



PRODUÇÃO DE MICROALGAS EM FOTOBIORREATOR AIRLIFT

Lara Regina Soccol Gris, Anderson de Campos Paim, Elis Cristina Domeneghini, Cauã Brum Borges,
Jorge Otávio Trierweiler, Marcelo Farenzena

Grupo de Intensificação, Modelagem, Simulação e Controle de Processos
Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)
R. Eng. Luis Englert, s/n. Campus Central. CEP: 90040-040 - Porto Alegre - RS - BRASIL,
E-MAIL: {lara, andpaim, edomene, cauabrum, jorge, farenz}@enq.ufrgs.br

Resumo: As microalgas são microorganismos fotossintéticos com grande capacidade de biofixação de CO₂. A biomassa produzida, fonte potencial de energia renovável, pode ser convertida em biocombustíveis via processos termoquímicos ou bioquímicos. Neste trabalho, são estudados os efeitos da temperatura, concentração de CO₂ na corrente de aeração e intensidade luminosa no crescimento da microalga *Nannochloropsis oculata*. Os cultivos foram realizados em meio f/2 Guillard, salinidade de 33 g/l, taxa de aeração de 0,25 v.v.m., em fotobiorreator do tipo airlift. Seguiu-se um planejamento fatorial 2³, com ponto central em triplicata. As medidas de biomassa foram realizadas pela medida da absorbância em 570 nm e pela determinação do peso seco. A maior taxa específica de crescimento foi de 0,629 dia⁻¹, obtida nas condições de 27 °C, 2% CO₂ e 9000 lux. A maior produtividade em biomassa foi de 800 ± 60 mg/l, obtida nas condições de 24°C, 3% CO₂ e 7000 lux, ao final de 13 dias de cultivo.

Palavras-chave: Microalgas, *Nannochloropsis oculata*, fotobiorreator airlift, biocombustíveis, sequestro de CO₂.

1. Introdução

Os problemas relacionados ao aquecimento global são tema de estudos e discussões por todo o mundo. Em 2007, foi divulgado pelo *Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC)* o relatório AR4, que trata das bases científicas das mudanças climáticas. Este estudo conclui que o aquecimento global dos últimos 50 anos é causado pelas atividades humanas. O CO₂ é o principal gás causador do efeito estufa (GHC), sendo responsável por cerca de 77% das emissões totais em base CO₂-eq. A taxa de crescimento das emissões entre 1995 e 2004 foi de 0,92 GtCO₂-eq/ano. Somente em 2004, 38Gt de CO₂-eq foram emitidas no mundo por atividades humanas.

Conceitualmente, a redução de CO₂ na atmosfera pode ser feita de três formas: através da redução da queima de combustíveis fósseis, de sua captura na atmosfera, ou de seu uso, captura ou sequestro antes que ele entre na atmosfera. Espera-se que a biofixação de CO₂ e a produção de energia de biomassa serão medidas que servirão atenuar o acréscimo de CO₂ atmosférico e evitar futuras crises de energia (AMIN, 2009).

1.1. Potencial das microalgas

Microalgas são microorganismos movidos à energia solar que convertem dióxido de carbono majoritariamente em lipídios, proteínas e carboidratos. Cada quilograma de biomassa algal representa aproximadamente a redução de

1,83kg de CO₂ atmosférico. A maioria das microalgas são uma fonte rica de ácidos graxos ω-3 e ω-6 e aminoácidos essenciais, como a leucina, isoleucina, valina, etc. O óleo acumulado em quase todas as microalgas é principalmente rico em triglicerídeos (>80%), com um perfil de ácidos graxos ricos em C16 e C18, comparável com óleo de sementes de plantas, contendo ácidos esteárico, oléico, linoléico e palmítico. Através de processos termoquímicos ou biológicos, a biomassa pode ser convertida a potenciais biocombustíveis renováveis, incluindo o metano, biodiesel e biohidrogênio (AMIN, 2009; CHISTI, 2007; MENG *et al.*, 2009).

As microalgas crescem rapidamente, geralmente dobrando a biomassa em um período de 24h. O conteúdo médio de lipídios varia entre 1% e 70%, mas pode chegar a 90% do peso seco sob determinadas condições operacionais. Entre as biomassas, devido à sua estrutura ser mais simples, as microalgas têm geralmente uma maior eficiência fotossintética em relação a vegetais superiores, como as oleaginosas e as árvores (AMIN, 2009; CHISTI, 2007; MATA *et al.*, 2010; MENG *et al.*, 2009). A Tabela 1 considera a produção de lipídios a partir de microalgas em relação a outras oleaginosas, avaliando os rendimentos teóricos e a área necessária para produção. O estudo foi realizado considerando 50% da demanda por combustível nos Estados Unidos. Os rendimentos teóricos de uma alga com 30% de lipídios em peso seco chegam a ser 130 vezes superiores ao rendimento da soja, por exemplo, com base em dados

experimentais de produção em fotobiorreatores tubulares, por exemplo (CHISTI, 2007).

Tabela 1. Comparação de algumas fontes de lipídios.

Cultura	Rendimento em óleo (L/ha)	Área necessária (M ha) ^a	Percentual necessário da área de cultivo existente nos EUA
Milho	172	1540	846
Soja	446	594	326
Canola	1190	223	122
Jatropha	1892	140	77
Coco	2689	99	54
Palma	5950	45	24
Microalga ^b	136.900	2	1,1
Microalga ^c	58.700	4.5	2,5

^a Para atender 50% da demanda por combustíveis nos EUA.

