



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO
RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS**



Produção de carotenoides e lipídeos pela microalga *Dunaliella tertiolecta* utilizando CO₂ de fermentação de cerveja

Arthur Lygeros das Chagas

**Porto Alegre
2014**

Arthur Lygeros das Chagas

PRODUÇÃO DE CAROTENOIDES E LIPÍDEOS PELA MICROALGA *Dunaliella tertiolecta* UTILIZANDO CO₂ DE FERMENTAÇÃO DE CERVEJA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos como requisito parcial para a obtenção de Grau em Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Rosane Rech
Coorientador: Marco Antônio Zachia Ayub

**Porto Alegre
2014**

CIP - Catalogação na Publicação

Chagas, Arthur Lygeros das
Produção de carotenoides e lipídeos pela microalga
Dunaliella tertiolecta utilizando CO2 de fermentação
de cerveja / Arthur Lygeros das Chagas. -- 2014.
79 f.

Orientadora: Rosane Rech.
Coorientador: Marco Antônio Zachia Ayub.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia de
Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e
Tecnologia de Alimentos, Porto Alegre, BR-RS, 2014.

1. Microalga Dunaliella tertiolecta. 2. Fermentações
alcoólicas, cerveja e YPD. 3. Biofixação de CO2. 4.
Lipídeos e carotenoides. 5. Fotobiorreator airlift tipo
placa. I. Rech, Rosane, orient. II.
Ayub, Marco Antônio Zachia, coorient. III. Título.

Dissertação

**Produção de carotenoides e lipídeos pela microalga *Dunaliella tertiolecta* utilizando CO₂
de fermentação de cerveja**

Arthur Lygeros das Chagas

Aprovado em: ____/____/____

Banca:

Rosane Rech (Orient.)
Doutora em Biologia Celular e Molecular
UFRGS

Marco Antônio Zachia Ayub (Coorient.)
Doutor em Biotechnology
University Of Manchester Institute Of Science And Technology

Daniele Misturini Rossi
Doutora em Engenharia Química
UFRGS

Leila Queiroz Zepka
Doutora em Ciência de Alimentos
UFSM

Vitor Manfroi
Doutor em Ciência e Tecnologia Agroindustrial
UFRGS

Dedico este trabalho aos meus familiares,
à minha companheira Karine Lippert
Bonazza, aos meus amigos e irmãos
DeBarão e *DeMolays* e à equipe do
Laboratório 117 do ICTA.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao ICTA, destaco as equipes dos laboratórios 210, 211 e 216 por todo carinho, compreensão e suporte.

Agradeço especialmente à equipe do laboratório 117 pelos anos incríveis e felizes de convívio.

Agradeço também ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo apoio financeiro na realização desta pesquisa.

RESUMO

O presente trabalho avaliou o crescimento da microalga *Dunaliella tertiolecta* pela biofixação do CO₂ liberado pela produção de cerveja, reciclando um dos gases responsáveis pelo efeito estufa, reduzindo custo da matéria-prima CO₂ e agregando valor ao produzir lipídeos e carotenoides naturais. Para isso a microalga foi cultivada em sistemas integrados entre fotobiorreatores e fermentadores. A diferença nos cultivos foi o tipo e a quantidade de CO₂ produzida pelas fermentações. Inicialmente se fez fermentações com meio YPD (*Yeast Peptone Dextrose*) em fermentadores de 2 L acoplados a cada 24 h aos fotobiorreatores em 4 condições distintas, sendo o último fermentador colocado sempre em 144 h de cultivo de microalgas: 30 g L⁻¹ de dextrose a partir de 72 h de cultivo de microalgas, 60 g L⁻¹ de dextrose a partir de 72 h de cultivo de microalgas, 30 g L⁻¹ de dextrose a partir de 24 h de cultivo de microalgas e variando a concentração de (10 à 60) g L⁻¹ de dextrose a partir de 24 h de cultivo de microalgas (YPD (10-60)/24). Os maiores valores para biomassa, carotenoides, produtividades e lipídeos foram obtidos na condição YPD (10-60)/24. Para reproduzir a essa condição utilizando mosto de cerveja, foi calculada a conversão de substrato em produto para, então, acoplar diariamente volumes diferentes de mosto de cerveja em cultivos de microalgas. Os valores obtidos para os cultivos com CO₂ desprendidos por estas fermentações foram 1,10 ± 0,05 g L⁻¹ de biomassa, 0,18 ± 0,01 g L⁻¹ d⁻¹ de produtividade de biomassa, 0,58 ± 0,06 d⁻¹ foi a velocidade específica de crescimento, 4,74 ± 0,59 mg g⁻¹ de carotenoides por biomassa, 0,86 ± 0,06 mg L⁻¹ d⁻¹ de produtividade de carotenoides e 13,5 ± 0,4 % (em massa) de lipídeos. Estes valores foram praticamente o dobro dos valores obtidos para o cultivo com CO₂ do ar atmosférico, demonstrando que a integração entre fermentadores e fotobiorreatores é uma boa alternativa para indústria alimentícia. Todos cultivos com *D. tertiolecta* apresentaram o mesmo perfil de carotenoides representado por 46,7 ± 2,0 % de luteína, 22,5 ± 1,6 % de β-caroteno, 9,50 ± 0,66 % de zeaxantina, 1,10 ± 0,16 % de α-caroteno e 20,2 ± 3,0 % para outros.

Palavras-chave: Microalgas. *Dunaliella tertiolecta*. Fotobiorreator *airlift*. Biofixação de CO₂. Fermentações alcoólicas. Cerveja. Pigmentos. Carotenoides. Luteína. β-caroteno. Lipídeos.

ABSTRACT

This study evaluated the growth of microalgae *Dunaliella tertiolecta* for CO₂ biofixation released by brewing, recycling one of the greenhouse gases, reducing cost of raw material CO₂ and adding value to produce lipids and natural carotenoids. For this, microalgae were cultivated in integrated systems between photobioreactors and fermenters. The difference in the cultures was the culture medium and the amount of CO₂ produced. Initially, fermentation with medium YPD (Yeast Peptone Dextrose) in 2 L fermenters were coupled every 24 h to photobioreactors in 4 different conditions: 30 g L⁻¹ of dextrose from 72 h culture of microalgae; 60 g L⁻¹ of dextrose from 72 h culture of microalgae; 30 g L⁻¹ of dextrose from 24 h culture of microalgae; and ranging dextrose concentration of (10 to 60) g L⁻¹ from 24 h culture of microalgae (YPD (10-60)/24). The highest values for biomass, carotenoids, productivities and lipids were obtained in the condition YPD (10-60)/24. To reproduce this condition using beer wort, the substrate to product yield was determined and different volumes of beer wort were daily coupled to microalgae cultivations. The values obtained for cultures with CO₂ released from these fermentations were 1.10 ± 0.05 g L⁻¹ of biomass, 0.18 ± 0.01 g L⁻¹ d⁻¹ of biomass productivity, 0.58 ± 0.06 d⁻¹ for the specific growth rate, 4.74 ± 0.59 mg g⁻¹ of carotenoids per biomass, 0.86 ± 0.06 mg L⁻¹ d⁻¹ of carotenoids productivity and 13.5 ± 0.4 % (mass fraction) of lipids. These values were almost twice the values observed in the cultivation with CO₂ of atmospheric air, showing that the integration between fermenters and photobioreactors is a good alternative to increase microalgae growth. All cultures with *D. tertiolecta* showed the same profile of carotenoids represented by 46.7 ± 2.0 % of lutein, 22.5 ± 1.6 % of β-carotene, 9.50 ± 0.66 % of zeaxanthin, 1.10 ± 0.16 % of α-carotene and 20.2 ± 3.0 % for others.

Keywords: Microalgae. *Dunaliella tertiolecta*. Airlift photobioreactor. CO₂ biofixation. Alcoholic fermentation. Beer. Pigments. Carotenoids. Lutein. β-carotene. Lipids.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Sistemas básicos para a captura de CO ₂ (Metz, 2005).....	17
Figura 2. Distribuição global de companhias de CCS através de microalgas (Oilgae, 2013).	18
Figura 3. Principais interesses para o cultivo de algas, onde o eixo das abscissas é o número de respostas dadas por cientista e produtores em um levantamento feito pela Oilgae (Oilgae, 2010).....	19
Figura 4. Esquemática da fotossíntese, da fixação do CO ₂ e do acúmulo de carbono na célula da microalga (Zeng <i>et al.</i> , 2011).....	20
Figura 5. Imagem da <i>Dunaliella tertiolecta</i> (Laboratório 117, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, UFRGS).	20
Figura 6. Representação esquemática e exemplos de lagoas <i>raceway</i> (A) (Jorquera <i>et al.</i> , 2010), (B) (Bitog <i>et al.</i> , 2011) e (C) Cyanotech Company.	25
Figura 7. Diferenciação entre alguns FBRs, na qual a primeira linha demonstra a geometria tipo placa e tubo (Schenk <i>et al.</i> , 2008), a segunda linha a agitação mecânica (A) e as pneumáticas, (Yang, 2011) e a terceira linha a iluminação natural e artificiais (Bitog <i>et al.</i> , 2011; Tamburic <i>et al.</i> , 2011).	25
Figura 8. Representação esquemática da taxa de crescimento de microalgas cultivadas em batelada (Mata, Martins e Caetano, 2010).....	27
Figura 9. Fluxograma para o beneficiamento de CO ₂ em cervejarias (Hough <i>et al.</i> , 1982 <i>apud</i> Briggs, 2004).	31
Figura 10. Biomassa centrifugada de <i>D. tertiolecta</i>	37
Figura 11. Câmara incubadora com inóculos de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> CAT-1 e <i>D. tertiolecta</i>	38
Figura 12. Sistema integrado entre fermentadores e fotobiorreatores.....	39
Figura 13. Preparo da cerveja.	40
Figura 14. Sistema integrado entre fotobiorreatores e fermentadores com mosto de cerveja.	41
Figura 15. Amostras para análise de carotenoides totais.....	43
Figura 16. Amostras para análise de nitrogênio.	44
Figura 17. Preparo das amostras liofilizadas para análise de lipídeos.	45
Figura 18. Extração de carotenoides da biomassa de <i>D. tertiolecta</i> liofilizada.	46
Figura 19. Duplicatas das fermentações do mosto de cerveja para determinação de CO ₂	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Comparação entre microalgas e outras matérias-primas para a produção de biodiesel adaptada de Mata, Martins e Caetano (2010).....	21
Tabela 2. Composição geral de diferentes fontes de alimento e microalgas (% de massa seca) adaptada de Brown (1991), Lourenco (2006) e Becker (2007).....	21
Tabela 3. Comparação entre fotobiorreatores e sistemas abertos para a produção em larga escala de microalgas (Mata, Martins e Caetano, 2010).....	24
Tabela 4. Comparação de CO ₂ liberado anualmente no mundo pelas fermentações para obtenção de biocombustível e cerveja, e pelos combustíveis fósseis.....	30
Tabela 5. Visão geral de mercados existentes, emergentes e potenciais de consumo de CO ₂ nos Estados Unidos (Xu, Isom e Hanna, 2010), adaptada.....	32
Tabela 6. Gradiente utilizado como fase móvel na coluna de fase reversa C30	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CCS	Captura e sequestro de carbono
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CO ₂	Dióxido de carbono
EGA	Emissões gasosas antropogênicas
FBR	Fotobiorreator
SAB	Sistemas abertos
YPD	Extrato de levedura e dextrose peptonada
YPD 30/72	Cultivo integrado entre fotobiorreator e fermentador com meio YPD e 30 g L ⁻¹ de dextrose, sendo o primeiro fermentador acoplado em 72 h de cultivo de microalga
YPD 60/72	Cultivo integrado entre fotobiorreator e fermentador com meio YPD e 60 g L ⁻¹ de dextrose, sendo o primeiro fermentador acoplado em 72 h de cultivo de microalga
YPD 30/24	Cultivo integrado entre fotobiorreator e fermentador com meio YPD e 30 g L ⁻¹ de dextrose, sendo o primeiro fermentador acoplado em 24 h de cultivo de microalga
YPD (10-60)/24	Cultivo integrado entre fotobiorreator e fermentador com meio YPD e variação da concentração de dextrose de (10 à 60) g L ⁻¹ , sendo o primeiro fermentador acoplado em 24 h de cultivo de microalga

LISTA DE SÍMBOLOS

A	Absorbância	Adimensional
C	Concentração de carotenoides	mg L^{-1}
C_a	Concentração de clorofila a	mg L^{-1}
C_b	Concentração de clorofila b	mg L^{-1}
D	Concentração de dextrose	g L^{-1}
D_0	Concentração de dextrose inicial	g L^{-1}
E	Concentração de etanol	g L^{-1}
OD	Densidade ótica	nm
ps	Massa de amostra	g
pl	Massa de lipídeos em 5 mL de amostra	g
Q_C	Produtividade de carotenoides	$\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$
Q_X	Produtividade de biomassa	$\text{g L}^{-1} \text{d}^{-1}$
t_0	Tempo inicial	h
t_f	Tempo final	h
X	Concentração de biomassa de microalga	g L^{-1}
$Y_{E/D}$	Conversão de dextrose em etanol	Adimensional
$\mu_{\text{máx}}$	Velocidade específica máxima de crescimento	d^{-1}

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS	10
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	11
LISTA DE SÍMBOLOS	12
1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 Aquecimento global.....	16
2.2 Captura e sequestro de carbono	17
2.3 Microalgas, microbiologia, bioquímica, produtos obtidos e mercados.....	19
2.3.1 <i>Pigmentos naturais</i>	22
2.4 Cultivo de microalgas.....	23
2.5 Fatores que influenciam no cultivo de microalgas	27
2.6 Fermentação.....	28
2.6.1 <i>Fermentação alcoólica</i>	29
2.6.2 <i>CO₂ da fermentação alcoólica</i>	30
2.7 CO ₂ da fermentação alcoólica como fonte de carbono para o cultivo de microalgas em sistemas integrados	32
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
3.1 Microalga e meio de cultivo	34
3.2 Pré-inóculo de microalgas	35
3.3 Cultivo em fotobiorreatores.....	35
3.4 <i>Downstream</i> : centrifugação e liofilização de microalgas.....	36
3.5 Fermentação alcoólica com <i>Yeast Peptone Dextrose</i>	37
3.6 Preparo do inóculo de YPD	37
3.7 Fermentadores com mosto YPD integrados aos fotobiorreatores	38
3.8 Preparo da cerveja	39

3.9 Fermentadores com mosto de cerveja integrados aos fotobiorreatores	40
3.10 Análise da formação de biomassa	41
3.11 Determinação da taxa de acúmulo de carbono	42
3.12 Determinação de carotenoides totais	42
3.13 Análise de nitrogênio.....	43
3.14 Análise de lipídeos	44
3.15 Identificação dos carotenoides por cromatografia líquida de alta eficiência.....	45
3.16 Determinação da concentração de açúcar e etanol do YPD por cromatografia líquida de alta eficiência.....	47
3.17 Determinação do CO ₂ acumulado, taxa de geração de CO ₂ e do fator de conversão de dextrose em etanol no YPD.....	47
3.18 Determinação da concentração de etanol da cerveja por cromatografia líquida de alta eficiência.....	48
3.19 Determinação do CO ₂ acumulado e da taxa de geração de CO ₂ da fermentação com mosto de cerveja.....	48
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
5 RESULTADOS, DISCUSSÕES E CONCLUSÕES NO FORMATO DE ARTIGO CIENTÍFICO.....	54
6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	78
ANEXO	79

1 INTRODUÇÃO

Alterações no equilíbrio climático terrestre têm causado diversos problemas na biodiversidade do planeta, na produção de alimentos, além de intensificar catástrofes naturais, tendo como maior causador o aumento das emissões gasosas geradas pelo homem. Dentre os gases do efeito estufa o dióxido de carbono emitido principalmente durante a queima de combustíveis fósseis é o que apresenta a maior parcela das emissões globais. No entanto, há um aumento considerável na produção de biocombustíveis por fermentação alcoólica, dando-se atenção para o seu CO₂ liberado, pois possui elevada pureza se comparada aos combustíveis fósseis. Atualmente a quantidade de CO₂ liberada pela fermentação da produção de cerveja supera a quantidade liberada pela produção de biocombustíveis e possui pureza próxima, sendo que, em alguns casos, não é aproveitada, ou seja, é liberada para a atmosfera.

Uma das alternativas para minimizar a concentração de CO₂ na atmosfera é desenvolver e aplicar tecnologias de captura e sequestro de carbono. Fotobioreatores *airlift* tipo placa que utilizam a microalga *Dunaliella tertiolecta* tem chamado a atenção pela alta eficiência na biofixação do CO₂ de forma sustentável, com a possibilidade de gerarem energia e produtos de alto valor agregado.

Neste sentido, o presente trabalho tem como objetivo reciclar o CO₂ liberado pelas fermentações alcoólicas com meio YPD e com mosto para produção de cerveja na utilização como fonte de carbono para o cultivo da microalga *D. tertiolecta* em fotobiorreatores *airlift* tipo placa, constituindo um sistema integrado com fermentadores, avaliando a influência da quantidade e da forma como o CO₂ é adicionado ao cultivo de microalgas sobre a produção de biomassa, carotenoides e lipídeos. Para isso, a biomassa foi determinada por espectrofotometria, carotenoides por cromatografia líquida de alta eficiência e espectrofotometria e lipídeos por Bligh and Dyer. As fontes de carbono para o cultivo são consideradas um dos principais custos para a produção de microalgas. Utilizando o CO₂ desperdiçado pela produção da cerveja, é possível também diminuir este custo.

Foram encontrados na literatura estudos referentes à biofixação por microalga de CO₂ de fermentação para produção de biocombustível. O caráter inovador deste trabalho está no fato de estudar o cultivo de microalga utilizando como fonte de carbono o CO₂ oriundo das fermentações para obtenção da bebida alcoólica mais produzida no mundo, a cerveja, as quais contribuem com uma liberação para a atmosfera tão significativa quanto à quantidade liberada pela fermentação para a produção de biocombustíveis.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Aquecimento global

O aquecimento global tem atingido índices alarmantes, devido à mudança no ambiente mundial. Indústrias ligadas à geração de eletricidade, processamento de gás natural, cimento, ferro, a fabricação de aço e a combustão dos resíduos sólidos urbanos são os principais contribuintes para o efeito estufa por causa de sua dependência de fontes de carbono como carvão, petróleo e gás natural para satisfazer suas necessidades energéticas. O aumento do efeito estufa é causado pelo crescimento das concentrações na atmosfera de metano, óxidos nitrosos, haletos orgânicos e dióxido de carbono (CO₂) que contribui com 60 % das emissões gasosas antropogênicas (EGA) (Maeda *et al.*, 1995; Intergovernmental Panel on Climate Change, 2014).

Dentre as alterações do meio ambiente causadas pelo aumento da temperatura terrestre, como consequência do efeito estufa, tem-se a mudança na distribuição e quantidade de precipitações, o impacto na produção de alimentos, o derretimento acelerado das calotas polares, o aumento do nível dos oceanos e a extinção acelerada de espécies (Aronson e McNulty, 2009; Bilanovic *et al.*, 2009).

Os gases de efeito estufa, além de contribuírem para o aquecimento global, influenciam em outros meios: os oceanos absorvem aproximadamente um terço do CO₂ emitido a cada ano pelas atividades humanas, tornando a água gradualmente mais ácida, o que pode causar a perda rápida de barreiras de corais e da biodiversidade do ecossistema marinho com enormes implicações na vida marinha e consequentemente na vida terrestre (Mata, Martins e Caetano, 2010).

Na tentativa de frear tais efeitos nocivos ao meio ambiente, as Nações Unidas promoveram o Protocolo de Quioto em 1997 com o objetivo mais específico de reduzir as EGA em 5,2 % sobre a base das emissões de 1990. Mais de 170 países ratificaram o protocolo e, além disso, propuseram a introdução de um sistema de créditos de carbono em 2010, com preço unitário estimado em US\$ 270 t⁻¹ (Stewart e Hessami, 2005). Finalmente, as Nações Unidas na Convenção sobre Mudanças Climáticas, realizada em Copenhague em 2010, concordou em fornecer cerca de US\$ 100 bilhões para a mitigação de efeito estufa até 2020 (ABEMC, 2011), a qual envolve a redução das emissões de CO₂ através da redução de combustíveis fósseis (substituição por biocombustíveis, utilização de energia solar, eólica, de

marés), do avanço tecnológico para uma melhor eficiência energética ou pelas tecnologias de captura e fixação de carbono (do inglês *Carbon Capture and Storage – CCS*).

2.2 Captura e sequestro de carbono

As técnicas de CCS são divididas em duas etapas, captura e fixação. As tecnologias que podem ser usadas na etapa de captura do CO₂ emitido são: (a) absorção química através de reações químicas com solventes, muito utilizada em termoelétricas, com posterior recuperação térmica do CO₂ e a adsorção através de alguns materiais com alta área superficial, como as zeólitas e o carvão ativado, que podem separar o CO₂ presente em misturas gasosas por adsorção física; (b) a separação física do CO₂ por membrana, também utilizada em termoelétricas e (c) o fracionamento criogênico através do controle de temperatura e pressão (Metz, 2005). A **Figura 1** demonstra esquematicamente tais tecnologias.

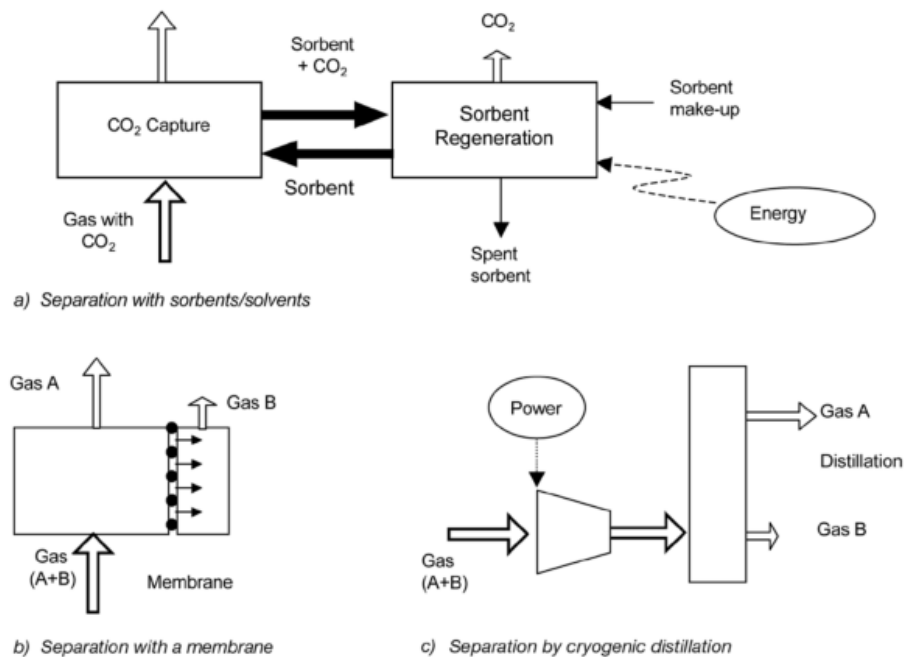


Figura 1 – Sistemas básicos para a captura de CO₂ (Metz, 2005).

