis (cianobactérias) podem contribuir no tratamento de efluentes agroindustriais reduzindo consideravelmente poluentes inorgânicos (minerais e fosfatados) e orgânicos (lactose, amônia, gorduras e proteínas originalmente encontrados no leite). Por outro lado, PEREZ-GARCIA *et al.* (2011) discutiram que fontes de carbono como sacarose, lactato, lactose e etanol podem ser utilizadas sob condições heterotróficas em culturas de microalgas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com os resultados obtidos da densidade da alga, é possível observar que a concentração de clorofila, que foi analisada no início e no final da fermentação, está diretamente ligada a biomassa da alga, conforme apresenta a Tabela 5.2.

Tabela 5.2 - Quantificação da clorofila no início e no final da fermentação do Ensaio 1

| Tempo (horas) | Clorofila (mg/m ³) | | | |
|---------------|--------------------------------|-------------|-------------|-------------------|
| | TAP | TAP com PSL | TAP com GLC | TAP com GLC e PSL |
| 0 | 9,27 | 9,72 | 8,59 | 8,91 |
| 240 | 38,81 | 86,74 | 67,34 | 52,45 |

PSL: permeado de soro de leite; GLC: glicose

Para uma melhor compreensão da atividade da célula da alga procurou-se analisar o teor de clorofila, uma vez que pigmentos fotossintéticos (clorofilas e carotenóides), localizados na membrana tilacóide dos cloroplastos das algas, absorvem a energia luminosa que é utilizada no processo fotossintético (HIRANO *et al.*, 1997). Tais pigmentos fornecem informações quanto à viabilidade destes indivíduos, já que a atividade fotossintética está direta ou indiretamente relacionada com a síntese de inúmeros insumos de valor agregado. Na Tabela 5.2 foi possível observar a síntese de clorofila, fato que sugere boa adaptação da alga nas condições operacionais utilizadas. Ressalta-se também que na presença de lactose, em detrimento da glicose, uma maior síntese de clorofila foi verificada, atingindo 86,74 mg/m³ no final da fermentação. Isto novamente revela a preferência da alga pela fonte mixotrófica de carbono lactose na produção de biomassa.

Neste ensaio, a produção de etanol foi insignificante, indicando que a microalga consumiu os açúcares privilegiando rotas metabólicas destinadas ao seu crescimento. Desta forma, torna-se necessário compreender como ocorreu o consumo de glicose, de lactose, bem como a evolução do ácido acético, apresentados nas Figuras 5.2, 5.3 e 5.4, respectivamente, enquanto que a Tabela 5.3 apresenta o consumo específico de glicose, de lactose, de açúcar total e de ácido acético.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 5.3 - Dados do consumo específico da glicose (q_{GLC}), da lactose (q_{LAC}), do açúcar total (q_{AT}) e do ácido acético ($q_{ác. acético}$) do Ensaio 1

| Condições | q_{GLC} ($g_{GLC}/g_{biomassa} \cdot h$) | q_{LAC} ($g_{LAC}/g_{biomassa} \cdot h$) | q_{AT} ($g_{AT}/g_{biomassa} \cdot h$) | $q_{ác. acético}$ ($g_{ác. acético}/g_{biomassa} \cdot h$) |
|-------------------|---|---|---|---|
| TAP | - | - | - | 0,0109 |
| TAP com PSL | - | 0,0130 | - | 0,0115 |
| TAP com GLC | 0,0082 | - | - | 0,0068 |
| TAP com PSL e GLC | - | - | 0,0254 | 0,0107 |

PSL: permeado de soro de leite; GLC: glicose; AT: açúcar total

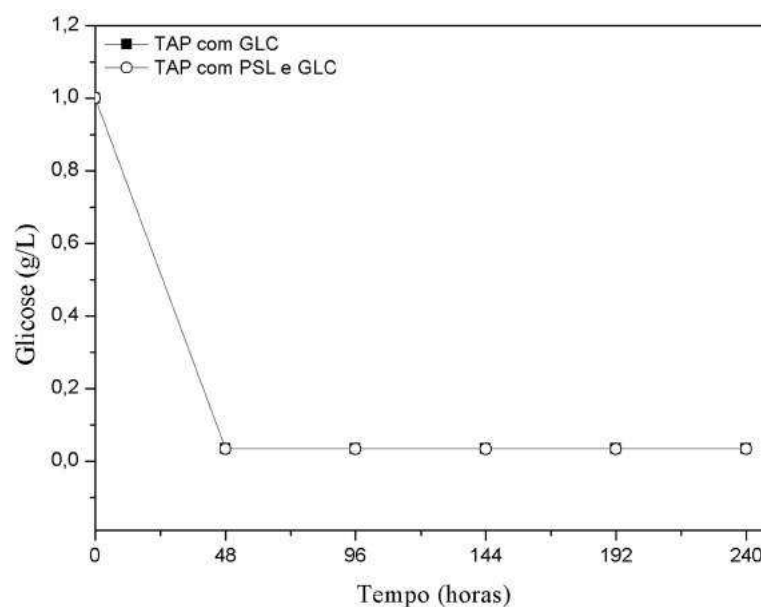


Figura 5.2 - Consumo de glicose do Ensaio 1.

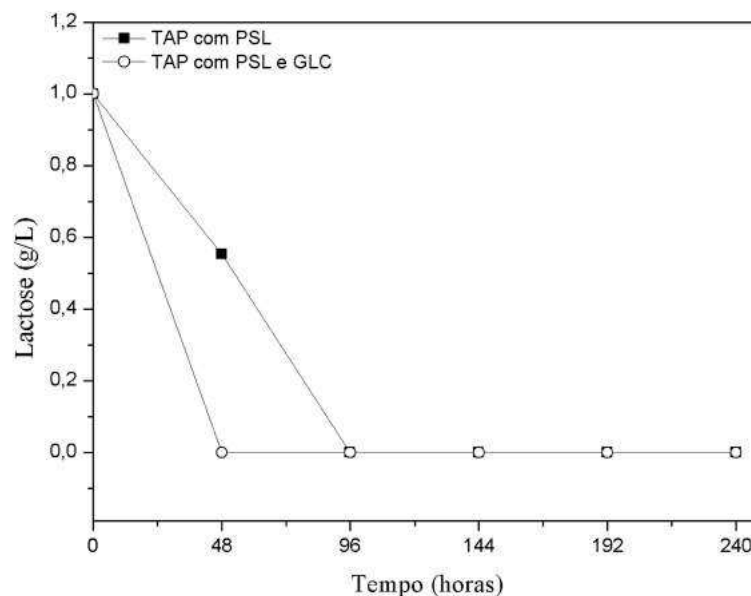


Figura 5.3 - Consumo de lactose do Ensaio 1.

Pelas Figuras 5.2 e 5.3 observa-se que a glicose foi totalmente consumida nas 48 horas iniciais nas duas condições suplementadas com este composto (Condições 3 e 4), enquanto que a lactose foi totalmente consumida nas 96 horas iniciais no meio suplementado apenas com PSL (Condição 2). Porém, no meio com a presença de glicose e PSL (Condição 4), a lactose foi consumida totalmente nas 48 horas iniciais. De acordo com a Tabela 5.3, observou-se que o consumo específico em relação aos açúcares é maior no meio com a presença de lactose ($0,0130 \text{ g}_{\text{LAC}}/\text{g}_{\text{biomassa}}\cdot\text{h}$).

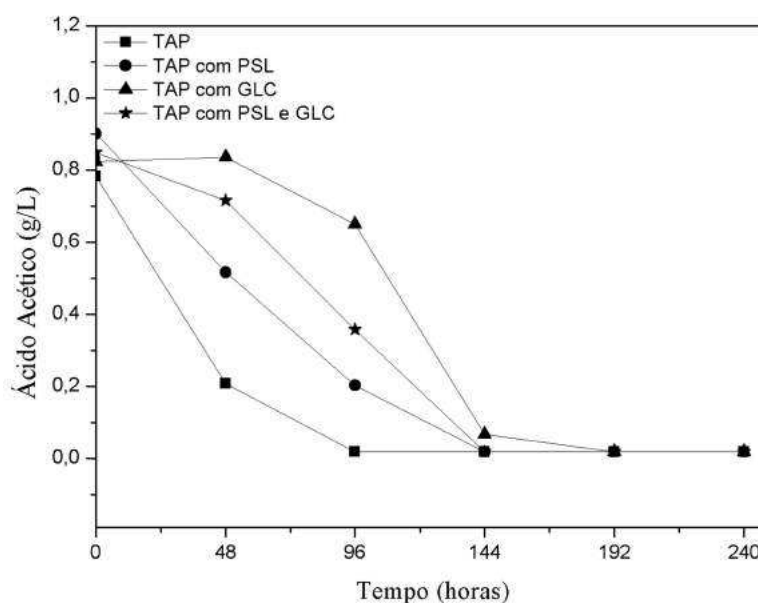


Figura 5.4 - Evolução do ácido acético do Ensaio 1.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em relação ao ácido acético apresentado na Figura 5.4, percebe-se que no meio TAP (Condição 1) o ácido acético foi consumido nas 96 horas iniciais, em seguida, destaca-se o meio TAP suplementado apenas PSL (Condição 2), em que o ácido acético foi consumido mais rapidamente quando comparado com as demais condições suplementadas com açúcares. Tal fato também foi confirmado pelo cálculo do consumo específico deste componente (Tabela 5.3). No entanto, no meio TAP contendo glicose (Condição 3), o consumo de ácido acético foi lento no início, apresentando um consumo acelerado após as 96 horas que coincide com a fase exponencial do crescimento celular.

Observa-se que em 144 horas o ácido acético foi praticamente consumido em todas as condições analisadas e, nesse mesmo tempo, a glicose e a lactose já tinham sido consumidas. Percebe-se que no período de 144 horas em diante o crescimento celular permaneceu praticamente constante (Figura 5.1), devendo-se, portanto a exaustão das fontes de carbono no meio. Além disso, é possível verificar que o consumo dos açúcares foi mais rápido que o consumo de ácido acético, relatando a preferência da microalga para este tipo de nutriente, conforme verificado na Tabela 5.3.

Além da presença de fontes de carbono no meio TAP, a presença ou não de enxofre também influencia o metabolismo da alga, com isso, no Ensaio 2 foi avaliado o meio TAP isento de enxofre suplementado com glicose e PSL individualmente e simultaneamente, com concentrações iniciais de 1 g/L de glicose e/ou lactose, como meio de fermentação para a microalga *C. reinhardtii*.

A Tabela 5.4 apresenta a densidade celular final e os resultados dos parâmetros de taxa específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) e tempo de duplicação (t_d), enquanto que a cinética de crescimento celular está apresentada na Figura 5.5.

Tabela 5.4 - Dados de biomassa final, taxa específica máxima de crescimento e tempo de duplicação do Ensaio 2

| Condições | Biomassa final (g/L) | $\mu_{\text{máx}}$ (h ⁻¹) | t_d (h) |
|---------------------|-------------------------|--|--------------|
| TAP-S | 1,17 | 0,021 | 33 |
| TAP-S com PSL | 1,68 | 0,027 | 26 |
| TAP-S com GLC | 1,20 | 0,022 | 31 |
| TAP-S com PSL e GLC | 1,61 | 0,028 | 25 |

TAP-S: TAP isento de enxofre; PSL: permeado de soro de leite; GLC: glicose

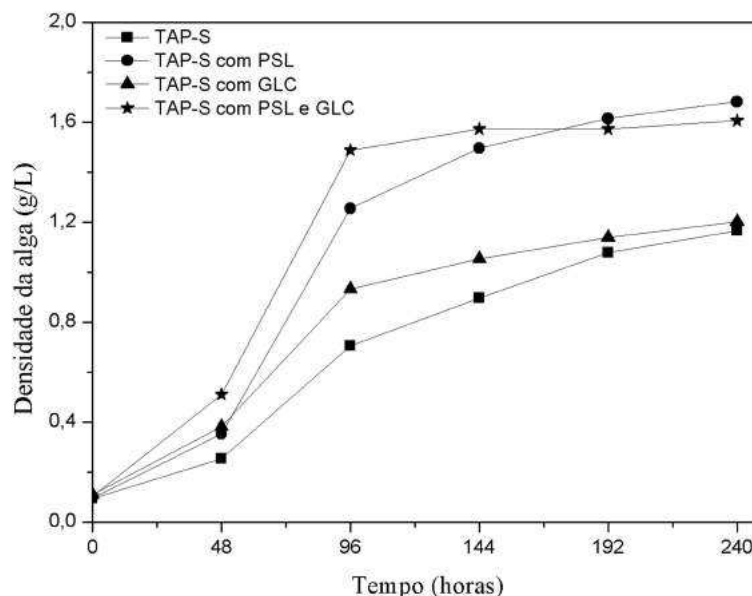


Figura 5.5 - Cinética de crescimento celular do Ensaio 2.

A partir da Figura 5.5, verifica-se que houve crescimento celular ao longo da fermentação, atingindo uma densidade algal final de 1,68 g/L no meio suplementado apenas com PSL (Condição 6), enquanto que no meio suplementado com glicose e PSL (Condição 8) simultaneamente a densidade algal final foi de 1,61 g/L. No meio suplementado apenas com glicose (Condição 7) a densidade algal final alcançou 1,20 g/L, que foi praticamente a mesma alcançada pelo meio TAP isento de enxofre sem a adição de açúcares (Condição controle/Condição 5), sendo de 1,17 g/L. Observa-se que na Tabela 5.4 a taxa específica máxima de crescimento está em torno de $0,02 \text{ h}^{-1}$ em todas as condições analisadas, como também, o tempo de duplicação está variando de 25 a 33 horas. O crescimento verificado nas condições apresentadas foi semelhante, apresentando uma fase exponencial após as 48 horas. Além disso, é nítido que no meio TAP isento de enxofre suplementado com glicose e PSL (Condição 8), após as 96 horas, o crescimento se mantém constante até o término da fermentação, enquanto que nas demais condições ainda se observa ligeiro crescimento. Como no experimento anterior (Ensaio 1), novamente o meio suplementado apenas com glicose (Condição 7) demonstrou um crescimento retardado, confirmando que a microalga *C. reinhardtii* apresentou maior adaptação ao uso da lactose presente no PSL. Além disso, deve-se destacar que no Ensaio 1, a densidade celular atingiu valores mais elevados (alcançando em torno de 2 g/L de biomassa de alga), já que a microalga é originalmente cultivada em meio TAP contendo enxofre e já se encontrava plenamente adaptada a este tipo de meio.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com os resultados obtidos da densidade da alga, é possível observar que a concentração de clorofila, que foi analisada no início e no final da fermentação, está diretamente ligada a biomassa da alga, conforme apresenta a Tabela 5.5.

Tabela 5.5 - Quantificação da clorofila no início e no final da fermentação do Ensaio 2

| Tempo (h) | Clorofila (mg/m ³) | | | |
|-----------|--------------------------------|---------------|---------------|---------------------|
| | TAP-S | TAP-S com PSL | TAP-S com GLC | TAP-S com GLC e PSL |
| 0 | 10,96 | 10,72 | 10,59 | 10,91 |
| 240 | 27,96 | 46,75 | 40,00 | 45,77 |

TAP-S: TAP isento de enxofre; PSL: permeado de soro de leite; GLC: glicose

Por meio da Tabela 5.5, é possível identificar uma maior síntese de clorofila no meio suplementado apenas com PSL (Condição 6: 46,75 mg/m³), seguido pelo meio com a presença de glicose e PSL (Condição 8: 45,77 mg/m³). Posteriormente, o meio suplementado com glicose (Condição 7), sendo de 40 mg/m³, e por fim, a condição controle (Meio TAP isento de enxofre/ Condição 5), com concentração de clorofila em 27,96 mg/m³. Com base nestes valores é possível relatar que a concentração de clorofila está diretamente ligada a densidade celular, uma vez que as maiores concentrações de clorofila coincidem também com a máxima biomassa (Tabela 5.4).

Neste ensaio foi verificada a síntese de etanol conforme apresenta a Figura 5.6, enquanto que a Tabela 5.6 apresenta a máxima produção de etanol e respectivas produtividades volumétricas.

Tabela 5.6 - Dados de concentração máxima de etanol produzido e respectivas produtividades volumétricas de etanol do Ensaio 2

| Condições | Concentração de etanol (mg/L) | Produtividade volumétrica de etanol (mmol/L.dia) |
|---------------------|-------------------------------|--|
| TAP-S | 40,22 | 0,44 |
| TAP-S com PSL | 911,39 | 3,29 |
| TAP-S com GLC | 1114,55 | 2,42 |
| TAP-S com PSL e GLC | 1189,91 | 2,58 |

TAP-S: TAP isento de enxofre; PSL: permeado de soro de leite; GLC: glicose

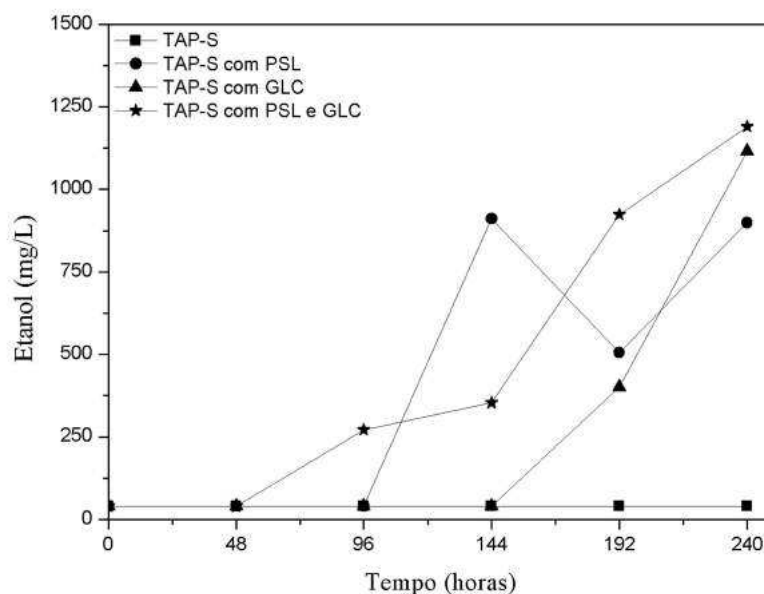


Figura 5.6 - Evolução do etanol do Ensaio 2.

De acordo com a Figura 5.6, observa-se que o máximo de etanol produzido foi de 1189,91 mg/L no meio TAP isento de enxofre suplementado com glicose e PSL (Condição 8). Em seguida foi alcançada 1114,55 mg/L de etanol no meio TAP isento de enxofre contendo glicose (Condição 7) no final da fermentação. Entretanto, no meio TAP isento de enxofre com PSL (Condição 6), a concentração de etanol atingiu 911,39 mg/L no tempo de 144 horas. Além disso, é necessário mencionar que no meio TAP isento de enxofre sem a adição de açúcares (Condição 5), a produção de etanol foi insignificante. Isto indica que para a produção deste biocombustível fontes mixotróficas são essenciais, haja vista que tais fontes estão diretamente relacionadas à via glicolítica na qual o piruvato atua como precursor do etanol (Figura 3.5).