^b 70% de óleo em peso seco.

^c 30% de óleo em peso seco.

(Fonte: CHISTI, 2007).

As vantagens da produção de microalgas como fonte de biomassa e lipídios não estão embasadas somente na maior produtividade em biomassa e na biofixação de CO₂, mas também em outros aspectos importantes:

- É possível produzir durante todo ano em regiões com boa disponibilidade de luz e temperatura adequada;
- Crescem em meio aquoso, mas precisam de menos água do que plantas terrestres, reduzindo a demanda por fontes de água doce;
- Crescem também em águas salobra e salgada;
- Podem ser cultivadas em terras não-aráveis, diminuindo os impactos ambientais associados ao uso de terras cultiváveis e não concorrendo com produção de alimentos, forragens, etc;
- Os nutrientes necessários ao cultivo de microalgas, principalmente nitrogênio e fósforo, podem ser obtidos a partir de águas residuais; portanto, além do fornecimento de meio de crescimento, existe um potencial para o tratamento de efluentes orgânicos da indústria agro-alimentar;
- Após a extração de óleo, a biomassa das algas resultante pode ser transformada em etanol, metano, ração animal ou ser usada como adubo orgânico devido a seu alto teor de N e P, ou simplesmente utilizada para a cogeração de energia (eletricidade e calor);
- A composição bioquímica das microalgas pode ser otimizada variando as condições experimentais, dependendo dos produtos de interesse (BRENNAN & OWENDE, 2010; MATA *et al.*, 2010).

Apesar de todo potencial envolvendo as microalgas, muitos autores são categóricos a respeito da necessidade de mais estudos para tornar a biofixação de CO₂ e a produção

da biomassa em biocombustíveis viável economicamente. (BRENNAN & OWENDE, 2010; CHISTI, 2007; MATA *et al.*, 2010). As pesquisas devem abordar, dentre outros, os seguintes aspectos:

- A seleção de espécies deve equilibrar os requisitos para a produção de biocombustíveis e extração de produtos de alto valor agregado;
- Alcance de maior eficiência fotossintética através do desenvolvimento contínuo de sistemas de produção;
- Desenvolvimento de técnicas para sucesso com monoculturas, redução da evaporação de água e de perdas de CO₂ por difusão;
- Aperfeiçoar o balanço energético após a contabilização de operações no bombeamento de água, transferência de CO₂, colheita e extração;
- Mais pesquisas com plantas em larga escala, pois há poucas plantas em operação para coleta de dados;
- Aproveitamento de gases de combustão que são impróprios em altas concentrações, devido à presença de componentes tóxicos como NO_x e SO_x (BRENNAN & OWENDE, 2010).

1.2. Tipos de cultivo

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

Microalgas, dependendo de sua espécie, apresentam três tipos principais de metabolismo:

- Autotrófico: utilização da luz como fonte de energia única que é convertida em energia química por meio de reações fotossintéticas;
- Heterotrófico: utilização apenas de compostos orgânicos como fonte de carbono e energia;
- Mixotrófico: realização da fotossíntese como a principal fonte de energia, embora compostos orgânicos e CO₂ sejam ambos essenciais. No metabolismo anfitrófico, subtipo de mixotrofia, os organismos são capazes de viver autotrófica ou heterotroficamente, dependendo da concentração de compostos orgânicos e intensidade de luz disponível. (MATA *et al.*, 2010);

Além do apelo pela biofixação de CO₂, atualmente a produção fotoautotrófica é o único método que é tecnicamente e economicamente factível para produção em grande escala de biomassa de algas para fins não energéticos (BRENNAN & OWENDE, 2010). Quanto ao regime de cultivo, há três tipos principais:

- Cultivos batelada ou estanque: caracterizados por modificações intensas na composição do meio de cultura ao longo do processo e pelo efeito de autosombreamento das células. As células são inoculadas no meio fresco no início do cultivo, não havendo nenhuma adição posterior de nutrientes. Nesse regime, há etapas de crescimento bem definidas: fase de aptação ou *lag*, fase exponencial ou logarítmica, fase de redução do crescimento ou de transição, fase estacionária, fase de declínio ou de morte. Esse tipo de cultivo é interessante para pesquisa, onde se deseja entender o comportamento do sistema frente às condições operacionais aplicadas. (LOURENÇO, 2006).
- Cultivos semicontínuos: caracterizadas pela substituição de parte do meio de cultivo em intervalos periódicos, geralmente quando a quantidade de biomassa presente já é alta. As curvas de crescimento típicas apresentam variações bruscas na densidade de células. Nesse tipo de cultivo a produtividade é elevada, bem como o consumo de nutrientes. A concepção atual de que microalgas constituem sistemas de alta produtividade advém em parte de cultivos semicontínuos (LOURENÇO, 2006).
- Cultivos contínuos: processo permanente de saída de cultura com microalgas e entrada de meio esterilizado no recipiente de cultivo. Pode ser feito através de dois sistemas de cultivo: turbidostato e quimiostato. Fornece células algáceas com maior uniformidade do que em outros tipos de cultivo. Pode ser necessários de dias ou até semanas para estabilizar esse regime de cultivo (LOURENÇO, 2006).

