

Monografia

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOMASSA A PARTIR DE MICROALGAS SOB
A INFLUÊNCIA DE TEMPERATURA E NUTRIENTES**

Thalisson Costa de Souza

Natal, Junho de 2015

THALISSON COSTA DE SOUZA

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOMASSA A PARTIR DE MICROALGAS SOB
A INFLUÊNCIA DE TEMPERATURA E NUTRIENTES**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
à Universidade Federal do Rio Grande do Norte
como exigência parcial para obtenção do título
de Bacharel em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Humberto Neves Maia de Oliveira

NATAL

2015

RESUMO

Diante de um cenário energético cada vez mais voltado para as fontes de energias alternativas, novas fontes de energia limpa motivam a pesquisa realizada. Com o intuito de buscar fontes diferentes até mesmo das convencionais ao ramo de energia limpa, chegamos às Microalgas, microrganismos fotossintetizantes onde têm sua biomassa composta em parte por uma cadeia lipídica rica, que manuseada da forma correta é capaz de gerar biodiesel. Estas microalgas, além de simplesmente serem apresentados como fonte de energia, possuem uma fixação de CO₂ considerável, em relação à outras fontes, fazendo desta um diferencial em energia limpa, sem contar também com o aspecto socioeconômico, o desenvolvimento da cultura de microalga, ocupa um espaço físico bem inferior, quando se comparado com outras fontes biodiesel, e não gera competição em outras áreas econômicas. Afim de explorar esta fonte, a pesquisa volta-se para estudar a produção de biomassa no cultivo de microalga utilizando energia solar como fonte luminosa. O estudo do cultivo analisa dois fatores essenciais para a produção da biomassa de microalga *Isochrysis galbana*: temperatura e nutrientes. Visando controlar estas duas variáveis no cultivo, uma configuração para o sistema de cultivo foi montada de modo que se pudesse expor o cultivo à luz solar sem exceder a temperatura máxima suportada (35°C) pelo microrganismo. Um reator, montado interno ao laboratório de pesquisas, acondiciona o cultivo de 4 litros de volume e este é bombeado por uma bomba centrífuga à uma vidraria exposta ao sol, onde ao ser analisado a variação de temperatura ao longo do dia, definimos que esta configuração satisfaz a necessidade de não desnaturar o microrganismo pelo excesso de temperatura. Com esta configuração o cultivo foi realizado com técnicas de alimentação estudada em literatura, modificado, à qual compreende em nutrir a cultura com soluções de nitrato, fosfato, metais e vitaminas. Definido os nutrientes, uma alimentação diferenciada foi realizada em cada cultivo, elevando a concentração de um nutriente em relação aos outros, à fim de obter uma dimensão da influencia de cada nutriente no crescimento e produção da biomassa. Os resultados mostram de fato que uns nutrientes influenciam mais que outros, e alguns chegam a prejudicar o cultivo em grande quantidade, como o excesso de traços de metais. Com isto o trabalho possibilita mostrar aquilo que foi proposto em seu objetivo, avaliar a influencia da alimentação e traçar uma curva de temperatura do cultivo exposto ao sol pela configuração adotada.

SUMÁRIO

1-INTRODUÇÃO	5
2-REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
2.1-Trabalhos Desenvolvidos na Área	7
2.2-Fundamentação teórica.....	9
2.2.1-Biodiesel	9
2.2.2-Microalgas	11
2.2.3-Produção de Biomassa e Cultivo de Microalgas	12
2.2.4-Tipos de Fotobiorreatores.....	13
2.2.4.1-Fotobiorreator Tubular.....	13
2.2.4.2-Placa Plana	14
2.2.4.3-Coluna Vertical	14
2.2.5-Desinfecção do Meio de Cultivo	14
3-METODOLOGIA	16
3.1-Microorganismos.....	16
3.2-Sistema de Cultivo.....	16
3.3-Inóculos	17
3.4-Meio de Cultivo.....	17
3.5-Análise de Crescimento.....	18
3.6-Influencia Nutricional.....	19
4-RESULTADOS E DISCUSSÕES	20
4.1-Volumes de Operação e Faixas de Temperatura	20
4.2-Contagem e Crescimento.....	26
4.3-Influencia Nutricional no Crescimento	27
5-CONCLUSÃO	31

1 - INTRODUÇÃO

Com a demanda de petróleo reduzindo com o passar dos anos é indiscutível o fato de que esta fonte energética um dia irá se esgotar, o que nos leva a fazer previsões sobre a sobrevivência deste recurso, trazendo consigo resultados cada vez mais preocupantes à nossa realidade. Estima-se que com o presente ritmo de exploração do petróleo, todas as reservas conhecidas serão esgotadas em 2046.(ANP. 2005). Em vista desse futuro iminente, estudos e exploração de energias renováveis vem ao longo dos anos cada vez mais sendo incentivados e aplicados com sucesso no cenário nacional e mundial. Motivado por este contexto, pesquisas foram iniciadas para se obter fontes de energia limpa e renovável.

Os biocombustíveis surgiram como resultado a essas pesquisas. Derivados de biomassa renovável, podem substituir parcialmente ou totalmente os combustíveis fósseis em motores a combustão. Dois dos biocombustíveis mais usados no Brasil são os provenientes da cana-de-açúcar e o biodiesel advindo de óleos vegetais e gordura animal. Essas fontes de energia chegam a uma proporção de 45% de energia e 18% dos combustíveis consumidos no Brasil, enquanto no resto do mundo 86% da energia ainda provem de fontes não-renováveis.(ANP 2012).

O biodiesel adentrou ao cenário energético como um ótimo substituinte ao diesel de petróleo, usado em motores de caminhões, tratores e máquinas geradoras de energia. Ao final da década de 1990 o Brasil dirigiu sua atenção ao biodiesel e deu um grande salto na área ao criar em 2004 o Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel(PNPB).(Ministério de Minas e Energia). Produzido a partir do óleo de plantas e animais, o biodiesel também pode ser produzido a partir de microalgas, pequenos seres fotossintetizantes capazes de converter dióxido de carbono em lipídio contido em sua biomassa.(Chisti, 2007). O biodiesel de microalga se mostrou com grande potencial de rendimento de óleo em comparação a outras fontes de biodiesel.(Chisti 2007).

A produção de biodiesel de microalga, além do aspecto socioeconômico, tem a vantagem de ser uma energia de origem de baixo custo em relação à outras fontes de biomassa e alto valor ambiental, onde esta produz oxigênio e consome CO₂ em larga escala, tornando cada vez mais viável o incentivo a pesquisa.