Após ser capturado o CO₂ precisa ser armazenado (ou fixado) de alguma forma que evite seu retorno à atmosfera. Técnicas envolvendo a injeção oceânica, em aquíferos, em reservatórios de hidrocarbonetos e subterrâneo do CO₂ capturado têm despertado grande interesse, contudo há altas demandas energéticas envolvidas nestas tecnologias, juntamente com infraestruturas com grandes alterações no meio ambiente, acompanhadas de dificuldades na sua manutenção e operação e, com todos estes fatores, os custos acabam se elevando.

Juntamente com estas desvantagens, não são gerados produtos a serem comercializados (Bilanovic *et al.*, 2009).

Assim, a biofixação de carbono durante o crescimento de organismos fotossintetizantes é apontada como uma alternativa promissora às CCSs e atualmente está difundida mundialmente, como mostra a **Figura 2**, porém no Brasil ainda não há companhias em operação.



Figura 2 – Distribuição global de companhias de CCS através de microalgas (Oilgae, 2013).

A biofixação pode ser conduzida indiretamente quando uma floresta é manejada e usada como um sumidouro natural de CO₂, de forma que a madeira gerada pode ser usada como um substituto de combustíveis fósseis, ou ainda diretamente quando envolve o cultivo de organismos fotossintéticos mais simples e de biofixação mais efetiva que plantas superiores, tais como microalgas e cianobactérias. A versatilidade da CCS através de microalgas se aplica em diversos tipos de indústrias, possibilitando a obtenção de uma gama ampla de produtos através da biomassa (fazendo parte do conceito de biorrefinarias) formada pelas microalgas, assim como a utilização dessa biomassa para a geração de energia. Na mesma linha da versatilidade das microalgas a **Figura 3** demonstra os principais interesses no seu cultivo atualmente.

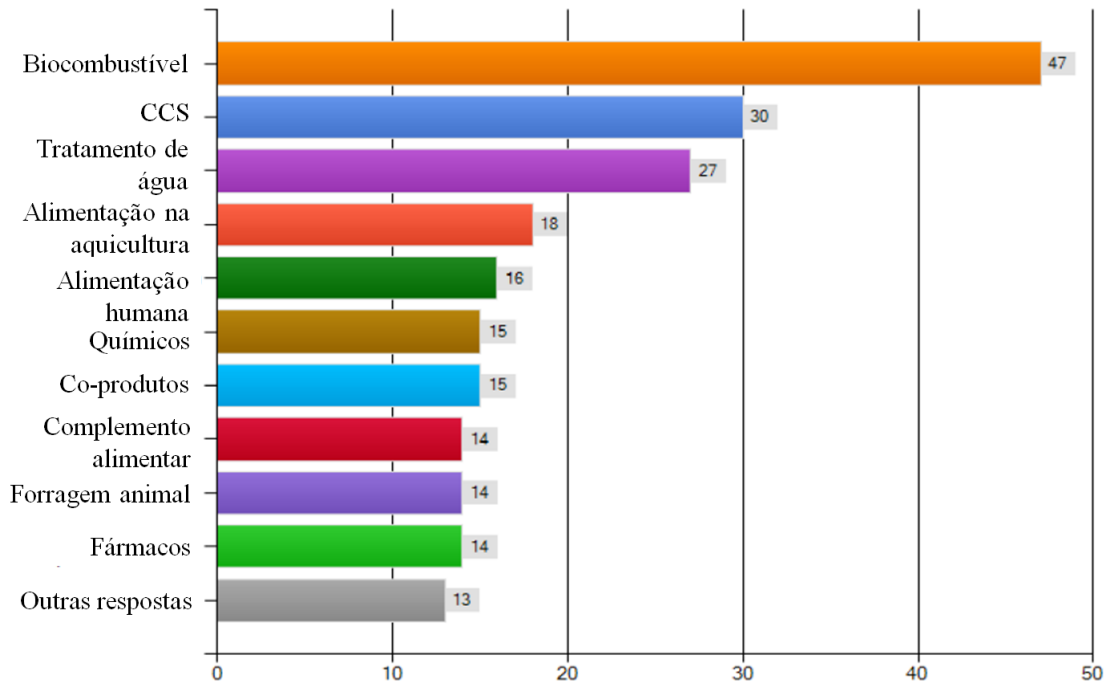
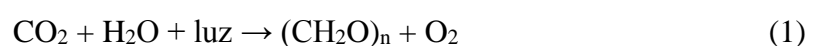


Figura 3 – Principais interesses para o cultivo de algas, onde o eixo das abscissas é o número de respostas dadas por cientista e produtores em um levantamento feito pela Oilgae (Oilgae, 2010).

2.3 Microalgas, microbiologia, bioquímica, produtos obtidos e mercados

O termo microalga pode ser usado para definir todos os microrganismos fotossintetizantes unicelulares, compreendendo nesta definição os procarióticos (cianobactérias) e os eucarióticos (também chamadas de microalgas em um sentido mais restrito) (Li *et al.*, 2008). Elas são distribuídas em toda a biosfera e crescem sob a mais ampla variedade possível de condições, desde aquáticas (água doce à salinidade extrema) a lugares terrestres. Sua singularidade que os separa de outros microrganismos é devido à presença de clorofila e de ter capacidade fotossintética em uma única célula algal, permitindo assim uma maior facilidade para a geração de biomassa e uma investigação genética e metabólica mais simples em um período de tempo muito mais curto comparada a plantas convencionais.

Independente do método a ser usado para o cultivo de microalgas essas sempre dependerão do sistema fotossintético em cultivos autotróficos - resumido por Zeng *et al.* (2011) na **Figura 4**, juntamente com a fixação de CO₂ e o acúmulo de carbono - usado para reações fotoquímicas, nas quais o CO₂ é fixado através da sua conversão para carboidratos, através da luz como fonte de energia e da água usada como fonte de elétrons. A reação geral para a fotossíntese é dada pela **Equação 1**.



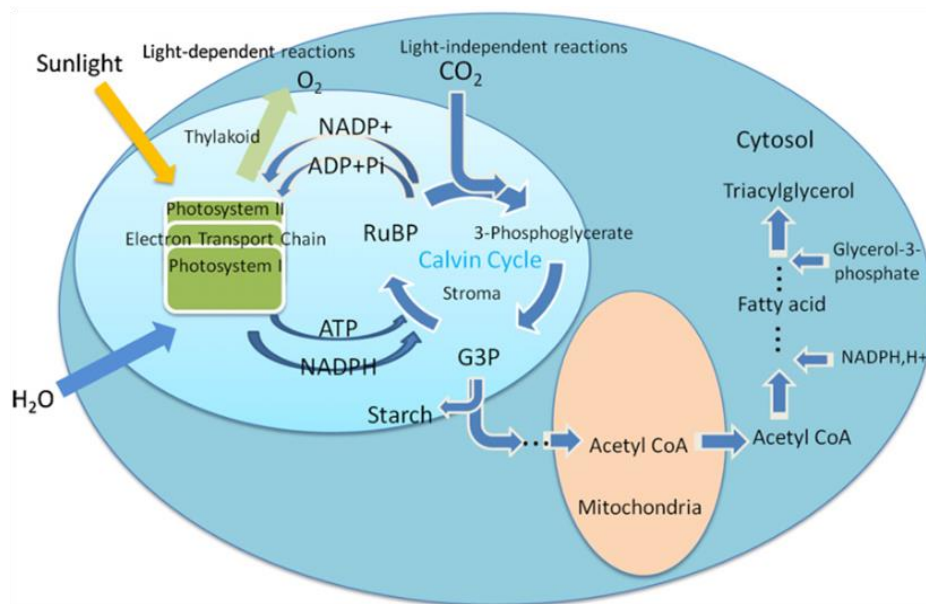


Figura 4 – Esquemática da fotossíntese, da fixação do CO₂ e do acúmulo de carbono na célula da microalga (Zeng *et al.*, 2011).

Para que a aplicação das microalgas à CCS seja efetiva elas devem possuir características tais como: fácil obtenção, alta taxa de crescimento, de captura e transformação de CO₂ em biomassa, estarem adaptadas aos meios de culturas de baixo custo, serem robustas frente a contaminações, cisalhamentos e substâncias tóxicas, além de produzirem biomassa de fácil remoção que gerem produtos de alto valor agregado, tais como carotenoides e lipídeos. Essas características são encontradas nos organismos marinhos fitoplanctônicos da espécie *Dunaliella tertiolecta* (**Figura 5**) que são algas verdes, eucarióticas, do reino plantae, classe clorofíceas, encontradas em países como Noruega e Irã (Fazeli *et al.*, 2006; Guiry e Guiry, 2014).

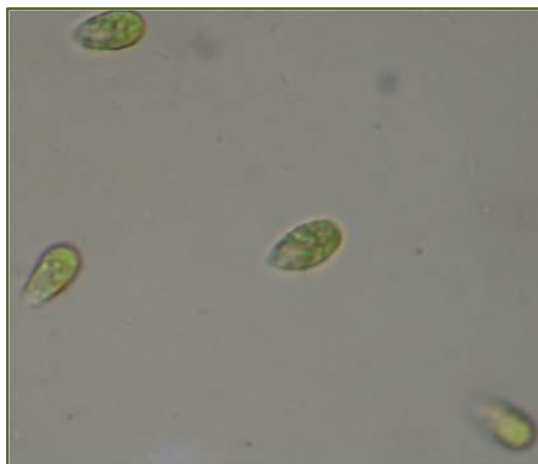


Figura 5 – Imagem da *Dunaliella tertiolecta* (Laboratório 117, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, UFRGS).

As microalgas formam biodiesel com altas produtividades (**Tabela 1**) e possuem composições nutricionais que podem superar as de alimentos tradicionais (**Tabela 2**) como, por exemplo, as proteínas da *Spirulina maxima* e da *Chorella vulgaris*, os carboidratos da *Porphyridium cruentum* e os lipídeos da *Chorella vulgaris* e da *D. tertiolecta*.

Tabela 1 – Comparação entre microalgas e outras matérias-primas para a produção de biodiesel adaptada de Mata, Martins e Caetano (2010)

Fonte	Lipídeo na biomassa (% massa seca)	Produção de lipídeo (L ha ⁻¹ ano ⁻¹)	Área de cultivo por produção de biodiesel (m ² ano kg ⁻¹)	Produtividade de biodiesel (kg ha ⁻¹ ano ⁻¹)
Milho (<i>Zea mays</i> L.)	44	172	66	152
Soja (<i>Glycine max</i> L.)	18	636	18	562
Canola (<i>Brassica napus</i> L.)	41	974	12	862
Girassol (<i>Helianthus annuus</i> L.)	40	1070	11	946
Mamona (<i>Ricinus communis</i>)	48	1307	9	1156
Palma (<i>Elaeis guineensis</i>)	36	5366	2	4747
Microalga (pouco óleo)	30	58700	0,2	51927
Microalga (médio)	50	97800	0,1	86515
Microalga (muito óleo)	70	136900	0,1	121104

Tabela 2 – Composição geral de diferentes fontes de alimento e microalgas (% de massa seca) adaptada de Brown (1991), Lourenco (2006) e Becker (2007)

Fonte	Proteínas	Carboidratos	Lipídeos
Carne	43	1	34
Leite	26	38	28
Arroz	8	77	2
<i>Spirulina maxima</i>	60-71	13-16	6-7
<i>Porphyridium cruentum</i>	28-39	40-57	9-14
<i>Chlorella vulgaris</i>	51-58	12-17	14-22
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	12	15	15-21

Os lipídeos constituem a membrana das microalgas, atuam como isolante térmico e reserva de energia. A biogênese de ácidos graxos poli-insaturados depende de fatores de estresse como, em particular, o aumento da concentração de CO₂ no meio, que altera o aparato fotossintético de forma adaptativa das células, e essas acabam produzindo mais lipídeos. Alguns desses ácidos graxos essenciais produzidos pelas microalgas são utilizados

de forma nutricional e farmacêutica por possuírem grupos como os ômega 3, 6 e 9 que estão ligados a benefícios a saúde, tais como a prevenção e tratamento de doenças cardíacas, prevenção e tratamento de doença de Crohn/colite, asma, alergias, antimicrobianos, anticâncer, anti-inflamatórios, etc. Estas funcionalidades acabam aumentando o valor de mercado para a biomassa de microalga quando utilizadas como nutracêuticos (Muradyan *et al.*, 2004; Lourenço, 2006; Mata, Martins e Caetano, 2010; Asif, 2011). O ácido-graxo ômega-3 de óleos marinhos como de peixes e algas teve um consumo mundial estimado em 2013 de 123,8 mil toneladas métricas, com valor de mercado de US\$ 2,3 bilhões. Prevê-se que a demanda chegará a 241 mil toneladas métricas, com um valor de US\$ 4,96 bilhões entre 2013 e 2020 (AIM, 2014).

2.3.1 Pigmentos naturais

Podem-se obter também de microalgas pigmentos naturais tais como luteína, β -caroteno, α -caroteno e zeaxantina. Os carotenoides são uma classe de pigmentos naturais lipossolúveis encontrados principalmente em plantas, vegetais, algas e bactérias fotossintéticas, onde desempenham papel importante na fotossíntese: a luz é convertida em energia através dos pigmentos orgânicos, os quais são divididos em três principais grupos, as clorofilas, os carotenoides e as ficobilinas (Masojídek, Koblížek e Torzillo, 2003; Mulders *et al.*, 2014).

O papel principal nos sistemas de absorção de luz é desempenhado pela clorofila a, logo, ela está presente em todas as espécies de microalgas fotossintetizantes. Já as clorofilas b, c e d são pigmentos acessórios da fotossíntese, sendo encontradas na maioria das microalgas. Podem ser utilizadas no tratamento de úlcera e recuperação do fígado devido à atividade como agente quelante e na reparação celular. Além dos benefícios à saúde, podem ser usadas como aditivo em alimentos devido a sua forte coloração verde. Culturas de microalgas, em condições ótimas, podem chegar a quantidades de clorofilas acima de 4 % de massa seca (Lourenço, 2006; Pangestuti e Kim, 2011; Mulders *et al.*, 2014).

As ficobilinas estão presentes em algumas algas e podem ser pigmentos azuis, as ficocianinas, ou pigmentos vermelhos, as ficoeritrinas. Elas aumentam o espectro de captação da luz pela fotossíntese e também atuam como reserva de nitrogênio. Microalgas ricas em ficobilinas são utilizadas como corantes naturais (Lourenço, 2006; Mulders *et al.*, 2014).

Os pigmentos orgânicos mais comercializados são os carotenoides, sendo as microalgas uma fonte vegana destes pigmentos acessórios. Existem mais de quatrocentos

carotenoides conhecidos em microalgas, divididos em dois grupos, os carotenos, que contém apenas hidrocarbonetos, e as xantofilas, que contém hidrocarbonetos e grupos funcionais com oxigênio em sua molécula. Representando um mercado em expansão de nutracêuticos, os carotenoides têm um mercado global estimado em US\$ 1,2 bilhões para 2015. β -caroteno, zeaxantina e luteína são carotenoides encontrados em altas concentrações em algumas microalgas, em média esta concentração fica entre 0,1 % e 2 % de peso seco, porém no gênero *Dunaliella* pode chegar à 14 %, uma quantidade significativa de algumas substâncias que são importantes e não são sintetizados pelo corpo humano. Os carotenos mais representativos, os isômeros β -caroteno e α -caroteno, são importantes por serem precursores da vitamina A, por terem propriedades antioxidantes e no combate ao câncer. O β -caroteno representa a maior parcela do mercado de carotenoides avaliado em US\$ 247 milhões em 2007 e com estimativa de US\$ 285 milhões para 2015. Até 1980, a produção de β -caroteno era sintética. Carotenoides naturais, embora mais caros do que os sintéticos, têm a vantagem de fornecer isômeros na sua razão natural e esses são considerados superiores se comparado a forma trans dos sintéticos. Em 1994, teve início a comercialização de β -caroteno obtido através de microalgas com mercado estabelecido em países como Austrália, Israel, EUA, Índia e China (Borowitzka e Brown, 1974; Shaish, Ben-Amotz e Avron, 1991; Lourenço, 2006; Hosseini Tafreshi e Shariati, 2009; Oilgae, 2011; Pangestuti e Kim, 2011; Oilgae, 2013; Oilgae, 2014; Mulders *et al.*, 2014).

Com um mercado em crescimento exponencial como nutracêuticos, a luteína e a zeaxantina, representantes das xantofilas, são associadas ao tratamento e prevenção da degeneração macular referente à idade, da catarata e da aterosclerose, possuindo também propriedades antioxidantes. O valor de mercado da luteína foi de US\$ 233 milhões em 2010 com uma estimativa de US\$ 309 milhões para 2018 (Krinsky, Landrum e Bone, 2003; Richer *et al.*, 2004; Lourenço, 2006; Hosseini Tafreshi e Shariati, 2009; Oilgae, 2011; Pangestuti e Kim, 2011; Mulders *et al.*, 2014).

2.4 Cultivo de microalgas

O cultivo autotrófico de microalgas pode ser feito em sistemas abertos (SAB), como lagoas *raceway*, ou em sistemas fechados controlados chamados de fotobiorreatores (FBR). Um biorreator é definido como um sistema em que uma conversão biológica é conduzida. Assim, um fotobiorreator é um biorreator em que organismos fotoautotróficos (cianobactérias, algas e células vegetais) são cultivados ou usados para conduzir reações fotobiológicas.

Apesar desta definição ser aplicável para sistemas abertos ou fechados, a literatura normalmente a usa para descrever os sistemas fechados (Mata, Martins e Caetano, 2010). A **Tabela 3** demonstra uma comparação entre os dois sistemas.

Tabela 3 – Comparação entre fotobiorreatores e sistemas abertos para a produção em larga escala de microalgas (Mata, Martins e Caetano, 2010)

Item de comparação	Fotobiorreatores (FBR)	Sistemas abertos (SAB)
Controle de contaminação	Fácil	Difícil
Risco de contaminação	Reduzido	Alto
Esterilidade	Alcançável	Nenhuma
Controle do processo	Fácil	Difícil
Controle de espécies	Fácil	Difícil
Agitação	Uniforme	Baixa
Regime de operação	Batelada ou semi-contínuo	Batelada ou semi-contínuo
Razão Área/Volume	Alto (20-200 m ⁻¹)	Baixo (5-10 m ⁻¹)
Concentração celular	Alto	Baixo
Investimento	Alto	Baixo
Custo de operação	Alto	Baixo
Eficiência de utilização luminosa	Alta	Baixa
Controle de temperatura	Alcançável	Difícil
Produtividade	3-5 vezes mais produtivo	Baixo
Tensão hidrodinâmica sobre as células	Baixa-alta	Muito baixa
Evaporação do meio de cultura	Baixa	Alta
Controle de transferência gasosa	Alto	Baixo
Perda de CO ₂	Depende do pH, alcalinidade, etc.	Depende do pH, alcalinidade, etc.
Inibição por O ₂	Grande problema em FBR	FBR > SAB
Aumento de escala	Difícil	Difícil

Lagoas *raceway* e mesmo lagoas naturais podem ser usadas para a produção comercial de microalgas. Uma lagoa *raceway* é composta de canais que permitem a recirculação de parte da biomassa e do meio de cultivo, conforme a **Figura 6**. A agitação e a circulação são providas por um rotor com pás e o fluxo é guiado por chicanas posicionadas nos canais de escoamento. Devido a não necessidade de uso de materiais transparentes, diversos materiais mais baratos podem ser usados na construção, como concreto e terra compactada, que podem adicionalmente ser revestidos com filmes plásticos brancos. Durante o período luminoso do dia, o meio de cultivo é constantemente alimentado imediatamente após o rotor, sendo uma quantidade proporcional retirada imediatamente antes do rotor. O rotor é mantido sempre ligado para evitar a decantação da biomassa (Scoparo, 2010).

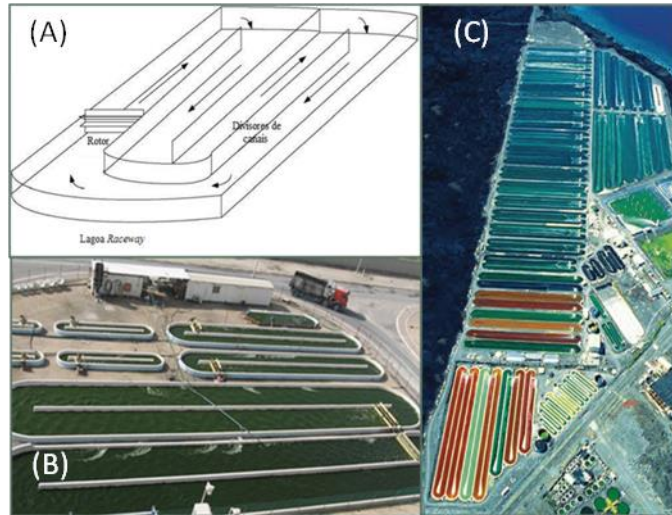


Figura 6 – Representação esquemática e exemplos de lagoas *raceway* (A) (Jorquera *et al.*, 2010), (B) (Bitog *et al.*, 2011) e (C) Cyanotech Company.

Diversos FBRs têm sido estudados pelas vantagens apresentadas na Tabela 3, com isso surgem uma gama de tipos construídos com materiais transparentes que se diferenciam basicamente pela sua geometria, pelo tipo de agitação e de iluminação, conforme mostra a **Figura 7**.

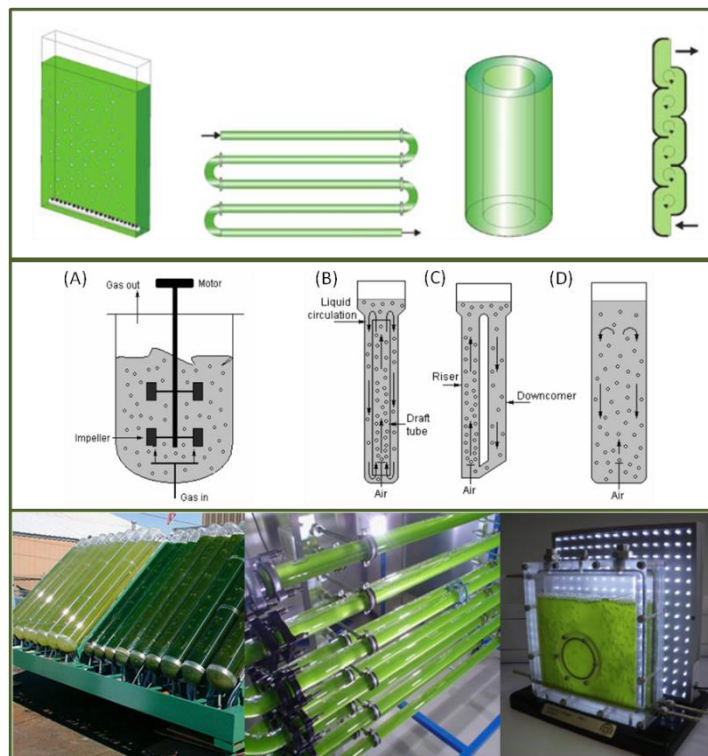


Figura 7 – Diferenciação entre alguns FBRs, na qual a primeira linha demonstra a geometria tipo placa e tubo (Schenk *et al.*, 2008), a segunda linha a agitação mecânica (A) e as pneumáticas, (Yang, 2011) e a terceira linha a iluminação natural e artificiais (Bitog *et al.*, 2011; Tamburic *et al.*, 2011).