A limitação quanto ao uso de cultivos semicontínuos e contínuos está relacionada principalmente à contaminação por outros microorganismos. É extremamente difícil produzir cultivos monoalgáceos axênicos (ausentes de contaminantes microbianos), mesmo em escala de laboratório (LOURENÇO, 2006).

1.3. Sistemas de cultivo

Os sistemas atuais de produção de microalgas são baseados em lagoas abertas e em tecnologias de fotobiorreatores fechados. A viabilidade técnica de cada sistema é influenciada pelas propriedades intrínsecas das espécies de microalgas utilizadas, bem como as condições climáticas e os custos da terra e da água (BRENNAN & OWENDE, 2010). Até agora, o mercado da biomassa de microalgas produz cerca de 5000 t/ano de biomassa seca (MENG *et al.*, 2009), produzidas majoritariamente em sistemas abertos. Estes sistemas, embora apresentem menor produtividade, ainda são preferidos em função dos menores custos de instalação e manutenção. A Tabela 2

contempla de maneira geral as principais diferenças entre lagoas abertas (*raceways*) e fotobiorreatores (*PBRs*). A Figura 1 ilustra as interações que ocorrem em fotobiorreatores, evidenciando a dificuldade de otimização de tal equipamento.

Tabela 2. Comparação entre lagoas e fotobiorreatores.

Vantagens	Limitações
Lagoas <i>raceway</i>	
Relativamente barato; fácil de limpar; utiliza terras não agriculturáveis; baixa demanda de energia; fácil manutenção.	Produtividade baixa, requer grandes áreas; limitado a algumas espécies de microalgas; mistura, utilização de luz e CO ₂ pobres; culturas são facilmente contamináveis.
Fotobiorreatores (<i>PBRs</i>)	
Fácil controle do processo; ocupa menor área; maiores produtividades; boa utilização de luz e CO ₂ ; fácil de esterilizar; mistura eficiente.	Investimento e custos de operação altos, <i>scale up</i> difícil, inibição por O ₂ se não removido; stress por cisalhamento.

(Fontes: BRENNAN & OWENDE, 2010 ; MATA *et al.*, 2010).

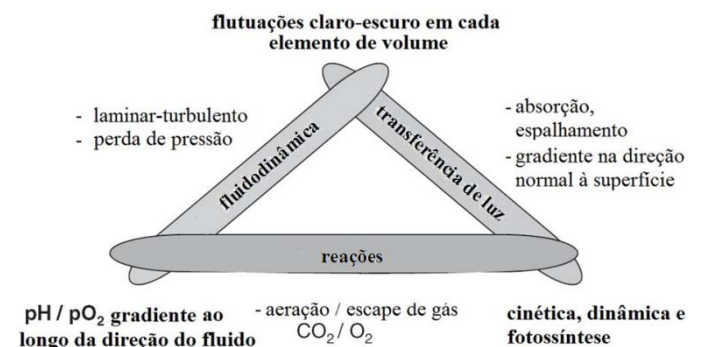


Figura 1. Interações entre fluidodinâmica, reações bioquímicas e transferência de luz em fotobiorreatores.

(Fonte: adaptado de POSTEN, 2009).

Muitos artigos de revisão envolvendo a geometria de fotobiorreatores têm sido publicados recentemente, mostrando as vantagens e desvantagens de diferentes sistemas de produção (BRENNAN & OWENDE, 2010; BOROWITZKA, 1999; CHISTI, 2007; MATA *et al.*, 2010; POSTEN, 2009). O sistema utilizado nesse estudo é do tipo *airlift* e suas características, vantagens e desvantagens são apresentadas a seguir.

O termo *reator airlift* abrange uma série de dispositivos pneumáticos de contato gás-líquido ou gás-líquido-sólido, que são caracterizados pela circulação de fluidos em um ciclo definido através de canais construídos para esse fim. O conteúdo do reator é pneumaticamente agitado por uma corrente de ar ou outros gases, e tem a importante tarefa de facilitar a transferência de massa entre o meio e a fase gasosa. Além disso, evita-se sedimentação e o contato entre as células e os nutrientes é favorecido. A principal diferença entre *arlifts* e coluna de bolhas reside no tipo de fluxo do fluido, que depende da geometria do sistema. (BRENNAN & OWENDE, 2010; MATA *et al.*, 2010; MERCHUK & GLUZ, 2002).

O fotobiorreator de coluna de bolhas é um vaso simples onde gás é injetado geralmente na parte inferior, e mistura aleatória é produzida pelas bolhas ascendentes. No *airlift*, a circulação do fluido é determinada pela concepção do fotobiorreator. O *riser* é o canal de gás ascendente e o *downcomer* é um canal separado para o fluxo descendente. Os dois canais estão ligados através da base, no fundo, e do separador de gás, no topo, para dar um circuito fechado. Momento, transferência de massa e de calor serão diferentes em cada seção, mas a geometria de cada uma pode influenciar o desempenho das outras, já que as quatro estão interligadas. (MERCHUK & GLUZ, 2002).

As boas perspectivas para fotobiorreatores *airlift* e coluna de bolhas incluem transferência de massa alta, boa mistura com baixa tensão de cisalhamento e baixo consumo de energia. As limitações incluem seu custo, e escalabilidade. Uma vez que o diâmetro e altura não podem ser muito maiores em função da absorção de luz e trocas gasosas, um grande número de unidades seria necessário para construção de uma planta comercial, por exemplo. (MATA *et al.*, 2010).