Tendo em vista o exposto, o objetivo da pesquisa baseia-se em estudar faixas de temperatura ótima e concentração ideal de nutrientes, aos quais irão fazer parte do cultivo, onde este será feito em fotobiorreator solar, já que na região em que vivemos temos abundância presença de luz, dispensando luz artificial e assim consequentemente mais um

gasto para a produção. Assim, visando uma melhor produção de biomassa à baixo custo, proveniente de microalga, com bom rendimento de lipídios resultando na fonte de biodiesel combustível.

Portanto, uma fonte de energia limpa, renovável, de mínimo impacto ambiental que se apresenta como substituinte de um dos derivados do petróleo passa a ser boa alternativa de energia a ser explorada, vislumbrando um horizonte onde consumo de energia pode ser feito sem danos e sem cessar.

2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A produção de biodiesel proveniente de microalga ainda não faz parte das pesquisas mais realizadas na comunidade científica. No entanto, diversas frentes são trabalhadas no que tange espécies e formas de cultivo, catalogando as melhores espécies para produção e rendimento e melhores formas de cultivo com finalidade de se obter um biodiesel mais rentável e qualitativo.

2.1 – Trabalhos Desenvolvidos Na Área

Em 2011 Carolino, L.R.V. realizou em Lisboa, estudos para o cultivo de microalgas usando outras duas espécies diferentes, *Ankistrodesmus fusiformis* e *scenedesmus* sp.1, caracterizando seus crescimentos e analisando o rendimento das mesmas no sequestro de carbono e produção de biomassa quanto ao rendimento de lipídios destas. O cultivo permitiu uma análise a qual se pôde evidenciar um crescimento de biomassa para as espécies estudadas, definindo semelhantes potenciais de produção de biocombustíveis para essas espécies de microalgas.

Chisti, Yusuf. (2007) Apresentou uma pesquisa que tinha por finalidade dimensionar o potencial do cultivo de microalgas como fonte de biomassa rica em lipídios para se produzir biodiesel. Bons resultados foram obtidos e concluiu-se que cultivo de microalga é uma prática de baixo custo e ótimo retorno lipídico em relação a outras fontes de biodiesel.

Em 2010 Chagas, B.M.E. submeteu a microalga *Isochrysis galbana* à um estresse nutricional, condicionando o meio de cultura à fim de se obter um maior sucesso na mitigação do CO₂ e uma maior produção de biomassa rica em lipídios e ácidos graxos. Não observou grande diferença no crescimento mediante estresse nutricional desde que o nitrogênio mínimo necessário seja presente sempre, no cultivo. Porém o acúmulo de lipídio teve crescimento notável em culturas estressadas.

Da Fré, N.C. et al. (2011) estudou o comportamento da cultura da microalga *Dunaliella tertiolecta* sob influência da temperatura e da salinidade do meio em foto biorreator airlift. O estudo teve como conclusão uma faixa ideal de temperatura e salinidade para cultivo e maior produção de biomassa, como também maior rendimento de lipídios desta, para uma fixação ideal de carbono(CO₂).

Roleda, M.Y. et al. (2013) estudou mais especificamente faixas de temperaturas ideais para o cultivo da microalga e meios nutricionais que proporcionam uma melhor produção de biomassa tanto quantitativamente quanto qualitativamente de seis tipos diferente de

microalgas. Concluiu uma forte correlação negativa entre os parâmetro com o crescimento e rendimento de massa e de óleo no cultivo dos seis tipos de microalga utilizados.

Rukminasari, Nita. (2013) este estudo foi feito de maneira que as condições nutricionais foram mínimas e o meio foi submetido a um estresse de temperatura, verificando assim a produção de biomassa e quantidade de lipídios dos mesmos nas condições submetidas. Em conclusão o projeto mostrou que as variações dos parâmetros estudados tem forte influencia na produção de biomassa, não apenas variando a produção de lipídios mas afetando o crescimento das microalgas.

Picardo, M.C. (2012) desempenhou um estudo com finalidade de se fazer cultivo de microalga para se estudar a produção de óleo proveniente dessa biomassa e quantificar o carbono(CO₂) sequestrado, à partir de um fotobiorreator piloto dimensionado para a operação. Tal projeto obteve sucesso nos seus estudos, mostrando que o cultivo teve satisfatório rendimento na produção com o reator utilizado em todos os meios estudados, no que tange a avaliação do sequestro de carbono para maior eficiência na produção, como também foi notificado variações de fatores que não favoreceram tanto o crescimento. Quanto a qualidade da biomassa no que se refere a produção de óleo combustíveis, também foi notado ótimo rendimento.

2.2 – Fundamentação Teórica

2.2.1 Biodiesel

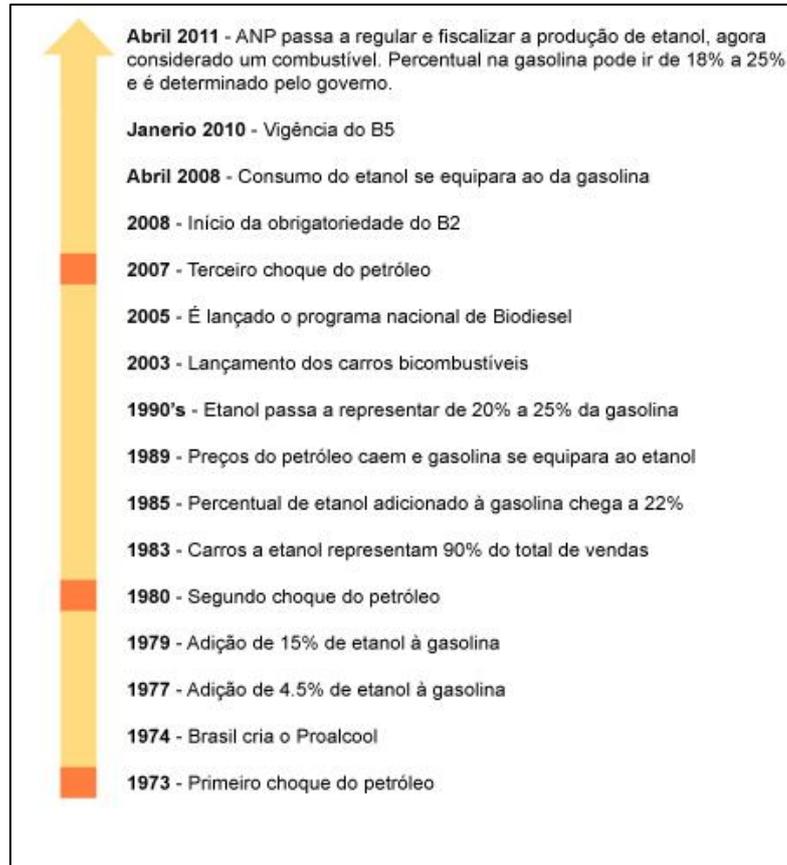
A Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis(ANP, 2012), define como Biodiesel um combustível produzido a partir de óleos vegetais ou de gordura animal. Inúmeras espécies de plantas tem essa função de fornecer óleo para produção de biodiesel, muitas delas encontradas no Brasil, como, soja, dendê, girassol, babaçu, amendoim, mamona entre outras.