Os FBRs tipo placa levam vantagem sobre o tipo tubo, pois possuem razão entre área e volume maior, têm menores gradientes de luminosidade e temperatura no seu interior, a sua limpeza é mais fácil, o gasto energético é menor, entretanto, o seu escalonamento apresenta maior complexidade devido à necessidade de mais compartimentos e materiais de apoio do que FBR tipo tubular, além das células sofrerem maior tensão por cisalhamento devido ao choque com as quinas do FBR. Sendo mais utilizado em fermentações, os tanques com agitação mecânica diferem entre si pelo número e tipo de impelidores, geram menos custos que os FBRs com agitação pneumática, contudo podem causar a morte celular das microalgas pela alta tensão de cisalhamento. Sendo assim, os FBRs com agitação pneumática são mais utilizados para o cultivo de microalgas por ter em uma agitação mais suave e homogênea, além de contribuírem com uma melhor distribuição de luz sobre as células. São divididos em coluna de bolha (Figura 7-D) ou *airlift*. Este último se difere da coluna de bolha por conter no interior do FBR tubos de sucção que podem ter circulação interna (Figura 7-B) ou externa (Figura 7-C). Leva vantagem sobre a coluna de bolha pelo fato das bolhas circularem de forma mais homogênea, com menor coalescência e como consequência há maior transferência de calor e massa. A circulação externa dá ao FBR *airlift* uma menor coalescência de bolhas frente à circulação interna, logo, a distribuição e o cisalhamento são mais uniformes. A iluminação natural é mais sustentável que a artificial, todavia há problemas com o seu controle. Outro item a ser considerado é o tipo e a disposição do trocador de calor no FBR, que pode ser interno ou externo (Lee, 2001; Merchuk e Gluz, 2002; Jorquera *et al.*, 2010; Yang, 2011; Lam e Lee, 2012; Lam, Lee e Mohamed, 2012).

Além dos cultivos autotróficos em SAB e FBR, cultivos heterotróficos também vêm ganhando destaque para produção de microalgas. O metabolismo heterotrófico tem capacidade de crescimento na ausência de luz, substituindo a fixação de CO₂ atmosférico juntamente com a utilização de compostos orgânicos para o crescimento. O meio de cultura básico é similar ao autotrófico com exceção da adição de fonte de carbono orgânico. O crescimento heterotrófico elimina algumas deficiências do crescimento autotrófico, permitindo a utilização de praticamente qualquer fermentador como um biorreator e produzindo, como resultado importante, uma redução significativa de custos para a maioria dos processos, porém apresenta limitações como o número limitado de espécies de microalgas que pode crescer heterotroficamente, maiores despesas com energia e com custos por adição de um substrato orgânico, contaminação por competição com outros microrganismos, inibição de crescimento pelo substrato orgânico em excesso e apresenta menor apelo ambiental por

não biofixar diretamente CO_2 atmosférico, por exemplo. Unindo características metabólicas de cultivos autotróficos e heterotróficos, os cultivos mixotróficos também têm sido utilizados (Yang, Hua e Shimizu, 2000; Perez-Garcia *et al.*, 2011).

2.5 Fatores que influenciam no cultivo de microalgas

A **Figura 8** apresenta as curvas típicas de crescimento celular para uma cultura de microalgas em batelada (linha contínua) e a concentração de nutrientes ao longo do cultivo (linha tracejada). Cinco fases de crescimento podem ser identificadas: (1) fase *lag* ou de adaptação; (2) fase de aceleração, na qual a taxa de crescimento específico é continuamente aumentada; (3) fase de crescimento exponencial, na qual a máxima taxa específica de crescimento é alcançada; (4) fase estacionária, na qual a máxima concentração celular é atingida e a taxa de crescimento específico é continuamente reduzida e (5) fase de declínio ou morte. Geralmente, células na fase exponencial apresentam alto teor de proteína, enquanto que células na fase estacionária possuem mais moléculas de reserva de energia como carboidratos e glicogênio (Mata, Martins e Caetano, 2010).

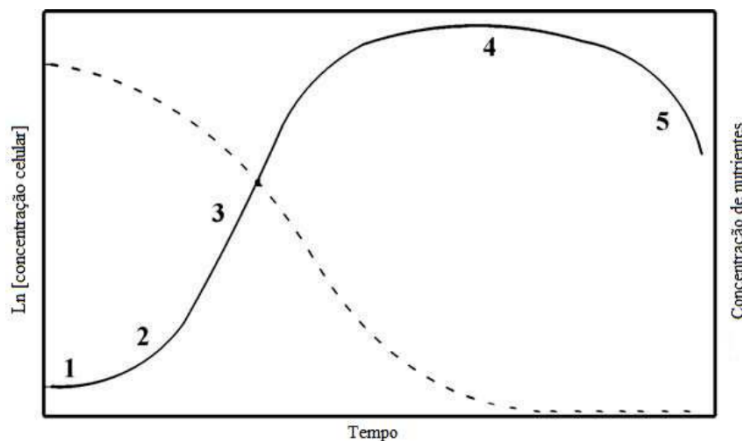


Figura 8 – Representação esquemática da taxa de crescimento de microalgas cultivadas em batelada (Mata, Martins e Caetano, 2010).

A redução da taxa de crescimento na fase estacionária é atribuída principalmente à diminuição da quantidade de nutrientes disponíveis no meio de cultivo. Durante a fase de crescimento exponencial, por outro lado, a taxa de crescimento específico atinge o seu valor máximo, refletindo o fato de que as taxas de metabolismo intracelular e mobilidade celular estão também em seu ponto ótimo, podendo ser sustentadas pela quantidade de nutrientes disponíveis no meio (Danquah *et al.*, 2009).

O meio de cultura deve prover a quantidade de nutrientes necessários para o crescimento celular. Carbono, nitrogênio, fósforo e enxofre são os principais componentes das células. Nitrogênio é comumente usado na forma de nitrato, amônia ou ureia (ou uma combinação desses). Fósforo é outro elemento de grande relevância para o crescimento e metabolismo microalgal. Trata-se de um constituinte fundamental do DNA, do RNA, da adenosina trifosfato (ATP) e da membrana celular. Por ser um elemento constituinte das moléculas de ATP, é essencial para os processos celulares relacionados à transferência de energia. Adicionalmente, a fotossíntese é um processo que envolve a participação de um grande número de proteínas (principalmente a ribulose-bifosfato carboxilase oxigenase - Rubisco), e as proteínas são sintetizadas pelos ribossomos, que são estruturas ricas em fósforo. Enxofre, ferro e outros elementos são também indispensáveis para promover o crescimento. Enxofre está nos aminoácidos cisteína e metionina e, portanto, na ausência de enxofre a biossíntese proteica é interrompida. Magnésio é requerido para a atividade da nitrogenase. Ferro está envolvido no fluxo de elétrons da fotossíntese. Outros elementos traços como o magnésio e o cálcio também desempenham um papel fundamental nas reações envolvidas no processo fotossintético (Lourenco, 2006; Wang *et al.*, 2008). A fonte de carbono e nitrogênio, o tipo e a intensidade de luz são os principais fatores que podem limitar o crescimento celular fotossintético (Cuaresma *et al.*, 2006).

Resumindo, pode-se dividir os fatores que influenciam o crescimento microalgal em fatores abióticos como a luminosidade (qualidade e intensidade), temperatura, concentração de nutrientes, O₂ e CO₂, pH, salinidade e presença de compostos tóxicos; e fatores bióticos como a presença de patógenos (bactérias, fungos e viroses) e a competição com outras microalgas; e fatores operacionais como o cisalhamento produzido pela agitação, taxa de diluição e profundidade (Mata, Martins e Caetano, 2010).

2.6 Fermentação

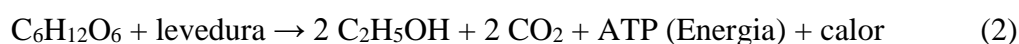
A palavra "fermentação" pode ter uma variedade de significados. Qualquer definição deve incluir atividades que produzem bebidas alcoólicas ou produtos de ácidos lácteos, processos microbianos que ocorrem com ou sem ar, ou de qualquer reação com liberação de energia que ocorre em condições anaeróbias. Abrange também a deterioração dos alimentos por microrganismos, como a transformação de vinho em vinagre por acetobactérias. Os microrganismos associados à fermentação constituem um grupo diversificado, incluindo procariotos (bactérias) e eucariontes (leveduras e bolores). A fermentação é de grande

importância, pois fornece à humanidade uma forma de preservar alimentos e bebidas em uma ampla diversidade de sabores, aromas e texturas. A fabricação de bebidas alcoólicas e produtos lácteos representam a maior parcela da indústria de fermentação (Introduction: Overview of Fermentation and Microorganisms, 2010).

Uma parcela menor da indústria utiliza a fermentação para a obtenção de biocombustíveis, através de fermentações da cana de açúcar, milho, beterraba, sorgo, arroz como alternativa para os combustíveis derivados do petróleo. Estima-se que a utilização de combustíveis renováveis reduz em 80 % as emissões de CO₂ se comparado à utilização de combustíveis fósseis (Xu, Isom e Hanna, 2010).

2.6.1 Fermentação alcoólica

Sob condições anaeróbicas, leveduras convertem açúcares em CO₂ e etanol, de acordo com a **Equação 2**, recuperando menos da energia armazenada nas moléculas de substrato:



A conversão teórica de 180 g de açúcar em 92 g de etanol (51,1 %) e 88 g de dióxido de carbono (48,9 %) só poderia ser esperada na ausência de qualquer crescimento da levedura, de outros metabólitos e de perda de etanol por evaporação. Num modelo de fermentação, cerca de 95 % do açúcar é convertido em etanol e CO₂, 1 % em material celular e 4 % em outros produtos, tais como o glicerol (Pretorius, 2000, *apud* Alcoholic Fermentation, 2010).

O substrato utilizado na fermentação alcoólica é altamente variável e pode ser constituído por produtos com açúcares, tais como a cana de açúcar, beterraba, mel, melaço e frutas, ou materiais amiláceos, como grãos de amido, raízes, tubérculos e outros. Os microrganismos responsáveis pela fermentação alcoólica são leveduras, tais como *Saccharomyces* e *Schizosaccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Brettanomyces*, *Kloeckera* e *Nadsonia* sp (Alencar *et al.*, 2009).

O microrganismo a ser utilizado deve ter características tais como: capacidade de fermentar carboidratos com um alto desempenho, alta velocidade de fermentação, osmotolerância, tolerância ao etanol, resistir a meios ácidos, poder ser reutilizado. Tais características são encontradas na *Saccharomyces cerevisiae* que é a levedura envolvida na maioria das fermentações industriais (Alencar *et al.*, 2009).

2.6.2 CO₂ da fermentação alcoólica

Em comparação com o volume de CO₂ produzido pela combustão de combustíveis fósseis, a quantidade de CO₂ emitida por fermentação para se obter etanol - fonte renovável - é pequena. No entanto, há um crescimento na produção de biocombustíveis acompanhado a regulamentos mais restritivos quanto à liberação do seu CO₂ para a atmosfera. Com a sua captura, pode-se obter um balanço negativo de CO₂ na atmosfera. (Mollersten *et al.*, 2003 e Kheshgi and Prince, 2005, *apud* Xu, Isom e Hanna, 2010)

A bebida alcoólica mais consumida no mundo, a cerveja, contribui com uma quantidade significativa de CO₂ liberado se comparada aos biocombustíveis, conforme mostra a **Tabela 4**.

Tabela 4 – Comparação de CO₂ liberado anualmente no mundo pelas fermentações para obtenção de biocombustível e cerveja, e pelos combustíveis fósseis

Produto	Ano	Produção (10⁹ L ano⁻¹)	CO₂ liberado (Mt^a ano⁻¹)
Biocombustível	2008	65,6 ^b	49,8 ^b
Cerveja	2010	185 ^c	140 ^d
Combustíveis fósseis	2008	-	31900 ^e

^a Milhoes de toneladas métricas.

^b *Renewable Fuels Associate* (2009) *apud* Xu, Isom e Hanna (2010).

^c BMG (2011).

^d Estimativa através do cálculo comparativo com os valores de biocombustível (^b), considerando liberação de CO₂ equivalentes para as fermentações alcoólicas de biocombustível e cerveja.

^e *Agence France-Presse* (2009) *apud* Xu, Isom e Hanna (2010).

Em algumas cervejarias é realizado o beneficiamento do CO₂, demonstrado na **Figura 9**. Em microcervejarias tal beneficiamento não é frequente.

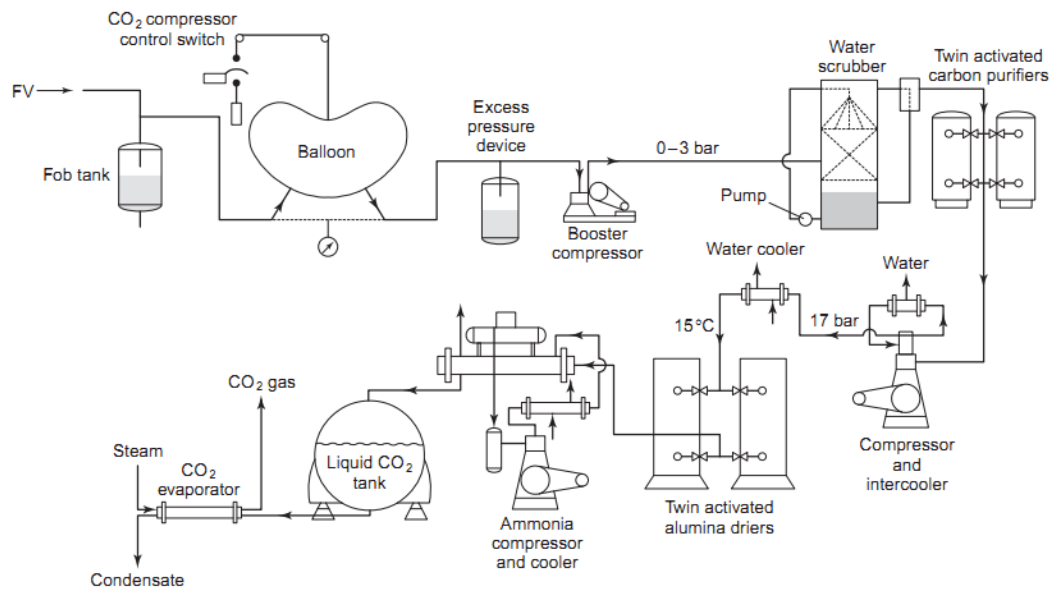


Figura 9 – Fluxograma para o beneficiamento de CO₂ em cervejarias (Hough *et al.*, 1982 *apud* Briggs, 2004).

O custo do CO₂ varia, mas geralmente é caro e certamente custa mais que o nitrogênio. A quantidade de CO₂ por volume de cerveja produzida necessária em cervejarias varia consideravelmente de (1,3 à 2,0) kg para cada 100 L. Um aspecto essencial dos sistemas de recuperação é que o gás tem que ser purificado para ser adicionado à cerveja. O CO₂ bruto é normalmente armazenado em um balão inflável após sair do fermentador. Passa através do lavador de água para remoção de alcoóis, aldeídos, cetonas, ésteres e partículas. Na sequência há a desodorização, antes de ser comprimido à pressão de liquefação. Isso cria um calor considerável, o gás comprimido deve ser então arrefecido e assim liquefeito. O gás é seco através de secadores de alumina e, em seguida, armazenado na forma líquida até ser necessário para utilização, quando ele pode ser restaurado para o estado gasoso através de um evaporador. Na etapa de condensação outros gases (O₂, N₂, Ar, He) são separados do CO₂ e eliminados através de purgas que podem arrastar até 10 % de CO₂ (perda no processo). Outras perdas são inerentes ao processo e a recuperação pode fornecer cerca de 60 % do necessário em cervejarias para um CO₂ de pureza de 99,99 %, porém os custos energéticos e de instalação do beneficiamento são elevados (Briggs, 2004).

O CO₂ é essencial para muitas finalidades e pode ser armazenado na forma bruta após a fermentação alcoólica com uma pureza de 99 % (o **Anexo I** mostra possíveis impurezas). Pureza essa muito superior se comparada a do CO₂ da queima de combustíveis fósseis, por exemplo, fazendo com que represente a maior parcela do mercado em volume, 33 % (Xu, Isom e Hanna, 2010).

Para ilustrar as aplicações do CO₂, Xu, Isom e Hanna (2010) apresentaram uma visão geral do mercado nos Estados Unidos (**Tabela 5**).

Tabela 5 – Visão geral de mercados existentes, emergentes e potenciais de consumo de CO₂ nos Estados Unidos (Xu, Isom e Hanna, 2010), adaptada

Mercado	CO ₂ consumido (Mt ano ⁻¹)	Aplicações
Recuperação avançada de petróleo	7500	Recuperação de petróleo remanescente em reservatórios
Cultivo de microalgas	>1000	Biodiesel, biomassa, carotenoides
Processamento de alimentos	3,2-4,0	Refrigeração, congelamento, envase em atmosfera modificada, extração por fluido supercrítico, descontaminação
Bebidas carbonatadas	1,6-2,4	Cervejas, água mineral, refrigerantes
Indústria Química	0,4	Fontes de carbono para carbonatos inorgânicos, carbonatos orgânicos, polímeros e gás de síntese; extração com fluido supercrítico
Fabricação de metais	0,2	Soldagem, fundição, separação de resíduos
Agricultura	0,05	Fumigante/inseticida, aditivo para água de irrigação e estufas
Processamento de plástico e borracha	0,02	Agente de expansão / moldagem e rebarba
Solventes	-	Pulverizador para pintura, limpeza a seco, produção de partículas finas
Tratamento de água	-	Carbonatação da água, controle do pH e reabilitação de água de poço

O cultivo de microalgas aparece como um dos mercados mais promissores para o consumo de CO₂, no qual 2 t de microalga removem aproximadamente 1 t de CO₂ (Rushing, 2008d, *apud* Xu, Isom e Hanna, 2010). Além desta grande remoção, o CO₂ acaba tendo o seu valor de mercado consideravelmente aumentado, pois participa na formação de produtos como os pigmentos naturais.

2.7 CO₂ da fermentação alcoólica como fonte de carbono para o cultivo de microalgas em sistemas integrados

Fontes de nitrogênio e carbono são importantes objetos de estudo para os cultivos. Dentre os custos associados ao cultivo de microalga (capital, mão de obra, água, nutrientes e

energia), calcula-se que o carbono representa um dos principais componentes dos custos de operação (Borowitzka, 1992).

Meios de cultivos tradicionais utilizam carbonato de sódio e bicarbonato de sódio como fontes de carbono para microalgas, mas o CO₂ tem se apresentado como uma excelente alternativa (Schlösser, 1982 e Paoletti *et al.*, 1975, *apud* Matsudo *et al.*, 2011).

Ferraz *et al.* (1985) *apud* Matsudo *et al.* (2011), fizeram uma avaliação do uso de CO₂ proveniente de fermentação alcoólica com mosto de melão de cana de açúcar no cultivo de *Arthrospira máxima* em SAB. Os autores concluíram que este CO₂ pode ser uma fonte de carbono adequada para a *A. máxima*.

Matsudo *et al.* (2011) estudaram o cultivo de *Arthrospira platensis* em um processo contínuo com FBR tubular, utilizando ureia como fonte de nitrogênio, CO₂ da fermentação alcoólica do mosto de melão de cana de açúcar, sem qualquer tratamento, como fonte de carbono e compararam os resultados com os do cultivo com CO₂ puro. O cultivo com CO₂ da fermentação alcoólica obteve uma produtividade de células apenas 10 % abaixo da produtividade com o CO₂ puro.

Rosenberg *et al.* (2011) projetaram o cultivo de *Chlorella vulgaris* em lagoas *raceway* recebendo CO₂ de biorrefinarias de etanol. Já *Arthrospira platensis* foi cultivada por Bezerra *et al.* (2013) em fotobiorreatores tubulares, em bateladas alimentadas, utilizando ureia como fonte de nitrogênio e CO₂ de fermentação alcoólica do mosto de melão de cana de açúcar.

Está em andamento um projeto, também com cana-de-açúcar, intitulado “Um processo integrado para a produção total de bioetanol e emissão zero de CO₂” na Universidade Estadual de Campinas com quatro artigos publicados, porém são referentes à bioetanol de primeira e segunda geração, sem a utilização de microalgas para biofixação (Dias, Junqueira, Cavalett, Cunha, *et al.*, 2013; Dias, Junqueira, Cavalett, Pavanello, *et al.*, 2013; Mariano *et al.*, 2013b; a).

Essas referências utilizam a biofixação por microalga de CO₂ de fermentação para produção de biocombustível. O caráter inovador deste trabalho está no fato de estudar o cultivo de microalga utilizando como fonte de carbono o CO₂ oriundo das fermentações para obtenção da bebida alcoólica mais produzida no mundo, a cerveja, as quais contribuem com uma liberação para a atmosfera tão significativa quanto à quantidade liberada pela fermentação para a produção de biocombustíveis.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Foram realizados dois tipos de cultivos integrados para captura e fixação de CO₂ proveniente de fermentações alcoólicas através da microalga *Dunaliella tertiolecta*. O primeiro foi com a fermentação em meio YPD e o segundo com a produção de cerveja. Inicialmente foram determinados o CO₂ acumulado, taxa de geração de CO₂ e conversão de dextrose em etanol em fermentações com YPD para, então, realizar os cultivos integrados entre fotobiorreatores e fermentadores com este meio. Diariamente foram retiradas amostras do fotobiorreator para determinação de biomassa, nitrogênio consumido e produção de carotenoides totais. Ao final de cada cultivo, as microalgas foram centrifugadas e liofilizadas para análise de lipídeos e determinação de perfil de carotenoides. Por último, a mesma sequência de trabalho foi realizada para os cultivos entre fotobiorreatores e fermentadores com mosto de cerveja, reproduzindo a condição que obteve os melhores resultados para YPD. Os preparos dos meios, os cultivos e as análises são descritas a seguir. Todos os cultivos e todas as análises foram realizadas, no mínimo, em duplicata.

3.1 Microalga e meio de cultivo

A microalga utilizada foi a *Dunaliella tertiolecta*, a qual foi mantida pelo banco de algas do laboratório 117, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, em Erlenmeyer de 250 mL sob 20 °C em incubadora. A iluminação foi fornecida por lâmpadas eletrônicas de 30 W e a luminosidade se mantém em aproximadamente 2,0 klx com fotoperíodo de 12 h.

Os cultivos do banco de algas são renovados em um período de um mês, mantendo assim as células vivas, nos quais 10 mL do último cultivo são transferidos para 100 mL de meio estéril Guillard “f1/2” (Guillard, 1975) modificado com a adição de NaCl P.A. (Synth) para maior produção de biomassa pelo estresse salino e maior concentração de NaNO₃ P.A. (Fmaia) (Da Fré, 2011).