1.4. Objetivo

A necessidade de otimização da biofixação de CO₂ e da produção de microalgas e também da maximização de produtos que possam ser convertidos a biocombustíveis e/ou produtos de alto valor agregado é uma realidade. Ingressar nessa área é uma tarefa multidisciplinar. Por se tratar de um projeto inovador neste grupo de pesquisa, este trabalho tem como objetivo estudar o crescimento de uma microalga em fotobiorreator para determinação das melhores condições operacionais de crescimento e acúmulo de lipídios.

2. Materiais e Métodos

2.1. Seleção da microalga

Embora ainda não esteja determinado com exatidão, estima-se que o fitoplâncton marinho seja formado por pelo menos 5000 espécies (LOURENÇO, 2006). Uma série de publicações apresenta a composição bioquímica média de espécies de microalgas. As espécies mais citadas como pontenciais produtores de lipídios são apresentadas na Tabela 3.

Uma das vantagens importantes que as microalgas marinhas apresentam em relação às de água doce é o menor potencial de contaminação por bactérias e fungos devido à natureza salina dos meios de cultivo. Além disso, projetando cultivos em larga escala, com recursos naturais, é importante que se utilize o menor volume possível de água doce, evitando a concorrência com a produção de alimentos e com o próprio consumo humano e das indústrias. Dessa forma, este estudo direciona-se num primeiro momento para espécies oriundas do mar.

BORGES (2005) estudou o potencial de absorção de CO₂ de dez espécies diferentes de microalgas. A Eustigmatoficea *Nannochloropsis oculata* foi apontada como melhor opção, devido à sua maior produtividade e

conteúdo lipídico. Essa microalga, que tipicamente tem de 2 a 4 µm de diâmetro, é amplamente distribuída nos oceanos. Microalgas do gênero *Nannochloropsis* também se destacam por serem produtoras de um importante ácido graxo poliinsaturado essencial, o ácido eicopentanóico (EPA) (BROWN *et al.*, 1997; ZITTELLI *et al.*, 1999, ZOU *et al.*, 2000).

Tabela 3. Microalgas potencias na produção de biocombustíveis.

	Espécie	% lipídios em peso seco de biomassa
Microalgas marinhas	<i>Chaetoceros calcitrans</i> (diatomácea)	17,6
	<i>Dunaliella salina</i> (clorofíceia)	6,0 – 25
	<i>Dunaliella tertiolecta</i> (clorofíceia)	16,0 – 71,0
	<i>Isochrysis galbana</i> (primnesiofíceia)	7,1 - 33
	<i>Nannochloropsis oculata</i> (eustigmatofíceia)	22,7 - 29,7
	<i>Phaeodactylum tricorutum</i> (diatomácea)	18,0 – 57,0
	<i>Skeletonema costatum</i> (diatomácea)	13,5 - 51,3
Microalgas de água salobra e/ou doce	<i>Botryococcus braunii</i> (clorofíceia)	25,0 – 75,0
	<i>Chlorella vulgaris</i> (clorofíceia)	5,0 – 58,0
	<i>Neochloris oleoabundans</i> (clorofíceia)	29,0 – 65

(Fonte: CHIU *et al.*, 2009 ; MATA *et al.*, 2010).

Por tratar-se de um microorganismo robusto, que tem boa produtividade em relação à média e com bom potencial na produção de lipídios, a *Nannochloropsis oculata* é a espécie de microalga escolhida para este estudo. A cepa foi fornecida pelo Laboratório de Ecologia de Fitoplâncton e Microrganismos Marinhos, da Universidade Federal do Rio Grande. A sua composição bioquímica média, pode ser vista na Tabela 4.

Tabela 4. Composição da microalga *Nannochloropsis oculata*.

% em relação ao peso seco de biomassa			Fonte
Lipídios	Proteínas	Carboidratos	
16,2	-	-	BORGES, 2005.
3,4	21,3	11,0	CAMPOS <i>et al.</i> , 2010.
22,7-29,7	-	-	CHIU <i>et al.</i> , 2009.
18,0	35,0	7,8	LOURENÇO, 2006.

2.2. Meio de cultura e cuidados necessários

A infraestrutura básica para o cultivo de microalgas em laboratório requer basicamente um local climatizado, disponibilidade de água de boa qualidade, vidraria, adequada, reagentes para preparação de meio de cultura e equipamentos para esterilização e assepsia (LOURENÇO, 2006). O meio de cultura utilizado nesse estudo é o f/2 (Guillard, 1975), largamente utilizado em pesquisas com microalgas marinhas. Sua composição está na Tabela 5.

Tabela 5. Composição do meio f/2 (Guillard, 1975).

Solução (volume no meio final)	Reagente utilizado e sua concentração na solução estoque		
Água do mar ¹ (1000 ml)	-	-	
Nitrato (1 ml)	NaNO ₃	75 g/l	
Fosfato (1 ml)	NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	5 g/l	
Silicato (1 ml)	Na ₂ SiO ₃ .9H ₂ O	30 g/l	
Soluções estoque	CuSO ₄ .5H ₂ O	9,8 mg/l	
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	22,2 mg/l	
	CoCl ₂ .6H ₂ O	10 mg/l	
	Metais-traço (1 ml)	MnCl ₂ .4H ₂ O	180 mg/l
		Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	6,3 mg/l
		FeCl ₃ .6H ₂ O	3,15 g/l
	Na ₂ EDTA	4,36 g/l	
Vitaminas (1ml)	Tiamina (B ₁)	100 mg/l	
	Cianocobalamina (B ₁₂)	0,5 mg/l	
	Biotina (B ₇)	0,5 mg/l	

¹ Solução salina do sal comercial *Red Sea* (33 ± 1 g/l).