Os biocombustíveis são ecologicamente corretos no que compreende o processo de combustão dos motores e também porque seu processo de produção tende a ser mais limpo.

Em relação ao diesel derivado do petróleo, o biodiesel leva vantagens no quesito ambientais. Estudos do National Biodiesel Board (associação que representa a indústria de biodiesel nos Estados Unidos) demonstraram que a queima de biodiesel pode emitir em média 48% menos monóxido de carbono; 47% menos danoso à saúde; 67% menos hidrocarbonetos. Como esses percentuais variam de acordo com a quantidade de B100(biodiesel) adicionado ao diesel de petróleo, no B3(3% de biodiesel na composição de diesel) essas reduções ocorrem de modo proporcional.(ANP, 2012)

O programa de incentivo a biocombustíveis se confunde com a produção de biodiesel e devido a imensa diversidade de fontes naturais e recursos essa evolução foi acentuada permitindo ao país ter parte de sua energia proveniente do biodiesel, uma diferença notável se comparar com outros países. O Brasil ostenta 18% dos combustíveis e 45% de energias renováveis, enquanto o resto do mundo circula em 86% de combustíveis não-renováveis.(ANP, 2012).

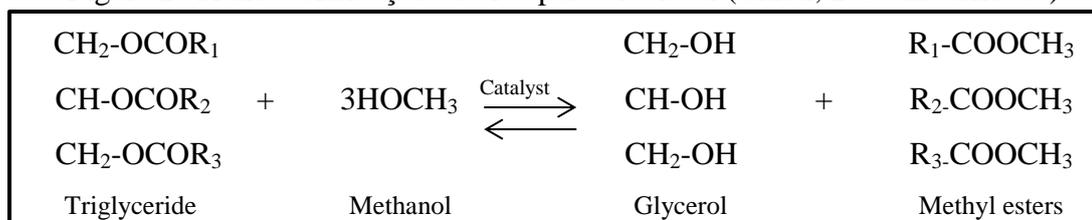
Figura1: Evolução dos Biocombustíveis no Brasil (ANP, 2012)



Porém para se obter este biodiesel não se faz pura e simplesmente a extração das oleaginosas, é necessário um processo chamado transesterificação, realizados nas instalações produtoras de biodiesel.

O Processo de transesterificação, converte os ácidos graxos em glicerol e biodiesel obedecendo a seguinte reação:

Figura 2: Transesterificação de óleo para biodiesel (Chisti, 2007 modificado)



O Processo de transesterificação necessita de 3 moles de álcool para cada mol de triglicerídeos extraído, produzindo assim 3 moles de ester(biodiesel).(Fukuda et al, 2001).

Os processos de produção de biodiesel ainda focam mais em plantas oleaginosas, porém estudos dão uma melhor dimensão e um futuro promissor para a produção a partir de microalgas.

2.2.2 – *Microalgas*

Microalgas são algas microscópicas tal qual as cianobactérias de composição bioquímica diversificada(carboidratos, proteínas, lipídios, ácidos graxos e etc.), onde a composição está relacionada a espécie de microalga, também diferem às espécies as condições às quais melhor se reproduzem e sobrevivem.(Miao & WU, 2006). As microalgas são seres fotossintetizantes, onde convertem dióxido de carbono em biomassa, podendo ser usado para diversos fins onde entre eles temos o biodiesel.

Pesquisas como a de Yusuf Chisti(2007), dão uma dimensão de todo o potencial das microalgas para uso como fonte de biocombustíveis. Grande parte das microalgas já estudadas apresentam uma alta porcentagem de lipídios em sua composição, girando entre 20% - 80%. Sem contar que proporcionalmente produzem muito mais óleo por hectare do que outras fontes já utilizadas.(Chisti, 2007).

Tabela 1: Comparação de Recursos de Biodiesel (Chisti 2007)

Colheita (L/ha)	Rendimento Necessário(M ha) ^a	Area	Porcentagem de área plantada ^a
Milho	172	1540	846
Soja	446	594	326
Canola	1190	223	122
Jatropha	1892	140	77
Coco	2689	99	54
Óleo de palma	5950	45	24
Microalga ^b	136,900	2	1.1
Microalga ^c	58,700	4.5	2.5

^a Por 50% dos combustíveis necessário nos EUA
^b 70% óleo (por massa) em biomassa
^c 30% óleo (por massa) em biomassa

Tabela 2: Composição de óleo de algumas espécies de microalgas. (Chisti. 2007).

Microalga	Oil content (% dry wt)
<i>Botryococcus braunii</i>	25-75
<i>Chlorella</i> sp.	28-32
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	20
<i>Cylindrotheca</i> sp.	16-37
<i>Dunaliella primolecta</i>	23
<i>Isochrysis</i> sp.	25-33
<i>Manollanthus salina</i>	>20
<i>Nannochloris</i> sp.	20-35
<i>Nannochloropsis</i> sp.	31-68
<i>Neochloris oleoabundans</i>	35-54
<i>Nitzschia</i> sp.	45-47
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	20-30
<i>Scizochytrium</i> sp.	50-77
<i>Tetraselmis sueica</i>	15-23

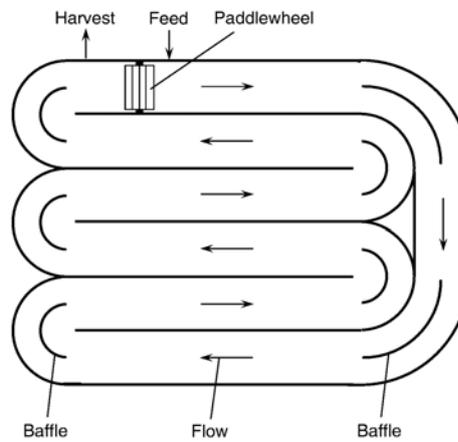
2.2.3 – Produção de Biomassa e Cultivo de Microalgas.