Para um melhor entendimento do aparecimento de etanol apenas nas condições suplementadas com açúcares, é necessário entender como ocorreu o consumo de glicose, de lactose, bem como a evolução do ácido acético, apresentados nas Figuras 5.7, 5.8 e 5.9, respectivamente, enquanto que a Tabela 5.7 apresenta o consumo específico de glicose, de lactose, de açúcar total e de ácido acético.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 5.7 - Dados do consumo específico da glicose (q_{GLC}), da lactose (q_{LAC}), do açúcar total (q_{AT}) e do ácido acético ($q_{ác. acético}$) do Ensaio 2

| Condições | q_{GLC} ($g_{GLC}/g_{biomassa} \cdot h$) | q_{LAC} ($g_{LAC}/g_{biomassa} \cdot h$) | q_{AT} ($g_{AT}/g_{biomassa} \cdot h$) | $q_{ác. acético}$ ($g_{ác. acético}/g_{biomassa} \cdot h$) |
|---------------------|---|---|---|---|
| TAP-S | - | - | - | 0,0092 |
| TAP-S com PSL | - | 0,0168 | - | 0,0069 |
| TAP-S com GLC | 0,0196 | - | - | 0,0018 |
| TAP-S com PSL e GLC | - | - | 0,0394 | 0,0023 |

TAP-S: TAP isento de enxofre; PSL: permeado de soro de leite; GLC: glicose

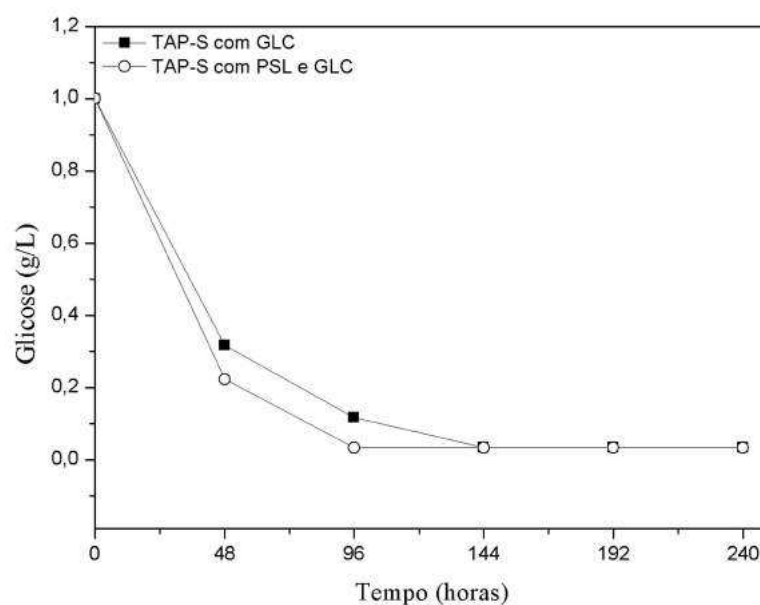


Figura 5.7 - Consumo de glicose do Ensaio 2.

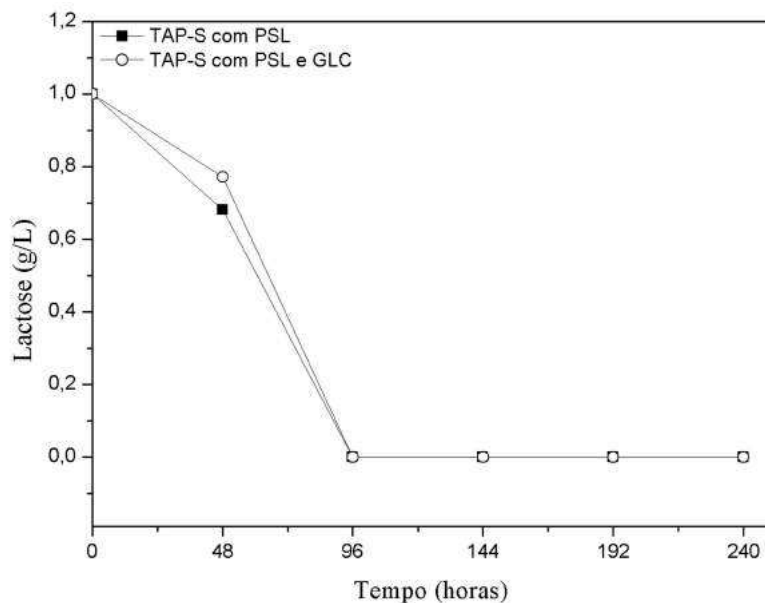


Figura 5.8 - Consumo de lactose do Ensaio 2.

Analisando as Figuras 5.7 e 5.8, percebe-se que no meio TAP isento de enxofre contendo glicose (Condição 7), este açúcar foi totalmente consumido em 144 horas, e foi a partir deste período que ocorreu a produção de etanol. Da mesma forma que no meio TAP isento de enxofre suplementado com glicose e PSL (Condição 8), em que tanto a glicose quanto a lactose foram consumidas totalmente em 96 horas, foi verificada a produção de etanol neste tempo. Já no meio TAP isento de enxofre com PSL (Condição 6), observou-se que a lactose foi totalmente consumida em 96 horas. A partir deste período ocorreu a produção de etanol. É possível verificar ainda uma diferença acentuada no perfil de consumo de glicose e lactose (Figuras 5.7 e 5.8).

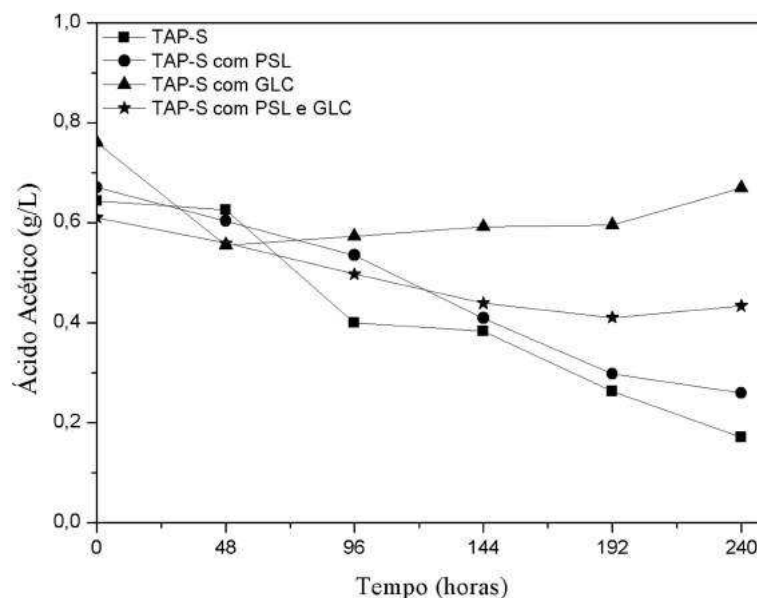


Figura 5.9 - Evolução do ácido acético do Ensaio 2.

Através da Figura 5.9, verifica-se que dentre as condições analisadas, no meio TAP isento de enxofre com glicose (Condição 7), a concentração de ácido permaneceu praticamente constante ao longo da fermentação, apresentando um valor menor de consumo específico deste substrato que as demais condições (Tabela 5.7). Entretanto, no meio TAP isento de enxofre (Condição 5), o ácido acético foi consumido com uma velocidade maior ($0,0092 \text{ gác. acético/g}_{\text{biomassa}}\cdot\text{h}$) aquela observada na presença de glicose e/ou lactose. Isto sugere que nesta condição o ácido acético atuou como fonte de carbono utilizado pela microalga para seu crescimento. Comparando o comportamento do consumo de ácido acético neste ensaio (Ensaio 2) com o experimento anterior (Ensaio 1), observam-se valores de consumo específico inferiores no Ensaio 2, conforme apresentado na Tabela 5.7. Isto indica que a ausência de enxofre também influencia na redução do consumo deste ácido pelas algas.

Comparando-se o Ensaio 1 e o Ensaio 2 concluiu-se que a produção de etanol só foi verificada na condição de supressão de enxofre. O consumo de lactose e glicose ocorreu praticamente em 48 horas no Ensaio 1, enquanto que no Ensaio 2 o consumo dos açúcares e de ácido acético foi mais lento, além de se observar uma densidade final de algas mais baixa. Isto pode ser atribuído a uma condição de estresse em que a alga foi exposta no caso da supressão de enxofre. Possivelmente, a alga preparou o seu metabolismo para o período de reserva, controlando o consumo dos nutrientes presentes no meio, como também induzindo a produção de novos subprodutos do metabolismo, como o etanol, que posteriormente poderia ser destinado para o consumo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Outro ponto a ser lembrado, sendo já citado na revisão bibliográfica é que a microalga *C. reinhardtii* é capaz de acumular amido e TAGs (triacilgliceróis) quando ocorre o esgotamento do enxofre (DOEBBE *et al.*, 2010; WANG *et al.* 2009; WORK *et al.*, 2010). Desta forma, a partir das vias fermentativas, o piruvato deriva da oxidação do amido e serve como substrato para a síntese de diversos produtos, como o etanol.

Com base nos experimentos realizados anteriormente, foi verificado que a fonte de açúcar mais apropriada, dentre as testadas, para o crescimento da microalga *C. reinhardtii* é a lactose. A partir disso, no terceiro ensaio (Ensaio 3) foram avaliadas três fontes diferentes de lactose, sendo o PSL (70 % de lactose), soro de leite (50 % de lactose) e lactose PA. Neste caso, a concentração inicial de lactose suplementada no meio TAP foi ajustada para 5 g/L. A Tabela 5.8 apresenta a densidade final das algas e os resultados dos parâmetros de taxa específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) e tempo de duplicação (t_d), enquanto que a cinética de crescimento celular está representada na Figura 5.10.

Tabela 5.8 - Dados de biomassa final, taxa específica máxima de crescimento e tempo de duplicação do Ensaio 3

| Condições | Biomassa Final (g/L) | $\mu_{\text{máx}}$ (h ⁻¹) | t_d (h) |
|----------------|-------------------------|--|--------------|
| TAP | 1,14 | 0,025 | 28 |
| TAP com PSL | 1,65 | 0,028 | 25 |
| TAP com SL | 1,62 | 0,026 | 26 |
| TAP com LAC PA | 1,90 | 0,026 | 26 |

PSL: permeado de soro de leite; SL: soro de leite; LAC: lactose

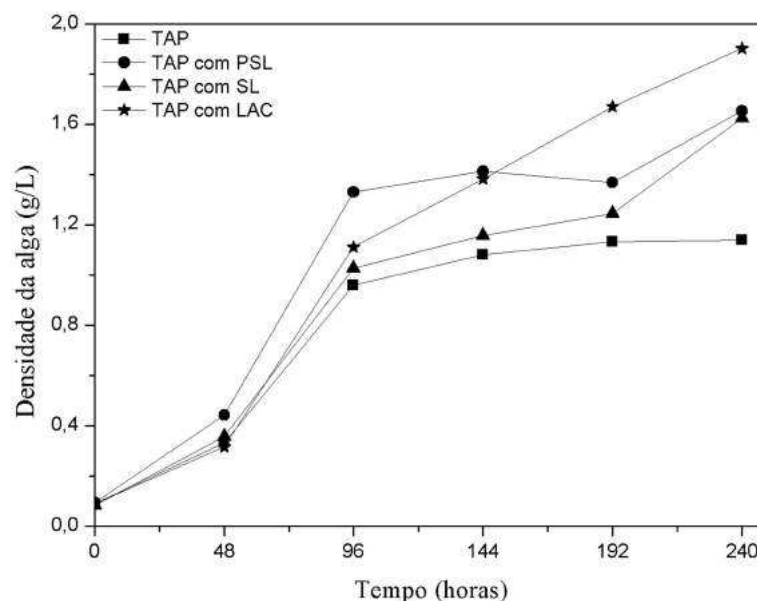


Figura 5.10 - Cinética de crescimento celular do Ensaio 3.

Por meio da análise da Figura 5.10, verifica-se que houve crescimento celular ao longo da fermentação, atingindo uma densidade final das algas de 1,90 g/L no meio suplementado com lactose PA (Condição 12), enquanto que no meio suplementado com PSL (Condição 10) a densidade final das algas foi de 1,65 g/L. No meio suplementado com soro de leite (Condição 11) a densidade final das algas alcançou 1,62 g/L e no meio TAP (Condição controle/ Condição 9) foi de 1,14 g/L. De acordo com a Tabela 5.8, identifica-se um menor valor de $\mu_{\text{máx}}$ e um maior valor de t_d na condição controle (Meio TAP). Isso já era esperado em função do seu comportamento de crescimento ser mais lento que os demais, uma vez que não havia a presença de glicose e lactose, mas somente ácido acético. O crescimento verificado nos meios suplementados com PSL e soro de leite (Condição 10 e 11) foi semelhante, apresentando uma fase exponencial após as 48 horas. Vale ressaltar que entre 96 e 192 horas foi observado um período em que a densidade das algas permaneceu constante e, após este período verificou-se um ligeiro aumento na densidade celular. No meio suplementado com lactose (Condição 12) verificou-se um crescimento acentuado ao longo de toda a fermentação. Deve-se relatar que no meio TAP (Condição controle/ Condição 9) foi observado um crescimento exponencial até às 96 horas, sendo que a partir deste período a densidade das algas permanece praticamente constante. Com base neste ensaio, foi nítido que dentre as fontes de lactose utilizadas, a facilmente metabolizada e que proporcionou maior biomassa de alga foi a lactose PA.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com os resultados obtidos da densidade da alga, é possível observar que a concentração de clorofila, que foi analisada no início e no final da fermentação, está diretamente ligada a biomassa da alga, conforme apresenta a Tabela 5.9.

Tabela 5.9 - Quantificação da clorofila no início e no final da fermentação do Ensaio 3

| Tempo (horas) | Clorofila (mg/m ³) | | | |
|---------------|--------------------------------|-------------|------------|----------------|
| | TAP | TAP com PSL | TAP com SL | TAP com LAC PA |
| 0 | 9,27 | 8,93 | 8,64 | 8,76 |
| 240 | 38,81 | 49,56 | 50,08 | 65,75 |

PSL: permeado de soro de leite; SL: soro de leite; LAC: lactose

Por meio da Tabela 5.9, é possível identificar uma maior síntese de clorofila no final da fermentação no meio suplementado com lactose PA (Condição 12), atingindo 65,75 mg/m³. Em seguida, verificou-se nos meios com PSL e soro de leite (Condição 10 e 11) alcançando aproximadamente 50 mg/m³. Por fim, a condição controle (Meio TAP) com concentração de clorofila de até 38,81 mg/m³. Com base nestes valores é possível relatar que a concentração de clorofila está diretamente relacionada a densidade de algas, uma vez que as maiores concentrações de clorofila coincidem também com a máxima biomassa, conforme mostrado na Tabela 5.8.

Neste ensaio foi verificada a síntese de etanol conforme apresenta a Figura 5.11, enquanto que a Tabela 5.10 apresenta a máxima produção de etanol e respectivas produtividades volumétricas.

Tabela 5.10 - Dados de concentração máxima de etanol e respectivas produtividades volumétricas de etanol do Ensaio 3

| Condições | Concentração de etanol (mg/L) | Produtividade volumétrica de etanol (mmol/L.dia) |
|----------------|-------------------------------|--|
| TAP | 40,22 | 0,44 |
| TAP com PSL | 425,46 | 2,31 |
| TAP com SL | 515,94 | 1,87 |
| TAP com LAC PA | 394,58 | 2,14 |

PSL: permeado de soro de leite; SL: soro de leite; LAC: lactose

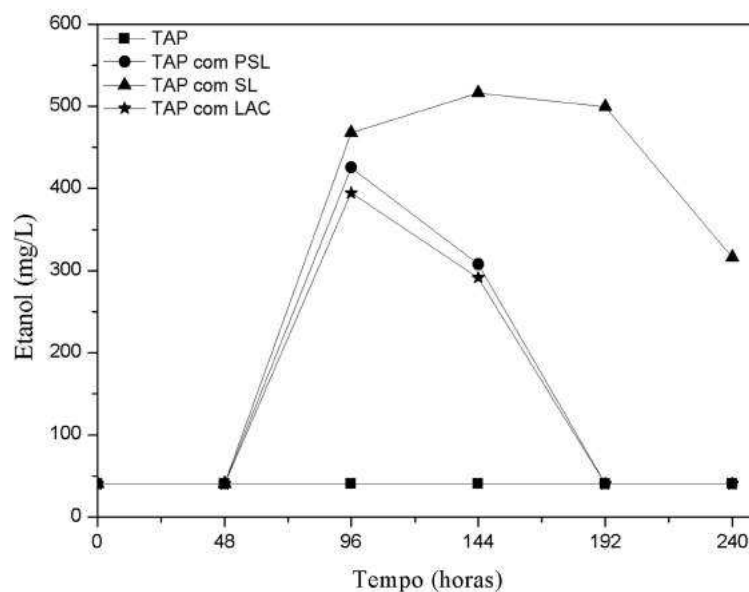


Figura 5.11 - Evolução do etanol do Ensaio 3.

De acordo com a Tabela 5.10 e a Figura 5.11, observa-se que o máximo de etanol produzido foi de 515,94 mg/L no meio TAP suplementado com soro de leite (Condição 11), seguido por 425,46 mg/L de etanol no meio TAP suplementado com PSL (Condição 10), enquanto que no meio TAP suplementado com lactose PA (Condição 12) atingiu 394,58 mg/L de etanol. Observa-se que nas condições em que houve a produção de etanol, o comportamento foi semelhante, uma vez que o primeiro pico de etanol surgiu no tempo de 96 horas. Logo depois, verificou-se um decréscimo na concentração de etanol, que coincide com a exaustão da lactose. Entretanto, no meio suplementado com soro de leite este decréscimo é mais lento. Conforme relatado, este comportamento de produção de etanol seguido de um decréscimo na sua concentração foi diferente do apresentado no Ensaio 2, em que a produção de etanol foi crescente, com exceção do meio suplementado apenas com PSL.

Para um melhor entendimento do aparecimento de etanol apenas nas condições suplementadas com açúcares, é necessário entender como ocorreu o consumo de lactose e a evolução do ácido acético, apresentados nas Figuras 5.12 e 5.13, respectivamente, enquanto que a Tabela 5.11 apresenta o consumo específico de lactose e de ácido acético.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 5.11 - Dados do consumo específico da lactose (q_{LAC}) e do ácido acético ($q_{ac. \text{ acético}}$) do Ensaio 3

| Condições | q_{LAC} ($g_{LAC}/g_{biomassa} \cdot h$) | $q_{ac. \text{ acético}}$ ($g_{ac. \text{ acético}}/g_{biomassa} \cdot h$) |
|----------------|---|---|
| TAP | - | 0,0115 |
| TAP com PSL | 0,0885 | 0,0066 |
| TAP com SL | 0,0850 | 0,0025 |
| TAP com LAC PA | 0,0723 | 0,0055 |

PSL: permeado de soro de leite; SL: soro de leite; LAC: lactose

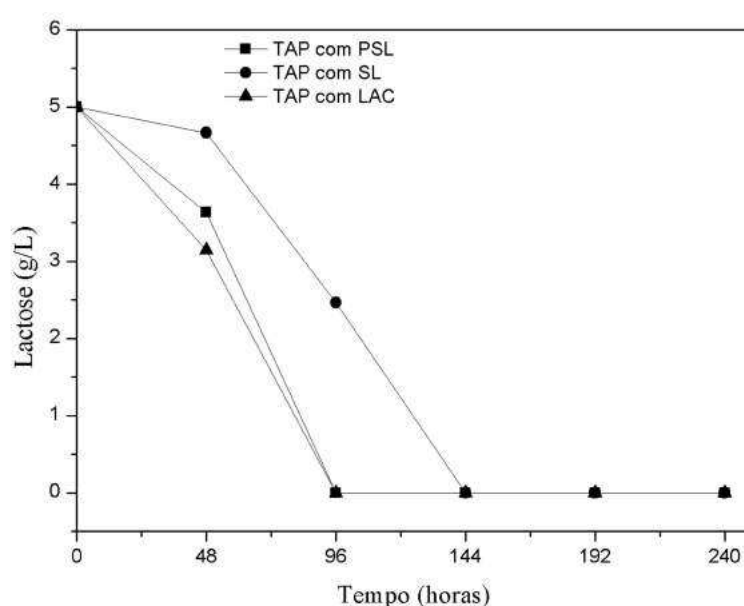


Figura 5.12 - Consumo de lactose do Ensaio 3.