Fonte: (LOURENÇO, 2006).

A manutenção da cepa mãe e dos inóculos utilizados foi realizada em uma incubadora montada no laboratório, dotada de controle de temperatura e fotoperíodo. A repicagem para renovação dos cultivos foi efetuada a cada 10 dias até sua utilização.

Toda vidraria utilizada no trabalho foi esterilizada em autoclave a 121 °C, 2 bar por 30 min. Quanto às soluções utilizadas na preparação do meio de cultivo (sal marinho, nitrato, fosfato, silicato e metais), foram igualmente autoclavadas, com exceção da solução de vitaminas, que é esterelizada por filtração (filtro de 0,22 µm de poro) para evitar degradação térmica.

Após a autoclavagem, a manipulação de todo material que direta ou indiretamente entra em contato com os cultivos foi feita em capela de fluxo laminar vertical ou em chama esterilizante.

2.3. Planejamento experimental

CHIU *et al.* (2009) estudaram o efeito de diferentes concentrações de CO₂ na alimentação de cultivos semicontínuos de *Nannochloropsis oculata*, avaliando o crescimento e o acúmulo de lipídios em fotobiorreator cilíndrico. Os melhores rendimentos em biomassa e lipídios são verificados para 2 % de CO₂ na corrente de aeração. Além disso, os resultados mostram que concentrações de CO₂ de 5 a 15% podem inibir o crescimento algal.

CONVERTI *et al.* (2009) avaliaram a influência da temperatura e da concentração de nitrogênio no crescimento e acúmulo de lipídios de *Nannochloropsis oculata*. Para os experimentos realizados em erlenmeyers, a maior taxa de crescimento ocorreu em 20 °C, e os maiores acúmulos de lipídios ocorreram em 15 e 25 °C. Quanto à influência do nitrogênio, a melhor condição coincide com a concentração de nitrato utilizado neste

trabalho.

SPOLAORE *et al.* (2006) otimizaram o crescimento de *Nannochloropsis oculata* em fotobiorreator de coluna de bolhas, avaliando temperatura, intensidade luminosa, pH e taxa de aeração. As condições ótimas de crescimento foram 21 °C, 52 µE m⁻² s⁻¹, pH 8,4 e 0,245 v.v.m de taxa de aeração.

Considerando estudos anteriores em diferentes sistemas de cultivo, este trabalho teve como variáveis de interesse a temperatura, luminosidade e concentração de CO₂ na corrente de aeração, seguindo um planejamento fatorial 2³ com 3 replicatas no ponto central, totalizando 11 experimentos. O experimento foi realizado com salinidade de 33±1 g/l (padrão para o sal marinho comercial *Red Sea*), fotoperíodo 12h/12h claro escuro, 0,25 v.v.m (volume de ar por volume de líquido por minuto, equivalente a vazão de ar de 750 ml/min). Os níveis das variáveis e o respectivo experimento associado estão representados na Tabela 6. Este bloco fará parte de um delimitamento composto central rotacional em análises futuras.

Tabela 6. Matriz do planejamento experimental adotado neste trabalho.

Experimento	Temperatura (°C)		% CO ₂		Intensidade luminosa (lux; µE m ⁻² s ⁻¹)	
	Valores codificados e originais das variáveis					
P2-2	-1	21	-1	2	-1	5000; 70
P2-1	1	27	-1	2	-1	5000; 70
P2-4	-1	21	1	4	-1	5000; 70
P2-3	1	27	1	4	-1	5000; 70
P3-2	-1	21	-1	2	1	9000; 126
P3-1	1	27	-1	2	1	9000; 126
P3-4	-1	21	1	4	1	9000; 126
P3-3	1	27	1	4	1	9000; 126
P1-1	0	24	0	3	0	7000; 98
P1-2	0	24	0	3	0	7000; 98
P1-3	0	24	0	3	0	7000; 98

2.4. Fotobiorreator airlift

Os fotobiorreatores *airlift* utilizados nesse estudo foram construídos em acrílico, apresentam formato retangular e têm as dimensões representadas na Figura 2, com volume útil de três litros. A aeração é feita por duas pedras porosas situadas na parte inferior do *riser*. A troca térmica do sistema é feita por correntes que circulam em tubos de aço inox 316 de ¼" inseridos no *downcomer*. A mistura de CO₂ e ar para alimentação dos fotobiorreatores foi feita com rotâmetros de ar. Para verificar a composição das misturas foram feitas análises por cromatografia gasosa antes do início dos cultivos. Os dados obtidos no cromatógrafo Perkin Elmer AutoSystemXL foram avaliados considerando fatores de resposta (DIETZ, 1967). As intensidades luminosas especificadas na Tabela 6 foram medidas com o auxílio de um luxímetro

Instrutherm LD-200 na superfície de cada fotobiorreator. A temperatura dos fluidos de refrigeração/aquecimento foram controladas por controladores digitais de temperatura Fullgauge TIC-17RGTi; a temperatura dos cultivos foi monitorada diariamente.