O cultivo de microalgas pode ser feito de diversas formas, por processo autotrófico, heterotrófico, mixotrófico ou fotoheterotrófico. Para o cultivo autotrófico luz e carbono inorgânico são as fontes de energia para a fotossíntese, diferentemente do heterotrófico que utiliza carbono orgânico. Já o cultivo mixotrófico usa compostos orgânicos para obter o carbono necessário. Por fim temos o fotoheterotrófico que para obter o carbono dos compostos orgânicos necessitam da luz solar. (Brennan & Owende 2010, Chen et al. 2011).

Para o cultivo da microalga o sistema a ser inserido possui várias tecnologias para tal processo. Respeitando algumas exigências para esse cultivo, como salinidade, luminosidade, tipo da água (doce ou salgada), acesso a fonte de carbono necessária pela espécie de microalga e temperatura de operação (geralmente entre 20°C – 35°C) (Chisti 2006).

Os tipos de cultivo feito para microalga são produzidos mais comumente em lagoas e fotobiorreatores. Lagoas de cultivo, mais comuns a serem usadas são as “raceways ponds” onde tanques de circulação por canais são responsáveis pelo cultivo a céu aberto da microalga (Picardo, 2012). Tal método de cultivo é exposto a contaminações e outros diferentes problemas ao ser comparado com fotobiorreatores (Chisti 2007).

Figura3: Modelo “raceways pound” Cultivo aberto.



Fotobiorreatores tem maiores vantagens devido a uma maior segurança quanto a contaminações, maior controle de volume de água, energia e nutrientes para o cultivo, permitindo melhor manuseio do cultivo, moldando o crescimento da microalga.(Chisti 2007). No entanto uma desvantagem seria o custo com energia para gerar luz à esse reator, que temos uma opção pra contornar este problema. O fotobiorreator solar contornaria este problema, incrementando assim mais uma vantagem ao fotobiorreator em relação aos cultivos abertos.

2.2.4 – Tipos de Fotobiorreatores

2.2.4.1 – Fotobiorreator Tubular.

Fotobiorreatores tubulares, compreendem nos sistemas mais utilizados para cultivo de microalga, geralmente sendo composto por duas partes: compartimento de cultivo e sistema de troca gasosa. Onde o primeiro é feito de tubulações transparentes, para as células ali presentes possam ter total acesso a luz para seu crescimento. Já a troca gasosa pode ser feita por membrana permeável ou injeção de ar(Chagas, 2010; Sugai, 2012).

Figura 4: Fotobiorreator tubular com capacidade de 1000L na Universidade de Murdoch, Austrália (Chisti, 2007).



2.2.4.2 – Placa plana

Compreende a um sistema de cultivo em forma de placa que oferece grande área de contato com a superfície, dando acesso a iluminação e boa adequação a ser instalado ao cultivo externo com luz solar. Acumula menos oxigênio que os fotobiorreatores tubulares, mas mesmo assim proporcionam alta eficiência no cultivo de microalgas.(Chagas, 2010).

2.2.4.3 – Coluna Vertical

Fotobiorreatores de coluna vertical se destacam pelo baixo custo e por proporcionarem uma larga escala de cultivo. Utilizam borbulhamento, aumentando as taxas de crescimento, possuem altas transferência de massa, alta eficiência e manuseio.(Chagas, 2010).

2.2.5 Desinfecção do Meio

Para desinfetar o meio de cultivo, devido a mudança para a utilização de água do mar natural, ao invés da sintética, foi feita a filtragem natural para a remoção de grãos e corpos indesejados, porém uma desinfecção química se fazia necessária, um novo método introduzido em Procópio(2014), se fez possível para aplicar na pesquisa, onde este se constituía em adicionar hipoclorito à taxa de 0,01% v/v, gerando resultados satisfatórios e favoráveis a produção.

Somado à desinfecção por hipoclorito, em Assemany(2013) foi mostrado que a desinfecção por raios UV elimina bactérias e contaminantes indesejáveis ao cultivo, favorecendo um cultivo mais limpo, devido ao cultivo ser efetuado em exposição de luz solar.

3 – METODOLOGIA

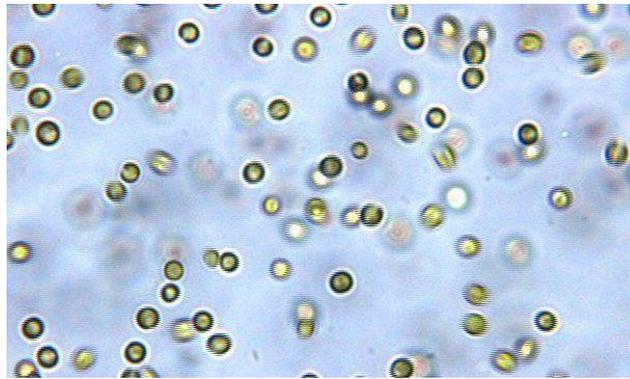
3.1 – Microorganismo

O Microorganismo estudado trata-se da *Isochrysis galbana*, com base nas pesquisas em Picardo(2012) e Procópio(2014), por apresentar considerável potencial na produção de óleo e aplicação deste como energia e biocombustíveis.

As espécies vinham sendo cultivadas no laboratório do Nucleo de Petróleo e Gás(Nupeg) da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, e apresentaram boa adaptação ao clima e crescimento para se desenvolver seu cultivo de maneira a ser manipulado e analisado.

Figura 5: Imagem da microalga *Isochrysis galbana* sob a ótica do microscópio.

Aquaculture(2011)



3.2 – Sistema de Cultivo

Um primeiro modelo para o reator montado, consistia de um reator vertical alocado no exterior do laboratório com o cultivo estático, sendo que este reator necessitava de uma jaqueta que seria resfriada por um reservatório de água interno ao laboratório que circularia por este, impedindo que o cultivo atingisse temperaturas superiores a desejada para a sobrevivência da espécie utilizada(35°C).

Por motivos de logística o sistema teve de ser modificado e se iniciou testes com novas configurações onde consequentemente se conseguiu um sistema mais simples, dispensando resfriar o cultivo.