As concentrações do meio “f1/2” modificado foram as seguintes: 34 g L⁻¹ de sal marinho (Red Sea Salt), 17 g L⁻¹ de NaCl P.A., 300 mg L⁻¹ de NaNO₃ P.A., 5 mg L⁻¹ NaH₂PO₄.H₂O P.A. (Vetec), 30 mg L⁻¹ Na₂SiO₃ P.A. (Synth). Soluções estoques foram preparadas de acordo com Lourenço (2006) e 1 mL de cada uma das seguintes soluções foram adicionadas ao meio: solução de metais traço contendo 9,8 mg L⁻¹ de CuSO₄.5H₂O P.A. (Vetec), 22 mg L⁻¹ de ZnSO₄.7H₂O P.A. (Vetec), 1 mg L⁻¹ de CoCl₂.6H₂O P.A. (Vetec), 180 mg L⁻¹ de MnCl₂.4H₂O P.A. (Vetec), 6,3 mg L⁻¹ de Na₂MoO₄.2H₂O P.A. (Vetec), 4,36 g L⁻¹

de Na₂EDTA P.A. (Vetec) e 3,15 g de FeCl₃.6H₂O P.A. (Vetec), solução de vitaminas contendo 100 mg L⁻¹ de tiamina, C₁₂H₁₇N₄OS P.A. , (Synth), 0,5 mg L⁻¹ de cianocobalamina, C₆₃H₈₈CoN₁₄O₁₄P P.A. , (Vetec) e 0,5 mg L⁻¹ de biotina, C₁₀H₁₆N₂O₃S P.A., (Fluka). A solução tampão foi preparada com 50 g de tris, C₄H₁₁NO₃ P.A., (Synth), aproximadamente 30 mL de HCl P.A. (Proton) para ajuste de pH e água destilada, completando a solução em 200 mL. Todas as soluções foram preparadas com água destilada e autoclavadas (Primatec, Autoclave vertical CS) a 121 °C por 15 min, exceto a de vitaminas que foi esterilizada por microfiltração (Sartorius Stedim Biotech), As soluções foram misturadas e transferidas em capela de fluxo laminar (Labconco, Purifiertm Clean Bench), com chama e a temperatura ambiente.

3.2 Pré-inóculo de microalgas

Para cada biorreator de 2,4 L, foi preparado pré-inóculo com 10 mL de microalgas do banco de cultivo, inoculadas em 100 mL de meio de cultivo estéril em frasco Erlenmeyer de 500 mL. O pré-inóculo permaneceu durante uma semana em incubadora (Oxylab, Oxy 304 T) com 150 rpm de agitação, a uma temperatura de 28 °C e com luminosidade de 3,0 ± 1,0 klx. Mais 130 mL de meio de cultura estéril foram adicionados. Após mais uma semana em incubadora (mesmas condições da primeira semana), o pré-inóculo ficou pronto para ser adicionado aos biorreatores. Todas as transferências de líquidos foram realizadas em capela de fluxo laminar com chama e a temperatura ambiente.

3.3 Cultivo em fotobiorreatores

Primeiramente se fez a assepsia dos fotobiorreatores com 10 mL de solução de 2,5 % de NaClO (Dinâmica) em cada reator e os mesmo foram preenchidos totalmente com água, permanecendo em repouso por 15 min, quando então se neutralizou o NaClO com 2,5 mL de solução de 250 g L⁻¹ de Na₂S₂O₃ P.A. (Synth), após 2 h os fotobiorreatores foram esvaziados (Andersen, 2005) para posterior recebimento de 240 mL de pré-inóculo e de 2160 mL de meio de cultivo cada.

As microalgas foram cultivadas em fotobiorreatores de acrílico tipo placa e *airlift*, com volume útil de 2,4 L, providos de camisa interna de aquecimento/resfriamento conectada

a banho térmico (Haake DC 30) e mantidas a 28 °C. Os reatores foram projetados de acordo com Kochem *et al.* (2014).

A iluminação foi realizada através de um painel com lâmpadas eletrônicas de 30 W disposto atrás dos fotobiorreatores e a luminosidade foi de aproximadamente 18,0 klx, medida na parede externa anterior do fotobiorretor pelo luxímetro digital MS6610 da Akso.

A aeração foi realizada com vazão de 1 L min⁻¹ de ar comprimido filtrado com membrana de 0,22 µm Midisart®2000 (Sartorius Stedim Biotech), após o filtro, na saída de ar na extremidade da mangueira de silicone, utilizou-se duas pedras porosas inseridas pelo topo dos fotobiorreatores até o fundo dos mesmos. As vazões de ar foram controladas utilizando rotâmetros (Dwyer).

Os cultivos duraram de 7 a 8 dias, dependendo do tratamento, e diariamente foram feitos os seguintes procedimentos: leituras de pH através de fita de pH Alkalit® (Merck), adição de 2,4 mL de solução estoque de NaH₂PO₄ e 2,4 mL de solução estoque de metais traço, adição de água destilada para acertar o nível de 2,4 L quando o mesmo baixava por evaporação, retirada de amostras para medidas de densidade ótica, para as análises de carotenoides totais e análise de nitrato. Ao final do cultivo a biomassa formada e o meio de cultivo remanescente foram centrifugados e liofilizados para que a biomassa seca fosse tratada para análise de perfis de carotenoides e análise de lipídeos.

3.4 Downstream: centrifugação e liofilização de microalgas

Ao final do cultivo, o conteúdo dos fotobiorreatores foram centrifugados pela centrífuga Hitachi CR21GIII à 10000 × g, durante 10 min à 4 °C. O sobrenadante foi descartado e a biomassa úmida foi lavada com água destilada e centrifugada novamente. O novo sobrenadante foi descartado e a biomassa úmida foi liofilizada (Edwards do Brasil) à -40 °C durante 72 h. Na **Figura 10** a biomassa centrifugada é demonstrada.



Figura 10 – Biomassa centrifugada de *D. tertiolecta*.

3.5 Fermentação alcoólica com *Yeast Peptone Dextrose*

A levedura utilizada foi a *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 do banco de leveduras do Laboratório de Biotecnologia (Bioteclab) do ICTA, sendo inoculada a 10 % (volume). As concentrações de YPD utilizadas foram de 10 g L⁻¹ de extrato de levedura (Himedia), 20 g L⁻¹ de peptona bacteriológica (Himedia) e a concentração de dextrose (Nuclear) variou de acordo com os ensaios realizados. Foram autoclavadas separadamente a mistura entre extrato de levedura e peptona bacteriológica e a solução de dextrose, para evitar reação de Maillard, à 121 °C durante 15 min. Estas condições da autoclave foram utilizadas também para as vidrarias utilizadas. Todas as transferências de líquidos foram realizadas em capela de fluxo laminar com chama. As condições utilizadas para os cultivos foram de 28 °C, 180 rpm e 24 h. Estas condições foram utilizadas para o preparo do inóculo, determinação da conversão de substrato em produto, determinação de CO₂ acumulado, taxa de geração de CO₂ e cultivo nos fermentadores integrados aos fotobiorreatores.

3.6 Preparo do inóculo de YPD

A levedura foi transferida da placa com Agar do banco de leveduras através de alça esterilizada por chama para Erlenmeyers de 500 mL com solução YPD, que variou sua concentração de dextrose de acordo com o ensaio realizado. As condições foram as mesmas descritas no item 3.5, sendo os inóculos mantidos em câmara incubadora refrigerada com agitação orbital (Marconi MA-830). Ao final de 24 h, o meio com células foi diluído com meio YPD até a densidade ótica (600 nm) chegar a 1, sendo inoculado então a 10 % (volume)

no YPD. Os inóculos em câmara incubadora estão representados na **Figura 11** juntamente com inóculos de *D. tertiolecta*.

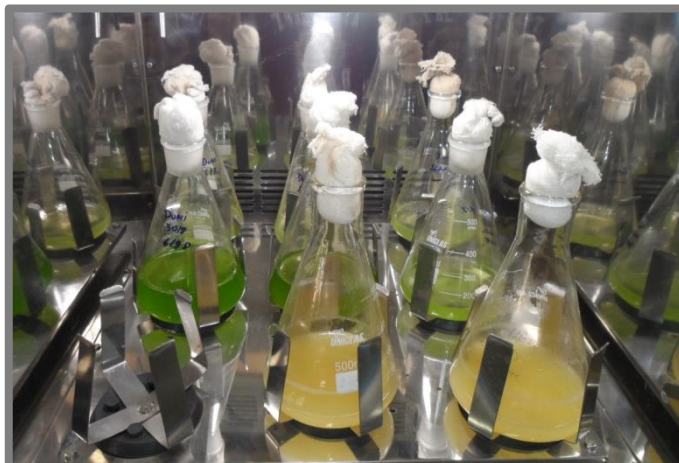


Figura 111 – Câmara incubadora com inóculos de *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 e *D. tertiolecta*.

3.7 Fermentadores com mosto YPD integrados aos fotobiorreatores

Os fermentadores utilizados foram de 2 L com camisa externa para troca térmica, sendo posicionados acima dos fotobiorreatores e a saída de CO₂ do fermentador foi conectada no fundo dos fotobiorreatores, pedras porosas foram utilizadas para dissipar e diminuir o tamanho das bolhas de CO₂. A agitação foi realizada com agitadores magnéticos e as condições foram as mesmas descritas no item 3.5.

Com os valores obtidos no estudo das taxas de geração de CO₂ e dos fatores de conversão para as concentrações de (20, 40 e 60) g L⁻¹ de dextrose em YPD, foram planejados os seguintes experimentos em duplicatas:

YPD 30/72: em 72 h de cultivo de microalgas foi acoplado o primeiro fermentador com 2 L de YPD e 30 g L⁻¹ de dextrose, após 24 h de fermentação foi retirado o fermentador e integrado um novo ao fotobiorreator, nas mesmas condições do fermentador anterior. Este procedimento se repetiu até 144 h;

YPD 60/72: em 72 h de cultivo de microalgas foi acoplado o primeiro fermentador com 2 L de YPD e 60 g L⁻¹ de dextrose, após 24 h de fermentação foi retirado o fermentador e integrado um novo ao fotobiorreator, nas mesmas condições do fermentador anterior. Este procedimento se repetiu até 144 h;

YPD 30/24: em 24 h de cultivo de microalgas foi acoplado o primeiro fermentador com 2 L de YPD e 30 g L⁻¹ de dextrose, após 24 h de fermentação foi retirado o fermentador e

integrado um novo ao fotobiorreator, nas mesmas condições do fermentador anterior. Este procedimento se repetiu até 144 h;

YPD (10-60)/24: em 24 h de cultivo de microalgas foi acoplado o primeiro fermentador com 2 L de YPD e 10 g L⁻¹ de dextrose, após 24 h de fermentação foi retirado o fermentador e integrado um novo ao fotobiorreator, aumentando a concentração de dextrose (20 g L⁻¹). A cada dia a concentração de dextrose foi aumentada em 10 g L⁻¹, este procedimento se repetiu até a concentração chegar em 60 g L⁻¹ de dextrose em 144 h de cultivo de microalga.

A **Figura 12** mostra o sistema integrado entre fermentadores com YPD e fotobiorreatores. Todos cultivos foram acompanhados por um cultivo controle sem a utilização de CO₂ proveniente de fermentação alcoólica, representado na Figura 12 pelo fotobiorreator central.



Figura 122 – Sistema integrado entre fermentadores e fotobiorreatores.

3.8 Preparo da cerveja

As matérias-primas utilizadas foram malte tipo pilsen em grãos, lúpulo *nugget* 11 % AM T-90 e fermento liofilizado S-33 alta fermentação tipo Ale, levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Fermentis).

A cerveja foi preparada de forma artesanal. O malte foi moído e colocado em infusão com água na proporção 1:2,5 (peso/volume) sob curva de aquecimento cujas temperaturas variaram entre (20 e 78) °C durante 60 min. No mosto formado foi realizado o teste do iodo sendo, em seguida, clarificado em tina de aço inoxidável através de recirculações e adição de água no malte, no mesmo volume utilizado na infusão, a 76 °C. O mosto clarificado foi aquecido e no início da fervura foram adicionados 4 g L⁻¹ de lúpulo, as proteínas formadas durante a fervura foram retiradas com coador. A fervura permaneceu durante 60 min, na sequência se fez o resfriamento do mosto a 20 °C através de banho com gelo e *chiller* de imersão, nesta temperatura o mosto foi transferido para o fermentador e 0,5 g L⁻¹ de fermento foram adicionados. Fez-se agitação manual e aeração do mosto, por cerca de 2 minutos, antes da conexão com o fotobiorreator. As fermentações duraram cerca de 36 h, sendo mantidas a 20 °C por banho térmico (Thermomix BM, B. Braun Biotech International), sem agitação. Algumas etapas da produção de cerveja aparecem na **Figura 13**.



Figura 13 – Preparo da cerveja.

3.9 Fermentadores com mosto de cerveja integrados aos fotobiorreatores

Os fermentadores utilizados foram frascos de borossilicatos (Duran) de diferentes volumes, ficando posicionados acima dos fotobiorreatores e a saída de CO₂ do fermentador foi conectada no fundo dos fotobiorreatores, pedras porosas foram utilizadas para dissipar e diminuir o tamanho das bolhas de CO₂. Com base nos resultados das microalgas cultivadas com CO₂ provenientes de fermentações com YPD e do $Y_{E/D}$, fez-se o seguinte planejamento,

em duplicata, com variação volumétrica do mosto de cerveja para a liberação de CO₂ equivalente à liberação de CO₂ do ensaio com concentração variável de dextrose de (10 à 60) g L⁻¹ (**Figura 14**). No início do cultivo de microalgas foi acoplado o primeiro fermentador com 257 mL de mosto de cerveja, após 24 h de cultivo de microalga foi integrado um novo aumentando o volume em 257 mL de mosto em relação ao anterior. Este procedimento se repetiu até 1543 mL de mosto de cerveja em 144 h de cultivo de microalga. Cada fermentador ficou em contato com os fotobiorreatores durante 48 h, sendo retiradas amostras em duplicatas no final de cada fermentação para determinar o teor alcoólico da cerveja por CLAE. Todos cultivos foram acompanhados por um cultivo controle sem a utilização de CO₂ proveniente de fermentação alcoólica, representado na Figura 14 pelo fotobiorreator da direita.

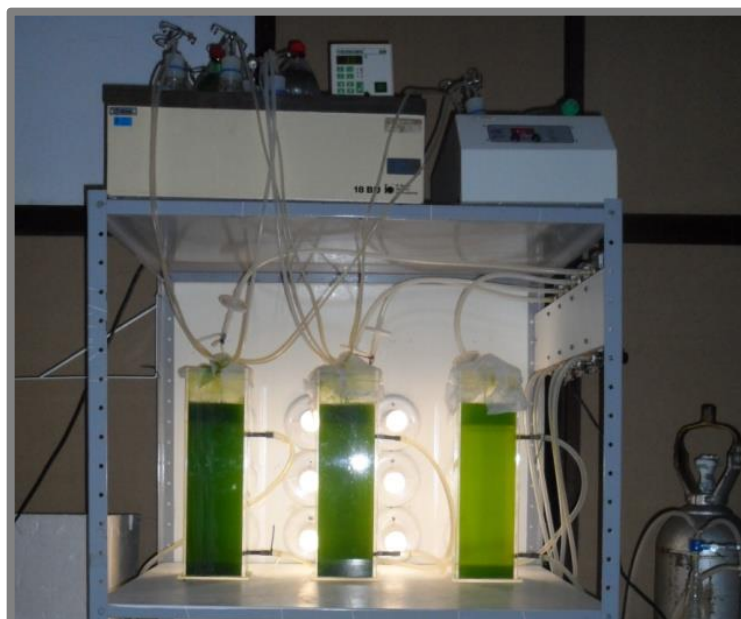


Figura 14 – Sistema integrado entre fotobiorreatores e fermentadores com mosto de cerveja.

3.10 Análise da formação de biomassa

O crescimento da *Dunaliella tertiolecta* foi acompanhado a cada 24 h através da densidade ótica (750 nm) de amostras retiradas diretamente do fotobiorreator, com espectrofotômetro Amersham Biosciences modelo Ultrospec 3100 Pro e os resultados foram relacionados com a curva de calibração característica da *Dunaliella tertiolecta* do laboratório.

3.11 Determinação da taxa de acúmulo de carbono

A taxa de acúmulo de carbono foi calculada através da biomassa da *D. tertiolecta* do Laboratório 117, ICTA, que possui 41,2 % de carbono (resultado ainda não publicado). Depois de calculado o total de carbono em cada ponto da medição do cultivo, geraram-se curvas do total de carbono biofixado pelo tempo através de polinômios de grau 3. Essas curvas foram derivadas resultando em curvas de taxa de acúmulo de carbono ($\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$) pelo tempo (h).

3.12 Determinação de carotenoides totais

As amostras coletadas a cada 24 h do fotobiorreator foram centrifugadas a $16000 \times g$ durante 5 min pela centrífuga Fanen modelo 204-NR. Os sobrenadantes foram separados para análise de nitrogênio e nos sedimentos foram colocados 2 mL de Acetona P.A, $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$, (Synth) em cada amostra, as quais foram tampadas, colocadas em local escuro à 4°C por 12 h. As leituras no espectrofotômetro Amersham Biosciences modelo Ultrospec 3100 Pro foram realizadas a 470 nm, 662 nm e 645 nm. As **Equações (3), (4) e (5)** foram aplicadas para determinar a concentração de carotenoides em mg L^{-1} (Lichtenthaler e Buschmann, 2001). Na **Figura 15** estão as amostras prontas para a leitura.

$$C_a = 11,24 \times A_{662} - 2,04 \times A_{645} \quad (3)$$

$$C_b = 20,13 \times A_{645} - 4,19 \times A_{662} \quad (4)$$

$$C = (1000 \times A_{470} - 1,90 \times C_a - 63,14 \times C_b)/214 \quad (5)$$

onde C_a , C_b , e C são, respectivamente, as concentrações de clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides em mg L^{-1} , e A são as absorvâncias em (470, 662 e 645) nm.

Os resultados foram relacionados com os resultados da análise da formação de biomassa e apresentados como carotenoides por célula (mg g^{-1})



Figura 15 – Amostras para análise de carotenoides totais.

3.13 Análise de nitrogênio

O método utilizado foi o de Cataldo *et al.*, (1975). Alíquotas de 0,25 mL de sobrenadante do meio de cultura centrifugado foram transferidas para Erlenmeyers de 250 mL. Foi preparada solução de 1 g de ácido salicílico, $C_7H_6O_3$, (Synth) com 20 mL de H_2SO_4 P.A (Synth), 0,8 mL desta mistura foram adicionados nos Erlenmeyers, permanecendo em repouso durante 20 min à temperatura ambiente, 19 mL de 2 mol L^{-1} de NaOH (Synth) foram então adicionados lentamente em cada Erlenmeyer. As leituras no espectrofotômetro Amersham Biosciences modelo Ultrospec 3100 Pro foram realizadas a 410 nm após resfriamento das amostras a temperatura ambiente. Para cada dia de análise, foram preparadas novas soluções e novas curvas de calibração. Para o branco foi utilizado o meio de cultivo salino das microalgas sem nitrato e para as curvas padrões quantidades estabelecidas de $NaNO_3$ P.A (Fmaia) foram adicionadas no meio de cultivo salino, ambos seguiram o procedimento do ácido salicílico, H_2SO_4 e NaOH. A **Figura 16** representa amostras prontas para as leituras.



Figura 16 – Amostras para análise de nitrogênio.

3.14 Análise de lipídeos

O método utilizado foi o de Bligh e Dyer (1959). A biomassa liofilizada foi triturada e 1 g de cada amostra foi pesada (Shimadzu AY220) e colocada em agitação magnética com 10 mL de clorofórmio P.A (Synth), 20 mL de metanol P.A (Synth) e 8 mL de água destilada durante 30 min a temperatura ambiente. Em seguida foram adicionados mais 10 mL de clorofórmio e 10 mL de solução 1,5 g L⁻¹ de Na₂SO₄ (Synth). Após mais 2 minutos de agitação, deixou-se em funil de separação até as fases estarem bem divididas. Cerca de 15 mL da camada inferior foi transferida para um tubo de 30 mL e foi adicionada 1 g de Na₂SO₄ anidro (Synth). O tubo fechado foi agitado até remover traços de umidade. O líquido foi filtrado rapidamente e 5 mL da solução límpida foi colocada em béquer de 50 mL com tara prévia. Os béqueres foram colocados em estufa a 80 °C por cerca de 20 min até a completa evaporação do solvente. Após o resfriamento dos béqueres em dessecador, estes foram pesados em balança analítica e o percentual de lipídeos foi calculado através da **Equação (6)**. As etapas deste método estão representadas pela **Figura 17**.

$$\% \text{ lipídeos} = \frac{pl \times 4}{ps} \times 100 \quad (6)$$

onde *pl* (g) é a massa de lipídeos em 5 mL de amostra e *ps* (g) é a massa da amostra.



Figura 17 – Preparo das amostras liofilizadas para análise de lipídeos.

3.15 Identificação dos carotenoides por cromatografia líquida de alta eficiência

A metodologia de Mercadante, Britton e Rodriguez-Amaya (1998) foi utilizada para extração de carotenoides. As amostras de microalgas liofilizadas foram pesadas em 0,01 g e posteriormente hidratadas com 300 μL de água destilada, ficando em repouso por 24 h em tubos de ensaio fechados a 4 °C, depois foram congeladas e mantidas por mais 24 h. Após este período, foram adicionados 2 mL da mistura de hidrocarbonetos éter de petróleo (Vetec), 1 mL de éter etílico P.A (Vetec) e 1 mL de metanol P.A (Synth), sendo a mistura homogeneizada por vórtex (Certomat MV, B. Braun Biotech International) e centrifugada por 15 min a $2000 \times g$ e 4 °C. A adição de solventes, homogeneização e a centrifugação foram repetidas até que a biomassa ficasse branca. O sobrenadante foi transferido para frasco âmbar.

O mesmo volume total de solventes utilizado na extração foi utilizado na adição de solução 20 g L^{-1} de NaOH P.A. (Fmaia) para saponificar o extrato. Esta reação permaneceu por 24 h a temperatura ambiente em local protegido da luz.

No dia seguinte, o conteúdo dos frascos âmbar foi colocado em funil de separação juntamente com 500 mL de água destilada, 50 mL de éter de petróleo e 50 mL de éter etílico. Após separação das fases, a fase aquosa foi descartada e diversas lavagens com água destilada foram feitas até que o meio atingisse pH neutro. Utilizou-se Na_2SO_4 anidro para retirar a umidade.

O solvente do extrato foi evaporado a vácuo pelo evaporador rotatório (Heidolph Laborota 4000) a 40 °C. Para retirar completamente o extrato do balão do evaporador, foi utilizada uma quantidade mínima de éter etílico e este foi retirado do extrato através de nitrogênio gasoso a uma baixa vazão, sendo apenas os extratos congelados em frascos âmbar a 18 °C para posterior injeção no CLAE.

Para injeção no cromatógrafo, as amostras foram descongeladas e o solvente MTBE P.A. (Vetec) adicionado a uma quantidade suficiente para as amostras ficarem em um tom amarelo claro. Cada mistura ficou em banho de ultrassom por 5 min, após foi filtrada com membrana de 0,45 µm (Milipore) para solventes orgânicos para injeção no cromatógrafo. A **Figura 18** mostra algumas etapas do preparo da amostra.