Através da Figura 5.12, percebe-se que em todas as condições suplementadas com fontes de lactose, este açúcar foi consumido com uma velocidade maior nas primeiras 96 horas, sendo que a neste período verificou-se a produção de etanol (Figura 5.11). A lactose foi totalmente consumida em 96 horas no meio suplementado com PSL e lactose PA (Condições 10 e 12) e após este período o etanol que tinha sido formado foi consumido. No entanto, observa-se que no meio com soro de leite (Condição 11) o consumo total da lactose ocorreu em 144 horas, com isso, a alga utilizou os outros compostos presentes no soro de leite, como fonte de carbono, preferencialmente ao etanol, uma vez que apresenta em sua composição apenas 50 % de lactose.

Comparando este ensaio com o Ensaio 2, em que a concentração inicial de glicose e/ou lactose foi de 1 g/L, sendo praticamente consumido em 96 horas, como também foi observado neste ensaio, no entanto, a concentração inicial de lactose foi de 5 g/L. E ainda, no

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ensaio 2, a microalga foi exposta em meio com supressão de enxofre e nesta condição de estresse foi induzida a controlar o consumo de tais fontes de carbono.

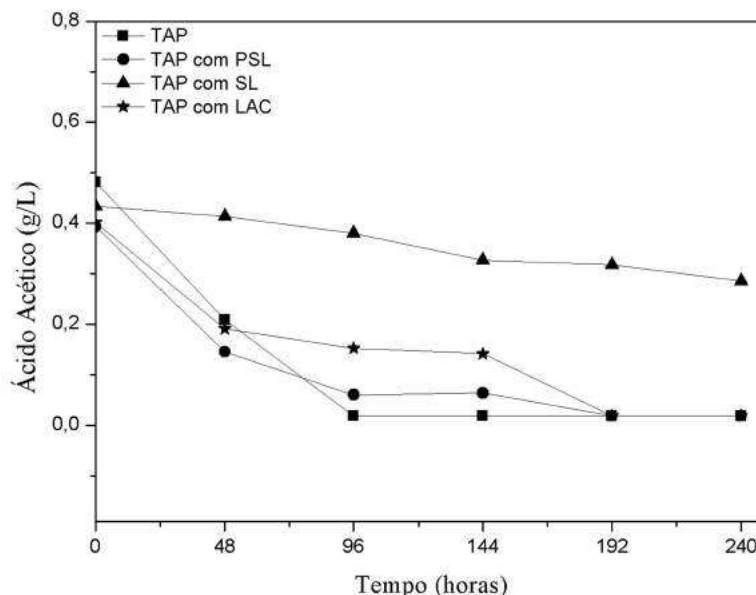


Figura 5.13 - Evolução do ácido acético do Ensaio 3.

Analisando a Figura 5.13, percebe-se que no meio suplementado com soro de leite (Condição 11), a concentração de ácido acético permaneceu praticamente constante ao longo da fermentação, apresentado um leve consumo após as 96 horas. Com isso, um valor menor de consumo específico deste ácido foi observado (Tabela 5.11). Nos meios suplementados com PSL e lactose PA (Condições 10 e 12), o consumo de ácido acético apresentou um comportamento semelhante, sendo que houve um consumo acelerado nas 48 horas iniciais e em seguida permaneceu praticamente constante. Observa-se também que, nestas condições, em 192 horas o ácido acético foi totalmente consumido, como também o etanol (Figura 5.11). Entretanto, no meio com PSL o consumo de ácido acético foi maior ao longo da fermentação, apresentando um valor mais elevado de consumo específico que as demais condições suplementadas com fontes de lactose (Tabela 5.11). Deve-se mencionar que no meio TAP (Condição 9), o ácido acético é consumido com uma velocidade maior que os demais (Tabela 5.11), conforme verificado no ensaio anterior (Ensaio 2). Isto demonstra que este foi o componente presente utilizado pela microalga para seu crescimento, uma vez que o ácido acético foi totalmente consumido em 96 horas e a partir deste período o crescimento celular permanece praticamente constante.

Comparando o Ensaio 3 e o Ensaio 2, verifica-se uma maior produção de etanol quando em supressão de enxofre (Ensaio 2), aproximadamente o dobro. Isto confirma mais

RESULTADOS E DISCUSSÃO

uma vez que quando a microalga está exposta a condições de estresse, a mesma possui a capacidade de sintetizar etanol. Além disso, a alga controlou o consumo de ácido acético, sendo consumido com uma velocidade menor, ou seja, a microalga prepara seu metabolismo para um momento de reserva, produzindo produtos (Etanol) e economizando no consumo dos componentes presentes no meio para uma possível necessidade de consumi-los para sua manutenção.

Ao comparar o Ensaio 3 com o Ensaio 1 (Meio TAP suplementado com glicose e/ou lactose) observa-se que os açúcares foram consumidas praticamente nas 48 horas iniciais e não houve o aparecimento de etanol. Sugere-se que a baixa concentração de açúcares (1 g/L) resultou em um rápido consumo dos mesmos, indicando que a microalga necessita de quantidades elevadas de nutrientes a serem consumidas ao longo da fermentação para direcioná-los a síntese de etanol.

Complementarmente foi analisado o teor de nitrogênio total e o teor de carbono total apresentados nas Figuras 5.14 e 5.15, respectivamente, a fim de entender como o metabolismo da alga sintetiza estes dois componentes.

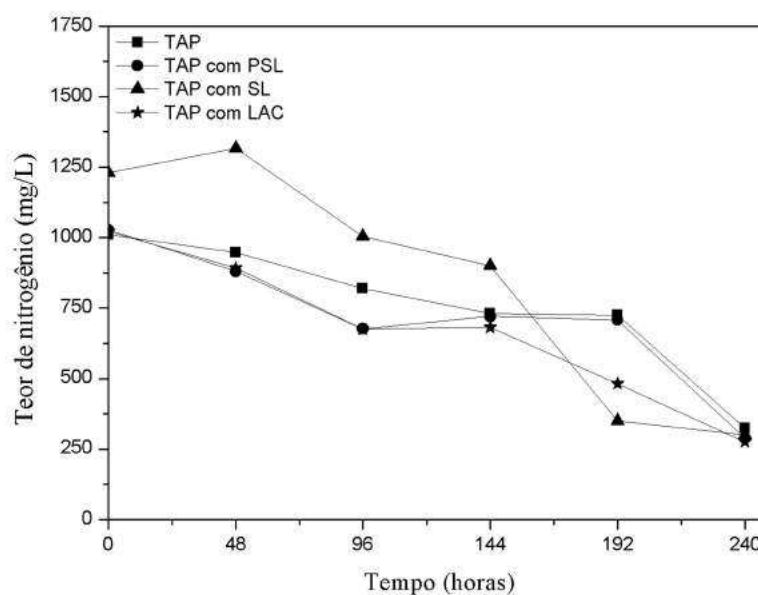


Figura 5.14 - Evolução do teor de nitrogênio total do Ensaio 3.

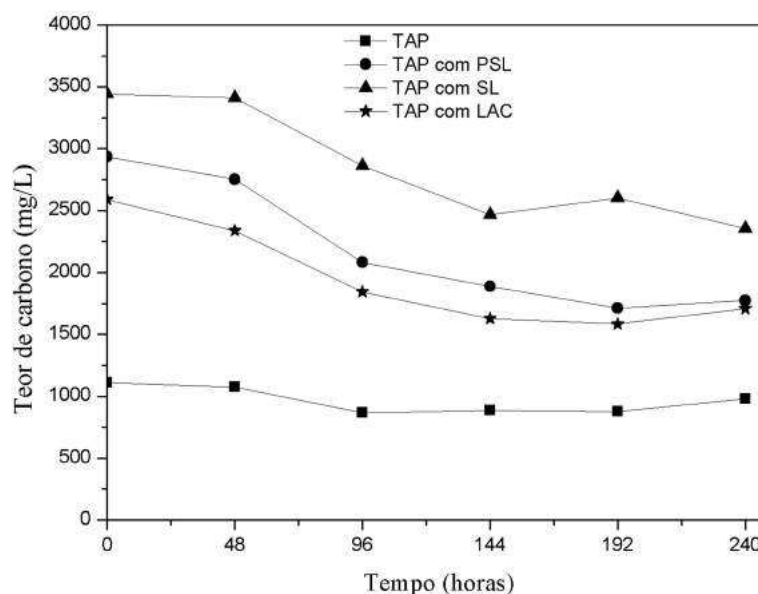


Figura 5.15 - Evolução do teor de carbono total do Ensaio 3.

Com base nas Figuras 5.14 e 5.15, é possível verificar que a quantidade de carbono total presente no meio é muito maior (concentração inicial em torno de 3000 mg/L nos meios com presença de lactose) que a quantidade de nitrogênio total, em função da presença da lactose. No entanto, o consumo de nitrogênio foi mais acelerado, atingindo praticamente a mesma concentração no final da fermentação para todas as condições avaliadas (aproximadamente 290 mg/L). Entretanto, deve-se mencionar que no meio suplementado com soro de leite (Condição 11) o consumo de nitrogênio no início foi mais lento que nos demais. Deve-se destacar a importância do nitrogênio para as microalgas, uma vez que este componente está diretamente relacionado com a síntese de proteínas, carotenóides e de clorofila presentes nas células (LOURENÇO, 2006).

Em geral, em relação ao carbono total verificou-se um consumo durante as 144 horas iniciais e posteriormente não se observou uma variação importante desta variável. Já na condição controle (Meio TAP), o carbono total foi consumido nas primeiras 96 horas, fato representado pelo consumo de ácido acético. Após isso, esta variável permaneceu praticamente constante devido à contribuição de outras fontes na qual o elemento pode ser encontrado, mas que não foram monitoradas.

5.1.2. Avaliação do sistema híbrido

No Ensaio 4 foi avaliado o sistema híbrido por meio da associação da alga verde *C. reinhardtii* e a bactéria fotossintetizante *R. capsulatus*, sendo que o efluente proveniente da fotofermentação da bactéria (RCV metabolizado) foi utilizado como meio de fermentação

RESULTADOS E DISCUSSÃO

para a alga. Vale ressaltar que em algumas condições este sobrenadante metabolizado foi suplementado com PSL e glicose individualmente a fim de garantir que a concentração inicial de lactose ou glicose fosse de 5 g/L. A Tabela 5.12 apresenta a densidade final das algas e os resultados dos parâmetros taxa específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) e tempo de duplicação (t_d), enquanto que a cinética de crescimento celular está apresentada na Figura 5.16.

Tabela 5.12 - Dados de biomassa final, taxa específica máxima de crescimento e tempo de duplicação do Ensaio 4

| Condições | Biomassa Final (g/L) | $\mu_{\text{máx}}$ (h^{-1}) | t_d (h) |
|--------------------------|----------------------|--|-----------|
| TAP | 1,44 | 0,018 | 39 |
| RCV metabolizado | 0,25 | 0,004 | 173 |
| RCV metabolizado com PSL | 0,21 | 0,004 | 173 |
| RCV metabolizado com GLC | 0,23 | 0,006 | 116 |

PSL: permeado de soro de leite; GLC: glicose

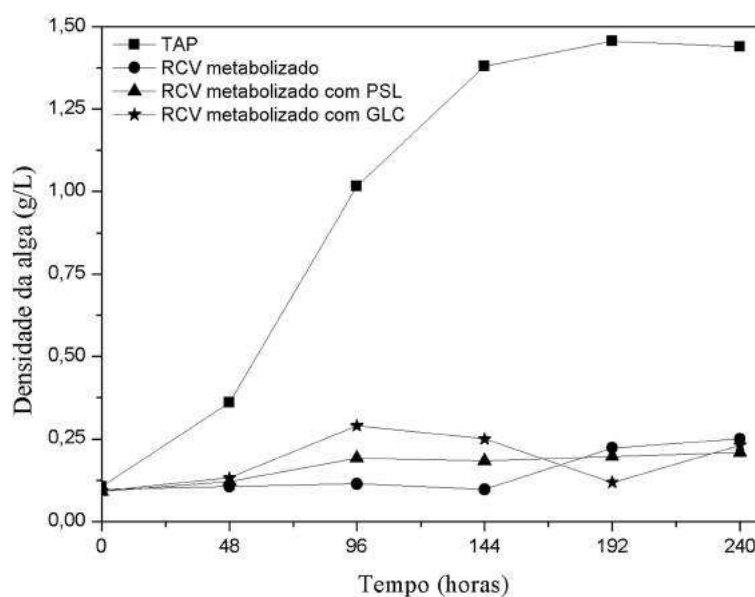


Figura 5.16 - Cinética de crescimento celular do Ensaio 4.

Observa-se pela Figura 5.16, que houve crescimento celular ao longo da fermentação apenas no meio TAP (Condição controle/ Condição 13) atingindo uma concentração celular final de 1,44 g/L. Nesta condição a microalga encontrava-se adaptada plenamente ao meio. No entanto, quando a alga foi exposta a outro meio de fermentação, como o meio RCV metabolizado, praticamente não se observou crescimento, mesmo com a adição de açúcares.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tal comportamento pode ser confirmado pelos valores reduzidos das taxas específicas máximas de crescimento, bem como valores elevados dos tempos de duplicação (Tabela 5.12).

Neste ensaio foi verificada a síntese de etanol conforme apresenta a Figura 5.17, enquanto que a Tabela 5.13 apresenta a máxima produção de etanol e respectivas produtividades volumétricas.

Tabela 5.13 - Dados de concentração máxima de etanol produzido e respectivas produtividades volumétricas de etanol do Ensaio 4

| Condições | Concentração de etanol (mg/L) | Produtividade volumétrica de etanol (mmol/L.dia) |
|--------------------------|-------------------------------|--|
| TAP | 40,22 | 0,44 |
| RCV metabolizado | 40,22 | 0,44 |
| RCV metabolizado com PSL | 899,59 | 2,44 |
| RCV metabolizado com GLC | 656,84 | 1,43 |

PSL: permeado de soro de leite; GLC: glicose

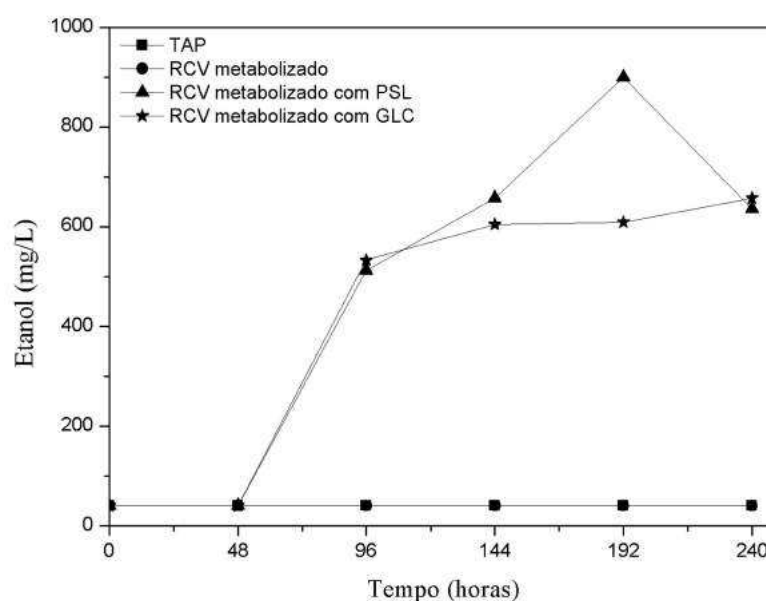


Figura 5.17 - Evolução do etanol do Ensaio 4.

De forma complementar, comportamento contrastante foi verificado neste ensaio com o uso do sistema híbrido, resultando no aumento da produtividade do produto alvo, mesmo que em baixa densidade celular. O máximo de etanol produzido alcançou 899,59 mg/L no meio RCV metabolizado suplementado com PSL (Condição 15), enquanto que no meio RCV metabolizado suplementado com glicose (Condição 16) a produção de

RESULTADOS E DISCUSSÃO

etanol foi de 656,84 g/L. Verifica-se que no meio RCV metabolizado com glicose (Condição 16), após o primeiro pico de etanol (96 horas) a concentração deste biocombustível permaneceu constante ao longo da fermentação. Já no meio RCV metabolizado com PSL (Condição 15), o primeiro pico de etanol também aparece no tempo de 96 horas, entretanto a máxima produção de etanol ocorreu no tempo de 192 horas e, após este período uma queda foi observada. Ao final, tal variável apresentou valor aproximado aquele obtido na condição do meio RCV metabolizado com glicose (Condição 16).

Comparando este experimento com o Ensaio 2, em que ocorreu a supressão de enxofre, a produção de etanol máxima alcançada foi de 1189,91 mg/L no meio TAP isento de enxofre suplementado com PSL e glicose (Condição 8) simultaneamente. Verifica-se que mesmo empregando o sistema híbrido a produtividade volumétrica em etanol não foi maior e, além disso, uma maior quantidade de açúcar (5 g/L de lactose ou glicose) foi utilizada. No entanto, ao comparar este experimento com o Ensaio 3, em que foram utilizadas diferentes fontes de lactose também com concentração inicial de 5 g/L, verificou-se que a produção de etanol foi maior no sistema híbrido (Tabela 5.13), ainda que menores densidades de biomassa de alga fosse observada. Isto indica que nesta condição a produção de etanol não foi associada ao crescimento celular. Entretanto, dependeu da presença de açúcar no meio.

Para um melhor entendimento do aparecimento de etanol apenas nas condições suplementadas com açúcares, é necessário entender como ocorreu o consumo de glicose, de lactose e também a evolução do ácido acético, apresentados nas Figuras 5.18, 5.19 e 5.20, respectivamente, enquanto que a Tabela 5.14 apresenta o consumo específico de glicose, de lactose e de ácido acético.

Tabela 5.14 - Dados do consumo específico da glicose (q_{GLC}), da lactose (q_{LAC}) e do ácido acético ($q_{ác. acético}$) do Ensaio 4

| Condições | q_{GLC} ($g_{GLC}/g_{biomassa} \cdot h$) | q_{LAC} ($g_{LAC}/g_{biomassa} \cdot h$) | $q_{ác. acético}$ ($g_{ác. acético}/g_{biomassa} \cdot h$) |
|--------------------------|---|---|---|
| TAP | - | - | 0,0097 |
| RCV metabolizado | - | - | 0,0212 |
| RCV metabolizado com PSL | - | 0,1559 | -0,0351* |
| RCV metabolizado com GLC | 0,1823 | - | -0,0339* |

PSL: permeado de soro de leite; GLC: glicose

*valores negativos correspondem, na média, à predominância de síntese em detrimento do consumo do ácido.