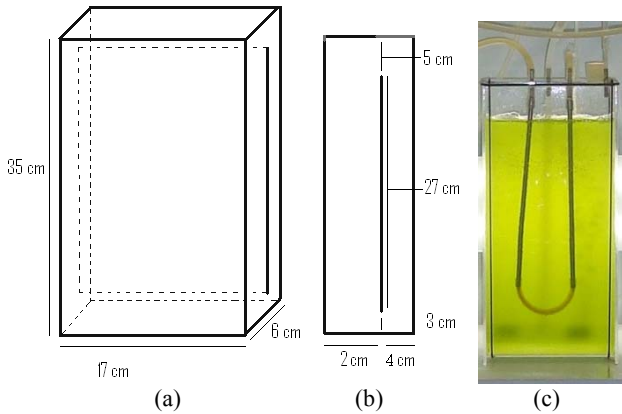


Figura 2. Fotobiorreator *airlift* utilizado.

(a) Dimensões e vista frontal. (b) Dimensões e vista lateral. (c) Fotobiorreator em experimento.

2.5. Preparo do inóculo

O inóculo para os cultivos foi preparado em erlenmeyer de 6l, com 4l de cultura, salinidade de 33 ± 1 g/l, 25 ± 1 °C, 6200 lux, fotoperíodo 12h/12h claro escuro, e alimentação de ar filtrado constante de 0,25 v.v.m. Foi determinada uma curva de crescimento para este sistema, sendo o fim da fase logarítmica de crescimento verificado após 10 dias de cultivo (absorbância próxima de um); portanto, para os cultivos nos fotobiorreatores foram utilizados inóculos com dez dias de crescimento. A relação inóculo/meio de cultura nos fotobiorreatores é de 1:10; dessa forma, 0,3 l de inóculo e 2,7 l de meio fresco foram adicionados em cada fotobiorreator, o que leva a medidas iniciais de absorbância equivalentes a 0,1 nos experimentos.

2.6. Medida de biomassa

O uso de densidade óptica para avaliar o crescimento de microalgas baseia-se na obstrução física da luz pelas células. Uma vez que microalgas possuem pigmentos fotossintetizantes, convém selecionar comprimentos de onda que não correspondam ao pico de absorção de luz pelas clorofilas e carotenóides, que são valores tipicamente maiores que 600 nm. Em 570 nm, a absorção fundamentalmente é atribuída à obstrução física da passagem da luz pelas células em suspensão. (LOURENÇO, 2006). A absorbância das culturas de cada um dos fotobiorreatores foi diariamente medida em Espectrofotômetro UV-1600 Pró-Análise, no comprimento de onda de 570 nm. Cada amostra foi diluída para a absorbância ficar entre 0,1 e 1,0 caso necessário.

Após finalizados os cultivos, foram realizadas medidas de peso seco com amostras de dois fotobiorreatores correspondendo ao ponto central, para posterior correlação com as medidas de absorbância realizadas. O volume de um litro de cultivo de cada um dos fotobiorreatores foi filtrado em filtros GF-3 MN, de 0,6

µm, previamente pesados. Os filtros foram colocados em estufa para secagem a 105 °C por 24 h.

3. Resultados e Discussões

Através do cálculo de peso seco, a relação obtida entre a absorbância em 570 nm e a massa de microalgas é dada pela Equação (1)

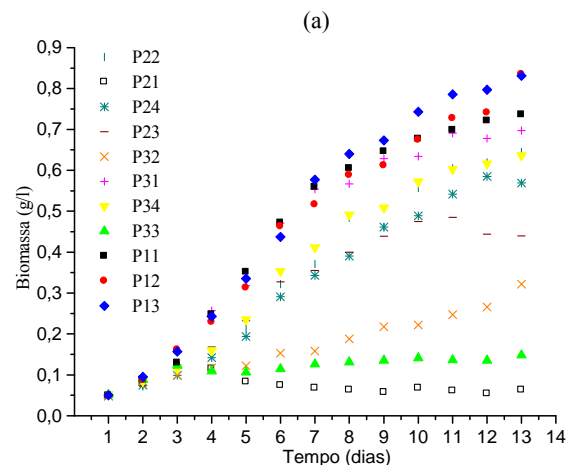
$$Biomassa \text{ (g/l)} = 0,3984 \times Abs_{570 \text{ nm}} \quad (1)$$

Em geral o acúmulo de lipídios nas microalgas ocorre majoritariamente durante a fase estacionária (CHIU *et al.*, 2009; BROWN *et al.*, 1997; MATA *et al.*, 2010). Por essa razão, a interrupção dos cultivos foi realizada somente nos 13º dia, quando foram verificadas pequenas diminuições na absorbância de alguns cultivos com absorbância crescente até então.

A produção de biomassa e as curvas de crescimento obtidas nos experimentos podem ser visualizados na Figura 3. A maior produção de biomassa foi de 800 ± 60 mg/l, obtido nos fotobiorreatores do ponto central (P1-1, P1-2 e P1-3), nas condições de 24 °C, 3% de CO₂ e 7000 lux. A taxa específica de crescimento (μ) é dada pela equação (2)

$$\mu = \frac{1}{t} \ln \left(\frac{X_f}{X_i} \right) \quad (2)$$

onde X_f e X_i são as concentrações de biomassa no final e no início de cada batelada, respectivamente, e t é o intervalo de amostragem (CHIU *et al.*, 2009; CONVERTI *et al.*, 2009). A maior taxa específica de crescimento foi de $0,629 \text{ dia}^{-1}$, verificada em 27 °C, 2% de CO₂ e 9000 lux (P3-1), durante o 1º e 2º dia de cultivo. Para os demais experimentos, as maiores taxas também foram observadas nos primeiros dias de cultivo. Essa rápida adaptação indica que as condições em que o inóculo foram produzidas são adequadas, pois pequenos períodos de adaptação são desejados.