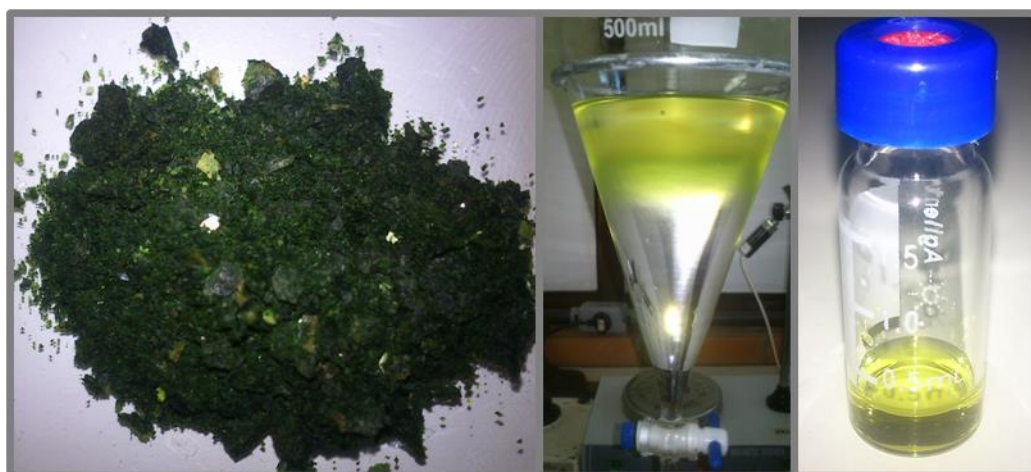


Figura 18 – Extração de carotenoides da biomassa de *D. tertiolecta* liofilizada.

Os solventes utilizados para as análises cromatográficas foram metanol, MTBE e acetonitrila (Panreac). Os padrões foram β -caroteno (pureza > 93 %), α -caroteno (pureza > 95 %) e zeaxantina (pureza > 95 %) da Sigma e luteína (pureza > 95 %) da Indofine.

O cromatógrafo utilizado foi o G1311A – DE14917573 Agilent 1100 Series com UV/Vis detector (G1314B - DE71358944 Agilent 1100 Series). A coluna polimérica C30 de fase reversa, 250 mm \times 4,6 mm i.d, 3 µm, (YMC, Japão) foi utilizada. O fluxo da fase móvel foi 1 mL min⁻¹. O volume de injeção foi 5 µL à 33 °C. A **Tabela 6** demonstra os gradientes utilizados como fase móvel.

Tabela 6 – Gradiente utilizado como fase móvel na coluna de fase reversa C30

Tempo (min)	Água (%)	Metanol (%)	MTBE (%)
0	5	90	5
12	0	95	5
25	0	89	11
40	0	75	25
60	0	50	50

Os carotenoides foram quantificados utilizando curvas-padrões para luteína (1–65 $\mu\text{g mL}^{-1}$), zeaxantina (1–40 $\mu\text{g mL}^{-1}$), α -caroteno (1–25 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e β -caroteno (5–50 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

3.16 Determinação da concentração de açúcar e etanol do YPD por cromatografia líquida de alta eficiência

Todas as concentrações de açúcar e etanol foram determinadas por CLAE através do equipamento Shimadzu, empregando-se coluna Bio-Rad Aminex HPX-87H a 45 °C, utilizando H_2SO_4 como eluente, com fluxo de 0,6 mL min^{-1} e detector por índice de refração. O volume de amostra injetada foi de 20 μL . As amostras foram previamente centrifugadas, diluídas e filtradas por filtro “Step-Pack” C18 (Milipore). O método utilizado e as curvas de calibração foram desenvolvidos por estudos prévios do Bioteclab do ICTA.

3.17 Determinação do CO_2 acumulado, taxa de geração de CO_2 e do fator de conversão de dextrose em etanol no YPD

Para determinação do CO_2 acumulado, taxa de geração de CO_2 e da conversão de dextrose em etanol (Y_{ED}), foram realizadas fermentações em duplicatas de (20, 40 e 60) g L^{-1} de dextrose em Erlenmeyers de 500 mL. As condições são as mesmas descritas no item 3.11 em câmara incubadora com agitação orbital (Marconi MA-830). Foram retiradas amostras a cada 3 h para determinar concentrações de etanol e açúcares em CLAE.

Através dos resultados da concentração de etanol fez-se a conversão por estequiometria para concentração de CO_2 acumulada e geraram-se curvas de concentração de CO_2 pelo tempo através de polinômios de grau 3. Essas curvas foram derivadas resultando em curvas de taxa de geração de CO_2 ($\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$) pelo tempo (h).

O fator de conversão de dextrose em etanol ($Y_{E/D}$) é o coeficiente angular da **Equação (7)**.

$$E = Y_{E/D} \times (D - D_0) \quad (7)$$

onde E é a concentração de etanol (g L^{-1}), D é a concentração de dextrose (g L^{-1}) e D_0 é a concentração de dextrose inicial (g L^{-1}).

3.18 Determinação da concentração de etanol da cerveja por cromatografia líquida de alta eficiência

As mesmas condições utilizadas para determinar açúcares e etanol nas fermentações YPD foram utilizadas para determinar o teor alcoólico da cerveja.

3.19 Determinação do CO_2 acumulado e da taxa de geração de CO_2 da fermentação com mosto de cerveja

Para determinação do CO_2 acumulado e da taxa de geração de CO_2 , foram realizadas fermentações em duplicatas de (180, 540 e 1080) mL de mosto em frascos de borossilicatos (Duran) de (250, 500 e 1000) mL respectivamente. As condições foram as mesmas descritas em preparo da cerveja. Foram retiradas amostras a cada 3 h para determinar concentrações de etanol em CLAE. Estas fermentações aparecem na **Figura 19**.

Através dos resultados da concentração de etanol fez-se a conversão por estequiometria para concentração de CO_2 acumulado e gerou-se curva de concentração de CO_2 pelo tempo através de polinômio de grau 3. Essas curvas foram derivadas resultando em curvas de taxa de geração de CO_2 ($\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$) pelo tempo (h).



Figura 19 – Duplicatas das fermentações do mosto de cerveja para determinação de CO_2 .

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEMC, Associação Brasileira das Empresas do Mercado de Carbono, acervo on-line em 08 de junho de 2013, em <http://www.abemc.com>.

AIM. Omega-3: a global market overview. 2014. Disponível em: < <http://www.algaeindustrymagazine.com/omega-3-a-global-market-overview/> >. Acesso em: 10 de junho de 2014.

Alcoholic Fermentation. In: (Ed.). **Handbook of Alcoholic Beverages**: John Wiley & Sons, Ltd, 2010. p.72-95. ISBN 9780470976524.

ALENCAR, E. M. B. D. et al. Fermentation capacity of *Saccharomyces cerevisiae* cultures. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, p. 819-824, 2009. ISSN 1516-8913.

ANDERSEN, R. A. **Algal culturing techniques**. Burlington, Mass.: Elsevier/Academic Press, 2005. ISBN 0120884267 9780120884261.

ARONSON, E. L.; MCNULTY, S. G. Appropriate experimental ecosystem warming methods by ecosystem, objective, and practicality. **Agricultural and Forest Meteorology**, v. 149, n. 11, p. 1791-1799, 2009. ISSN 0168-1923. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168192309001506> >.

ASIF, M. Health effects of omega-3,6,9 fatty acids: *Perilla frutescens* is a good example of plant oils. **Oriental Pharmacy & Experimental Medicine**, v. 11, n. 1, p. 51-59, 2011/03/01 2011. ISSN 1598-2386. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s13596-011-0002-x> >.

BECKER, E. W. Micro-algae as a source of protein. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 2, p. 207-210, 2007. ISSN 0734-9750. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S073497500600139X> >. Acesso em: 2007/4//.

BEZERRA, R. et al. Fed-Batch Cultivation of *Arthrospira platensis* Using Carbon Dioxide from Alcoholic Fermentation and Urea as Carbon and Nitrogen Sources. **BioEnergy Research**, v. 6, n. 3, p. 1118-1125, 2013/09/01 2013. ISSN 1939-1234. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s12155-013-9344-1> >.

BILANOVIC, D. et al. Freshwater and marine microalgae sequestering of CO₂ at different C and N concentrations – Response surface methodology analysis. **Energy Conversion and Management**, v. 50, n. 2, p. 262-267, 2009. ISSN 0196-8904. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0196890408003725> >.

BITOG, J. P. et al. Application of computational fluid dynamics for modeling and designing photobioreactors for microalgae production: A review. **Computers and Electronics in Agriculture**, v. 76, n. 2, p. 131-147, 5// 2011. ISSN 0168-1699. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168169911000305> >.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, n. 8, p. 911-917, 1959/08/01 1959. ISSN 0576-5544. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1139/o59-099> >. Acesso em: 2014/02/11.

BMG. (2011). World beer production increased again in 2010. (B.Manager, Ed.). Beverage Manager. Acesso em 7 de abril de 2014, <http://beveragemanager.net>

BOROWITZKA, L.; BROWN, A. The salt relations of marine and halophilic species of the unicellular green alga, *Dunaliella*. **Archives of Microbiology**, v. 96, n. 1, p. 37-52, 1974/01/01 1974. ISSN 0302-8933. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/BF00590161> >.

BOROWITZKA, M. Algal biotechnology products and processes — matching science and economics. **Journal of Applied Phycology**, v. 4, n. 3, p. 267-279, 1992. ISSN 0921-8971. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/BF02161212> >.

BRIGGS, D. E. Brewing science and practice. Boca Raton; Cambridge, England, 2004. ISSN 1591249198 9781591249191 1855739062 9781855739062 0203024192 9780203024195 1855734907 9781855734906 0849325471 9780849325472 6610347778 9786610347773. Disponível em: < <http://www.knovel.com/knovel2/Toc.jsp?BookID=1249> >.

BROWN, M. R. The amino-acid and sugar composition of 16 species of microalgae used in mariculture. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 145, n. 1, p. 79-99, 3/5/1991. ISSN 0022-0981. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/002209819190007J> >.

CATALDO, D. A. et al. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid 1. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 6, n. 1, p. 71-80, 1975/01/01 1975. ISSN 0010-3624. Disponível em: < <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00103627509366547> >. Acesso em: 2014/02/11.

CUARESMA, M. et al. Growth and photosynthetic utilization of inorganic carbon of the microalga *Chlamydomonas acidophila* isolated from Tinto river. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 1, p. 158-162, 2006. ISSN 0141-0229. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141022906003012> >.

DANQUAH, M. K. et al. Microalgal growth characteristics and subsequent influence on dewatering efficiency. **Chemical Engineering Journal**, v. 151, n. 1-3, p. 73-78, 2009. ISSN 1385-8947. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1385894709000783> >.

DIAS, M. O. S. et al. Cogeneration in integrated first and second generation ethanol from sugarcane. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 91, n. 8, p. 1411-1417, 8// 2013. ISSN 0263-8762. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0263876213002001> >.

DIAS, M. O. S. et al. Biorefineries for the production of first and second generation ethanol and electricity from sugarcane. **Applied Energy**, v. 109, n. 0, p. 72-78, 9// 2013. ISSN 0306-2619. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0306261913002778> >.

GUILLARD, R. L. Culture of Phytoplankton for Feeding Marine Invertebrates. In: SMITH, W. e CHANLEY, M. (Ed.). **Culture of Marine Invertebrate Animals**: Springer US, 1975. cap. 3, p.29-60. ISBN 978-1-4615-8716-3.

HOSSEINI TAFRESHI, A.; SHARIATI, M. *Dunaliella* biotechnology: methods and applications. **Journal of Applied Microbiology**, v. 107, n. 1, p. 14-35, 2009. ISSN 1365-2672. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04153.x> >.

INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE, W. G., III. Climate change 2014 mitigation of climate change. [Geneva, Switzerland], 2014. Disponível em: < <http://ipcc.ch/report/ar5/wg3/> >.

INTRODUCTION: OVERVIEW OF FERMENTATION AND MICROORGANISMS. In: (Ed.). **Handbook of Alcoholic Beverages**: John Wiley & Sons, Ltd, 2010. p.65-71. ISBN 9780470976524.

JORQUERA, O. et al. Comparative energy life-cycle analyses of microalgal biomass production in open ponds and photobioreactors. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 4, p. 1406-1413, 2// 2010. ISSN 0960-8524. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852409012449> >.

KOCHEM, L. H. et al. Characterization of a Novel Flat-Panel Airlift Photobioreactor With an Internal Heat Exchanger. **Chemical Engineering & Technology**, v. 37, n. 1, p. 59-64, 2014. ISSN 1521-4125. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/ceat.201300420> >.

KRINSKY, N. I.; LANDRUM, J. T.; BONE, R. A. Biologic mechanisms of the protective role of lutein and zeaxanthin in the eye. **Annual review of nutrition**, v. 23, n. 1, p. 171-201, 2003. ISSN 0199-9885.

LAM, M. K.; LEE, K. T. Microalgae biofuels: A critical review of issues, problems and the way forward. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 3, p. 673-690, 5// 2012. ISSN 0734-9750. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S073497501100200X> >. Acesso em: 2012/6//.

LAM, M. K.; LEE, K. T.; MOHAMED, A. R. Current status and challenges on microalgae-based carbon capture. **International Journal of Greenhouse Gas Control**, v. 10, n. 0, p. 456-469, 9// 2012. ISSN 1750-5836. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1750583612001673> >.

LEE, Y.-K. Microalgal mass culture systems and methods: Their limitation and potential. **Journal of Applied Phycology**, v. 13, n. 4, p. 307-315, 2001/08/01 2001. ISSN 0921-8971. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1023/A%3A1017560006941> >.

LI, Y. et al. Biofuels from Microalgae. **Biotechnology Progress**, v. 24, n. 4, p. 815-820, 2008. ISSN 1520-6033. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/bp070371k> >.

LICHTENTHALER, H. K.; BUSCHMANN, C. Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and Characterization by UV-VIS Spectroscopy. In: (Ed.). **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**: John Wiley & Sons, Inc., 2001. ISBN 9780471142911.

LOURENÇO, S. D. O. **Cultivo de microalgas marinhas : princípios e aplicações**. São Carlos: RiMa, 2006. ISBN 8576561131 9788576561132.

MAEDA, K. et al. CO₂ fixation from the flue gas on coal-fired thermal power plant by microalgae. **Energy Conversion and Management**, v. 36, n. 6-9, p. 717-720, 1995. ISSN 0196-8904. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S019689049500105M> >. Acesso em: 1995/9//.

MARIANO, A. P. et al. Butanol production in a first-generation Brazilian sugarcane biorefinery: Technical aspects and economics of greenfield projects. **Bioresource technology**, v. 135, p. 316-323, 2013a. ISSN 0960-8524.

MARIANO, A. P. et al. Utilization of pentoses from sugarcane biomass: Techno-economics of biogas vs. butanol production. **Bioresource technology**, v. 142, p. 390-399, 2013b. ISSN 0960-8524.

MASOJÍDEK, J.; KOBLÍŽEK, M.; TORZILLO, G. Photosynthesis in Microalgae. In: (Ed.). **Handbook of Microalgal Culture**: Blackwell Publishing Ltd, 2003. p.20-39. ISBN 9780470995280.

MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 1, p. 217-232, 2010. ISSN 1364-0321. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1364032109001646> >.

MATSUDO, M. C. et al. CO₂ from alcoholic fermentation for continuous cultivation of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* in tubular photobioreactor using urea as nitrogen source. **Biotechnology Progress**, v. 27, n. 3, p. 650-656, 2011. ISSN 1520-6033. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/btpr.581> >.

MERCADANTE, A. Z.; BRITTON, G.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Carotenoids from Yellow Passion Fruit (*Passiflora edulis*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 10, p. 4102-4106, 1998/10/01 1998. ISSN 0021-8561. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/jf9801724> >. Acesso em: 2014/02/12.

MERCHUK, J. C.; GLUZ, M. Bioreactors, Air-lift Reactors. In: (Ed.). **Encyclopedia of Bioprocess Technology**: John Wiley & Sons, Inc., 2002. ISBN 9780471250586.

METZ, B.; INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE. WORKING, G., III. IPCC special report on carbon dioxide capture and storage. Cambridge; New York, 2005. ISSN 052186643X 9780521866439 0521685516 9780521685511. Disponível em: < <http://arch.rivm.nl/env/int/ipcc/pages%5Fmedia/SRCCS-final/IPCCSpecialReportonCarbondioxideCaptureandStorage.htm> >.

MULDERS, K. J. M. et al. Phototrophic pigment production with microalgae: biological constraints and opportunities. **Journal of Phycology**, v. 50, n. 2, p. 229-242, 2014. ISSN 1529-8817. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/jpy.12173> >.

MURADYAN, E. A. et al. Changes in Lipid Metabolism during Adaptation of the *Dunaliella salina* Photosynthetic Apparatus to High CO₂ Concentration. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 51, n. 1, p. 53-62, 2004. ISSN 1021-4437. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1023/B:RUPP.0000011303.11957.48> >.

OILGAE (2010). Algae World 2010 – Industry Survey. Acesso em 21 junho de 2012, <http://www.oilgae.com/>

OILGAE (2011). Nutraceuticals - An Added Bonus for Microalgae Biofuels Industry. Acesso em 1 de maio de 2014, http://www.oilgae.com/mlist/archives/24_feb_2011.html

OILGAE (2013). Comprehensive Oilgae Report – Energy from Algae: Products, Market, Processes & Strategies. Acesso em 1 de maio de 2014, http://www.oilgae.com/ref/report/Report_Sample.pdf

OILGAE (2014). The Comprehensive Guide for Algae-based Carbon Capture. Acesso em 1 de maio de 2014, http://www.oilgae.com/ref/report/co2_capture/co2_capture.html

PANGESTUTI, R.; KIM, S.-K. Biological activities and health benefit effects of natural pigments derived from marine algae. **Journal of Functional Foods**, v. 3, n. 4, p. 255-266, 10// 2011. ISSN 1756-4646. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1756464611000703> >.

PEREZ-GARCIA, O. et al. Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. **Water Research**, v. 45, n. 1, p. 11-36, 1// 2011. ISSN 0043-1354. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0043135410006019> >.

RICHER, S. et al. Double-masked, placebo-controlled, randomized trial of lutein and antioxidant supplementation in the intervention of atrophic age-related macular degeneration: the Veterans LAST study (Lutein Antioxidant Supplementation Trial). **Optometry - Journal of the American Optometric Association**, v. 75, n. 4, p. 216-229, 4// 2004. ISSN 1529-1839. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1529183904700494> >.

ROSENBERG, J. N. et al. Microalgal biomass production and carbon dioxide sequestration from an integrated ethanol biorefinery in Iowa: A technical appraisal and economic feasibility evaluation. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, n. 9, p. 3865-3876, 10// 2011. ISSN 0961-9534. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S096195341100287X> >.

SCHENK, P. M. et al. Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production. **Bioenergy research**, v. 1, n. 1, p. 20-43, 2008. ISSN 1939-1234.

SCOPARO, C. H. G. Remoção de CO₂ em fotobiorreatores utilizando efluentes petroquímicos. Campinas: Unicamp, 2010. 147 p. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Engenharia Química, Campinas, 2010.

SHAISH, A.; BEN-AMOTZ, A.; AVRON, M. Production and selection of high β -carotene mutants of *Dunaliella bardawil* (Chlorophyta). **Journal of Phycology**, v. 27, n. 5, p. 652-656, 1991. ISSN 1529-8817. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.0022-3646.1991.00652.x> >.

STEWART, C.; HESSAMI, M.-A. A study of methods of carbon dioxide capture and sequestration—the sustainability of a photosynthetic bioreactor approach. **Energy Conversion and Management**, v. 46, n. 3, p. 403-420, 2005. ISSN 0196-8904.

TAMBURIC, B. et al. Design of a novel flat-plate photobioreactor system for green algal hydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 36, n. 11, p. 6578-6591, 2011. ISSN 0360-3199.

WANG, B. et al. CO₂ bio-mitigation using microalgae. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 79, n. 5, p. 707-718, 2008. ISSN 0175-7598. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-008-1518-y> >.

XU, Y.; ISOM, L.; HANNA, M. A. Adding value to carbon dioxide from ethanol fermentations. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 10, p. 3311-3319, 2010. ISSN 0960-8524. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852410000465> >.

YANG, C.; HUA, Q.; SHIMIZU, K. Energetics and carbon metabolism during growth of microalgal cells under photoautotrophic, mixotrophic and cyclic light-autotrophic/dark-heterotrophic conditions. **Biochemical Engineering Journal**, v. 6, n. 2, p. 87-102, 10// 2000. ISSN 1369-703X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369703X00000802> >.

YANG, S.-T. **Bioprocessing for value-added products from renewable resources: new technologies and applications**. Elsevier, 2011. ISBN 0080466710.

ZANATTA, C. F.; MERCADANTE, A. Z. Carotenoid composition from the Brazilian tropical fruit camu-camu (*Myrciaria dubia*). **Food Chemistry**, v. 101, n. 4, p. 1526-1532, // 2007. ISSN 0308-8146. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814606003207> >.

ZENG, X. et al. Microalgae bioengineering: From CO₂ fixation to biofuel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 15, n. 6, p. 3252-3260, 2011. ISSN 1364-0321. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1364032111001511> >.

5 RESULTADOS, DISCUSSÕES E CONCLUSÕES NO FORMATO DE ARTIGO CIENTÍFICO

PRODUÇÃO DE CAROTENOIDES E LIPÍDEOS PELA MICROALGA *Dunaliella tertiolecta* UTILIZANDO CO₂ DE FERMENTAÇÃO DE CERVEJA

CHAGAS, A. L., RIOS, A., JARENKOW, A., MARCÍLIO, N. R., AYUB, M. A. Z., RECH, R.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos
E-mail para contato: arthurygeros@gmail.com; rech@ufrgs.br

RESUMO – O presente trabalho avaliou o crescimento de *Dunaliella tertiolecta* pela biofixação do CO₂ liberado durante a produção de cerveja, reciclando um dos gases responsáveis pelo efeito estufa, reduzindo custo da matéria-prima CO₂ e agregando valor ao produzir lipídeos e carotenoides naturais. Para isso a microalga foi cultivada em sistemas integrados entre fotobiorreatores e fermentadores. A diferença nos cultivos foi o tipo e a quantidade de CO₂ produzida pelas fermentações. Inicialmente se fez fermentações com meio YPD possibilitando a determinação das melhores condições para posterior biofixação do CO₂ produzido pela cerveja. Os maiores valores para biomassa, carotenoides, produtividades e lipídeos, pela biofixação do CO₂ de YPD, foram obtidos na condição em que a dextrose variou de (10 à 60) g L⁻¹ a cada 24 h. Para reproduzir esta condição utilizando mosto de cerveja, foi calculada a conversão de substrato em produto para, então, acoplar diariamente volumes diferentes de mosto de cerveja em cultivos de microalga. Os valores obtidos para este cultivo foram 1,10 ± 0,05 g L⁻¹ de biomassa, 0,18 ± 0,011 g L⁻¹ d⁻¹ de produtividade de biomassa, 0,58 ± 0,06 d⁻¹ foi a velocidade específica de crescimento, 4,74 ± 0,59 mg g⁻¹ de carotenoides por biomassa, 0,86 ± 0,06 mg L⁻¹ d⁻¹ de produtividade de carotenoides e 13,5 ± 0,4 % (em massa) de lipídeos. Estes valores foram praticamente o dobro dos valores obtidos para o cultivo com CO₂ do ar atmosférico. Todos cultivos apresentaram o mesmo perfil de carotenoides com maior porcentagem para luteína (46,7 ± 2,0 %).