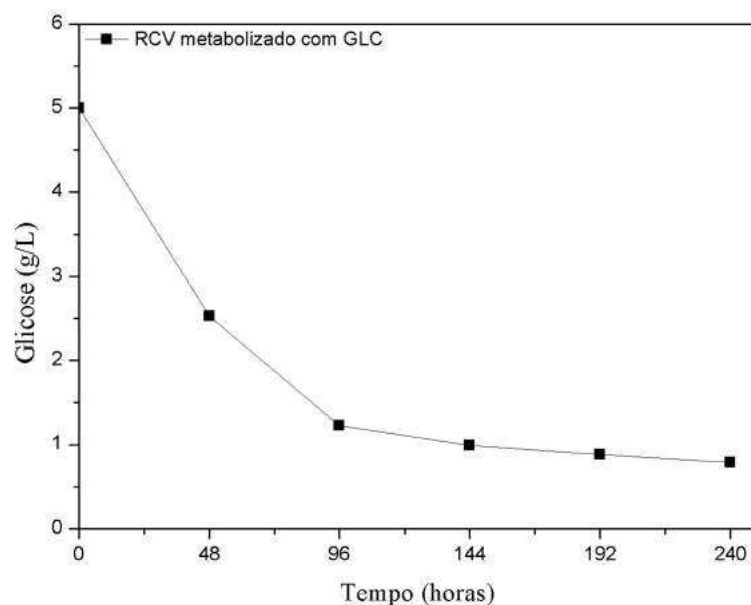


Figura 5.18 - Consumo de glicose do Ensaio 4.

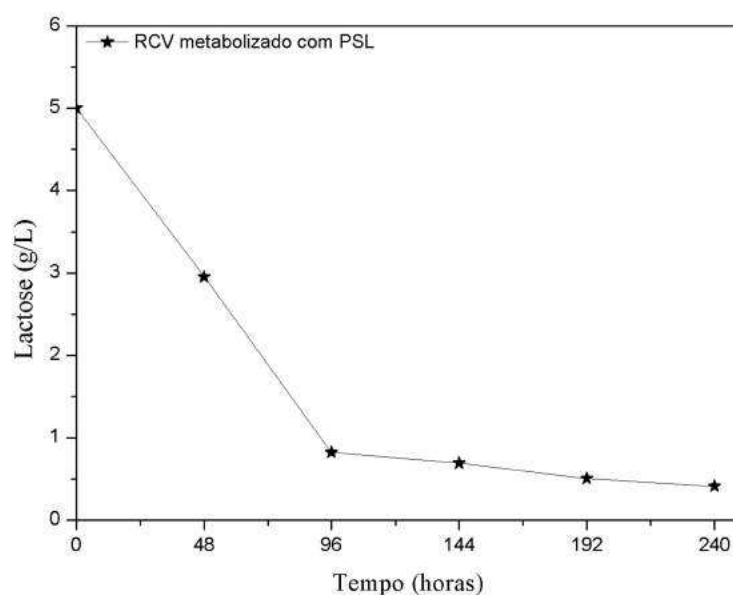


Figura 5.19 - Consumo de lactose do Ensaio 4.

Através das Figuras 5.18 e 5.19, percebe-se que nas condições suplementadas com glicose ou lactose (Condições 15 e 16), um consumo específico acentuado do açúcar foi verificado nas 96 horas iniciais, sendo que a partir de 48 horas a produção de etanol foi observada. De forma complementar, analisando a Tabela 5.14, é possível identificar que o consumo específico da glicose foi maior que o da lactose. Isto foi observado, pois a variação do substrato em função do tempo é multiplicada pela taxa específica máxima de crescimento, cujo valor foi maior na condição em que a glicose estava presente (Tabela 5.12).

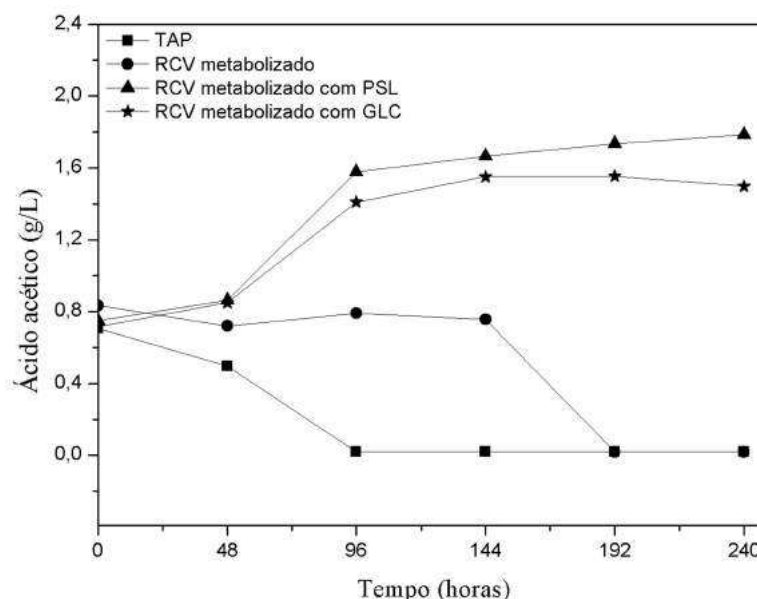


Figura 5.20 - Evolução do ácido acético do Ensaio 4.

A partir da Figura 5.20, observa-se que em relação ao ácido acético o comportamento foi diferente em relação aos outros ensaios, uma vez que foi verificado um aumento na concentração de ácido acético após as 48 horas. E a partir deste período, a concentração permaneceu praticamente constante, sendo que isto ocorreu no meio RCV metabolizado suplementado com PSL como também no meio RCV metabolizado suplementado com glicose (Condições 15 e 16). Assim, os consumos específicos apresentaram valores negativos (Tabela 5.14). Entretanto, no meio RCV metabolizado (Condição 14) foi observado que a concentração de ácido acético permaneceu praticamente constante até às 144 horas e, em seguida, o ácido foi totalmente consumido. Deve-se destacar que o meio RCV metabolizado também apresentava um residual de ácido acético em sua composição. Já na condição controle (Meio TAP/ Condição 13) o ácido acético foi totalmente consumido nas 96 horas iniciais.

É importante salientar que a microalga não estava adaptada a este tipo de meio, com isso, verifica-se que apesar do comportamento do consumo dos açúcares ser semelhante aos Ensaios 2 e 3, neste experimento percebe-se que após as 96 horas, a glicose e lactose permanecem praticamente constantes. Além disso, ocorreu síntese de ácido acético, indicando que a microalga desvia o seu metabolismo prevendo uma eventual necessidade por nutrientes.

5.1.3. Avaliação da supressão de ácido acético

Com base nos experimentos realizados anteriormente, este Ensaio 5 tem como objetivo avaliar a supressão de ácido acético no meio TAP e no meio TAP isento de enxofre a

RESULTADOS E DISCUSSÃO

fim de entender a importância deste composto para a microalga. A Tabela 5.15 apresenta a densidade final das algas e os resultados dos parâmetros taxa específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) e tempo de duplicação (t_d), enquanto que a cinética de crescimento celular está apresentada na Figura 5.21.

Tabela 5.15 - Dados de biomassa final, taxa específica máxima de crescimento e tempo de duplicação do Ensaio 5

| Condições | Biomassa Final (g/L) | $\mu_{\text{máx}}$ (h ⁻¹) | t_d (h) |
|-----------|-------------------------|--|--------------|
| TAP | 0,99 | 0,022 | 32 |
| TAP-AC | 0,19 | 0,005 | 144 |
| TAP-S | 0,82 | 0,021 | 33 |
| TAP-S-AC | 0,19 | 0,004 | 154 |

TAP-AC: meio TAP isento de ácido acético; TAP-S: meio TAP isento de enxofre; TAP-S-AC: meio TAP isento de enxofre e de ácido acético.

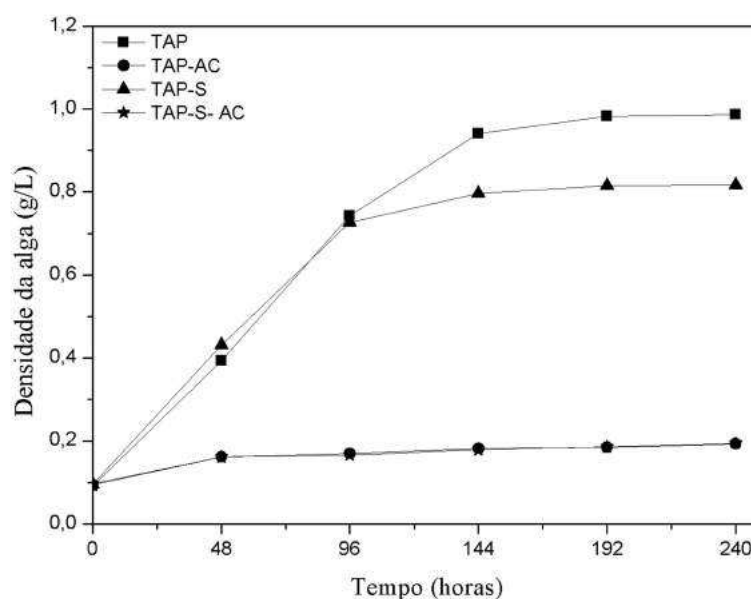


Figura 5.21 - Cinética de crescimento celular do Ensaio 5.

Observa-se pela Figura 5.21, que houve crescimento celular ao longo da fermentação apenas no meio TAP e no meio TAP isento de enxofre (Condições controle/ Condições 17 e 19) atingindo uma concentração celular final de 0,99 e 0,82 g/L, respectivamente. No entanto, quando a microalga foi exposta a uma condição de estresse, referente à supressão de ácido acético, praticamente não foi observado aumento da biomassa de algas ao longo da fermentação. Assim, valores baixos das taxas específicas máximas de crescimento e elevados tempos de duplicação foram observados nesta condição (Tabela 5.15). Desta forma, mostrou-

RESULTADOS E DISCUSSÃO

se clara a importância da presença deste ácido nas formulações de meio de cultivo para a alga *C. reinhardtii*.

Com os resultados obtidos da densidade da alga, é possível observar que a concentração de clorofila, que foi analisada no início e no final da fermentação, está diretamente ligada a biomassa da alga, conforme apresenta a Tabela 5.16.

Tabela 5.16 - Quantificação da clorofila no início e no final da fermentação do Ensaio 5

| Tempo (horas) | Clorofila (mg/m ³) | | | |
|---------------|--------------------------------|--------|-------|----------|
| | TAP | TAP-AC | TAP-S | TAP-S-AC |
| 0 | 10,29 | 8,01 | 9,79 | 8,66 |
| 240 | 92,41 | 14,47 | 39,02 | 14,48 |

TAP-AC: meio TAP isento de ácido acético; TAP-S: meio TAP isento de enxofre; TAP-S-AC: meio TAP isento de enxofre e de ácido acético.

De acordo com a Tabela 5.16, observa-se maiores concentrações de clorofila no final da fermentação, atingindo valores elevados nas condições controle, meio TAP e meio TAP isento de enxofre (Condições 17 e 19), sendo de 92,41 e 39,02 mg/m³, respectivamente. No entanto, nos meios com supressão de ácido acético, verifica-se pequenas concentrações de clorofila de aproximadamente 14,5 mg/m³. Isto indica que a presença de pigmento nas células é proporcional ao crescimento celular.

Neste ensaio, a produção de etanol foi insignificante, em virtude da condição de estresse pela ausência de nutrientes essenciais (enxofre e ácido acético). Vale lembrar que a produção de etanol em ensaios anteriores esteve vinculada a adição de fontes mixotróficas.

Para um melhor entendimento da importância do ácido acético no meio para a microalga *C. reinhardtii* é necessário entender como ocorreu a evolução do ácido acético ao longo da fermentação, como mostra a Figura 5.22, enquanto que a Tabela 5.17 apresenta o consumo específico de ácido acético.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 5.17 - Dados do consumo específico do ácido acético ($q_{\text{ác. acético}}$) do Ensaio 5

| Condições | $q_{\text{ác. acético}}$ ($\text{g}_{\text{ác. acético}}/\text{g}_{\text{biomassa}} \cdot \text{h}$) |
|--------------|---|
| TAP | 0,0209 |
| TAP – AC | -0,0034* |
| TAP – S | 0,0172 |
| TAP – S - AC | 0,0047 |

TAP-AC: meio TAP isento de ácido acético; TAP-S: meio TAP isento de enxofre; TAP-S-AC: meio TAP isento de enxofre e de ácido acético.

*valores negativos correspondem, na média, à predominância de síntese em detrimento do consumo do ácido.

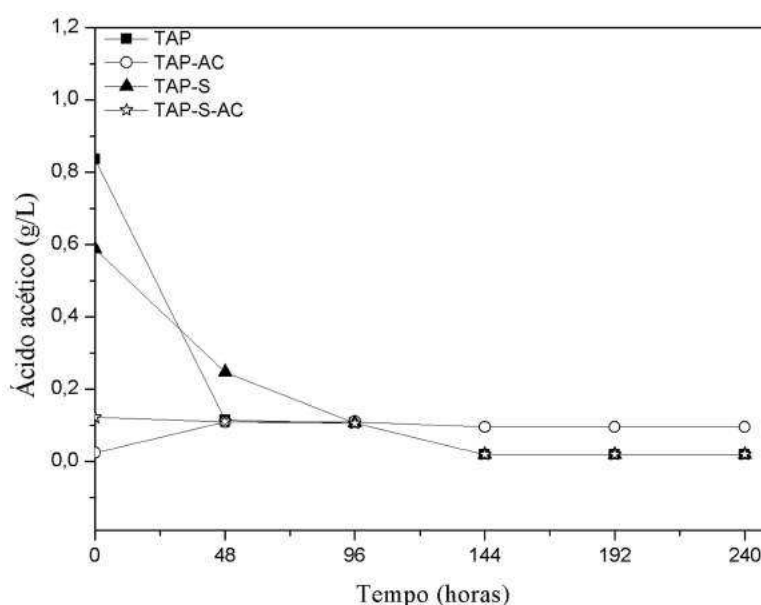


Figura 5.22 - Evolução do ácido acético do Ensaio 5.

Verifica-se pela Figura 5.22, que o consumo de ácido acético é acelerado nas condições controle (Condições 17 e 19), sendo totalmente consumido nas 144 horas iniciais, além de apresentar os maiores valores de consumo específico (Tabela 5.17). No entanto, no meio TAP isento de ácido acético (Condição 18) observa-se uma leve produção deste ácido nas 48 horas iniciais, permanecendo constante ao longo da fermentação. Já no meio TAP isento de enxofre e de ácido acético (Condição 20), a concentração do ácido orgânico permaneceu constante no início da fermentação e atingiu valores próximos de zero em 144 horas. É necessário esclarecer que a presença inicial de ácido acético no meio TAP isento de enxofre e de ácido acético (Condição 20), apesar de pequena, provavelmente foi proveniente do inóculo celular.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Complementarmente foi analisado o teor de nitrogênio total e o teor de carbono total apresentados nas Figuras 5.23 e 5.24, respectivamente, a fim de entender como o metabolismo da alga sintetiza estes dois componentes.

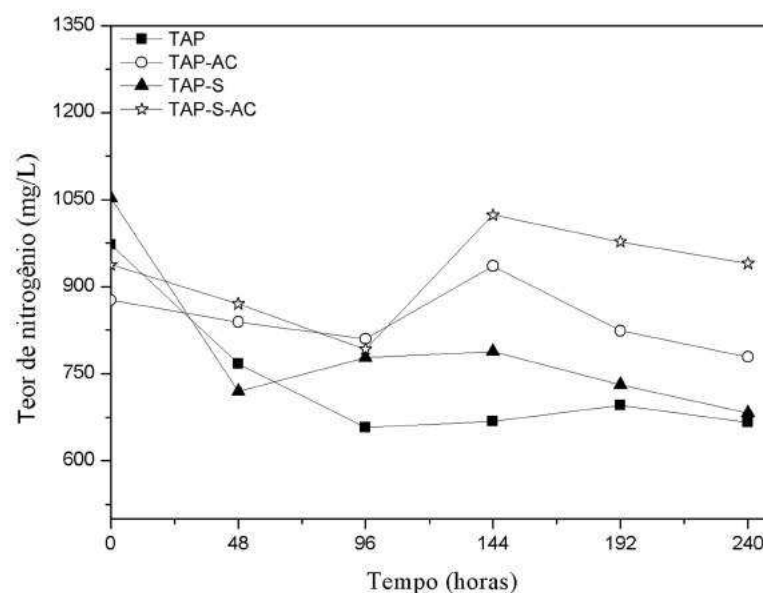


Figura 5.23 - Evolução do teor de nitrogênio total do Ensaio 5.

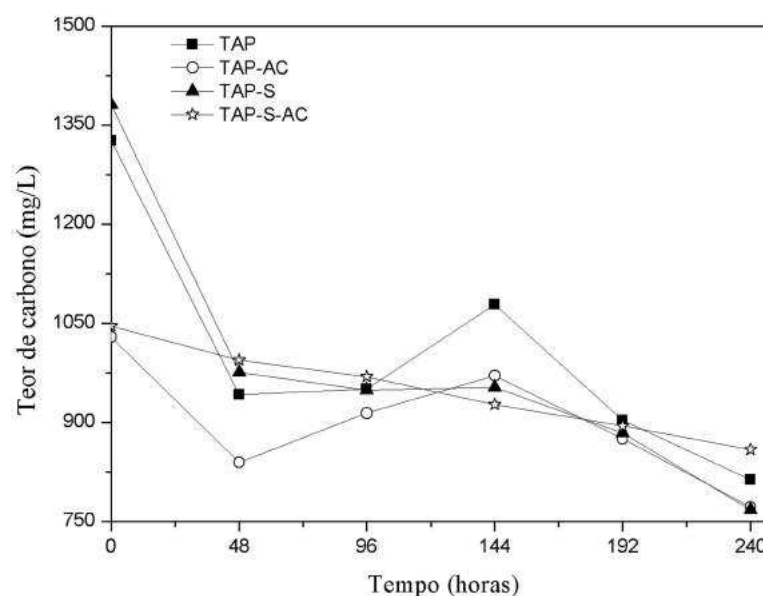


Figura 5.24 - Evolução do teor de carbono total do Ensaio 5.

Analisando as Figuras 5.23 e 5.24, percebe-se um consumo de nitrogênio e carbono no início da fermentação (48 horas iniciais) para as condições controle (Meio TAP e TAP isento de enxofre) e, após este período as concentrações permanecem constantes. Entretanto, nos meios em que ocorreu a supressão de ácido acético, observa-se que no início o teor de

RESULTADOS E DISCUSSÃO

nitrogênio e carbono ficou praticamente constante e, no caso do teor de nitrogênio, em seguida, um ligeiro aumento foi verificado.

Complementando o experimento anterior, o Ensaio 6 teve como objetivo avaliar a supressão de ácido acético com a presença de fonte de açúcar, especificamente a lactose presente no permeado de soro de leite. A concentração inicial de 5 g/L de lactose foi utilizada. A Tabela 5.18 apresenta a densidade final das algas e os resultados dos parâmetros taxa específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) e tempo de duplicação (t_d), enquanto que a cinética de crescimento celular está apresentada na Figura 5.25.