Para a fase inicial de dimensionamento do reator foi montado um sistema composto de duas partes, onde uma era composta de um recipiente alocado na parte interna do laboratório ligado por uma tubulação a outra parte composta por uma vidraria a ser exposta ao sol, para possibilitar que o cultivo ao ser bombeado de uma parte a outra tenha contato com o sol para promover a fotossíntese.

Montado este sistema, foi dado o início dos testes do reator quanto a volume a ser utilizado para melhor manuseio do cultivo e análise de temperatura do meio ao qual o cultivo seria submetido. Tal estudo foi feito com montagem de curva de temperaturas que condicionam o meio, à título de ter um controle da microalga a ser inserida tenha um meio de fácil adaptação e que as temperaturas não excedam as suportadas pela espécie cultivada.

A curva de temperatura é montada com medições de temperatura do volume do reator em espaços de 30 minutos pelo período em que o sistema é exposto ao sol(8:00 – 16:00). Os dados foram colhidos para volumes diferentes de 8 litros e de 4 litros, possibilitando relacionar o quanto aquele volume de água absorve de calor.

Feito isso pode-se escolher o volume adequado a se utilizar no reator para o cultivo dos padrões previamente preparados.

3.3 – Inóculos

Antes de introduzir cultivo no reator solar, as espécies de microalgas são inoculadas em volumes de 300mL de água do mar, previamente filtrada e autoclavada à 121°C, para remoção de corpos nocivos ao cultivo, onde estes inóculos irão se aclimatar com o meio para em seguida serem inseridos em um volume maior(reator solar).

3.4 – Meio de Cultivo

O meio de cultivo dos inóculos foi introduzido no reator, porém o grande volume, não permite autoclavar seu volume para desinfecção, assim o método realizado em Procópio(2014) propicia uma prática e eficiente desinfecção do meio a ser inserido os inoculos.. O sistema de alimentação do cultivo continuará o mesmo, seguindo o método de Guillard 1975 f/2 modificado, sem silicato, composto pelos nutrientes descritos na Tabela 3 abaixo, devidamente filtrados e autoclavados. Ministrando diariamente a alimentação do cultivo com Solução de Nitrato(NaNO_3), Fosfato(NaH_2PO_4), Solução de Metais(CoCl_2 , CuSO_4 , MnCl_2 , Na_2MoO_4 , ZnSO_4 , FeCl_3 e EDTA) e Vitaminas(tiamina, biotina e cianocobalamina), garantindo a nutrição para o cultivo crescer.

Tabela 3: Composição do meio F/2 modificado(Guillard 1975) Para Culturas de microalgas marinhas.(Procópio, 2014)

1. Solução de Nitrato NaNO ₃ (Adicionar 1 ml da solução para cada litro de água do mar)	75mg.L ⁻¹
2. Solução de Fosfato NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O (Adicionar 1ml da solução para cada litro de água do mar)	5mg.L ⁻¹
3. Solução Traço de Metais Na ₂ EDTA FeCl ₃ .6H ₂ O CuSO ₄ .5H ₂ O ZnSO ₄ .7H ₂ O CoCl ₃ .6H ₂ O MnCl ₂ .4H ₂ O (Adicionar 1 ml da solução para cada litro de água do mar)	4,36mg.L ⁻¹ 3,15mg.L ⁻¹ 0,001mg.L ⁻¹ 0,002mg.L ⁻¹ 0,001mg.L ⁻¹ 0,18mg.L ⁻¹
4. Solução de Vitaminas Tiamina Biotina Vitamina B12 (Adicionar 0,1 ml da solução para cada litro de água do mar)	1mg.L ⁻¹ 0,005mg.L ⁻¹ 0,005mg.L ⁻¹

3.5 – Análise de crescimento

A análise do crescimento e reprodução do cultivo foi feita a partir da metodologia encontrada em ROEHE(2013), onde uma amostra do cultivo é colhida, adicionada ao lugol(composto à se destacar as celular das microalgas) e diluída.

Posteriormente a amostra foi acondicionada à uma câmara de Neubauer e analisada à um microscópio para ser feita uma contagem do numero de células. Com este numero, leva-se em consideração o fator de diluição e as dimensões da câmara e obtemos um numero aproximado de células presente no cultivo. Um cultivo de 7dias nos dará uma ideia do seu crescimento

$$X = N \times 10.000 \times d$$

(Formula para contagem – ROEHE, 2013)

Onde X = Numero de células por ml

N = numero de células contadas na câmara de Neubauer

10.000 = volume corrigido de mm³ para ml

d = fator de diluição(volume total, amostra + água destilada)

3.6 – Influencia Nutricional

Para se avaliar a influencia individual no crescimento de biomassa, foi definido um modo de alimentação, onde os nutrientes escolhidos seriam aplicados em dosagens diferentes, proporcional ao estudado e definido na metodologia de cultivo.

Desta forma a aplicação seria feita, onde um nutriente teria sua dosagem dobrada, enquanto os demais seriam reduzidos à metade, já que todos são importantes à nutrição do cultivo, porém terá uma influencia maior de um nutriente em específico, e analisado sua influencia no crescimento.

4 – RESULTADOS E DISCUSSÓES

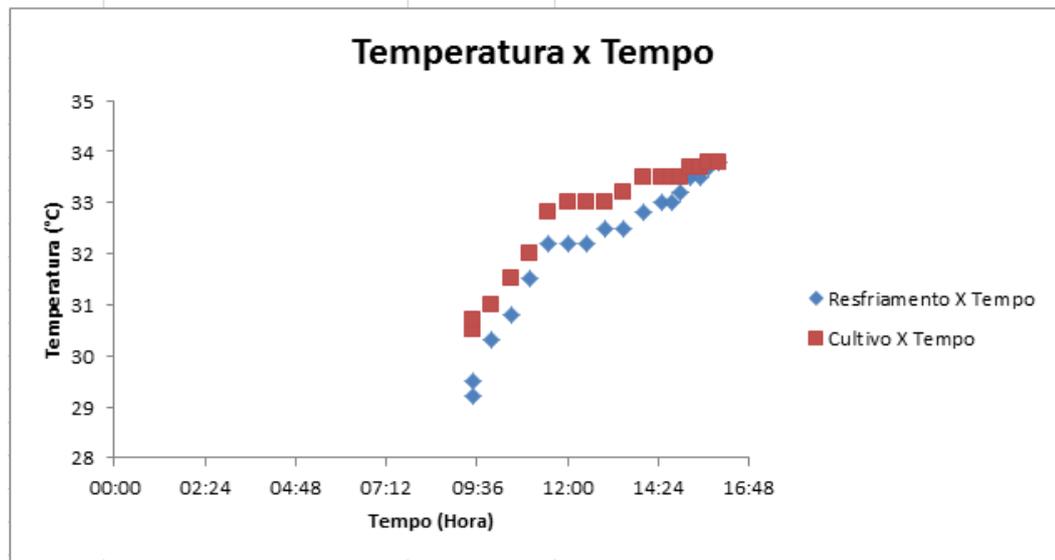
4.1 – Volume de Operação e Faixa de Temperatura