1. INTRODUÇÃO

A emissão de gases do efeito estufa continua crescendo, chegando em 2010 ao máximo já registrado. O dióxido de carbono (CO₂) representa atualmente 60 % destes gases (*Intergovernmental Panel on Climate Change*, 2014). Em comparação com o volume de CO₂ produzido pela combustão de combustíveis fósseis, a quantidade de CO₂ emitida por fermentação para se obter etanol - fonte renovável - é pequena. No entanto, há um crescimento na produção de biocombustíveis acompanhado de regulamentos mais restritivos quanto à liberação do seu CO₂ para a atmosfera. Com a sua captura, pode-se obter um balanço negativo de CO₂ na atmosfera (Mollersten *et al.*, 2003 e Kheshgi and Prince, 2005 *apud* Xu,

Isom e Hanna, 2010). Já a bebida alcoólica mais consumida no mundo, a cerveja, contribui com uma quantidade significativa de CO₂ se comparada aos biocombustíveis, conforme mostra a Tabela 1, e o seu percentual de pureza chega a 99 % (Xu, Isom e Hanna, 2010), consideravelmente mais elevado do que o CO₂ proveniente da queima de combustíveis fósseis, permitindo a sua utilização na produção de alimentos, por exemplo.

Tabela 1 – Comparação de CO₂ liberado anualmente no mundo por fermentações alcoólicas e pelos combustíveis fósseis

Produto	Ano	Produção (10 ⁹ L ano ⁻¹)	CO ₂ liberado (Mt ^a ano ⁻¹)
Biocombustível	2008	65,6 ^b	49,8 ^b
Cerveja	2010	185 ^c	140 ^c
Combustíveis fósseis	2008	-	31900 ^d

^a Milhões de toneladas métricas.

^b *Renewable Fuels Associate*, 2009, *apud* Xu, Isom e Hanna (2010).

^c Bmg (2010).

^e Estimativa através do cálculo comparativo com os valores de biocombustível (^b), considerando liberação de CO₂ equivalentes para as fermentações alcoólicas.

^d *Agence France-Presse* (2009) *apud* Xu, Isom e Hanna (2010).

Tecnologias de captura e sequestro de carbono (CCS - do inglês *Carbon Capture and Storage*) vêm sendo criadas para diminuir a concentração do CO₂ na atmosfera por promover a captura deste. Entretanto, tais técnicas necessitam da aplicação de substâncias químicas e altos gastos de energia e o CO₂ capturado necessita ser armazenado, ou fixado, para que não retorne ao ar (Bilanovic *et al.*, 2009). Neste contexto, a utilização de microalgas para biofixação de CO₂ surge como uma alternativa ambientalmente efetiva para a diminuição deste gás na atmosfera, uma vez que é utilizado, através de reações fotoquímicas, por estes microrganismos para sua multiplicação, produção de carboidratos, lipídeos e carotenoides naturais de alto valor agregado como o β-caroteno e a luteína que podem ser utilizados como nutracêuticos (Hosseini Tafreshi e Shariati, 2009; Dewapriya e Kim, 2014). Sua singularidade que os separa de outros microrganismos é devido à presença de clorofila e de ter capacidade fotossintética em uma única célula algal, permitindo assim uma maior facilidade para a geração de biomassa e uma investigação genética e metabólica mais simples em um período de tempo muito mais curto comparada a plantas convencionais, podendo fixar CO₂ de 10 à 50 vezes mais que plantas terrestres, em média microalgas consomem 1,83 g de CO₂ para produzir 1 g de biomassa (Chisti, 2007; Wang *et al.*, 2008; Rosenberg *et al.*, 2011).

A biomassa formada por microalgas pode ser comercializada como nutracêutico rico em ácidos-graxos ômega 3, 6 e 9, carotenoides, sendo uma fonte vegana para benefícios medicinais, incluindo prevenção e tratamento de doenças. O ácido-graxo ômega-3 de óleos

marinhos como de peixes e algas teve um consumo mundial estimado em 2013 de 123,8 mil toneladas métricas, com valor de mercado de US\$ 2,3 bilhões. Prevê-se que a demanda chegará a 241 mil toneladas métricas, com um valor de US\$ 4,96 bilhões entre 2013 e 2020 (Aim, 2014). Representando um mercado em expansão de nutracêuticos, os carotenoides têm um mercado global estimado em US\$ 1,2 bilhões para 2015. β -caroteno, zeaxantina e luteína são carotenoides encontrados em altas concentrações em algumas microalgas, em média esta concentração fica entre 0,1 % e 2 % de peso seco, porém em espécies do gênero *Dunaliella* pode chegar à 14 %. A luteína e a zeaxantina são representantes das xantofilas, divisão do grupo dos carotenoides, e são fortemente associadas ao tratamento e prevenção da degeneração macular referente à idade, da catarata e da aterosclerose, possuindo também propriedades antioxidantes. Já os carotenos mais representativos, os isômeros β -caroteno e α -caroteno, são importantes por serem precursores da vitamina A, por terem propriedades antioxidantes e na prevenção ao câncer. O β -caroteno representa a maior parcela do mercado de carotenoides avaliado em US\$ 247 milhões em 2007 e com estimativa de US\$ 285 milhões para 2015. O valor de mercado da luteína foi de US\$ 233 milhões em 2010 com uma estimativa de US\$ 309 milhões para 2018 (Borowitzka e Brown, 1974; Shaish, Ben-Amotz e Avron, 1991; Minowa *et al.*, 1995; Krinsky, Landrum e Bone, 2003; Richer *et al.*, 2004; Hosseini Tafreshi e Shariati, 2009; Oilgae, 2011; 2013; 2014).

Dentre as vantagens da utilização do sistema integrado entre fermentadores e fotobiorreatores está a redução de custo pela utilização de um CO₂ de alta pureza da fermentação sem a necessidade de armazenamento e beneficiamento deste gás, uma vez que 40 % do valor das matérias-primas utilizadas para cultivo de microalgas estão na utilização de CO₂ comprimido (Molina Grima *et al.*, 2003), agregando valor ao CO₂ liberado pela cerveja como, por exemplo, utilizando as microalgas produzidas na própria cerveja: “*A super nutritious and healthy beer*” (Chacón-Lee e González-Mariño, 2010).

O presente trabalho tem como objetivo implementar um sistema integrado entre fermentadores e fotobiorreatores, avaliando o crescimento da microalga *Dunaliella tertiolecta* pela biofixação de CO₂ produzido por dois tipos de fermentação alcoólica, em meio YPD (*Yeast-Peptone-Dextrose*) e durante a produção de cerveja, determinando os carotenoides naturais produzidos e lipídeos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Foram realizados dois tipos de cultivos integrados para captura e fixação de CO₂ proveniente de fermentações alcoólicas através da microalga *Dunaliella tertiolecta*. O primeiro foi com a fermentação em meio YPD e o segundo com a produção de cerveja. Primeiramente foram determinados o CO₂ acumulado, taxa de geração de CO₂ e conversão de dextrose em etanol em fermentações com YPD para, então, realizar os cultivos integrados entre fotobiorreatores e fermentadores com este meio. Todos cultivos integrados foram acompanhados por um cultivo controle sem a utilização de CO₂ de fermentação. Diariamente foram retiradas amostras do fotobiorreator para determinação de biomassa, nitrogênio consumido e produção de carotenoides totais. Ao final de cada cultivo, as microalgas foram centrifugadas e liofilizadas para análise de lipídeos e determinação de perfil de carotenoides. Por último, a mesma sequência de trabalho foi realizada para os cultivos entre fotobiorreatores e fermentadores com mosto de cerveja, reproduzindo a condição que obteve os melhores resultados para YPD. Os preparos dos meios, os cultivos e as análises são descritas a seguir. Todos os cultivos e todas as análises foram realizadas, no mínimo, em duplicata.

2.1. Microalga e meio de cultivo

A microalga utilizada foi a *Dunaliella tertiolecta* do banco de microalgas do Laboratório 117 do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sendo inoculada a 10 % (volume). O meio de cultivo utilizado foi o Guillard “*f/2*” (Guillard, 1975) modificado com aumento de salinidade e concentração de nitrogênio (Da Fré, 2011), sendo utilizadas as seguintes quantidades: 34 g L⁻¹ de sal marinho (Red Sea Salt), 17 g L⁻¹ de NaCl, 300 mg L⁻¹ de NaNO₃, 1 mL L⁻¹ de solução-estoque de fosfato, 1 mL L⁻¹ de solução-estoque de silicato, 1 mL L⁻¹ de solução-estoque de metais-traço, 1 mL L⁻¹ de solução-estoque de vitaminas e 1 mL L⁻¹ de solução-tampão TRIS. Soluções estoques foram preparadas de acordo com Lourenço (2006). Solução-estoque de metais-traço: 9,8 mg L⁻¹ de CuSO₄.5H₂O, 22 mg L⁻¹ de ZnSO₄.7H₂O, 1 mg L⁻¹ de CoCl₂.6H₂O, 180 mg L⁻¹ de MnCl₂.4H₂O, 6,3 mg L⁻¹ de Na₂MoO₄.2H₂O, 4,36 g L⁻¹ de Na₂EDTA e 3,15 g de FeCl₃.6H₂O. Solução-estoque de vitaminas: 100 mg L⁻¹ de tiamina, C₁₂H₁₇N₄OS, 0,5 mg L⁻¹ de cianocobalamina, C₆₃H₈₈CoN₁₄O₁₄P, e 0,5 mg L⁻¹ de biotina, C₁₀H₁₆N₂O₃S. Solução-estoque de fosfato: 5 g L⁻¹ de NaH₂PO₄.H₂O. Solução estoque de silicato: 30 g L⁻¹ de Na₂SiO₃.9H₂O. A solução-tampão foi preparada com 50 g de TRIS, C₄H₁₁NO₃,

aproximadamente 30 mL de HCl, para ajuste de pH, e água destilada completando a solução em 200 mL. Todas as soluções foram preparadas com água destilada e autoclavadas a 121 °C por 15 min, exceto a de vitaminas que foi esterilizada por microfiltração (0,22 µm Sartorius Stedim Biotech). Durante os cultivos foram adicionados diariamente 1 mL L⁻¹ de solução-estoque de fosfato, 1 mL L⁻¹ de solução-estoque de metais-traço e água destilada para acertar o nível de 2,4 L dos fotobiorreatores quando o mesmo baixava por evaporação.

2.2. Cultivo em meio YPD

A levedura utilizada foi a *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 do banco de leveduras do Laboratório de Biotecnologia (Bioteclab) do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, sendo inoculada a 10 % (volume). As concentrações de YPD utilizadas foram de 10 g L⁻¹ de extrato de levedura, 20 g L⁻¹ de peptona bacteriológica e a concentração de dextrose variou de acordo com os ensaios realizados. Todas as soluções foram preparadas com água destilada e autoclavadas a 121 °C por 15 min, sendo misturadas e transferidas em capela de fluxo laminar, com chama e a temperatura ambiente.

2.3. Fermentação com mosto de cerveja

Para as fermentações com mosto de cerveja, foram utilizados malte tipo pilsen, lúpulo *nugget* 11 % AM T-90 e fermento liofilizado S-33 de alta fermentação (levedura *Saccharomyces cerevisiae*). O preparo foi realizado de forma artesanal. O malte foi moído e colocado em infusão com água na proporção 1:2,5 (peso/volume) sob curva de aquecimento que variou entre (20 e 78) °C durante 60 min. No mosto formado foi realizado o teste do iodo sendo, em seguida, clarificado em tina de aço inoxidável através de recirculações e adição de água no malte, no mesmo volume utilizado na infusão, a 76 °C. O mosto clarificado foi aquecido e no início da fervura foram adicionados 4 g L⁻¹ de lúpulo, as proteínas formadas durante a fervura foram retiradas com coador. A fervura permaneceu durante 60 min, na sequência se fez o resfriamento do mosto a 20 °C através de banho com gelo e *chiller* de imersão, nesta temperatura o mosto foi transferido para o fermentador e 0,5 g L⁻¹ de fermento foram adicionados. Fez-se agitação manual e aeração do mosto, por cerca de 2 min. Os fermentadores foram colocados em banho termostatizado a 20 °C, sem agitação.

2.4. Determinação do CO₂ acumulado, taxa de geração de CO₂ e da conversão de dextrose em etanol

Para determinação da geração de CO₂ e da conversão de dextrose em etanol (Y_{ED}) em meio YPD, foram realizadas fermentações em duplicatas em 200 mL de meio YPD contendo (20, 40 ou 60) g L⁻¹ de dextrose em Erlenmeyers de 500 mL, mantidos em câmara incubadora com agitação orbital (180 rpm, 28 °C, 24 h). Amostras foram retiradas a cada 3 h para a determinação da concentração de dextrose e etanol.

Para determinação da geração de CO₂ no mosto de cerveja foram realizadas fermentações em duplicatas de (180, 540 e 1080) mL de mosto em frascos de borossilicato (Duran) de (250, 500 e 1000) mL, respectivamente, mantidos a 20 °C em banho termostaticado sem agitação. Foram retiradas amostras a cada 3 h para determinar concentrações de etanol.

Através dos resultados da concentração de etanol fez-se a conversão por estequiometria para CO₂ acumulado (1 mol de CO₂ produzido para cada 1 mol de etanol produzido) e geraram-se curvas de CO₂ acumulado pelo tempo através de polinômios de grau 3. Essas curvas foram derivadas resultando em curvas de taxa de geração de CO₂ pelo tempo. A partir desses valores foi possível o planejamento e execução de fermentações integradas com fotobiorreatores.

2.5. Sistema integrado entre fotobiorreatores e fermentadores

Os fotobiorreatores de acrílico utilizados foram tipo placa e *airlift*, com volume útil de 2,4 L, providos de camisa interna mantida a 28 °C por banho térmico (Kochem *et al.*, 2014). A iluminação foi realizada no lado do *riser* através de um painel de lâmpadas eletrônicas (30 W) na intensidade de 18,0 klx, e a aeração foi controlada por rotâmetros a 1 L min⁻¹ de ar comprimido filtrado (0,22 µm Midisart®2000, Sartorius Stedim Biotech). Diariamente foram retiradas amostras para medidas de biomassa, carotenoides totais e nitrato. Ao final do experimento, o conteúdo do biorreator foi centrifugado (10000 × g, 10 min, 4 °C) o sobrenadante foi descartado e a biomassa úmida foi lavada com água destilada e centrifugada novamente. A biomassa resultante foi liofilizada e armazenada (-18 °C) para determinação de lipídeos e perfil de carotenoides.

As fermentações alcoólicas com 2 L de meio YPD foram realizadas em frascos de borossilicato encamisados de 2 L, posicionados acima dos fotobiorreatores. A saída de CO₂ dos fermentadores foi conectada no fundo dos fotobiorreatores em pedras porosas para dissipar e diminuir o tamanho das bolhas de CO₂ (Figura 1). Cada fermentador ficou conectado durante 24 h ao fotobiorreator. Os cultivos sempre foram acompanhados por um cultivo controle, sem a injeção de CO₂, representado pelo fotobiorreator central da Figura 1. Os fermentadores foram mantidos em 28 °C e agitados por agitadores magnéticos. Foram realizadas fermentações com diferentes concentrações de dextrose em cada fermentador aos fotobiorreatores, com o primeiro fermentador sendo conectado em 72 h ou em 24 h de cultivo da microalga, conforme mostrado na Tabela 2.

As fermentações alcoólicas em mosto de cerveja foram realizadas em frascos de borossilicato de 200 mL, 500 mL, 1,0 L ou 2,0 L mantidos a 20 °C em banho térmico, sem agitação. Cada fermentador permaneceu conectado durante 48 h aos fotobiorreatores em sistema similar aos cultivos com YPD. Para que a concentração de CO₂ liberada fosse similar à liberada pela fermentação YPD (10-60)/24, diferentes volumes de mosto de cerveja foram acoplados durante o cultivo. Os volumes utilizados foram calculados através de $Y_{E/D}$: no início do cultivo de microalgas foi acoplado o primeiro fermentador com 257 mL de mosto de cerveja, equivalente a 2 L de YPD com 10 g L⁻¹ de dextrose. Após 24 h de cultivo foi adicionado o segundo fermentador, aumentando o volume em 257 mL de mosto em relação ao anterior. Este procedimento se repetiu até 144 h de cultivo da microalga.

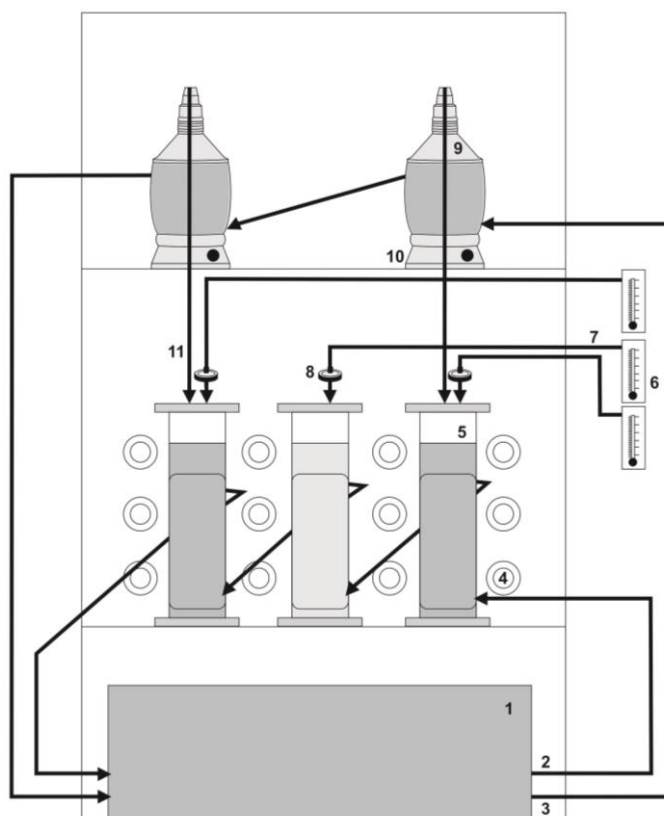


Figura 1 – Sistema integrado entre fermentadores e fotobiorreatores: (1) banho térmico, (2) e (3) saída de água para, respectivamente, camisa interna dos fotobiorreatores e camisa externa dos fermentadores, (4) lâmpadas, (5) fotobiorreatores, (6) rotômetros, (7) linha para ar atmosférico, (8) filtro, (9) fermentadores, (10) agitador magnético e (11) saída de CO₂ do fermentador para o fotobiorreator.

Tabela 2 – Cultivos de microalgas integrados com fermentações alcoólicas. A Tabela mostra o instante em que cada fermentador contendo meio YPD foi acoplado e a concentração de dextrose do meio de cultivo

Cultura	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144h
YPD 30/72	-	-	30 g L ⁻¹	30 g L ⁻¹	30 g L ⁻¹	30 g L ⁻¹
YPD 60/72	-	-	60 g L ⁻¹	60 g L ⁻¹	60 g L ⁻¹	60 g L ⁻¹
YPD 30/24	30 g L ⁻¹	30 g L ⁻¹	30 g L ⁻¹	30 g L ⁻¹	30 g L ⁻¹	30 g L ⁻¹
YPD (10-60)/24	10 g L ⁻¹	20 g L ⁻¹	30 g L ⁻¹	40 g L ⁻¹	50 g L ⁻¹	60 g L ⁻¹

2.6. Procedimentos analíticos

Nas fermentações alcoólicas foram determinadas as concentrações de dextrose e etanol por CLAE (Shimadzu) empregando-se coluna Bio-Rad Aminex HPX-87H a 45 °C, utilizando H₂SO₄ como eluente, com vazão de 0,6 mL min⁻¹ e detector por índice de refração. O volume de amostra injetada foi de 20 µL. As amostras foram previamente centrifugadas, diluídas e filtradas por filtro “Step-Pack” C18 (Milipore).

Nos fotobiorreatores foram determinados a biomassa de microalga, o pH, a concentração de nitrato e de carotenoides totais e calculada a taxa de acúmulo de carbono ao longo dos cultivos. A biomassa foi medida por densidade ótica a 750 nm e correlacionada com peso-seco. A taxa de acúmulo de carbono foi calculada considerando que a biomassa da *D. tertiolecta* possui 41,2 % de carbono (resultados ainda não publicados). As curvas de carbono biofixado pelo tempo foram aproximadas por polinômios de grau 3, os quais foram derivados resultando nas curvas de taxa de acúmulo de carbono pelo tempo. As leituras de pH foram realizadas através de fita de pH (Alkalit®/Merck) e a intensidade luminosa foi monitorada através de luxímetro digital (MS6610/Akson). Diariamente foram retiradas amostras do fotobiorreator, as quais foram centrifugadas ($16000 \times g / 5 \text{ min}$), o sobrenadante e o precipitado foram armazenados separadamente ($-18 \text{ }^\circ\text{C}$). No sobrenadante foi analisada a concentração de nitrogênio de acordo com Cataldo *et al* (1975). No precipitado foi analisada a concentração de carotenoides totais por método colorimétrico utilizando acetona como solvente (Lichtenthaler e Buschmann, 2001).

A biomassa liofilizada ao final do cultivo nos fotobiorreatores foi submetida à análise de lipídeos e à identificação e quantificação dos carotenoides. Os lipídeos foram determinados pelo método Bligh'n Dyer utilizando 1 g de biomassa liofilizada (Bligh e Dyer, 1959). A identificação de carotenoides foi realizada por CLAE, através da extração de carotenoides seguindo a metodologia de Mercadante, Britton e Rodriguez-Amaya (1998). O cromatógrafo utilizado foi o G1311A – DE14917573 Agilent 1100 Series com UV/Vis detector (G1314B - DE71358944 Agilent 1100 Series). A coluna polimérica C30 de fase reversa, 250 mm \times 4,6 mm i.d, 3 μm , (YMC, Japão) foi utilizada. O fluxo da fase móvel foi 1 mL min^{-1} . O volume de injeção foi 5 μL à $33 \text{ }^\circ\text{C}$. O comprimento de onda foi ajustado à 450 nm. As variações das concentrações da mistura entre água, metanol e MTBE, assim como as demais condições, foram realizadas de acordo com Zanatta e Mercadante (2007).

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1. Cinética de produção de etanol e liberação de CO₂ em meio YPD

Em um primeiro momento do trabalho foram realizados cultivos de *S. cerevisiae* CAT-1 em meio YPD com diferentes concentrações de dextrose com o objetivo de determinar a cinética de produção de etanol e liberação de CO₂. Como esperado, o aumento da concentração inicial de dextrose levou a um aumento na taxa de máxima de formação de CO₂,

na concentração de etanol e na massa acumulada de CO_2 produzido (Figura 2). Tanto no cultivo com 20 g L^{-1} de dextrose quanto no com 40 g L^{-1} de dextrose, a maior taxa de geração de CO_2 foi em aproximadamente 12 h de cultivo, enquanto que no com 60 g L^{-1} de dextrose foi entre 15 h e 18 h de cultivo. Em todas fermentações a dextrose foi totalmente consumida até 18 h de cultivo.