Tabela 5.18 - Dados de biomassa final, taxa específica máxima de crescimento e tempo de duplicação do Ensaio 6

| Condições | Biomassa Final (g/L) | $\mu_{\text{máx}}$ (h ⁻¹) | t_d (h) |
|------------------|-------------------------|--|--------------|
| TAP | 1,27 | 0,023 | 30 |
| TAP com PSL | 1,59 | 0,026 | 26 |
| TAP-AC com PSL | 0,77 | 0,022 | 31 |
| TAP-S | 1,13 | 0,023 | 30 |
| TAP-S com PSL | 1,54 | 0,027 | 26 |
| TAP-S-AC com PSL | 1,13 | 0,019 | 35 |

TAP-AC: meio TAP isento de ácido acético; TAP-S: meio TAP isento de enxofre; TAP-S-AC: meio TAP isento de enxofre e de ácido acético; PSL: permeado de soro de leite

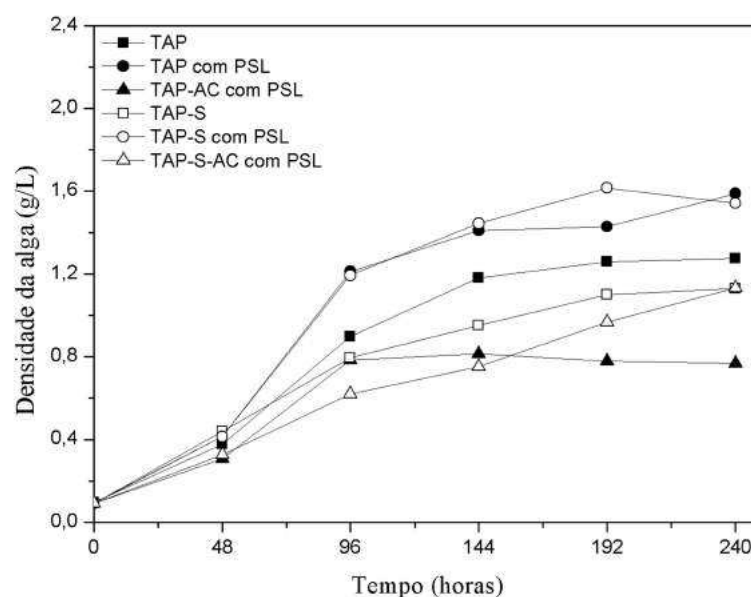


Figura 5.25 - Cinética de crescimento celular do Ensaio 6.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir da Figura 5.25, verifica-se que a densidade algal foi crescente ao longo da fermentação, atingindo uma densidade final de algas de 1,59 g/L no meio TAP suplementado com PSL (Condição 22). Em seguida, no meio TAP isento de enxofre suplementado com PSL (Condição 25) a densidade final de algas alcançou 1,54 g/L. Em relação às condições com supressão de ácido acético suplementados com lactose, meios TAP e TAP isento de enxofre com supressão de ácido acético e suplementados com PSL (Condições 23 e 26), a densidade final de algas atingiu os valores mais baixos, sendo de 0,77 e 1,13 g/L, respectivamente. Entretanto, comparando com o ensaio anterior (Ensaio 5), o crescimento celular foi maior na presença do açúcar.

Percebe-se que às condições controle, meio TAP e meio TAP isento de enxofre (Condições 21 e 24), a densidade final de algas foi de 1,27 e 1,13 g/L, respectivamente, sendo que o crescimento foi superior quando comparado com os meios com supressão de ácido acético. Exceto o meio TAP isento de enxofre e de ácido acético suplementado com PSL (Condição 26) que atingiu a mesma densidade final de algas do meio TAP isento de enxofre (Condição 24).

Com os resultados obtidos da densidade da alga, é possível observar que a concentração de clorofila, que foi analisada no início e no final da fermentação, está diretamente ligada a biomassa da alga, conforme apresenta a Tabela 5.19.

Tabela 5.19 - Quantificação da clorofila no início e no final da fermentação do Ensaio 6

| Tempo (horas) | Clorofila (mg/m ³) | | | | | |
|---------------|--------------------------------|-------------|------------------|---------|-----------------|--------------------|
| | TAP | TAP com PSL | TAP – AC com PSL | TAP - S | TAP – S com PSL | TAP – S-AC com PSL |
| 0 | 12,98 | 11,77 | 10,01 | 11,64 | 9,53 | 10,61 |
| 240 | 76,31 | 71,96 | 44,12 | 60,25 | 57,19 | 48,77 |

TAP-AC: meio TAP isento de ácido acético; TAP-S: meio TAP isento de enxofre; TAP-S-AC: meio TAP isento de enxofre e de ácido acético; PSL: permeado de soro de leite

Por meio dos resultados obtidos da concentração de clorofila como mostra a Tabela 5.19, verifica-se que as menores concentrações deste pigmento foram encontradas nos meios com supressão de ácido acético. Isto confirma novamente que nesta condição o crescimento celular foi retardado, uma vez que a clorofila está diretamente relacionada à densidade das algas e a atividade fotossintética.

Neste ensaio, a produção de etanol foi insignificante para todas as condições, com exceção do meio TAP suplementado com PSL (Condição 22), sendo que a máxima produção

RESULTADOS E DISCUSSÃO

de etanol foi de 544,25 mg/L no final da fermentação (no tempo de 240 horas) e sua respectiva produtividade volumétrica foi de 1,18 mmol/L.dia de etanol. Entretanto, deve-se esclarecer que era esperado o aparecimento de etanol também no meio TAP isento de enxofre suplementado com PSL (Condição 25), conforme o Ensaio 2. No entanto, é necessário relembrar que no Ensaio 2 o meio TAP isento de enxofre suplementado com PSL (Condição 6) iniciou com uma concentração de 1 g/L de lactose, que foi consumido nas 96 horas iniciais e após este período ocorreu a síntese de etanol, enquanto que neste ensaio a concentração inicial foi de 5 g/L de lactose, desta forma, apesar da condição de estresse em função da ausência de enxofre no meio, isto foi compensado pela maior quantidade de açúcar (lactose) que levou um maior tempo para ser consumido.

A partir desta análise, é necessário compreender o consumo de lactose, bem como a evolução do ácido acético conforme apresentado nas Figuras 5.26 e 5.27, respectivamente, enquanto que a Tabela 5.20 apresenta o consumo específico de lactose e do ácido acético.

Tabela 5.20 - Dados do consumo específico da lactose (q_{LAC}) e do ácido acético ($q_{\text{ác. acético}}$) do Ensaio 6

| Condições | q_{LAC} | $q_{\text{ác. acético}}$ |
|------------------|---|--|
| | ($g_{LAC}/g_{\text{biomassa}} \cdot h$) | ($g_{\text{ác. acético}}/g_{\text{biomassa}} \cdot h$) |
| TAP | - | 0,0108 |
| TAP com PSL | 0,0527 | 0,0037 |
| TAP-AC com PSL | 0,0736 | -0,0035* |
| TAP-S | - | 0,0099 |
| TAP-S com PSL | 0,0661 | 0,0062 |
| TAP-S-AC com PSL | 0,0597 | 0 |

TAP-AC: meio TAP isento de ácido acético; TAP-S: meio TAP isento de enxofre; TAP-S-AC: meio TAP isento de enxofre e de ácido acético; PSL: permeado de soro de leite

*valores negativos correspondem, na média, à predominância de síntese em detrimento do consumo do ácido.

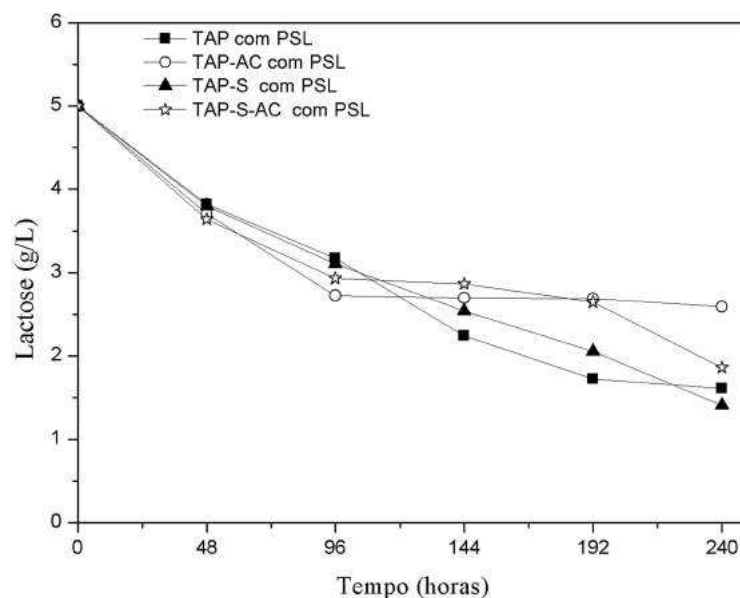


Figura 5.26 - Consumo de lactose do Ensaio 6.

De acordo com a Figura 5.26, que apresenta o consumo de lactose, observa-se que nos meios TAP e TAP isento de enxofre suplementados com PSL (Condições 22 e 25), o consumo de lactose foi contínuo ao longo da fermentação. No entanto, nos meios com supressão de ácido acético, meios TAP e TAP isento de enxofre com supressão de ácido acético suplementados com PSL (Condições 23 e 26), o comportamento de consumo de lactose foi semelhante, apresentando um consumo acelerado nas 96 horas iniciais. A partir deste período, verificou-se nestas condições a produção de ácido acético, conforme apresentado na Figura 5.27.

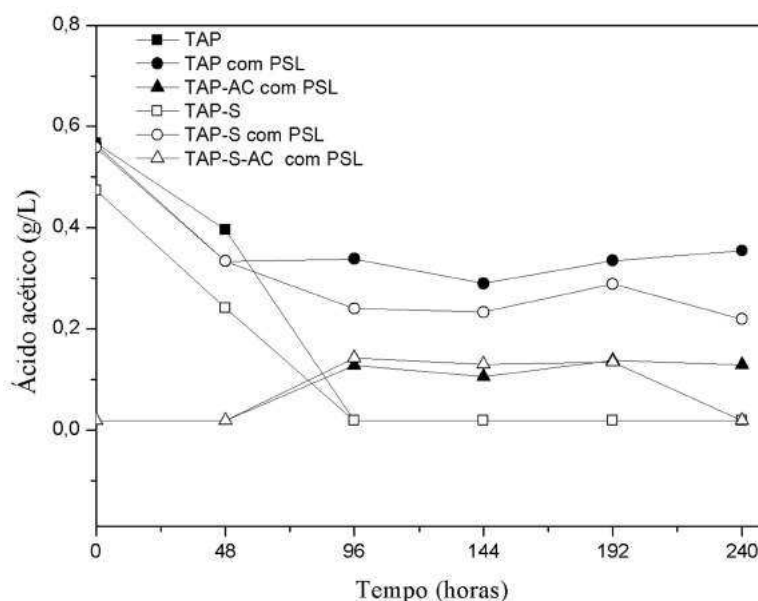


Figura 5.27 - Evolução do ácido acético do Ensaio 6.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pela análise da Figura 5.27, percebe-se que o ácido acético foi consumido rapidamente nos meios ausentes de açúcares. Em outras palavras, nas condições controle (Meio TAP e TAP isento de enxofre /Condições 21 e 24) o ácido foi totalmente consumido nas 96 horas iniciais, já que este era o componente presente no meio utilizado para o crescimento da alga. Já nos meios TAP e TAP isento de enxofre suplementados com PSL (Condições 22 e 25), o consumo de ácido acético foi acelerado nas 48 horas iniciais, sendo que a partir deste período, a concentração do ácido permaneceu praticamente constante.

No entanto, deve-se destacar a produção de ácido acético no tempo de 96 horas nos meios em que ocorreu a supressão deste ácido (Condições 23 e 26). Logo após este período observou-se ligeiro consumo deste ácido, permanecendo sua concentração praticamente constante até o final da fermentação no meio TAP isento de ácido suplementado com PSL (Condição 23). Por outro lado, no meio TAP isento de enxofre e de ácido suplementado com PSL (Condição 26), o ácido foi totalmente consumido no final da fermentação.

Além disso, a produção de etanol foi insignificante neste ensaio, destacando que mesmo com a presença de açúcares, não ocorreu o aparecimento do produto alvo. Desta forma, é nítida a importância do ácido acético tanto para a produção de etanol como também para o crescimento celular da microalga, uma vez que a mesma foi capaz de sintetizar ácido acético para uma possível necessidade de consumo futuro. Deve-se destacar também que o consumo de lactose foi mais lento nas condições em que houve a supressão de ácido acético, em virtude da microalga estar exposta a uma condição de estresse.

Complementarmente foi analisado o teor de nitrogênio total e o teor de carbono total em relação às condições do meio TAP e do meio TAP isento de enxofre apresentados nas Figuras 5.28, 5.29, 5.30 e 5.31, respectivamente, a fim de entender como o metabolismo da alga sintetiza estes dois componentes.

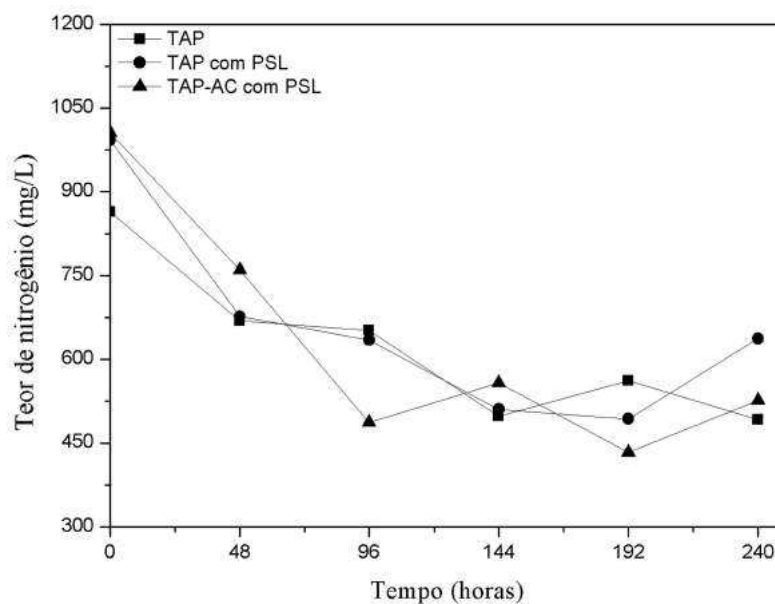


Figura 5.28 - Evolução do teor de nitrogênio total do Ensaio 6 em relação às condições do meio TAP com enxofre.

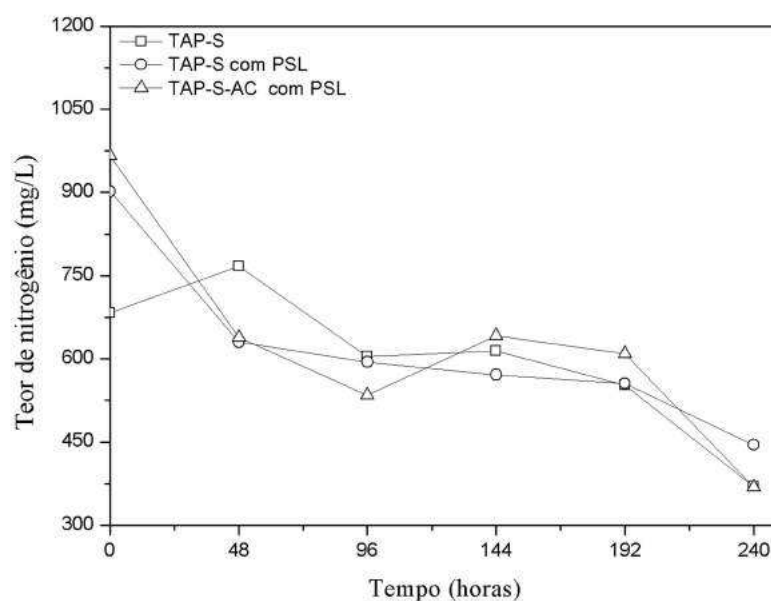


Figura 5.29 - Evolução do teor de nitrogênio total do Ensaio 6 em relação às condições do meio TAP isento de enxofre.

Através das Figuras 5.28 e 5.29, verifica-se que no início há um consumo mais rápido de nitrogênio total, porém, ao longo da fermentação o que se observou foram flutuações de subida e descida, direcionando o entendimento para uma fase constante.

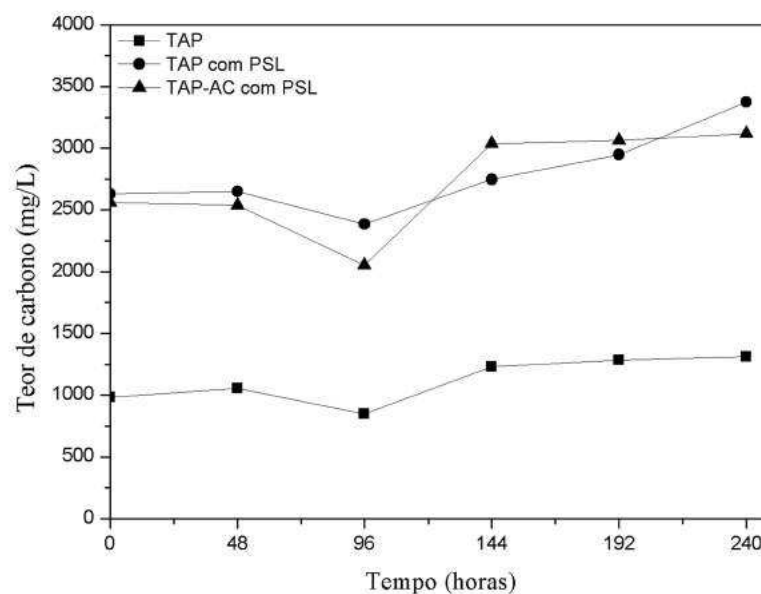


Figura 5.30 - Evolução do teor de carbono total do Ensaio 6 em relação às condições do meio TAP com enxofre.

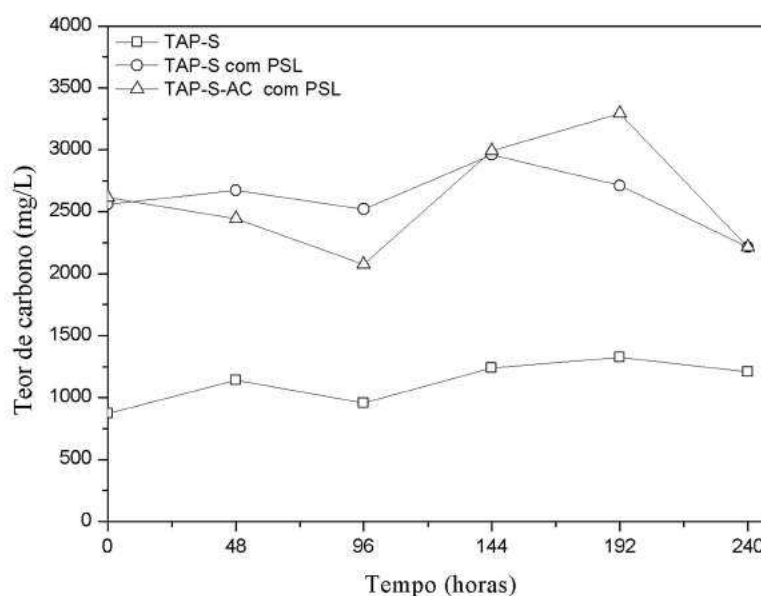


Figura 5.31 - Evolução do teor de carbono total do Ensaio 6 em relação às condições do meio TAP isento de enxofre.

Percebe-se pelas Figuras 5.30 e 5.31 que o teor de carbono total (concentração inicial em torno de 2500 mg/L nas condições com a presença de lactose) é muito maior que o teor de nitrogênio total em função da presença da lactose nas condições em que o PSL foi adicionado. É possível observar que nas condições controle (Meio TAP e TAP isento de enxofre/Condições 21 e 24) a concentração de carbono total praticamente permaneceu constante.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Além disso, nos meios TAP e TAP isento de enxofre suplementados com PSL (Condições 22 e 25) verificam-se flutuações de subida e descida ao longo da fermentação, podendo entender que a concentração de carbono total permanece constante. Exceto no meio TAP suplementado com PSL (Condição 22) em que há um leve aumento de carbono total no final da fermentação, sendo possivelmente proveniente do aparecimento de etanol. Em relação aos meios com supressão de ácido acético (Condições 23 e 26), um comportamento semelhante foi identificado, já que houve uma diminuição da variável analisada nas 96 horas iniciais, seguido de um aumento, sendo possivelmente proveniente da síntese de ácido acético.