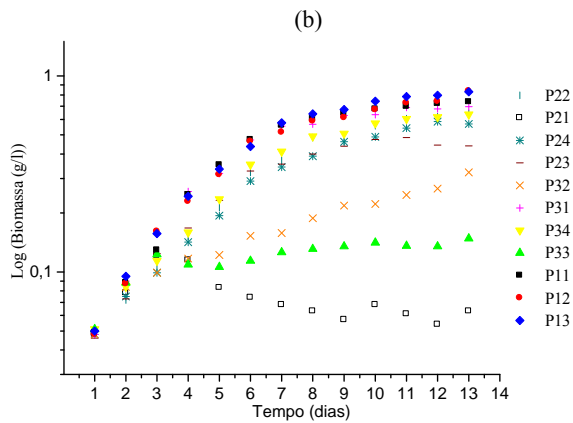


Figura 3. Resultados experimentais.
(a) Variação da concentração de biomassa com o tempo.
(b) Curvas de crescimento.

Os dados referentes à produtividade final de cada experimento realizado foram estatisticamente avaliados através do programa *Statistica 7.1 (StatSoft Inc)*. Realizando a análise da variância (ANOVA) considerando efeitos lineares e efeitos de interação entre as variáveis de estudo, os dados da Tabela 7 são verificados com 95% de significância.

Tabela 7. Análise de variância para a produtividade em biomassa.¹

Fator	Efeito	SQ	GL	MQ	F	p
T	Linear	0,0848	1	0,0848	27,02	0,035066
CO ₂	Linear	0,0005	1	0,0005	0,17	0,717550
I	Linear	0,0009	1	0,0009	0,29	0,641795
T x CO ₂	Interação	0,0210	1	0,0210	6,69	0,122571
T x I	Interação	0,0447	1	0,0447	14,23	0,063622
CO ₂ x I	Interação	0,0359	1	0,0359	11,43	0,077426
Falta de ajuste		0,5002	2	0,2501	79,65	0,012398
Puro erro		0,0062	2	0,0031		
Total SQ		0,6945	10			

¹ efeito significativo $p < 0,05$; SQ = soma dos quadrados; GL = graus de liberdade; MQ = mínimos quadrados; F = valor de F; p = probabilidade.; T= temperatura; CO₂ = concentração de CO₂ na corrente de aeração; I = intensidade luminosa.

A falta de ajuste foi o fato mais relevante na análise realizada e inviabiliza qualquer conclusão bem fundamentada nesse momento a respeito da influência das variáveis independentes na produção de biomassa. Com efeitos lineares e de interação entre as variáveis o valor de R² obtido foi igual a 0,2706, embora o valor do erro puro verificado tenha sido de 0,0031.

A falta de ajuste dos dados ao modelo pode ser atribuída basicamente a duas razões: o modelo utilizado não é adequado e/ou há erro significativo nos dados. Essa segunda hipótese pode parecer inválida considerando o baixo valor obtido para o erro puro. Porém, cabe salientar que as informações a respeito da reprodutibilidade do experimento são oriundas das três replicatas no ponto central, onde as condições experimentais estão sujeitas ao

mesmo sistema de controle de temperatura, intensidade luminosa e concentração de CO₂. Portanto, por mais que tenha ocorrido flutuação nas condições experimentais desejadas, os três pontos experimentais sofreram a mesma interferência. Por outro lado, problemas em relação à manutenção das variáveis manipuladas comprometem muito a relação entre todos os pontos do experimento, sujeitos a diferentes sistemas de controle das variáveis de estudo. No caso específico do conjunto de pontos experimentais realizados, as maiores fontes de distúrbio estiveram relacionadas à dosagem de CO₂ na corrente de aeração e da transferência de massa entre alguns fotobiorreatores, fatos que são comentados a seguir.

No sistema *airlift* em estudo, é razoável contar com perda de água por evaporação. Porém, no decorrer dos experimentos, houve também significativo arraste de meio de cultura através do orifício de saída de gases do fotobiorreator (localizado na tampa). Isso ocorreu por causa da pressão ocasionada pela corrente de aeração. Inicialmente, os orifícios de coleta de saída de gases de cada um dos sistemas estavam interconectados, ocasionando troca de massa entre os sistemas.

Desconectando as saídas de ar e deixando-as livres para o meio, o arraste continuou ocorrendo. Nessas perdas, não somente meio de cultura, mas também microalgas foram arrastadas para fora dos fotobiorreatores. Como o separador de gases do sistema deste estudo tem aproximadamente cinco centímetros de altura, no decorrer do experimento foram necessárias reposições de meio de cultura para que se mantivesse o fluxo no interior do sistema *airlift*; o volume necessário para cada sistema foi diferente, o que, juntamente com a perda de células, constitui uma das fontes de distúrbio e consequentemente de erro nos experimentos.