Para a primeira configuração usada o reator solar jaquetado contava com um volume de 1,5L para se fazer o cultivo e sua camada externa seria preenchida com água previamente armazenada em um reservatório interno ao laboratório. O sistema continha um volume de água de 18L controlaria a temperatura do cultivo. Os dados da tabela 4 e figura 6 mostram esse estudo:

Tabela 4: Leituras de temperaturas durante período de luz no sistema às condições apresentadas mediante ao clima exposto.

Modelo de Reator Jaquetado			
Hora	T. Agua de resfriamento(°C)	T.Cultivo(°C)	Volume de água para resfriamento = 18L
09:30	29,2	30,5	Volume do cultivo = 1L
09:30	29,5	30,7	Horario de Inicio de construção da curva: 14:30
10:00	30,3	31	Termino de construção de curva: 16:00
10:30	30,8	31,5	Intervalo de tempo entre temperaturas = 15min
11:00	31,5	32	Instrumento = Termometro Analógico
11:30	32,2	32,8	
12:00	32,2	33	
12:30	32,2	33	Tempo(09/05/2014) Fonte: Cptec-Inpe
13:00	32,5	33	T.Max: 31°C
13:30	32,5	33,2	T.Min: 24°C
14:00	32,8	33,5	Sensação Termica: 34°C
14:30	33	33,5	Umidade Relativa: 57%
14:45	33	33,5	Indice UV: 10(Muito Alto)
15:00	33,2	33,5	Climatologia Mensal = Maio/2014
15:15	33,5	33,7	T.Max: 28°C - 30°C
15:30	33,5	33,7	T.Min: 20°C - 22°C
15:45	33,7	33,8	T.Media: 26°C - 27°C
16:00	33,8	33,8	Umidade Relativa: 75% - 85%

Figura 6: Gráfico de dispersão comportamental da temperatura ao longo do tempo



O gráfico mostra que o aumento de temperatura do cultivo é suavizado pela fluxo de resfriamento, impedindo que o cultivo supraqueça e desnature as células. As curvas de temperatura crescem em paralelo, com o fluxo de resfriamento abaixo do cultivo.

Este desenvolvimento chega ao equilíbrio no pico da temperatura alcançada pelo sistema que compreende à 34°C, mantendo o cultivo a distancia de 1° da temperatura máxima suportada, dando uma margem confiável de temperatura.

Com a alteração da configuração de reator, reduziu-se o volume de água necessário, já que o cultivo foi armazenado no reator, interno ao laboratório e que foi circulado através da vidraria exposta ao sol por uma bomba centrífuga. Nessas condições o cultivo não ficou estático ao sol e sua maior porção ficou protegida da recepção de luz solar de todo o cultivo em decorrência do fluxo do mesmo com a proteção à altas temperaturas. Tal sistema foi analisado com dois diferentes volumes de trabalho, à título de se aliar um controle e segurança com a faixa de temperatura e volume razoável de trabalho.

Figura 7: Sistema adaptado para novo cultivo

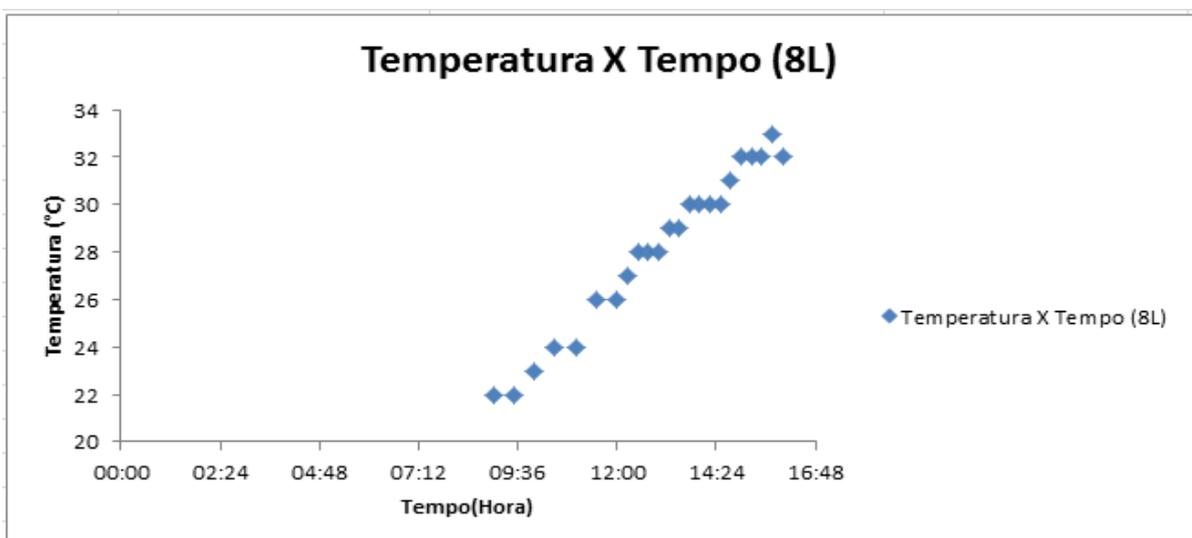


Teste para o sistema à 8L de volume obtivemos:

Tabela 5: Comportamento da temperatura do cultivo no reator à um volume de 8L.