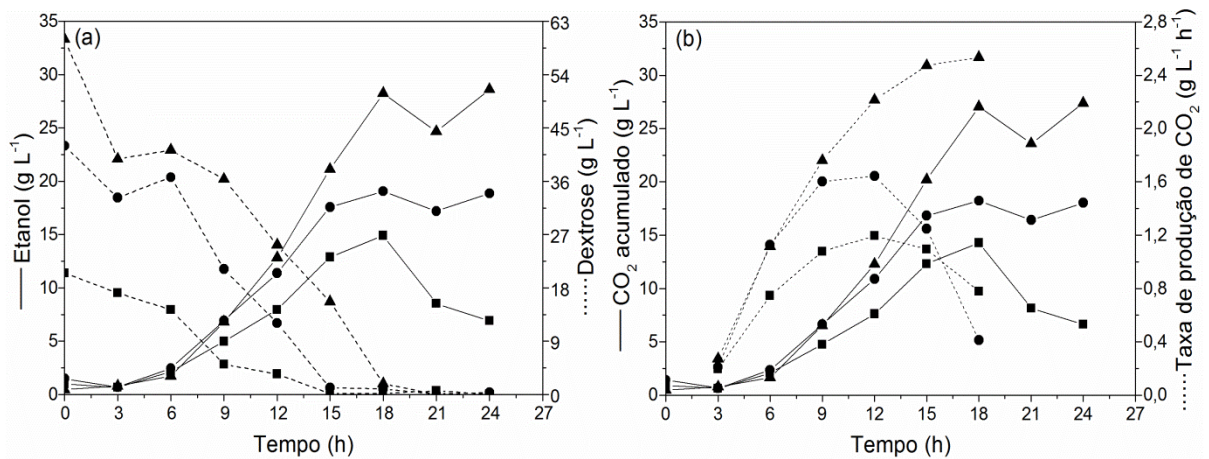


Figura 2 – Cinética de produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 em meio YPD com concentração de dextrose de (■) 20 g L^{-1} , (●) 40 g L^{-1} , e (▲) 60 g L^{-1} . (a) Curvas de consumo de dextrose e formação de etanol. (b) Curvas da massa acumulada de CO_2 produzido e da taxa de produção de CO_2 . Os desvio-padrões dos dados foram $0,044 \text{ g L}^{-1}$ para dextrose e $0,079 \text{ g L}^{-1}$ para etanol.

3.2. Média dos cultivos controle e cultivos integrados com meio YPD

Os dados da liberação de CO_2 em YPD foram utilizados para planejar fermentações alcoólicas integradas com fotobiorreatores, as quais foram comparadas com um cultivo controle, sem a utilização de CO_2 de fermentações (Figura 3).

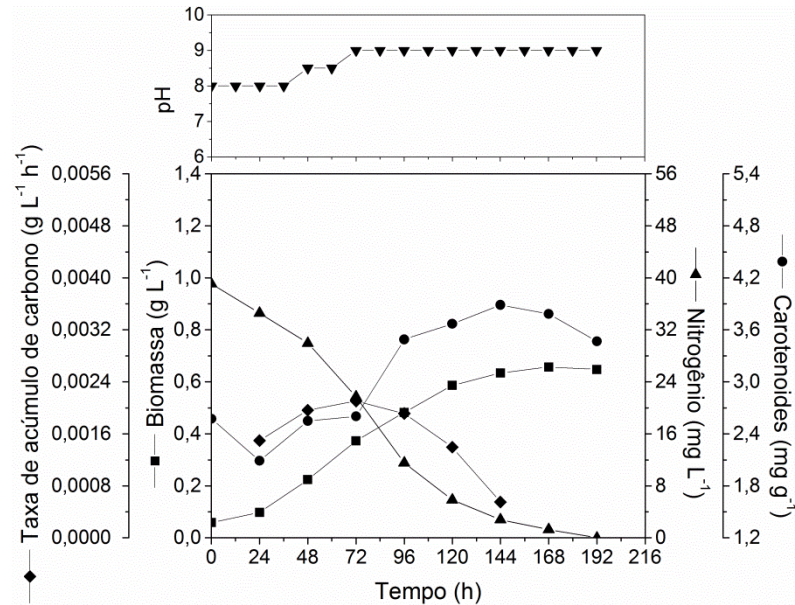


Figura 3 – Cinética do cultivo em fotobiorreator de *Dunaliella tertiolecta*, sem adição de CO₂. Os desvios-padrões dos dados foram 0,25 para pH, 0,052 g L⁻¹ para biomassa, 3,1 mg L⁻¹ para nitrogênio e 0,16 mg g⁻¹ para carotenoides.

No cultivo controle observa-se uma tendência de alcalinização do meio. O pH ficou dentro da faixa ótima para microalgas, iniciando em 8 e atingindo 9 em 72 h, permanecendo com este valor até o final. Em comparação com o cultivo controle, todos os cultivos de microalgas enriquecidos com CO₂ provenientes de fermentação alcoólica em meio YPD (Figura 4) apresentaram maior taxa de acúmulo de carbono, produção de biomassa e carotenoides, apresentando também um consumo mais rápido do nitrogênio presente no meio de cultivo.

Inicialmente foram realizados cultivos com microalgas acoplado os fermentadores à partir de 72 h de cultivo, dando tempo para uma maior formação de biomassa capaz de fixar o CO₂ liberado, evitando assim uma queda excessiva do pH (Figura 4 (YPD 30/72) e (YPD 60/72)). O pH dos cultivos de microalgas foi medido nos tempos de maior liberação de CO₂ das fermentações, para observar se o pH mínimo ficasse abaixo da faixa entre 6 e 9, considerada ótima para *Dunaliella* (Oren, 2005). Como o pH mínimo obtido foi 7, foram realizadas bateladas integrando os fermentadores a partir de 24 h de cultivo de microalgas (Figuras 4 (YPD 30/24) e (YPD (10-60)/24)). O pH caiu à 6,5 em 30 h e 57 h de cultivo para YPD 30/24 e YPD (10-60)/24 e novamente em 153 h para YPD (10-60)/24.

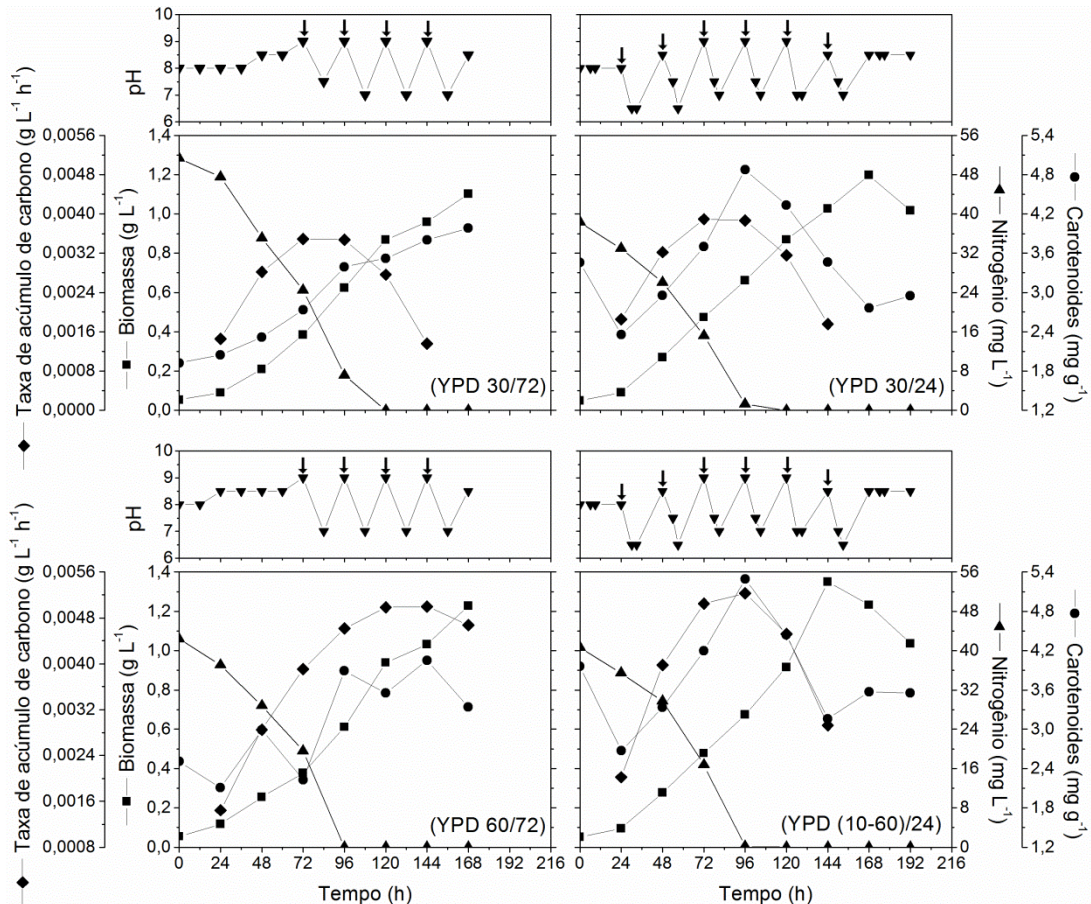


Figura 4 – Cultivo de *D. tertiolecta* em fotobiorreator enriquecido com CO₂ proveniente de YPD 30/72, YPD 60/72, YPD 30/24 e YPD (10-60)/24. As setas indicam os instantes em que foram acoplados os fermentadores. Os desvios-padrões dos dados foram 0,008 para pH, 0,014 g L⁻¹ para biomassa, 1,4 mg L⁻¹ para nitrogênio e 0,031 mg g⁻¹ para carotenoides.

No cultivo controle, o nitrogênio foi consumido lentamente, chegando próximo à zero no final das bateladas, já para os cultivos acoplados com fermentações alcoólicas, houve uma maior demanda de nitrogênio, devido à maior disponibilidade da fonte de carbono e maior produção de biomassa, caindo à zero entre 96 h e 120 h. Várias observações na literatura apontam que o aumento da biossíntese de carotenoides está relacionado com um desequilíbrio nutricional, particularmente falta de nitrogênio, em conjunto com outras condições de estresse como altas concentrações salinas, intensidade luminosa e temperatura. Essas condições podem afetar negativamente o crescimento de microalgas e a produção de clorofila, mas como resposta metabólica de proteção ao aparato fotossintético ocorre maior produção de carotenoides, que pode ser observado pela mudança da coloração do cultivo de verde para o amarelo, dependendo dos carotenoides produzidos (Ben-Amotz e Avron, 1983; Berges *et al.*, 1996; Marín *et al.*, 1998; Çelekli e Dönmez, 2006).

A fração mássica de carotenoides presente na biomassa caiu nas primeiras 24 h de cultivo, com exceção do YPD 30/72. Após este período a produção de carotenoides acompanhou a de biomassa com exceção de YPD 60/72 que oscilou durante o cultivo. No início do cultivo a concentração celular é baixa, ficando o meio com luminosidade suficiente para fotossíntese. À medida que a biomassa aumenta ocorre o sombreamento das células e como resposta há maior produção de carotenoides para manter elevada a captação de luz celular. Os carotenoides acompanharam o crescimento de biomassa até o esgotamento do nitrogênio, onde se observa a maior quantidade de carotenoides, após ocorreu o decaimento de carotenoides e a biomassa continuou aumentando, provavelmente pelo acúmulo de lipídeos e carboidratos, chegando ao máximo entre 144 h e 168 h de cultivo.

No cultivo YPD (10-60)/24 ocorreu a maior taxa de acúmulo de carbono, pois a adição gradual de CO₂ acompanhou o aumento da biomassa, diminuindo a possibilidade de retorno do CO₂ para atmosfera e aumentando a sua biofixação. Além do retorno para a atmosfera, a biofixação pode ser comprometida pela alteração do CO₂ na solução. Quando o CO₂ é dissolvido na água, três tipos de carbonos inorgânicos podem ser formados dependendo do pH da solução: predomínio de moléculas de CO₂ ou ácido carbônico (H₂CO₃) em pH abaixo de 4,5, predomínio de HCO₃⁻ em pH 8,5, predomínio de carbonato (CO₃⁻²) em pH acima de 8,5. Geralmente, não há difusão através da membrana celular para HCO₃⁻. No entanto, com a presença da enzima anidrase carbônica na superfície da célula, o HCO₃⁻ é rapidamente convertido em CO₂ e posteriormente transportado para dentro da célula para a assimilação (Lam, Lee e Mohamed, 2012; Van Den Hende, Vervaeren e Boon, 2012).

Os maiores valores obtidos para a taxa de acúmulo de carbono, biomassa e carotenoides foram, respectivamente, de 0,0052 g L⁻¹ h⁻¹, 1,35 g L⁻¹ e 5,29 mg g⁻¹ no cultivo YPD (10-60)/24. Desta forma este cultivo foi escolhido para ser reproduzido com a fermentação do mosto de cerveja.

3.3. Cinética de liberação de CO₂ em mosto de cerveja

A Figura 5 mostra a caracterização da liberação de CO₂ na fermentação da cerveja.

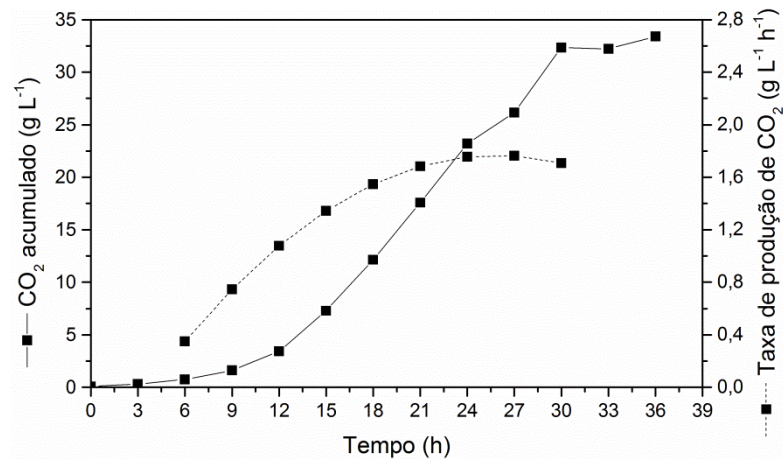


Figura 5 – Curvas da massa acumulada de CO₂ produzido e da taxa de produção de CO₂ ao longo da fermentação alcoólica em mosto de cerveja. O desvio-padrão médio foi de 0,83 g L⁻¹ de CO₂ acumulado.

Foram liberados 33,4 g L⁻¹ de CO₂ e a maior taxa de produção de CO₂ foi 1,76 g L⁻¹ h⁻¹ em 27 h de fermentação. Estes valores ficaram próximos aos da fermentação com 60 g L⁻¹ de dextrose (27,4 g L⁻¹ de CO₂ e 2,47 g L⁻¹ h⁻¹). A fermentação da cerveja cessou entre 30 h e 36 h, sendo mais lenta que a fermentação em YPD. Este fator fez com que o primeiro fermentador fosse integrado ao fotobiorreator no início do cultivo de microalgas (tempo 0 h) ao invés de após 24 h de cultivo, e que cada fermentador permanecesse acoplado durante 48 h. Para reproduzir a liberação crescente de CO₂ que foi obtida variando-se a concentração de glicose no cultivo YPD (10-60)/24, na fermentação da cerveja variou-se o volume de mosto a ser fermentado em cada 24 h. O volume inicial de mosto de 257 mL foi calculado para uma liberação de CO₂ similar à fermentação com 10 g L⁻¹ de dextrose. Pode-se observar na Figura 6 os resultados dos cultivos com CO₂ da fermentação da cerveja.

3.4. Cultivos integrados com mosto de cerveja

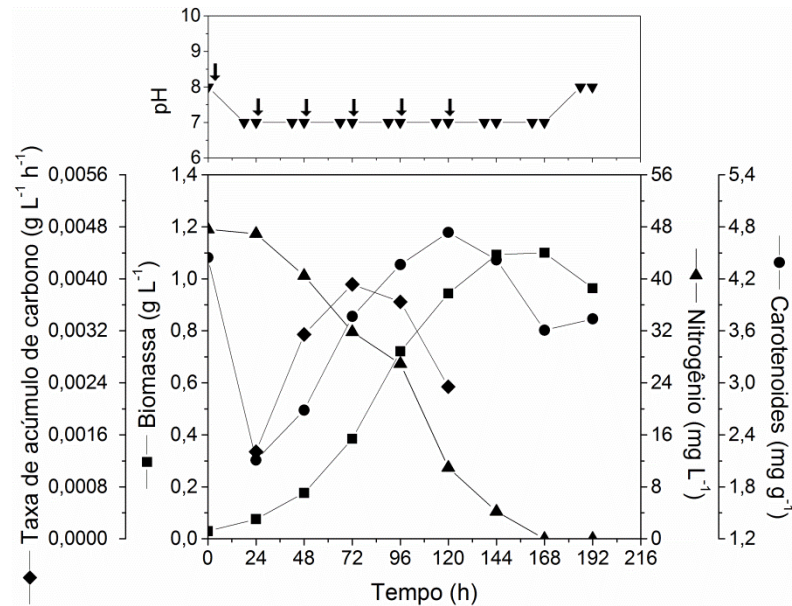


Figura 6 – Cultivo de *D. tertiolecta* em fotobiorreator enriquecido com CO₂ proveniente de fermentação de mosto da cerveja. As setas indicam os instantes em que foram acoplados os fermentadores. Os desvios-padrões dos dados foram 0,049 g L⁻¹ para biomassa, 3,1 mg L⁻¹ para nitrogênio, 0,17 mg g⁻¹ para carotenoides e o pH não apresentou desvio.

Como os fermentadores foram acoplados a cada 24 h e a fermentação de cada reator durou entre 30 h e 36 h, sempre houve CO₂ de fermentação disponível até 156 h de cultivo e o pH se manteve em 7 neste intervalo. O nitrogênio foi consumido de forma mais lenta do que no cultivo YPD (10-60)/24, sendo esgotado em 168 h de cultivo. A maior taxa de acúmulo de carbono foi de 0,0039 g L⁻¹ h⁻¹ ficando abaixo do valor de YPD (10-60)/24 (0,0052 g L⁻¹ h⁻¹).

3.5. Comparações entre os cultivos

A Figura 7 mostra as produtividades para biomassa e carotenoides nos cultivos.

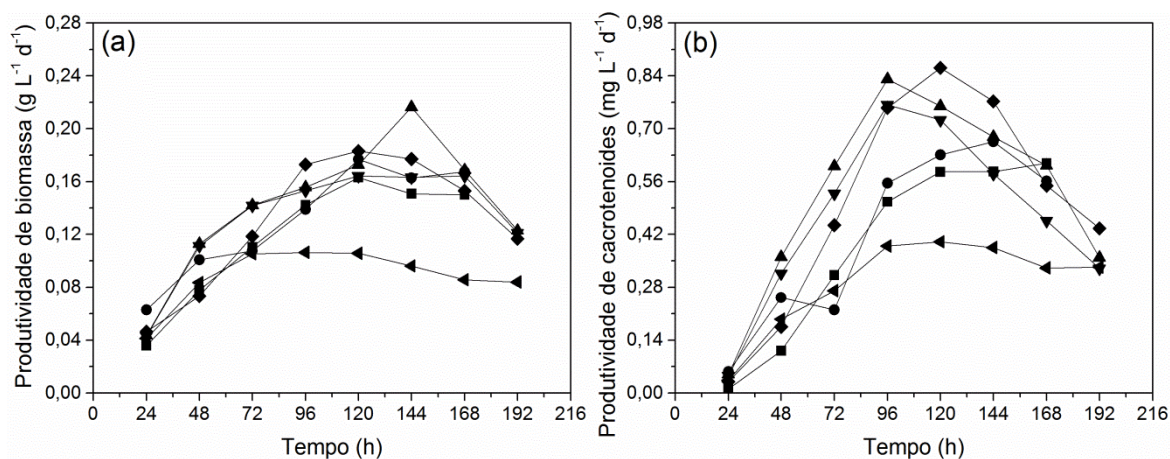


Figura 7 – Produtividades de (a) biomassa (desvio-padrão 0,013 g L⁻¹ d⁻¹) e (b) carotenoides (desvio-padrão 0,054 g L⁻¹ d⁻¹) nos cultivos (◄) Controle, (■) YPD 30/72, (●) YPD 60/72, (▼) YPD 30/24, (▲) YPD (10-60)/24 e (◆) Cerveja.

As maiores produtividades de biomassa e carotenoides ocorreram entre 96 h e 144 h de cultivo. Os maiores valores de produtividade, biomassa e velocidade específica de crescimento dos diferentes cultivos de microalgas estão na Tabela 3. Já os maiores valores para concentração carotenoides no meio de cultivo, produtividade de carotenoides e lipídeos estão na Tabela 4.

Tabela 3 – Resultados de biomassa (X), produtividade de biomassa (Q_X) e velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{m\acute{a}x}$) para os cultivos de *D. tertiolecta*

Cultura	X (g L ⁻¹)	Q_X (g L ⁻¹ d ⁻¹)	$\mu_{m\acute{a}x}$ (d ⁻¹)
Controle	0,66 ± 0,07 ^b	0,11 ± 0,002 ^b	0,31 ± 0,018 ^d
YPD 30/72	1,10 ± 0,01 ^a	0,16 ± 0,006 ^{ab}	0,49 ± 0,064 ^{abc}
YPD 60/72	1,23 ± 0,01 ^a	0,18 ± 0,008 ^{ab}	0,44 ± 0,019 ^{abcd}
YPD 30/24	1,20 ± 0,16 ^a	0,16 ± 0,016 ^{ab}	0,38 ± 0,004 ^{cd}
YPD (10-60)/24	1,35 ± 0,11 ^a	0,22 ± 0,019 ^a	0,39 ± 0,016 ^{bcd}
Cerveja	1,10 ± 0,05 ^a	0,18 ± 0,011 ^{ab}	0,58 ± 0,056 ^a

Letras iguais na mesma coluna mostram resultados sem diferença significativa entre si pelo teste de Tukey com nível de significância de 5 %.

Todos cultivos com CO₂ de fermentação alcoólica mostraram diferença significativa na biomassa quando comparados ao controle, produzindo praticamente o dobro, porém não apresentaram diferença entre si. A maior produtividade foi obtida no cultivo YPD (10-60)/24 mostrando que a quantidade e a forma que o CO₂ é distribuído influencia no cultivo, sendo a única com diferença em relação ao controle. Dentre as culturas com fermentação alcoólica, o cultivo acoplado com a fermentação do mosto de cerveja foi o único que teve CO₂ disponível ininterruptamente e pH estável em 7 durante a maior parte do tempo e conseqüentemente foi o que apresentou a maior velocidade específica de crescimento, seguida pelas culturas com

YPD iniciando a fermentação em 72 h, porém sem diferenças significativas. O cultivo controle apresentou a menor velocidade específica de crescimento.