5.2. Escala ampliada: Reatores de 1,5 L

5.2.1. Avaliação do sistema híbrido

No Ensaio 7 realizado no reator de 1,5 L foi avaliado o sistema híbrido por meio da associação da alga verde *C. reinhardtii* e a bactéria fotossintetizante *R. capsulatus*, sendo que o efluente proveniente da fotofermentação da bactéria (RCV metabolizado) foi utilizado como meio de fermentação para a alga. Em algumas condições o meio RCV metabolizado foi suplementado com PSL com concentração inicial de lactose de 5 g/L. Além disso, deve-se mencionar que as condições controle também foram avaliadas, como os meios TAP e TAP isento de enxofre. A Tabela 5.21 apresenta a densidade final das algas e os resultados dos parâmetros taxa específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) e tempo de duplicação (t_d), enquanto que a cinética de crescimento celular está apresentada na Figura 5.32.

Tabela 5.21 - Dados de biomassa final, taxa específica máxima de crescimento e tempo de duplicação do Ensaio 7

| Condições | Biomassa Final (g/L) | $\mu_{\text{máx}}$ (h ⁻¹) | t_d (h) |
|--------------------------|----------------------|---------------------------------------|-----------|
| TAP | 1,07 | 0,043 | 16 |
| TAP-S | 0,78 | 0,042 | 16 |
| RCV metabolizado | 1,53 | 0,012 | 57 |
| RCV metabolizado com PSL | 0,69 | 0,014 | 50 |

TAP-S: meio TAP isento de enxofre; PSL: permeado de soro de leite

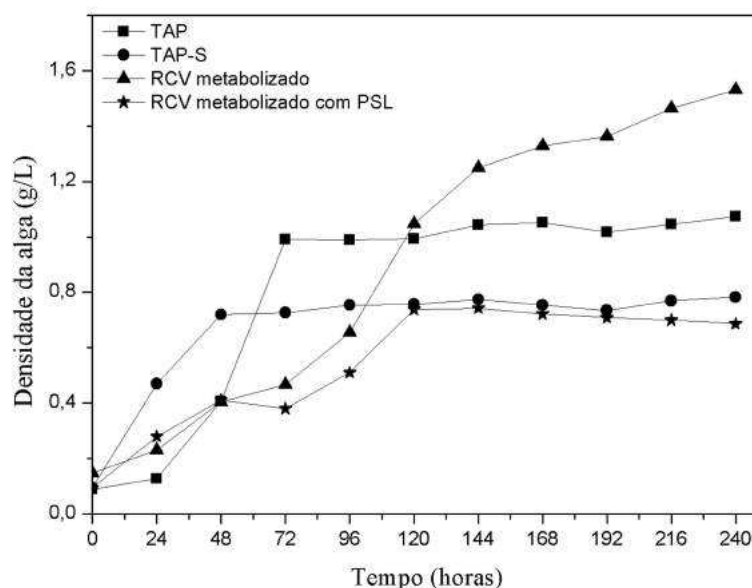


Figura 5.32 - Cinética de crescimento celular do Ensaio 7.

A partir da Figura 5.32, verifica-se que foi observado crescimento celular ao longo da fermentação, atingindo uma densidade final de 1,53 g/L no meio RCV metabolizado (Condição 29). No meio TAP (Condição 27), a densidade final foi de 1,07 g/L. Já no meio TAP isento de enxofre (Condição 28) a densidade final alcançou 0,78 g/L, que foi próxima ao observado no meio RCV metabolizado suplementado com PSL (Condição 30: 0,69 g/L). As condições controle, meios TAP e TAP isento de enxofre (Condições 27 e 28), apresentaram um crescimento celular semelhante aquele relatado nos ensaios de escala reduzida, bem como os valores da densidade final das algas. No entanto, apresentaram um crescimento acelerado no início, estabilizado em 72 e 48 horas, nos meios TAP e TAP isento de enxofre, respectivamente. Este período de estabilidade foi menor quando comparado com os experimentos de escala reduzida, nos quais a fase estacionária geralmente foi observada após às 144 horas.

Percebe-se que na condição em que houve a presença de lactose, o crescimento celular foi mais lento que os demais, sendo observado até às 120 horas. Após este período a densidade das algas permaneceu praticamente constante, apresentando os menores valores de biomassa, sendo que este comportamento foi semelhante aos ensaios de escala reduzida. Deve-se esclarecer que apesar da condição em escala ampliada e em escala reduzida ser a mesma, não havendo o controle de pH, entretanto, deve-se enfatizar que o reator não foi esterilizado, sendo apenas lavado com álcool 70 % e água deionizada, apresentando facilidade de contaminação. Ressalta-se que nestas condições a presença de PSL pode favorecer o aparecimento de bactérias. Outra observação contrastante foi o meio RCV metabolizado

RESULTADOS E DISCUSSÃO

(Condição 29) que apresentou um crescimento acelerado até às 168 horas. Em seguida verificou-se uma densidade algal praticamente constante, apresentando uma densidade de algas superior às condições controle (Meio TAP e TAP isento de enxofre: Condições 27 e 28). Entretanto, nos ensaios de escala reduzida seu crescimento foi insignificante e menor que a condição controle.

É necessário esclarecer ainda que o meio RCV metabolizado (Condição 29) continha em sua composição etanol, além do ácido acético. Contudo, nos ensaios de escala reduzida, empregando sistema híbrido, o etanol não foi detectado no efluente proveniente da fotofermentação da bactéria.

Com isso, a Figura 5.33 apresenta como foi a evolução do etanol, mostrando vestígios de etanol no início para o meio RVC metabolizado (Condição 29), além da síntese de etanol ter sido insignificante neste ensaio.

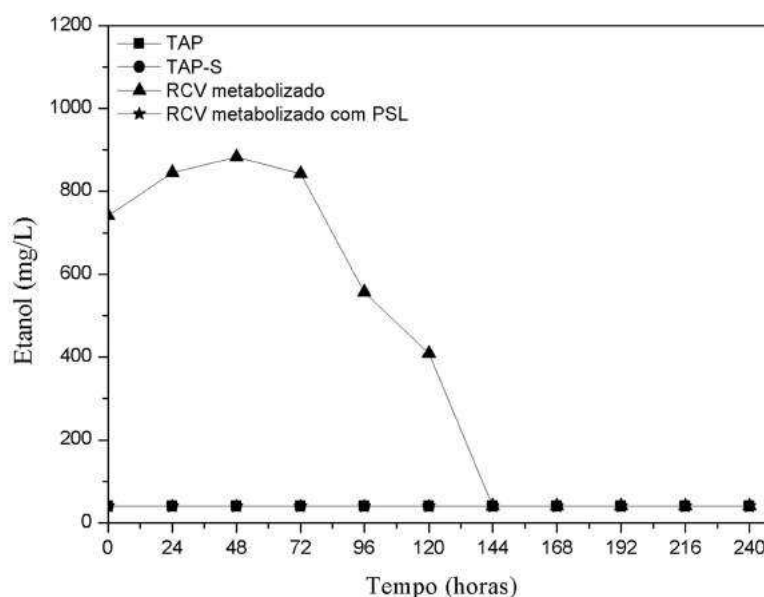


Figura 5.33 - Evolução do etanol do Ensaio 7.

Com base na Figura 5.33, é possível perceber que a produção de etanol foi insignificante para todas as condições analisadas, mesmo na presença de lactose, como no meio RCV metabolizado suplementado com PSL (Condição 30). Desta forma, um comportamento contraditório quando comparado a condição de escala reduzida foi verificado. Nele a produção de etanol em condições similares foi observada.

Em virtude do não aparecimento de etanol neste ensaio torna-se necessário compreender o consumo de lactose, bem como a evolução do ácido acético apresentados nas

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Figuras 5.34 e 5.35, enquanto que a Tabela 5.22 apresenta o consumo específico da lactose e do ácido acético.

Tabela 5.22 - Dados do consumo específico da lactose (q_{LAC}) e do ácido acético ($q_{ác. \text{ acético}}$) do Ensaio 7

| Condições | q_{LAC} ($g_{LAC}/g_{biomassa} \cdot h$) | $q_{ác. \text{ acético}}$ ($g_{ac. \text{ acético}}/g_{biomassa} \cdot h$) |
|--------------------------|---|---|
| TAP | - | 0,0073 |
| TAP-S | - | 0,0388 |
| RCV metabolizado | - | -0,0001* |
| RCV metabolizado com PSL | 0,1072 | -0,0053* |

TAP-S: meio TAP isento de enxofre; PSL: permeado de soro de leite

*valores negativos correspondem, na média, à predominância de síntese em detrimento do consumo do ácido.

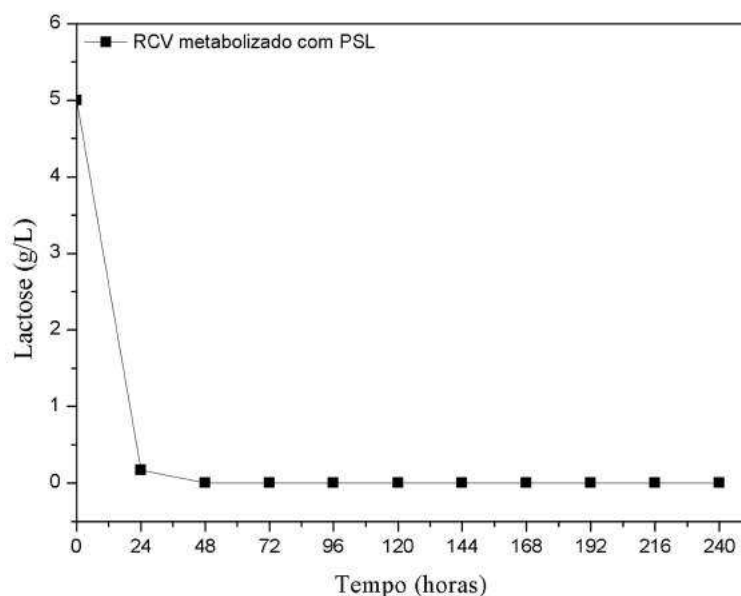


Figura 5.34 - Consumo de lactose no Ensaio 7.

De acordo com a Figura 5.34, a lactose presente no meio RCV metabolizado suplementado com PSL (Condição 30) foi totalmente consumida em 24 horas, sendo que este consumo foi mais rápido quando comparado com os ensaios de escala reduzida em que esta fonte de açúcar foi rapidamente consumida nas 96 horas iniciais. Além disso, foi no tempo de 48 horas, com o consumo total de lactose, que ocorreu a máxima produção de ácido acético, relatando novamente que a microalga prepara seu metabolismo para um período de reserva.

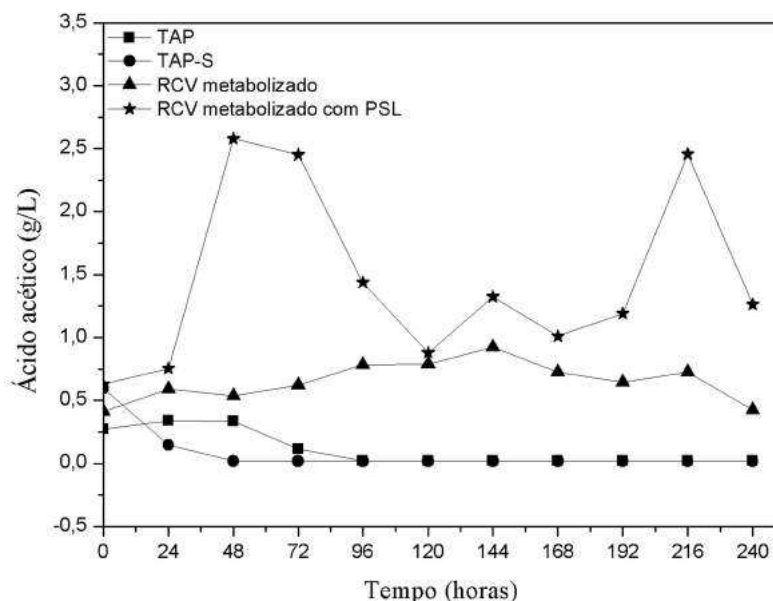


Figura 5.35 - Evolução do ácido acético do Ensaio 7.

Analisando a Figura 5.35, verifica-se que em relação ao ácido acético, o comportamento em escala ampliada foi semelhante ao verificado em escala reduzida. Nos meios TAP e TAP isento de enxofre (Condições 27 e 28), o ácido acético foi consumido com uma velocidade maior que nos demais meios (Tabela 5.22). Isto demonstra que este foi o componente presente utilizado pela microalga para seu crescimento, uma vez que o ácido acético foi totalmente consumido em 96 e 48 horas, respectivamente. A partir deste período a densidade celular permanece praticamente constante. Por outro lado, no meio RCV metabolizado (Condição 29), a concentração de ácido acético praticamente permaneceu constante, apresentando um leve consumo no final da fermentação, conforme observado nos ensaios de escala reduzida.

Já no meio RCV metabolizado suplementado com PSL (Condição 30), observa-se picos de produção de ácido acético seguidos de consumo, sendo que a maior produção deste ácido ocorreu no tempo de 48 horas. Logo após este período um decréscimo acentuado foi verificado até 120 horas. A partir deste tempo, a densidade de algas permaneceu praticamente constante. Este comportamento da evolução do ácido acético pode ser uma resposta do organismo com o objetivo de manter uma reserva deste ácido para uma possível necessidade de manutenção do seu metabolismo.

Foi também realizado no reator de 1,5 L o Ensaio 8, empregando o mesmo sistema híbrido, em que o efluente proveniente da fotofermentação da bactéria *R. capsulatus* (RCV metabolizado) foi suplementado com PSL, iniciando com uma concentração de 5 g/L de lactose. Entretanto, a cada 48 horas, um terço do volume útil foi removido, inclusive células e,

RESULTADOS E DISCUSSÃO

posteriormente reabastecido com meio fresco suplementado com PSL para que a concentração de lactose alcance novamente 5 g/L. A cinética de crescimento celular está apresentada na Figura 5.36.

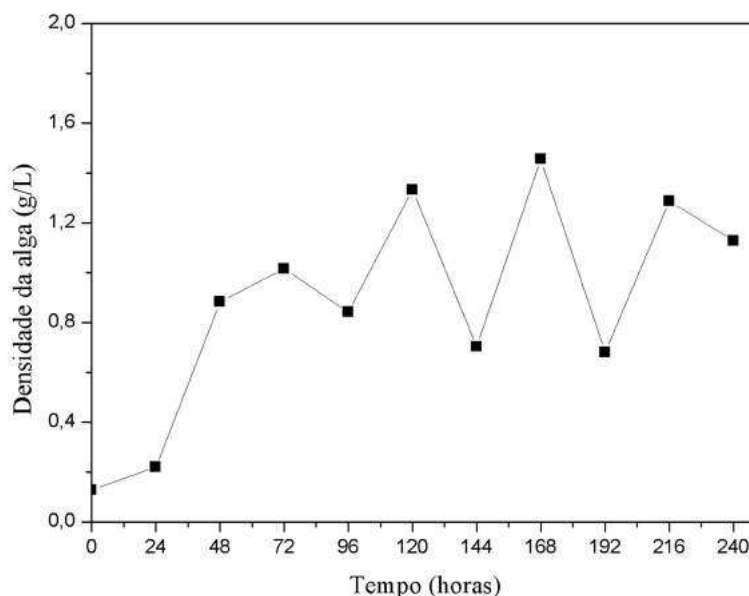


Figura 5.36 - Cinética de crescimento celular do Ensaio 8.

Analisando a Figura 5.36, percebe-se que no início há um crescimento celular até 72 horas. Logo depois, um decréscimo foi verificado em 96 horas, isto se deve ao fato da retirada de parte do volume que justifica a queda na densidade celular, uma vez que também é removido células de alga. No entanto, observou-se que após o reabastecimento com meio fresco contendo a fonte de carbono investigada (lactose contida no PSL), um crescimento celular foi identificado. Em seguida, uma diminuição da densidade de algas foi observada, fato que coincide com a exaustão da lactose no meio.

Com os resultados obtidos da densidade da alga, é possível observar que a concentração de clorofila, que foi analisada a cada 48 horas (após o reabastecimento de meio fresco), está diretamente ligada a biomassa da alga, conforme apresenta a Tabela 5.23.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 5.23 - Quantificação da clorofila do Ensaio 8

| Tempo (horas) | Clorofila (mg/m ³) |
|---------------|--------------------------------|
| 0 | 4,47 |
| 48 | 14,47 |
| 96 | 17,16 |
| 144 | 17,15 |
| 192 | 10,23 |
| 240 | 26,77 |

Por meio da Tabela 5.23, observa-se que a maior concentração de clorofila ocorreu no final da fermentação, enquanto que os pontos entre 48 e 192 horas apresentam valores próximos. Isto se deve a adição de meio fresco suplementado com PSL.

Neste ensaio diferentemente do Ensaio 7 foi verificada a síntese de etanol conforme apresenta a Figura 5.37.

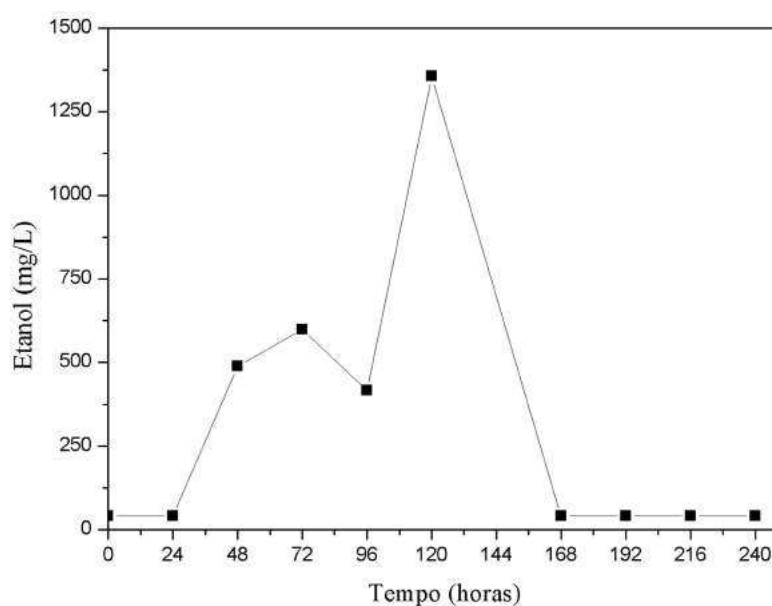


Figura 5.37 - Evolução do etanol do Ensaio 8.

Já na Figura 5.37, verifica-se que o primeiro pico de etanol ocorreu no tempo de 48 horas, após o reabastecimento com meio fresco, permanecendo praticamente constante até 96 horas. No entanto, uma concentração máxima de 1357 mg/L de etanol em 120 horas, cuja produtividade foi de 5,89 mmol/L.dia de etanol foi verificada. Após este período observa-se um consumo acelerado de etanol, sendo totalmente consumido em 168 horas. É necessário deixar claro que o meio fresco reabastecido não possuía etanol em sua composição.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste ensaio foi detectado a produção de etanol, o que não ocorreu no experimento anterior (Ensaio 7). Este fato pode ser decorrente dos reabastecimentos contínuos de meio fresco contendo lactose.