Embora as composições das correntes de alimentação de ar/CO₂ tenham sido ajustadas por cromatografia gasosa antes do início dos cultivos, cabe ressaltar que as misturas são feitas por rotômetros de ar, que apresentam baixa precisão comparada à de medidores mássicos de vazão, por exemplo. Sendo assim, é razoável concluir que o erro nos experimentos também está provavelmente relacionado à dosagem de CO₂. Outra influência do CO₂ refere-se ao pH do meio. O meio *t/2* apresenta pH $8,0 \pm 0,1$ em condições normais, sem adição de tampão, se assemelhando muito à água do mar, *habitat* natural das microalgas (LOURENÇO, 2006). Monitorando diariamente o pH dos cultivos, verificou-se que em todas condições experimentais estudadas o pH se encontrava na faixa de 6 a 7. Além disso, embora o fotoperíodo utilizado nesse estudo seja de 12h/12h claro escuro, as correntes de aeração foram continuamente alimentadas com CO₂. Isto pode ter ocasionado inibição no crescimento, já que há estudos aponta o pH ótimo de crescimento igual a 8,4 para cultivo de *Nannochloropsis oculata*. (SPOLAORE *et al.*, 2006). A inibição também desfavorece a obtenção de dados confiáveis.

Com relação ao modelo, a ausência de informações sobre os pontos axiais impede a utilização de termos quadráticos associados às variáveis. A realização de

experimentos nos pontos axiais permitirá avaliar a adequação dos dados a um modelo mais abrangente, com termos lineares e quadráticos.

4. Conclusão

Os experimentos realizados foram inconclusivos em função da falta de ajuste dos dados obtidos ao modelo proposto. Houve problemas na manutenção das condições experimentais propostas em função da dificuldade de manter a concentração de CO₂ no valor estabelecido e de problemas relativos à transferência de massa entre os fotobiorreatores. Outro fator que prejudicou a produtividade em biomassa está associado a valores de pH próximos de 6 em todos experimentos. Como próximos passos, será considerada a utilização de tampão no meio de cultivo, o que deverá contribuir na manutenção do pH alcalino, favorecendo o crescimento da *Nannochloropsis oculata*. Os experimentos serão repetidos e reavaliados após a adição de dados relacionados aos pontos axiais, partindo de um modelo com termos lineares, quadráticos e efeitos de interação. Quanto às misturas de ar e CO₂, serão buscadas alternativas para atingir precisão nas dosagens. O problema de arraste de meio cultivo deverá ser solucionado pela inserção de um balão no orifício de coleta de saída de gases, o que promove o retorno do líquido arrastado ao sistema. A análise do teor de lipídios deverá indicar qual a relação entre seu acúmulo e o crescimento de biomassa no sistema em estudo.

5. Agradecimentos

À UFRGS e ao Departamento de Engenharia Química pela estrutura oferecida, em especial aos laboratórios LACIP, LATEQ, LATEPA e Central Analítica e aos seus membros. À CAPES pela bolsa de mestrado e à FAPERGS por recursos para realização do projeto. Ao professor Paulo Cesar Abreu, do LABFITO da FURG, por ceder o microorganismo em estudo. À professora Rosane Rech pelas sugestões e fundamental contribuição na avaliação dos resultados. Aos membros da banca, Cassiano Ranzan e Luciane Ferreira Trierweiler, pelas sugestões.

6. Referências

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

BORGES, L. do V. *Caracterização do potencial de absorção do dióxido de carbono atmosférico por microalgas utilizadas na agricultura para geração de um mecanismo de desenvolvimento limpo (MDL)*. Dissertação de Mestrado, FURG, Rio Grande, RS, Brasil, 2005.

BOROWITZKA, M. A. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. *Journal of Biotechnology*, v. 70, pg. 313–321, 1999.

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

BROWN, R. *et al.* Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture*, v.51, pg. 315-331, 1997.

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

CHIU, S.-Y. *et al.* Lipid accumulation and CO₂ utilization of *Nannochloropsis oculata* in response to CO₂ aeration. *Bioresource Technology*, v.100, p.833–838, 2009.

CONVERTI, A. *et al.* Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. *Chemical Engineering and Processing*, v.48, p.1146–1151, 2009.

DIETZ, W. A. Response factors for Gas Chromatographic Analyses. *Journal of Gas Chromatographic*, 1967.

LOURENÇO, S. O. *Cultivo de Microalgas Marinhas: Princípios e Aplicações*. RiMa, 2006.

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, p. 217-232, 2010.

MENG, X. *et al.* Biodiesel production from oleaginous microorganisms. *Renewable Energy*, v. 34, pg. 1-5, 2009.

MERCHUK, J. C.; GLUZ, M. *Bioreactors, Air-lift Reactors. Encyclopedia of Bioprocess Technology*. John Wiley & Sons, Inc. All, 2002.

POSTEN, C. Review: Design principles of photobioreactors for cultivation of microalgae. *Engineering in Life Sciences*, v.9, n° 3, pg. 165–177, 2009.

SPOLAORE, P. *et al.* Optimization of *Nannochloropsis oculata* growth using the response surface method. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v.81, pg. 1049–1056, 2006.

ZITTELLI, G. C. *et al.* Production of eicosapentaenoic acid by *Nannochloropsis* sp. cultures in outdoor tubular photobioreactors. *Journal of Biotechnology*, v. 70, p.299–312, 1999.

ZOU, N. *et al.* Production of cell mass and eicosapentaenoic acid (EPA) in ultrahigh cell density cultures of *Nannochloropsis* sp. (Eustigmatophyceae). *European Journal of Phycology* v. 35: 2, pg. 127 -133, 2000.

Página da internet:

Intergovernmental Panel on Climate Change
www.ipcc.ch