Rosenberg *et al.* (2011) estudaram o cultivo de *Chlorella vulgaris* em lagoas *raceway* recebendo CO₂ de biorrefinarias de etanol e estimaram uma produtividade de 20 g m⁻² d⁻¹ considerada alta para sistemas abertos. Já *Arthrospira platensis* foi cultivada em fotobiorreatores tubulares, em bateladas alimentadas, utilizando ureia como fonte de nitrogênio e CO₂ de fermentação alcoólica do mosto de melão de cana de açúcar, neste caso, a biomassa máxima obtida foi de 2960 ± 35 g m⁻³ e a produtividade 425 ± 5,9 g m⁻³ d⁻¹ (Bezerra *et al.*, 2013).

Tabela 4 – Resultados de concentração de carotenoides totais (C), produtividade de carotenoides (Q_C) e lipídeos para os cultivos de *D. tertiolecta*

Cultura	C (mg g ⁻¹)	Q _C (mg L ⁻¹ d ⁻¹)	Lipídeos (% g g ⁻¹)
Controle	3,89 ± 0,34 ^a	0,40 ± 0,067 ^b	8,6 ± 0,5 ^b
YPD 30/72	3,98 ± 0,39 ^a	0,61 ± 0,058 ^{ab}	11,6 ± 0,8 ^a
YPD 60/72	4,05 ± 0,62 ^a	0,67 ± 0,095 ^{ab}	13,7 ± 0,2 ^a
YPD 30/24	4,88 ± 0,14 ^a	0,76 ± 0,047 ^a	13,5 ± 0,8 ^a
YPD (10-60)/24	5,29 ± 0,67 ^a	0,83 ± 0,037 ^a	14,0 ± 0,5 ^a
Cerveja	4,74 ± 0,59 ^a	0,86 ± 0,059 ^a	13,5 ± 0,4 ^a

Letras iguais na mesma coluna mostram resultados sem diferença significativa entre si pelo teste de Tukey com nível de significância de 5 %.

O cultivo YPD (10-60)/24 apresentou maior quantidade carotenoides por células, porém sem diferença significativa entre os cultivos. Observa-se uma tendência a maior produção de carotenoides em cultivos com CO₂ de fermentação alcoólica. A produtividade de carotenoides no meio de cultivo praticamente dobrou em culturas que iniciaram a fermentação em 24 h, assim como no cultivo com cerveja, se comparados com o controle. Também foi maior a produção de lipídios em cultivos com o CO₂ de fermentações alcoólicas, com tendência a maior formação em cultivos com maior injeção de CO₂. Para a produção de lipídeos, Muradyan *et al.* (2004) cultivaram a *Dunaliella salina* em bateladas sob altas concentrações de CO₂. Em condições naturais, no ar atmosférico, estão presentes cerca de 0,03 % de CO₂, já para condições ótimas para cultivos de microalgas são necessários de 2 % à 5 %, os autores utilizaram 10 % e obtiveram 133,1 mg g⁻¹ de peso seco para lipídeos, sendo boa parte desta quantidade representada pelos ômega 3, 6 e 9 benéficos a saúde. Este valor ficou acima do obtido pelos autores utilizando 2 % de CO₂ e são similares aos encontrados no presente trabalho com CO₂ de fermentações alcoólicas.

A Figura 8 demonstra um exemplo da caracterização dos carotenoides na biomassa de *D. tertiolecta*. O maior pico encontrado foi de luteína seguido pelo de β -caroteno, zeaxantina e α -caroteno.

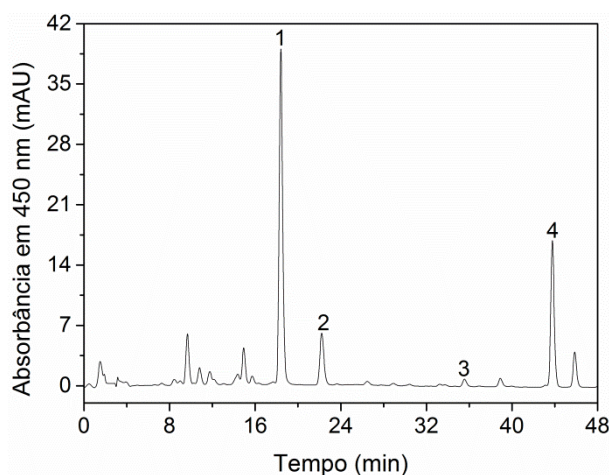


Figura 8 – Cromatograma dos carotenoides extraídos de microalgas do cultivo com CO₂ de mosto de cerveja. Os picos numerados indicam (1) luteína, (2) zeaxantina, (3) α -caroteno e (4) β -caroteno.

Na Tabela 5 estão as quantidades de carotenoides obtidas nos diferentes cultivos.

Tabela 5 – Carotenoides identificados em *D. tertiolecta* (mg g⁻¹) submetida a diferentes condições de cultivo quanto à disponibilidade de CO₂

Cultura	Luteína	β -caroteno	Zeaxantina	α -caroteno	Outros
Controle	1,88 \pm 0,33 ^b	0,78 \pm 0,07 ^b	0,37 \pm 0,03 ^a	0,036 \pm 0,003 ^b	0,81 \pm 0,07 ^a
YPD 30/72	1,83 \pm 0,26 ^{ab}	0,89 \pm 0,09 ^{ab}	0,34 \pm 0,03 ^a	0,043 \pm 0,004 ^{ab}	0,88 \pm 0,09 ^a
YPD 60/72	1,94 \pm 0,42 ^{ab}	0,86 \pm 0,13 ^{ab}	0,41 \pm 0,06 ^a	0,033 \pm 0,005 ^b	0,80 \pm 0,12 ^a
YPD 30/24	2,13 \pm 0,09 ^{ab}	1,18 \pm 0,03 ^{ab}	0,42 \pm 0,01 ^a	0,064 \pm 0,002 ^a	1,09 \pm 0,03 ^a
YPD (10-60)/24	2,61 \pm 0,47 ^a	1,34 \pm 0,17 ^a	0,55 \pm 0,07 ^a	0,062 \pm 0,008 ^a	0,73 \pm 0,09 ^a
Cerveja	2,14 \pm 0,38 ^{ab}	1,02 \pm 0,13 ^{ab}	0,45 \pm 0,06 ^a	0,059 \pm 0,007 ^a	1,07 \pm 0,13 ^a
Proporção	46,7 \pm 2,0 %	22,5 \pm 1,6 %	9,50 \pm 0,66 %	1,10 \pm 0,16 %	20,2 \pm 2,8 %

Letras iguais na mesma coluna mostram resultados sem diferença significativa entre si pelo teste de Tukey com nível de significância de 5 %.

Não ocorreu diferença significativa entre as culturas na proporção de carotenoides, sendo obtido o dobro de luteína em relação ao β -caroteno. Observa-se uma tendência de maior produção de luteína, β -caroteno e α -caroteno nos cultivos com CO₂ de fermentação alcoólica. A condição YPD (10-60)/24 apresentou diferença significativa para luteína e β -caroteno se comparada ao controle. Fu *et al.* (2013) estudaram o aumento da biossíntese de carotenoides em *Dunaliella salina* com diodos emissores de luz e evolução adaptativa em laboratório, na condição de estresse pela luminosidade combinada LED vermelho e azul, em

fotobiorreator tubular do tipo coluna de bolhas alimentado com 90 mL min^{-1} de ar, sendo 2,5 % de CO_2 . Os autores obtiveram aproximadamente 1,6 % de carotenoides em peso seco de células divididos em aproximadamente 0,8 % de luteína, 0,75 % de β -caroteno e o restante representado por licopeno e zeaxantina. A *Dunaliella salina* também foi cultivada por García-González *et al.* (2005) com 50 L h^{-1} de ar e 1 % (volume) de CO_2 . O pH se manteve em $7,5 \pm 0,5$ em fotobiorreatores tubulares do tipo *airlift* com luminosidade solar e regime semi-contínuo. Os autores alcançaram uma produtividade de $102,5 \pm 33,1 \text{ mg m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ para carotenoides totais, aproximadamente 20 mg L^{-1} de β -caroteno e 19 mg L^{-1} de luteína. Em ambos os trabalhos a proporção entre β -caroteno e luteína foi similar, diferentemente do presente trabalho no qual a luteína ocorreu em maior concentração. No trabalho de Fu *et al.* (2013), observa-se alteração das quantidades e da proporção entre os carotenoides com a mudança da quantidade e da qualidade da luminosidade. Ahmed *et al.* (2014) determinaram o perfil de carotenoides para diversas amostras de microalgas, essas foram cultivadas em frascos de 250 mL com meio F/2, ao final da fase exponencial de crescimento retiraram e trataram amostras para análise em CLAE. Os autores encontram maiores proporções de luteína do que de β -caroteno para *D. salina* (65,2 %) e *D. tertiolecta* (21,8 % e 13,3 % de luteína epoxidada), diferentemente dos trabalhos anteriores e de forma similar ao presente trabalho.

4. CONCLUSÕES

O cultivo integrado entre fermentações do mosto de cerveja e fotobiorreatores se mostrou uma boa alternativa para a indústria alimentícia e para o meio ambiente, uma vez que o CO_2 desprendido pela fermentação é reciclado pelas microalgas, aumentando a sua biomassa e a sua produtividade, reduzindo custos e gerando mais produtos como carotenoides naturais e lipídeos. Os resultados deste trabalho demonstraram que a biomassa e os lipídeos praticamente duplicaram com a utilização do CO_2 proveniente da fermentação do mosto de cerveja em relação ao cultivo com CO_2 atmosférico, além de mostrar uma tendência a maior produção de carotenoides por células. Os resultados também mostraram a importância da distribuição progressiva deste CO_2 ao longo do cultivo e que a proporção de carotenoides não é modificada significativamente com a alteração de CO_2 injetado.

5. REFERÊNCIAS

AHMED, F. et al. Profiling of carotenoids and antioxidant capacity of microalgae from subtropical coastal and brackish waters. **Food Chemistry**, v. 165, n. 0, p. 300-306, 12/15/2014.

AIM. Omega-3: a global market overview. 2014. Disponível em: < <http://www.algaeindustrymagazine.com/omega-3-a-global-market-overview/> >. Acesso em: 10 de junho de 2014.

BEN-AMOTZ, A.; AVRON, M. On the factors which determine massive β -carotene accumulation in the halotolerant alga *Dunaliella bardawil*. **Plant Physiology**, v. 72, n. 3, p. 593-597, 1983. ISSN 0032-0889.

BERGES, J. A. et al. Differential effects of nitrogen limitation on photosynthetic efficiency of photosystems I and II in microalgae. **Plant Physiology**, v. 110, n. 2, p. 689-696, 1996. ISSN 0032-0889.

BEZERRA, R. et al. Fed-Batch Cultivation of *Arthrospira platensis* Using Carbon Dioxide from Alcoholic Fermentation and Urea as Carbon and Nitrogen Sources. **BioEnergy Research**, v. 6, n. 3, p. 1118-1125, 2013/09/01 2013. ISSN 1939-1234. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s12155-013-9344-1> >.

BILANOVIC, D. et al. Freshwater and marine microalgae sequestering of CO₂ at different C and N concentrations – Response surface methodology analysis. **Energy Conversion and Management**, v. 50, n. 2, p. 262-267, 2009. ISSN 0196-8904. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0196890408003725> >.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A RAPID METHOD OF TOTAL LIPID EXTRACTION AND PURIFICATION. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, n. 8, p. 911-917, 1959/08/01 1959. ISSN 0576-5544. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1139/o59-099> >. Acesso em: 2014/02/11.

BMG. World beer production increased again in 2010. (B.Manager, Ed.). Beverage Manager. 2010. Disponível em: < <http://beveragemanager.net> >. Acesso em: 7 de abril de 2014.

BOROWITZKA, L.; BROWN, A. The salt relations of marine and halophilic species of the unicellular green alga, *Dunaliella*. **Archives of Microbiology**, v. 96, n. 1, p. 37-52, 1974/01/01 1974. ISSN 0302-8933. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/BF00590161> >.

CATALDO, D. A. et al. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid 1. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 6, n. 1, p.71-80,1975/01/01 1975.ISSN 0010-3624.Disponível em: < <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00103627509366547> >. Acesso em: 2014/02/11.

CHACÓN-LEE, T. L.; GONZÁLEZ-MARIÑO, G. E. Microalgae for “Healthy” Foods - Possibilities and Challenges. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 9,n.6, p. 655-675, 2010. ISSN 1541-4337. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1541-4337.2010.00132.x> >.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 3, p. 294-306, 5//2007. ISSN 0734-9750. Disponível em: <

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975007000262> >. Acesso em: 2007/6//.

DA FRÉ, N. C. et al. Influência da Temperatura e da Salinidade no Cultivo da Microalga *Dunaliella tertiolecta* em Fotobiorreator *Airlift*. X Oktoberfórum. 2011. Disponível em: <
<http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/37248/000821420.pdf?sequence=1> >.

DEWAPRIYA, P.; KIM, S.-K. Marine microorganisms: An emerging avenue in modern nutraceuticals and functional foods. **Food Research International**, v. 56, n. 0, p. 115-125, 2// 2014. ISSN 0963-9969. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996913006765> >.

FAZELI, M. R. et al. Carotenoids accumulation by *Dunaliella tertiolecta* (Lake Urmia Isolate) and *Dunaliella salina* (CCAP 19/18 and WT) under stress conditios. **DARU Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 14, n. 3, p. 146-150, 2006. ISSN 2008-2231.

FU, W. et al. Enhancement of carotenoid biosynthesis in the green microalga *Dunaliella salina* with light-emitting diodes and adaptive laboratory evolution. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 6, p. 2395-2403, 2013/03/01 2013. ISSN 0175-7598. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-012-4502-5> >.

GARCÍA-GONZÁLEZ, M. et al. Production of *Dunaliella salina* biomass rich in 9-cis- β -carotene and lutein in a closed tubular photobioreactor. **Journal of biotechnology**, v. 115, n. 1, p. 81-90, 2005. ISSN 0168-1656.

GUILLARD, R. L. Culture of Phytoplankton for Feeding Marine Invertebrates. In: SMITH, W. e CHANLEY, M. (Ed.). **Culture of Marine Invertebrate Animals**: Springer US, 1975. cap. 3, p.29-60. ISBN 978-1-4615-8716-3.

GUIRY, M.D. & GUIRY, G.M. 2014. *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>; searched on 1 July 2014.

HOSSEINI TAFRESHI, A.; SHARIATI, M. *Dunaliella* biotechnology: methods and applications. **Journal of Applied Microbiology**, v. 107, n. 1, p. 14-35, 2009. ISSN 1365-2672. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04153.x> >.

INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE, W. G., III. Climate change 2014 mitigation of climate change. [Geneva, Switzerland], 2014. Disponível em: < <http://ipcc.ch/report/ar5/wg3/> >.

KOCHEM, L. H. et al. Characterization of a Novel Flat-Panel Airlift Photobioreactor With an Internal Heat Exchanger. **Chemical Engineering & Technology**, v. 37, n. 1, p. 59-64, 2014. ISSN 1521-4125. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/ceat.201300420> >.

KRINSKY, N. I.; LANDRUM, J. T.; BONE, R. A. Biologic mechanisms of the protective role of lutein and zeaxanthin in the eye. **Annual review of nutrition**, v. 23, n. 1, p. 171-201, 2003. ISSN 0199-9885.

LAM, M. K.; LEE, K. T.; MOHAMED, A. R. Current status and challenges on microalgae-based carbon capture. **International Journal of Greenhouse Gas Control**, v. 10, n. 0, p. 456-469, 9// 2012. ISSN 1750-5836. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1750583612001673> >.

LICHTENTHALER, H. K.; BUSCHMANN, C. Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and Characterization by UV-VIS Spectroscopy. In: (Ed.). **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**: John Wiley & Sons, Inc., 2001. ISBN 9780471142911.

LOURENÇO, S. D. O. **Cultivo de microalgas marinhas : princípios e aplicações**. São Carlos: RiMa, 2006. ISBN 8576561131 9788576561132.

MARÍN, N. et al. Effect of nitrate concentration on growth and pigment synthesis of *Dunaliella salina* cultivated under low illumination and preadapted to different salinities. **Journal of Applied Phycology**, v. 10, n. 4, p. 405-411, 1998. ISSN 0921-8971.

MERCADANTE, A. Z.; BRITTON, G.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Carotenoids from Yellow Passion Fruit (*Passiflora edulis*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 10, p. 4102-4106, 1998/10/01 1998. ISSN 0021-8561. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/jf9801724> >. Acesso em: 2014/02/12.

MINOWA, T. et al. Oil production from algal cells of *Dunaliella tertiolecta* by direct thermochemical liquefaction. **Fuel**, v. 74, n. 12, p. 1735-1738, 12// 1995. ISSN 0016-2361. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/001623619580001X> >.

MOLINA GRIMA, E. et al. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. **Biotechnology Advances**, v. 20, n. 7-8, p. 491-515, 1// 2003. ISSN 0734-9750. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975002000502> >.

MURADYAN, E. A. et al. Changes in Lipid Metabolism during Adaptation of the *Dunaliella salina* Photosynthetic Apparatus to High CO₂ Concentration. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 51, n. 1, p. 53-62, 2004. ISSN 1021-4437. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1023/B:RUPP.0000011303.11957.48> >.

OILGAE. Nutraceuticals - An Added Bonus for Microalgae Biofuels Industry. 2011. Disponível em: < http://www.oilgae.com/mlist/archives/24_feb_2011.html >. Acesso em: 1 de maio de 2014.

OILGAE. Comprehensive Oilgae Report – Energy from Algae: Products, Market, Processes & Strategies. 2013. Disponível em: < http://www.oilgae.com/ref/report/Report_Sample.pdf >. Acesso em: 1 de maio de 2014.

OILGAE. The Comprehensive Guide for Algae-based Carbon Capture. 2014. Disponível em: < http://www.oilgae.com/ref/report/co2_capture/co2_capture.html >. Acesso em: 1 de maio de 2014.

OREN, A. A hundred years of *Dunaliella* research: 1905–2005. **Saline Systems**, v. 1, n. 1, p. 1-14, 2005/07/04 2005. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1186/1746-1448-1-2> >.

RICHER, S. et al. Double-masked, placebo-controlled, randomized trial of lutein and antioxidant supplementation in the intervention of atrophic age-related macular degeneration: the Veterans LAST study (Lutein Antioxidant Supplementation Trial). **Optometry - Journal of the American Optometric Association**, v. 75, n. 4, p. 216-229, 4// 2004. ISSN 1529-1839. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1529183904700494> >.

ROSENBERG, J. N. et al. Microalgal biomass production and carbon dioxide sequestration from an integrated ethanol biorefinery in Iowa: A technical appraisal and economic feasibility

evaluation. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, n. 9, p. 3865-3876, 10// 2011. ISSN 0961-9534. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S096195341100287X> >.

SHAISH, A.; BEN-AMOTZ, A.; AVRON, M. Production and selection of high β -carotene mutants of *Dunaliella bardawil* (Chlorophyta). **Journal of Phycology**, v. 27, n. 5, p. 652-656, 1991. ISSN 1529-8817. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.0022-3646.1991.00652.x> >.

VAN DEN HENDE, S.; VERVAEREN, H.; BOON, N. Flue gas compounds and microalgae:(Bio-) chemical interactions leading to biotechnological opportunities. **Biotechnology advances**, v. 30, n. 6, p. 1405-1424, 2012. ISSN 0734-9750.

WANG, B. et al. CO₂ bio-mitigation using microalgae. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 79, n. 5, p. 707-718, 2008/07/01 2008. ISSN 0175-7598. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-008-1518-y> >.

XU, Y.; ISOM, L.; HANNA, M. A. Adding value to carbon dioxide from ethanol fermentations. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 10, p. 3311-3319, 2010. ISSN 0960-8524. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852410000465> >.

ZANATTA, C. F.; MERCADANTE, A. Z. Carotenoid composition from the Brazilian tropical fruit camu-camu (*Myrciaria dubia*). **Food Chemistry**, v. 101, n. 4, p. 1526-1532, // 2007. ISSN 0308-8146. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814606003207> >.

ÇELEKLI, A.; DÖNMEZ, G. Effect of pH, light intensity, salt and nitrogen concentrations on growth and β -carotene accumulation by a new isolate of *Dunaliella* sp. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n. 2, p. 183-189, 2006. ISSN 0959-3993.

6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A biofixação do CO₂ de fermentações alcoólicas por microalga é uma boa alternativa para indústria de alimentos, pois aumenta a produção, de forma sustentável, de carotenoides naturais e lipídeos de alto valor agregado, além de reduzir custos por reciclar a matéria-prima mais cara para produção de microalgas, o CO₂. Os resultados deste trabalho demonstraram que a biomassa e os lipídeos praticamente duplicaram com a utilização do CO₂ proveniente da fermentação do mosto de cerveja em relação ao cultivo com CO₂ atmosférico, além de mostrar uma tendência a maior produção de carotenoides por células. Os resultados também mostraram a importância da distribuição progressiva deste CO₂ ao longo do cultivo e que a proporção de carotenoides não é modificada significativamente com a alteração de CO₂ injetado.

Como perspectivas futuras, tem-se o planejamento de novos cultivos, variando o volume de mosto de cerveja em quantidades diferentes das utilizadas até o momento, para otimizar ainda mais o processo. Outro estudo a ser realizado é a influência do nitrogênio para a produção de carotenoides, para isso serão realizados cultivos com diferentes concentrações de nitrato, além de realizar a caracterização dos lipídeos produzidos e estudar maneiras de aumentar a biofixação do CO₂ como, por exemplo, utilizar enzimas no cultivo. Planeja-se, também, utilizar o sistema integrado para cultivos semi-contínuos de microalgas e estudar a sua produtividade.

ANEXO

Possíveis impurezas no CO₂ na fermentação alcoólica (Swiegers *et al.*, 2005, *apud* Alcoholic Fermentation, 2010)

Fermentation byproduct	Characteristic odor description
Acetic acid	Sour, vinegary
Acetone	Nail varnish
Acetoin	Buttery, creamy
Aldehydes (various)	Buttery, fruity, nutty
Butanediol	Sweet, sickly
Butyric acid	Rancid butter
Carbonyl sulfide	Ether, chemical
Diacetyl	Buttery, cloying
Dimethyl sulfide	Quince, truffle, stagnant water
Diethyl sulfide	Ether, pungent
Dimethyl disulfide	Quince, asparagus, garlic
Diethyl disulfide	Garlic, rubber
Ethanal (acetaldehyde)	Sherry-like, bruised apple, oxidized, unpleasant
Esters (various)	Fruity, floral
Ethyl mercaptan, ethanethiol	Onion, garlic
Formic acid	Tart, pungent
Fumaric acid	Smoky, pungent
Glycerol	Mouthfeel, sweetness
Higher alcohols (various)	Pleasant floral → sickly fusel aromas
Hydrogen sulfide	Rotten egg
2-Mercaptoethanol	Burnt rubber
Methionol	Cooked cabbage, potato
Methyl mercaptan, methanethiol	Stagnant water, canned vegetable
Propionic acid	Cabbage, rancid