Comparando este ensaio com o experimento em escala reduzida (Ensaio 4), verifica-se que nos dois ensaios houve a produção de etanol, entretanto, neste ensaio, submetido a adições repetidas de meio fresco suplementado com lactose, observa-se uma maior produtividade do produto alvo. Desta forma, surge a necessidade de explorar este tipo de fermentação a fim de entender melhor o metabolismo da microalga, como também, induzir uma rota metabólica que favoreça a produção de etanol.

Para um melhor entendimento do aparecimento de etanol em função da suplementação de açúcar, é necessário entender como ocorreu o consumo de lactose bem como a evolução do ácido acético, apresentados nas Figuras 5.38 e 5.39.

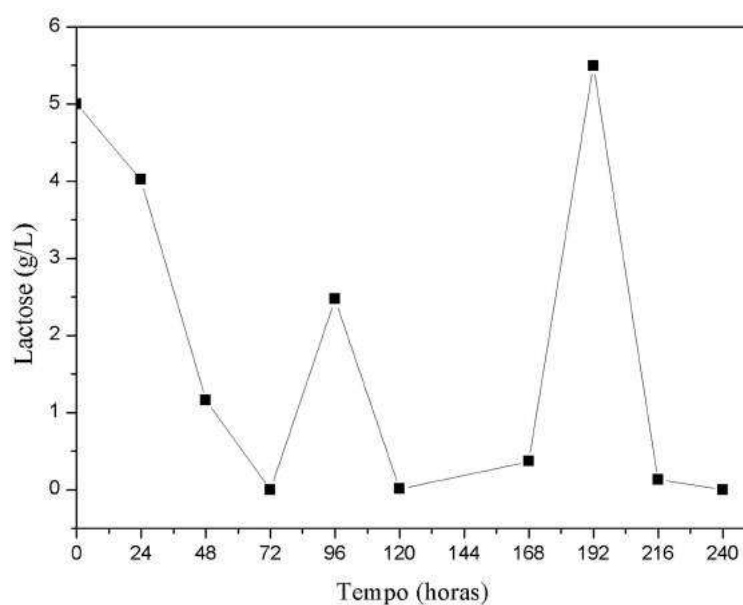


Figura 5.38 - Consumo de lactose do Ensaio 8.

A partir da Figura 5.38, verifica-se ainda que a concentração de lactose iniciou-se com 5 g/L, sendo rapidamente reduzida nas 72 horas iniciais. No entanto, a partir deste período, a cada 24 horas um pico de lactose foi observado. Isto é devido a intenção de se manter concentração deste açúcar em 5 g/L. É nítido identificar que o consumo de lactose foi acelerado. Deve-se esclarecer que alguns reabastecimentos foram insuficientes para se reestabelecer a concentração de lactose em 5 g/L.

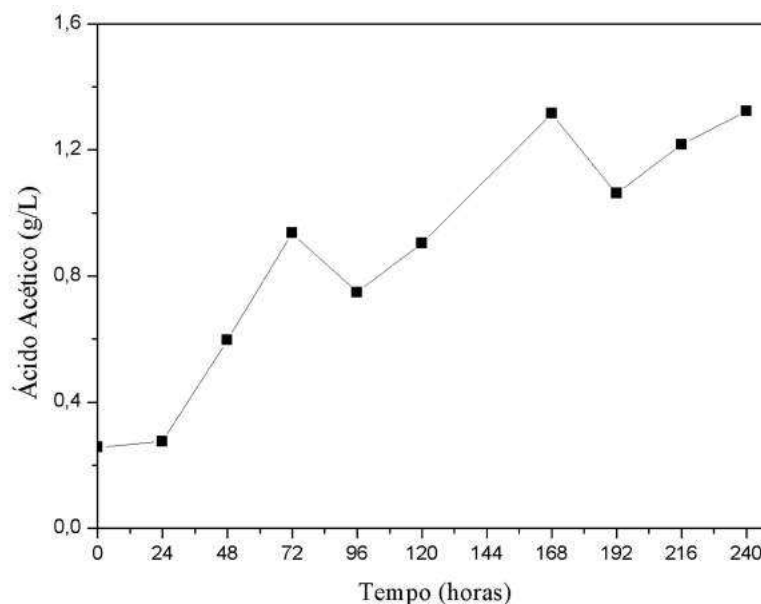


Figura 5.39 - Evolução do ácido acético do Ensaio 8.

Em relação à evolução do ácido acético representado pela Figura 5.39, observa-se um comportamento semelhante ao perfil de densidade das algas. A concentração de ácido acético foi crescente nas 72 horas iniciais, atingindo 0,94 g/L. Em seguida um leve consumo deste ácido foi verificado, seguido novamente de um pico crescente alcançando 1,32 g/L em 168 horas. Logo depois, a concentração cai e no final da fermentação novamente ocorreu a produção de ácido acético. Com isso, percebe-se que a concentração de ácido acético é elevada após a adição do meio fresco suplementado com PSL, isto ocorre porque o meio contém ácido acético em sua composição.

Complementarmente foi analisado o teor de nitrogênio total e o teor de carbono total apresentados nas Figuras 5.40 e 5.41, respectivamente, a fim de entender como o metabolismo da alga sintetiza estes dois componentes.

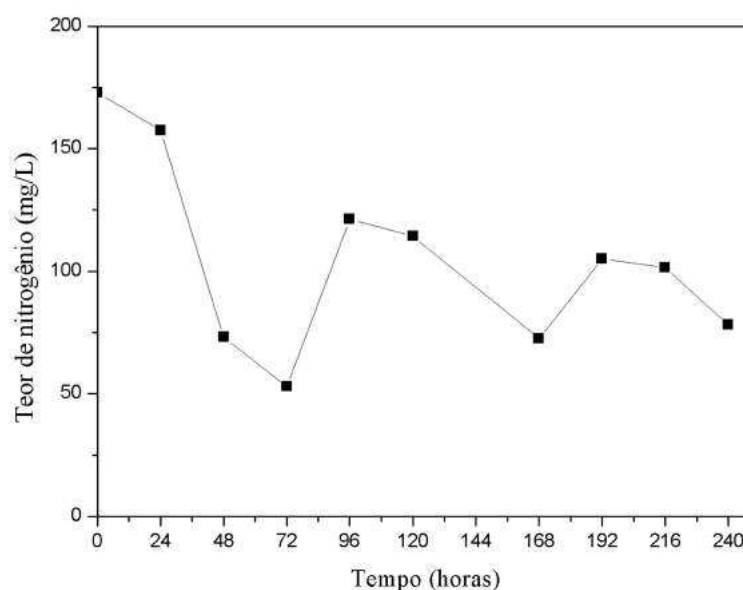


Figura 5.40 - Evolução do teor de nitrogênio total do Ensaio 8.

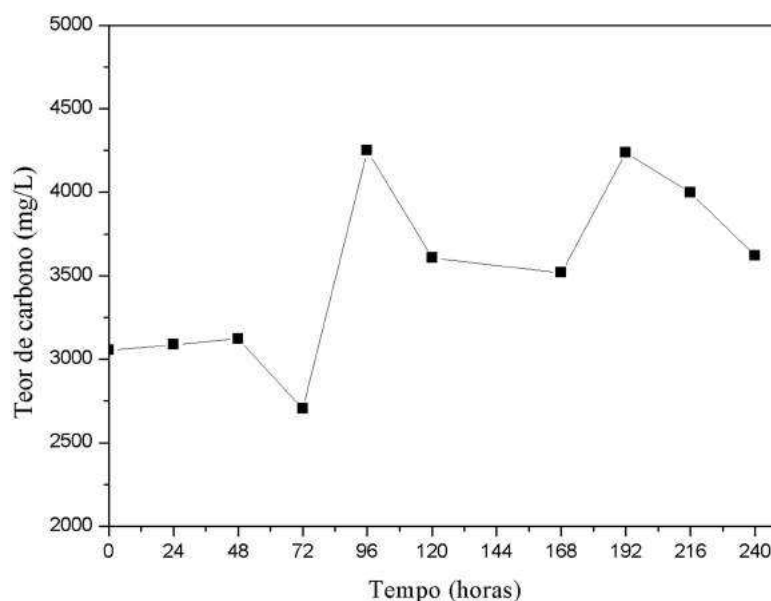


Figura 5.41 - Evolução do teor de carbono total do Ensaio 8.

Com base nas Figuras 5.40 e 5.41, observa-se que a concentração de carbono total (Concentração inicial de 3000 mg/L) foi mais elevada que a concentração do nitrogênio total, em função dos reabastecimentos de lactose.

No entanto, foi verificado um consumo acelerado de nitrogênio nas 72 horas. Em seguida, ocorreram flutuações de subida e descida, possivelmente em decorrência dos reabastecimentos de meio fresco que podem conter em sua composição compostos de nitrogênio. Entretanto, em relação ao teor de carbono total, verificou-se que nas 48 horas iniciais esta variável permanece praticamente constante. No decorrer da fermentação

RESULTADOS E DISCUSSÃO

ocorreram pequenas flutuações provenientes tanto da adição da lactose, como da produção de etanol e de ácido acético.

A partir dos resultados obtidos torna-se necessário compará-los com a literatura, entretanto, deve-se ressaltar que a síntese de etanol por algas é um assunto ainda pouco explorado e com dados escassos. De acordo com o Quadro 5.1, é possível obter uma melhor visão dos resultados encontrados no presente trabalho, sendo que o produto alvo é excretado de forma espontânea pela microalga *C. reinhardtii* a partir das condições avaliadas e, com isso, foi realizada a comparação com dados da literatura utilizando outros sistemas fermentativos.

Quadro 5.1 - Comparação da produção de etanol a partir de diferentes sistemas fermentativos

| Presente Trabalho (Escala Reduzida) | | Literatura (COSTA <i>et al.</i>, 2015) | |
|---|-------------------------------------|--|-------------------------------------|
| Condição | Concentração de etanol (g/L) | Condição | Concentração de etanol (g/L) |
| Ensaio 2 – TAP isento de enxofre com PSL e glicose (concentração inicial de 1 g/L de glicose e lactose) | 1,19 | TAP isento de enxofre com 0,1 g/L de PSL | 13,11 |
| Ensaio 2 – TAP isento de enxofre com PSL (concentração inicial de 1 g/L de lactose) | 0,9 | TAP isento de enxofre com 1 g/L de PSL | Etanol não foi detectado |
| Presente Trabalho (Escala Ampliada) | | Literatura (COSTA <i>et al.</i>, 2015) | |
| Condição | Concentração de etanol (g/L) | Condição | Concentração de etanol (g/L) |
| Ensaio 8 – Efluente proveniente da fotofermentação da bactéria <i>R. capsulatus</i> com PSL (concentração inicial de 5 g/L de lactose) como meio de fermentação para alga <i>C. reinhardtii</i> – Uso de corte na fermentação | 1,357 | Sistema Híbrido – Sobrenadante da alga <i>C. reinhardtii</i> como meio de fermentação para bactéria <i>R. capsulatus</i> | 12,61 |

RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com o Quadro 5.1, percebe-se que na literatura (COSTA *et al.*, 2015) utilizando a alga verde *C. reinhardtii* através de um metabolismo celular em ciclo de luz/escuro a 25 °C no meio TAP com depleção de enxofre utilizando o PSL na concentração de 0,1 g/L, a produção de etanol foi de 13,11 g/L, enquanto que ao aumentar a concentração da fonte de açúcar para 1 g/L, o etanol não foi detectado, porém, ao analisar esta condição no presente estudo, o produto alvo foi de 0,9 g/L.

Na avaliação do sistema híbrido, foram utilizados a associação da alga verde *C. reinhardtii* com a bactéria *R. capsulatus*, no entanto, a produção de etanol foi maior na literatura, uma vez que os metabólitos produzidos pela alga em meio TAP isento de enxofre foram utilizados como meio de fermentação para bactéria, em contrapartida com o presente estudo, que ocorreu o inverso, ou seja, o efluente proveniente da fotofermentação da bactéria foi utilizado como meio de fermentação para a alga.

Segundo os estudos de KHATTAK *et al.* (2014) sobre a produção de etanol a partir de culturas de leveduras por meio de dois sistemas diferentes, em que a primeira condição consistiu na lise de células de leveduras para a extração de enzimas, enquanto que a outra condição baseou-se no sistema de fermentação convencional com células de leveduras, com agitação (150 rpm) e pH em 7,0, avaliando diferentes temperaturas. Na condição da presença de enzimas livres de células a produção de etanol foi de $3,83 \pm 0,22$, $3,44 \pm 0,13$ e $1,94 \pm 0,06$ g/L de etanol para temperaturas de 40, 45 e 50 °C, respectivamente, utilizando 10 g/L de glicose. No entanto, para o sistema de fermentação convencional, a produção de etanol foi de $0,48 \pm 0,12$, $0,13 \pm 0,01$ e $0,05 \pm 0,01$ g/L de etanol para temperaturas de 40, 45 e 50 °C, respectivamente, utilizando 10 g/L de glicose, sabendo que estas temperaturas não correspondem a condição ótima de produção de etanol por culturas de leveduras.

6 - CONCLUSÃO

Com base nas diversas fermentações realizadas com a alga *C. reinhardtii* avaliando a presença de fontes de carbono mixotróficas, a supressão de enxofre e de ácido acético, bem como o uso de sistema híbrido contemplando a associação da alga com a bactéria *R. capsulatus*, foi possível obter uma melhor compreensão do metabolismo da alga.

Em relação à densidade algal, observou-se que a alga já encontrava-se plenamente adaptada ao meio TAP, atingindo valores de biomassa final em torno de 1,2 g/L, sendo que com a adição de fontes de açúcar, estes valores encontravam-se elevados, aproximadamente 1,8 g/L. Contudo, quando a alga foi exposta em meio TAP com supressão de ácido acético, verificou-se que o crescimento celular foi comprometido pela falta deste nutriente, sendo que mesmo com adição de lactose, houve um aumento nos valores de densidade algal, mas que não foram expressivos. Da mesma forma, na avaliação do sistema híbrido, os valores de biomassa foram muito baixos (0,2 g/L) mesmo com a adição de açúcares, indicando a dificuldade da alga em manter-se no meio RCV metabolizado.

No que diz respeito às fontes de carbono mixotróficas utilizadas, identificou-se que a microalga *C.reinhardtii* metabolizou rapidamente a lactose, atingindo os maiores valores de biomassa. É necessário destacar também que o aparecimento de etanol ocorreu somente na presença de fontes de açúcar, seja glicose ou lactose, confirmando a importância destas para a produção deste biocombustível.

Já na análise em escala reduzida da supressão de enxofre na presença de fontes de açúcar (PSL e/ou glicose), a produção de etanol foi potencializada, sendo o máximo produzido de 1189,91 mg/L, no meio suplementado com PSL e glicose, sendo que nesta condição a concentração inicial de glicose e lactose foi de 1 g/L para cada açúcar. Deve-se mencionar que a alga foi exposta a condição de estresse, no caso a supressão de enxofre, logo seu metabolismo foi preparado para um período de reserva, controlando o consumo de nutrientes presentes no meio, como também induzindo a síntese de etanol para uma possível necessidade de consumi-lo.

Pela análise das fermentações em escala reduzida avaliando diferentes fontes de lactose suplementadas no meio TAP, verificou-se que para a síntese de etanol foi necessário uma maior concentração de açúcar no meio, no caso foi utilizado 5 g/L de lactose. Entretanto, quando foi suplementado 1 g/L de glicose e/ou lactose no meio TAP a produção de etanol foi insignificante, uma vez que o consumo dos açúcares foi direcionado para o crescimento celular.

CONCLUSÃO

Observou-se também em escala reduzida a nítida importância da presença de ácido acético no meio fermentativo da alga, já que, mesmo na sua ausência a alga foi capaz de sintetizá-lo para manutenção de seu metabolismo. Contudo, ainda com a adição de fontes de açúcar (PSL) no meio com supressão de ácido acético, a densidade das algas continuou baixa, além de não ter sido detectada a síntese de etanol.

Além disso, a análise do sistema híbrido empregado em escala reduzida indicou a possibilidade de síntese de etanol, como também a síntese de ácido acético, verificado nas condições em que o meio RCV metabolizado foi suplementado com fontes de açúcar (PSL ou glicose). No entanto, a máxima produção de etanol foi verificada em escala ampliada, sendo de 1357 mg/L de etanol e a produtividade volumétrica obtida foi de 5,89 mmol de etanol/L.dia. Nesta fermentação, o emprego do sistema híbrido ocorreu em reator de 1,5 L, em que o efluente proveniente da fotofermentação da bactéria *R.capsulatus* foi suplementado com PSL e disponibilizado para a alga. Nesta condição a concentração inicial de lactose foi de 5 g/L. Vale ressaltar ainda que a cada 48 horas houve o reabastecimento de meio fresco suplementado com PSL a fim de que a concentração inicial de lactose fosse mantida no valor supracitado.

7 - SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Sugere-se inicialmente uma análise mais aprofundada do emprego do sistema híbrido, utilizando outras espécies de bactérias, como também outros micro-organismos, por exemplo, as leveduras, com o objetivo de otimizar a produção de etanol, além de fornecer informações adicionais em relação ao comportamento metabólico das algas para a síntese de outros produtos.

De forma complementar, a avaliação de outras condições de estresse para que a microalga *C. reinhardtii* seja exposta, haja vista que na literatura muitos autores relatam que esta microalga é capaz de acumular amido e triacilgliceróis quando submetida a privação de nitrogênio, alta salinidade, esgotamento de enxofre ou ainda na presença de luz elevada.