Hora	Temperatura do Meio	Volume do Reator(Total) = 8L
09:00	22	Volume do Exposto à Luz = 350mL
09:30	22	Instrumento = Termometro Digital
10:00	23	Margem de Erro = + ou - 1°C
10:30	24	Tempo(31/07/2014) Fonte: Cptec-Inpe
11:00	24	T.Max: 27°C
11:30	26	T.Min: 22°C
12:00	26	Sensação Termica: 27°C
12:15	27	Umidade Relativa: 73%
12:30	28	Indice UV: 7(Alto)
12:45	28	Climatologia Mensal = Julho/2014
13:00	28	T.Max: 28°C - 30°C
13:15	29	T.Min: 20°C - 22°C
13:30	29	T.Media: 26°C - 27°C
13:45	30	Umidade Relativa: 75% - 85%
14:00	30	
14:15	30	
14:30	30	
14:45	31	
15:00	32	
15:15	32	
15:30	32	
15:45	33	
16:00	32	

Figura8: Gráfico da evolução das temperaturas no meio ao longo do tempo para volume de 8L.

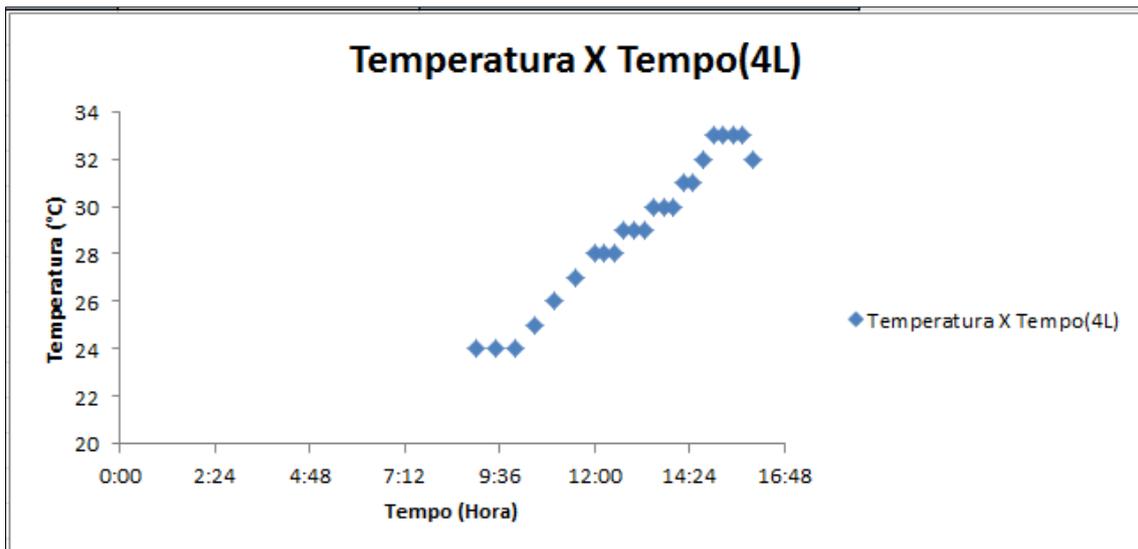


Para o sistema de 4L os dados se apresentam da seguinte forma:

Tabela 6: Comportamento da temperatura do cultivo no reator à um volume de 4L.

Modelo de Reator De Circulação		
Hora	Temperatura do Meio	Volume do Reator(Total) = 4L
09:00	24	Volume do Exposto à Luz = 350mL
09:30	24	Instrumento = Termometro Digital
10:00	24	Margem de Erro = + ou - 1°C
10:30	25	Tempo(30/07/2014) Fonte: Cptec-Inpe
11:00	26	T.Max: 27°C
11:30	27	T.Min: 21°C
12:00	28	Sensação Termica: 29°C
12:15	28	Umidade Relativa: 69%
12:30	28	Indice UV: 7(Alto)
12:45	29	Climatologia Mensal = Julho/2014
13:00	29	T.Max: 28°C - 30°C
13:15	29	T.Min: 20°C - 22°C
13:30	30	T.Media: 26°C - 27°C
13:45	30	Umidade Relativa: 75% - 85%
14:00	30	
14:15	31	
14:30	31	
14:45	32	
15:00	33	
15:15	33	
15:30	33	
15:45	33	
16:00	32	

Figura 9: Gráfico da evolução das temperaturas no meio ao longo do tempo para volume de 4L.



As curvas construídas nos ensaios realizados para a análise de temperatura do reator demonstraram que para os 2 volumes usado para cultivo atendem as necessidades de se dar segurança ao cultivo quanto ao sobreaquecimento do mesmo para evitar desnaturação e morte das células de microalgas. Os volumes são desejáveis para se trabalhar, principalmente quando se fala nas necessidades de temperaturas suportadas pelo cultivo, como visto em Da Fré, 2011. Porém um menor volume (4L) torna a manipulação deste e adaptação do cultivo mais favorável. Com isso também temos uma temperatura um pouco mais elevada, sem exceder a máxima, para um maior rendimento e crescimento.

4.2 – Contagem e Crescimento Celular do Cultivo

Definido e testado o sistema de cultivo, foi feita contagens e análise do crescimento celular no cultivo de microalgas sob o meio natural de água do mar, devidamente desinfetado, como proposto em ROEHE(2013) através de uma câmara de Neubauer analisada em um microscópio

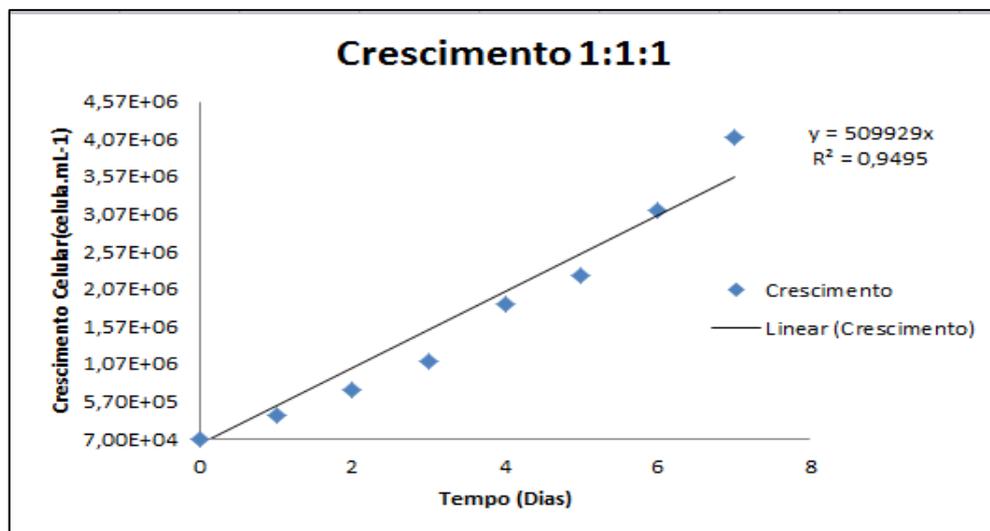
Inicialmente após a adaptação do cultivo no novo volume uma contagem inicial foi feita, esta contagem nos gera um numero para em seguida definirmos um novo numero de células que será nosso “zero” para a montagem da curva de crescimento em 7 dias.