Outra sugestão de trabalho futuro é a avaliação da adição de outras fontes de carbono e do uso de efluentes como meio de fermentação a fim de potencializar a síntese de biocombustíveis. Além disso, deve-se destacar a necessidade de explorar outras configurações de sistemas fermentativos como reatores de coluna de bolhas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMIN, S. Review on biofuel oil and gas production processes from microalgae. *Energy Convers. Manage.* 50, 1834–1840, 2009.
- ANDERSEN, R.A. *Algal culturing techniques* (Ed). London Elsevier Academic Press, 578, 2005.
- AVCIOGLU, S. G.; OZGUR, E.; EROGLU, I.; YUCEL, M.; GUNDUZ, U. Biohydrogen production in an outdoor panel photobioreactor on dark fermentation effluent of molasses, *International Journal of Hydrogen Energy*, 36, 11360-11368, 2011.
- BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. *Biochemical Engineering Fundamentals*, second ed. McGraw-Hill, Singapore, 1986.
- BARAS, J.; GACESA, S.; PEJIN, D. Ethanol is a strategic raw material. *Chem. Ind.*, 56, 89-105, 2002.
- BENEMANN, J. R. Feasibility analysis of photobiological hydrogen production. *Int. J. Hydrogen Energy* 22, 979–987, 1997.
- BENEMANN, J. R. Hydrogen production by microalgae. *J. Appl. Phycol.* 12, 291–300, 2000.
- BHARATHIRAJA, B.; CHAKRAVARTHY, M.; KUMAR, R. R.; YOGENDRAN, D.; YUVARAJ, D.; JAYAMUTHUNAGAI, J. *et al.* Aquatic biomass (algae) as a future feed stock for bio-refineries: a review on cultivation, processing and products. *Renew Sustain Energy Rev*; 47: 634–53, 2015.
- BRENNAN, L.; OWENDE, P. Biofuels from microalgae – a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 14, 557-77, 2010.
- ÇAKMAK, Z. E.; ÖLMEZ, T. T.; ÇAKMAK, T.; MENEMEM, Y.; TEKINAY, T. Induction of triacylglycerol production in *Chlamydomonas reinhardtii*: Comparative analysis of different element regimes. *Bioresour. Technology*, 155, 379-387, 2014.
- CHIARAMONTI, D. Bioethanol: role and production technologies. In: Ranalli, P. (Ed), *Improvement of Crop Plants for Industrial End Uses*, 209-251, 2007.
- CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. *Biotechnol Adv.*; 25(3), 294–306, 2007.
- CLESCERI, L. S.; EATON, A. D.; GREENBERG, A. E. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. ed. 20th. American Public Health Association, D.C, 1220, 1998.
- COONEY, M.; MAYNARD, M.; CANNIZZARO, C.; BENEMANN, J. Two-phase anaerobic digestion for production of hydrogen methane mixtures. *Bioresour. Technol.* 98, 2641–2651, 2007.
- CORTEZ, L. A.; ROSSELI, C. E.; JORDAN, R. A.; LEAL, M. R.; LORA, E. E. Necessidades de p&d na área industrial em vinhaça. In L. A., 2010.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- COSTA, R. L.; OLIVEIRA, T. V.; FERREIRA, J. S.; CARDOSO, V. L.; BATISTA, F. R. X. Prospective technology on bioethanol production from photofermentation. *Bioresource Technology*, 181, 330-337, 2015.
- DEMIRBAS, A. Biomass resource facilities and biomass conversion processing for fuels and chemicals. *Energy Convers. Manage*, 42, 1357-1378, 2001.
- DEMIRBAS, A. Use of algae as biofuel sources. *Energy Convers Manag*; 51 (12), 2738-49, 2010.
- DEMIRBAS, M.F. Biofuels from algae for sustainable development. *Appl Energy*, 88, 3473-80, 2011.
- DENG, M.; COLEMAN, J. Ethanol synthesis by genetic engineering in cyanobacteria. *Appl. Environ. Microbial*. 65, 428-523, 1999.
- DOEBBE, A.; KECK, M.; LA RUSSA, M.; MUSSGNUG, J. H.; HANKAMER, B.; TEKCE, E.; NIEHAUS, K.; KRUSE, O. The interplay of proton, electron and metabolite supply for photosynthetic H₂ production in *C. reinhardtii*. *J. Biol. Chem*. 285, 30247-30260, 2010.
- DRAGONE, G.; FERNANDES, B.; VICENTE, A. A.; TEIXEIRA, J. A. Third generation biofuels from microalgae in Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology, Mendez-Vilas A (ed.), Formatex, 1355-1366, 2010.
- FUKUDA, H.; KONDO, A.; NODA, H. Biodiesel fuel production by transesterification of oils. *J. Biosci. Bioeng*. 92, 405-416, 2001.
- GHIRARDI, M. L.; ZHANG, L.; LEE, J. W.; FLYNN, T.; SEIBERT, M.; GREENBAUM, E. Microalgae: a green source of renewable H₂. *Tibtech* 18, 506-511, 2000.
- HAHN, J.; GHIRARDI, M. L.; JACOBY, W. A. Effect of process variables on photosynthetic algal hydrogen production. *Biotechnol. Prog.* 20, 989-991, 2004.
- HALL, D. O.; RAO, K. K. *Photosynthesis*, fifth ed. Cambridge University Press, Cambridge, 1994.
- HANNON, M.; GIMPEL, J.; TRAN, M.; RASALA, B.; MAYFIELD, S. Biofuels from algae: challenges and potential. *Biofuels*, 1, 763-784, 2010.
- HARRIS, E. H. *Chlamydomonas* as a model organism. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52, 363-406, 2001.
- HARUN, R.; DANQUAH, M. K.; FORDE, G. M. Microalgal biomass as a fermentation feedstock for bioethanol production. *J Chem Technol Biotechnol*, 85, 199-203, 2010.
- HASE, E.; OTSUKA, H.; MIHARA, S.; TAMIYA, H. Role of sulfur in the cell division of *Chlorella*, studied by the technique of synchronous culture. *Biochim Biophys Acta*, 35, 180-9, 1959.
- HIRANO, A.; UEDA, R.; HIRAYAMA, S.; OGUSHI, Y. CO₂ fixation and ethanol production with microalgal photosynthesis and intracellular anaerobic fermentation. *Energy*, 22, 137-142, 1997.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- HIRAYAMA, S.; UEDA, R.; OGUSHI, Y.; HIRANO, A.; SAMEJIMA, Y.; HON-NAMI, K.; KUNITO, S. Ethanol production from carbon dioxide by fermentative microalgae. *Stud. Surf. Sci. Catal*, 114, 657-660, 1998.
- JANAUN, J.; ELLIS, N. Perspectives on biodiesel as a sustainable fuel. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(4), 1312-1320. doi:10.1016/j.rser.2009.12.011. 2010.
- JEFFREY, S. W.; HUMPHREY, G. F. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochemie und Physiologie der Pflanzen*, 167, 191-194, 1975.
- JOHN, R. P.; ANISHA, G. S.; NAMPOOTHIRI, K. M.; PANDEY, A. Micro and macroalgal biomass: A renewable source for bioethanol. *Bioresource Technology*, 102, 186-193, 2011.
- JONES, C. S.; MAYFIELD, S. P. Algae biofuels: versatility for the future of bioenergy. *Energy biotechnology*, 23, 346-351, 2012.
- KAPDI, S. S.; VIJAY, V. K.; RAJESH, S. K.; PRASAD, R. Biogas scrubbing, compression and storage: perspective and prospectus in Indian context. *Renew. Energy* 30, 1195-1202, 2005.
- KHATTAK, W. A.; UI-ISLAM, M.; ULLAH, M. W.; YU, B.; KHAN, S.; PARK, J. K. Yeast cell-free enzyme system for bio-ethanol production at elevated temperatures. *Process Biochemistry*, 49, 357-364, 2014.
- KIM, M. S.; BAEK, J. S.; SUYUN, Y.; SIM, S. J.; PARK, S.; KIM, S. C. Hydrogen production from *Chlamydomonas reinhardtii* biomass using a two-step conversion process: Anaerobic conversion and photosynthetic fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 31, 812 - 816, 2006.
- KIM, S.; DALE, B. E. Global potential bioethanol production from waste crops and crop residues. *Biomass Bioenerg*, 26, 361-375, 2003.
- KITO-BORSA, T.; PACAS, D. A.; SELIM, S.; COWLEY, S. W. Properties of an ethanol-diethyl ether-water fuel mixture for cold-start assistance of an ethanol-fueled vehicle. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 37, 3366-3374, 1998.
- KOSOUROV, S.; SEIBET, M.; GHIRARDI, M. L. Effects of extra cellular pH on the metabolic pathways in the sulfur-deprived H₂ producing *Chlamydomonas reinhardtii* cultures. *Plants Cell Physiology*, 44, 146-155, 2003.
- KOSOUROV, S.; TSYGANKOV, A.; SEIBERT, M.; GHIRARDI, M. L. Sustained hydrogen photoproduction by *Chlamydomonas reinhardtii* – effects of culture parameters. *Biotechnol Bioeng*, 78, 731-40, 2002.
- LEE, S. M.; LEE, J. H. *Appl. Chem. Eng.* 21 (2), 2010.
- LEE, S. M.; LEE, J. H. Ethanol fermentation for main sugar components of brown-algae using various yeasts. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 18, 16-18, 2012.
- LONGO, M. A. V.; LAZZARIN, N.; MIGUEZ, T. A. *Produção Biológica de Hidrogênio*. Apostila, Universidade Federal de Santa Catarina, 2009.
- LOPES, S. *Bio*. 1. ed., São Paulo: Saraiva, 2004.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- LOURENÇO, S. O. Cultivo de Microalgas Marinhas – princípios e aplicações. 1. ed. São Carlos: RiMa, 2006.
- MA, F.; HANNA, M. A. Biodiesel production: a review. *Bioresour. Technol.* 70, 1–15, 1999.
- MARKOU, G.; CHATZIPAVLIDIS, I.; GEORGAKAKIS, D.. Effects of phosphorus concentration and light intensity on the biomass composition of *Arthrospira (Spirulina) platensis*. *World J. Microbiol Biotechnol*, 2012.
- MARKOU, G.; GEORGAKAKIS, D. Cultivation of filamentous cyanobacteria (blue-green algae) in agro-industrial wastes and wastewaters: A review. *Applied Energy* 88, 3389–3401, 2011.
- MASOJÍDEK, J.; TORZILLO, G.; SVEN ERIK, J.; BRIAN, F. Mass cultivation of freshwater microalgae. *Environ Sci Technol*; 9 (2), 2226–35, 2008.
- MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. *Renew Sustain Energy Rev*, 14, 217–32, 2010.
- MENETREZ, M. Y. An overview of algae biofuel production and potential environmental impact. *Environ Sci Technol*; 46 (13), 7073–85, 2012.
- MERCHANT, S. S.; PROCHNIK, S. E.; VALLON, O. The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science*, 318, 245-250, 2007.
- MERCHANT, S.; ALLEN, M. D.; KROPAT, J.; MOSELEY, J. L.; LONG, J. C.; TOTTEY, S.; TERAUCHI, A. M. Between a rock and a hard place: trace element nutrition in *Chlamydomonas*. *Atta Biochemical et Biophysical*, 1763, 578-594, 2006.
- MEUSER, J. E.; ANAYEV, G.; WITTIG, L. E.; KOSOUIROV, S.; GHIRARDI, M. L.; SEIBERT, M.; DISMUKES, G. C.; POSEWITZ, M. C. Phenotypic diversity of hydrogen production in chlorophycean algae reflects distinct anaerobic metabolisms. *J Bacteriol*, 142, 21-30, 2009.
- MIAO, X.; WU, Q.; YANG, C. Fast pyrolysis of microalgae to produce renewable fuels. *J. Anal. Appl. Pyrol.* 71, 855–863, 2004.
- MOHSENPOUR, S. F.; RICHARDS, B.; WILLOUGHBY, N. Spectral conversion of light for enhanced microalgae growth rates and photosynthetic pigment production. *Biores. Technol.*, 125, 75-81, 2012.
- MOREIRA, J. R.; GOLDEMBERG, J. The alcohol program. *Energy Policy* Volume 27, Issue 4, 229–245, 1999.
- MUSSGUNG, J. H.; KLASSEN, V.; SCHLUTER, A.; KRUSE, O. Microalgae as substrates for fermentative biogas production in a combined biorefinery concept. *J Biotechnol*, 150, 51-56, 2010.
- NIGAM, P. S.; SINGH, A. Production of liquid biofuels from renewable resources. *Prog. Energy Combust. Sci*, doi:10.1016/j.pecs. 2010.01.003, 52-68, 2010.
- ONCEL, S. S. Microalgae for a macroenergy world. *Renewable Sustainable Energy Rev.* 26, 241–264, 2013.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- PANKOWSKI, A.; MCMINN, A. Development of immunoassays for the iron-regulated proteins ferredoxin and flavodoxin in polar microalgae. *J. Phycol.*, 45, 771 – 783, 2009.
- PENTEADO, D. M. R. Estudos de otimização do meio de cultura para a microalga *Phaeodactylum tricornutum* para a produção de Lipídios. 114 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.
- PEREZ-GARCIA, O.; ESCALANTE, F. M. E.; DE-BASHAN, L. E.; BASHAN, Y. Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. *Water Res.* 45, 11-36, 2011.
- PETROU, C. E.; PAPPIS, P. C. Biofuels: a survey on pros and cons. *Energy Fuel* 23, 1055-1066, 2009.
- PHILIPPS, G.; KRAWIETZ, D.; HEMSCHMEIER, A.; HAPPE, T. A pyruvate formate lyase-deficient *Chlamydomonas reinhardtii* strain provides evidence for a link between fermentation and hydrogen production in green algae. *The Plant Journal*, 66, 330-340, 2011.
- PIRES, J. C. M.; ALVIM-FERRAZ, M. C. M.; MARTINS, F. G.; SIMÕES, M. Carbon dioxide capture from flue gases using microalgae: engineering aspects and biorefinery concept. *Renew Sustain Energy Rev*; 16 (5), 3043–53, 2012.
- POWELL, E. E.; HILL, G. A. Economic assessment of an integrated bioethanol– biodiesel– microbial fuel cell facility utilizing yeast and photosynthetic algae. *Chem. Eng. Res. Des.* 87, 1340–1348, 2009.
- RAZZAK, S. A.; HOSSAIN, M. M.; LUCKY, R. A.; BASSI, A. S.; DE LASA, H. Integrated CO₂ capture, wastewater treatment and biofuel production by microalgae culturing - a review. *Renew Sustain Energy Rev*, 27, 622–53, 2013.
- ROSEGRANT, M. W; MSANGI, S.; SULSER, T.; SANTOS, R. V. Biofuels and the global food balance. Washington, DC: International Food Policy Research Institute; 2006.
- SAHU, J.; ADHIKARY, S. P. Heterotrophic growth and nitrogen fixation in the filamentous blue–green alga *Anabaena* sp. *J. Basic Microbiol.* 21, 669–676, 1981.
- SÁNCHEZ, Ó. J.; CADONA, C. A. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Biores. Technol*, 99, 5270–5295, 2008.
- SANTOS, G. M.; MACEDO, R. V. T.; ALEGRE, R. M.. Influência do teor de nitrogênio no cultivo de *Spirulina maxima* em duas temperaturas – Parte I: Alteração da Composição da Biomassa. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, 23 (Supl), 17 – 21, 2003.
- SCHMIDT, C. J. B. Aislamiento, purificación, y mantenimiento de cepas de microalgas. In: VEGA, B.O.A.; VOLTOLINA, D.. Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal. 1. ed. La Paz: Centro de Investigaciones biológicas Del Noroeste (CIBNOR), 1 – 16, 2007.
- SCOTT, S. A.; DAVEY, M. P.; DENNIS, J. S.; HORST, I.; HOWE, C. J.; LEA-SMITH, D. J; SMITH, A. G. Biodiesel from algae: challenges and prospects, *Current Opinion in Biotechnology*, 21, 277-286, 2010.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- SILVA, F. T. M.; MOREIRA, L. R.; FERREIRA, J. S.; BATISTA, F. R. X.; CARDOSO, V. L. Replacement of sugars to hydrogen production by *Rhodobacter capsulatus* using dark fermentation effluente as substrate. *Bioresource Technology*, 200, 72-80, 2016.
- SINGH, A.; NIGAM, P. S.; MURPHY, J. D. Renewable fuels from algae: an answer to debatable land based fuels. *Bioresour Technol*; 102, 10–6, 2011.
- SINGH, S. P.; SINGH, D. Biodiesel production through the use of diferente sources and characterization of oils and their esters as the substitute of diesel: a review. *Renewable Sustainable Energy Rev*; 14, 200–16. 2010.
- SIRON, R.; GIUSTI, G.; BERLAND, B. Changes in the fatty acid composition of *Phaeodactylum tricornutum* and *Dunaliella tertiolecta* during growth and under phosphorus deficiency. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 55, 95 – 100, 1989.
- SZE, P. A Biology of the Algae, third ed. WCB/McGraw-Hill Inc., Boston, Massachusetts. 1998.
- TSYGANKOV A.; KOSOUIROV, S.; SEIBERT, M.; GHIRARDI M. L. Hydrogen photoproduction under continuous illumination by sulfur-deprived, synchronous *Chlamydomonas reinhardtii* cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, 27, 1239-1244, 2002.
- UENO, Y.; KURANO, N.; MIYACHI, S. Ethanol production by dark fermentation in the marine green alga, *Chlorococcum littorale*. *J. Ferment. Bioeng.* 86, 38–43, 1998.
- ULLAH, K.; AHMAD, M.; SOFIA SHARMA, V. K.; LU, P.; HARVEY, A.; ZAFAR, M., *et al.* Assessing the potential of algal biomass opportunities for bioenergy industry: a review. *Fuel*; 143, 414–23, 2015.
- WANG, Z. T.; ULLRICH, N.; JOO, S.; WAFFENSCHMIDT, S.; GOODENOUGH, U. Algal lipid bodies: stress induction, purification, and biochemical characterization in wildtype and starchless *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryot. Cell* 8, 1856–1868, 2009.
- WEAVER, P. F.; WALL, J. D.; GEST, H. Characterization of *Rhodopseudomonas capsulate*. *Arch. Microbiol*, 105, 207-216, 1975.
- WECKER, M. S. A.; MEUSER, J. E.; POSEWITZ, M. C.; GHIRARDI, M. L. Design of a new biosensor for algal H₂ production based on the H₂- sensing system of *Rhodobacter capsulatus*. *Int J Hydrogen Energy*, 36, 11229-11237, 2011.
- WIDJAJA, A.; CHIEN, C. C.; JU, Y. H. Study of increasing lipid production from fresh water microalgae *Chlorella vulgaris*. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 40, 13-20, 2009.
- WOO, S. G.; YOO, K.; LEE, J.; BANG, S.; LEE, M.; ON, K. Comparison of fatty acid analysis methods for assessing biorefinery applicability of waste water cultivated microalgae. *Talanta*; 97, 103–10, 2012
- WORK, V. H.; RADA KOVITS, R.; JINKERSON, R. E.; MEUSER, J. E.; ELLIOT, L. G.; VINYARD, D. J.; LAURENS, L. M. L.; DISMUKES, G. C.; POSEWITZ, M. C. Increased lipid accumulation in the *Chlamydomonas reinhardtii* sta7-10 starchless isoamylase mutant

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

and increased carbohydrate synthesis in complemented strains. *Eukaryot. Cell* 9, 1251–1261, 2010.

XU, L., WANG, F., GUO, C., LIU, C. Z. Improved algal oil production from *Botryococcus braunii* by feeding nitrate and phosphate in an airlift bioreactor. *Eng. Life Sci.*, 12 (2), 171 – 177, 2012.

XUAN, J.; LEUNG, M. K. H.; LEUNG, D. Y. C.; NI, M. A review of biomass-derived fuel processors for fuel cell systems. *Renew. Sust. Energy Rev.* 13, 1301–1313, 2009.

YACOBY, I.; POCHEKAILOV, S.; TOPOTRIK, H.; GHIRARDI, M. L.; KING, P. W.; ZHANG, S. Photosynthetic electron partitioning between [FeFe]- hydrogenase and ferredoxin: NADP⁺-oxidoreductase (FNR) enzymes in vitro. *Proc Natl Acad Sci*, 108, 9396–9401, 2011.

YANYUSHIN, M. F. Hydrogen evolution and hydrogenase activity in synchronous culture of *Chlamydomonas reinhardtii* in connection with anaerobic degradation of starch. *Sov Plant Physiol*; 29, 121-6, 1981.

YEN, H. W.; BRUNE, D. E. Anaerobic co-digestion of algal sludge and waste paper to produce methane. *Bioresour. Technol.* 98, 130–134, 2007.

ZHANG, L.; HAPPE, T.; MELIS, A. Biochemical and morphological characterization of sulfur-deprived and H₂ producing *Chlamydomonas reinhardtii* (green alga). *Planta*; 214, 552–61, 2002.

ZHU, J.; RONG, J.; ZONG, B. Factors in mass cultivation of microalgae for biodiesel. *Chin J Catal*; 34 (1), 80–100, 2013.

ZIOLKOWSKA, J. R.; SIMON, L. Recent developments and prospects for algae-based fuels in the US. *Renew Sustain Energy Rev*; 29, 847–53, 2014.