Para o primeiro ensaio de análise de crescimento da pesquisa temos:

Tabela 7: Contagem por dias de cultivo

Dia	Células.mL ⁻¹
Adaptação	457.000
0	70.000
1	378.000
2	732.000
3	1.101.000
4	1.870.000
5	2.250.000
6	3.130.000
7	4.105.000

Figura 10: Curva de crescimento do cultivo



4.3 – Influencia Nutricional no crescimento.

Em seguida se foram executadas, diferenciações na metodologia de alimentação, a fim de se analisar a influencia de cada nutriente no crescimento.

A metodologia consistiu em dobrar o volume da alimentação necessária ao cultivo do nutriente de interesse e reduzir à metade os outros nutrientes, exceto à quantidade de vitaminas, por esta representar uma influência qualitativa nas células(CHAGAS, 2010).

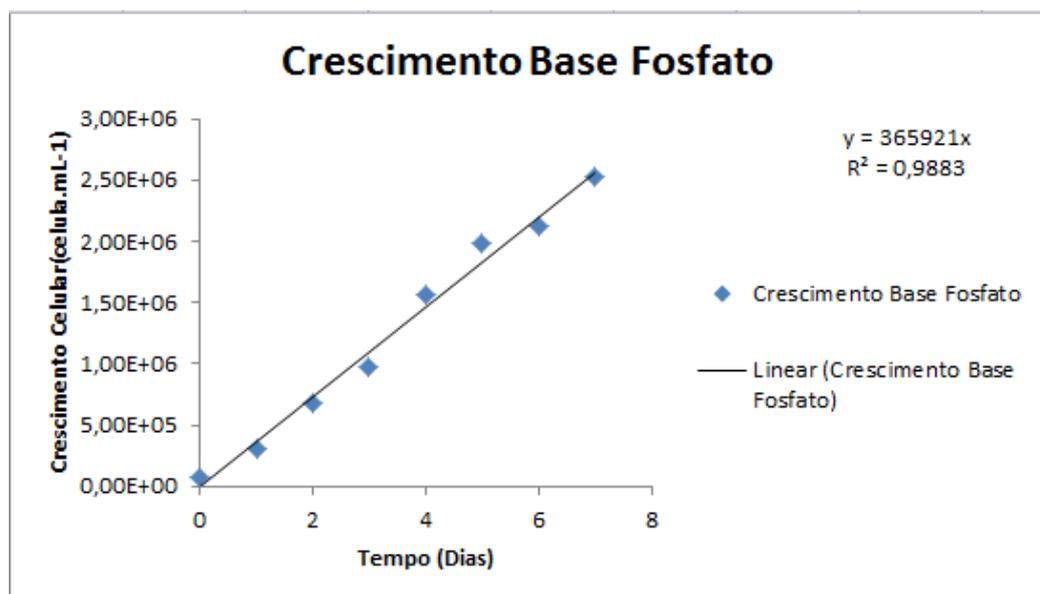
Ao cultivar as microalgas com alimentação diferenciada, analisamos o crescimento desta e como cada nutriente pode interferir ou contribuir para o crescimento.

Alimentação diferenciada de Fosfato:

Tabela 8: Contagem por dias de cultivo(Fosfato)

N1:P4:M1	
Dia	Células.mL ⁻¹
Adaptação	4,01E+05
0	7,00E+04
1	3,15E+05
2	6,78E+05
3	9,71E+05
4	1,57E+06
5	1,98E+06
6	2,12E+06
7	2,54E+06

Figura 11: Curva de crescimento para alimentação a base de Fosfato.

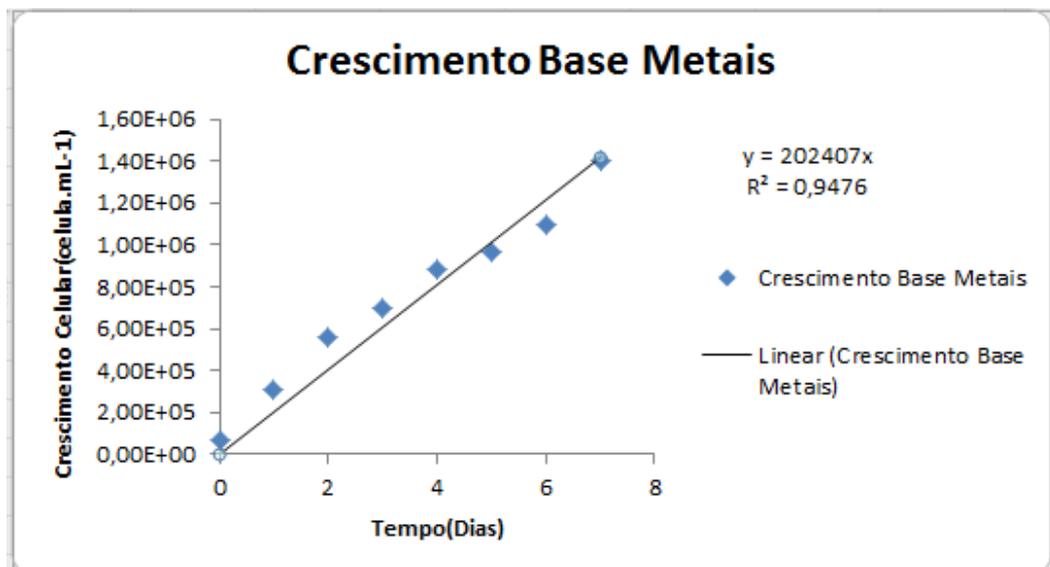


Alimentação diferenciada de Metais:

Tabela 9: Contagem por dias de cultivo(Metais)

N1:P1:M4	
Dia	Células.mL ⁻¹
Adaptação	3,17E+05
0	7,00E+04
1	3,05E+05
2	5,62E+05
3	7,01E+05
4	8,80E+05
5	9,70E+05
6	1,10E+06
7	1,41E+06

Figura 12: Curva de crescimento para alimentação diferenciada de Metais.

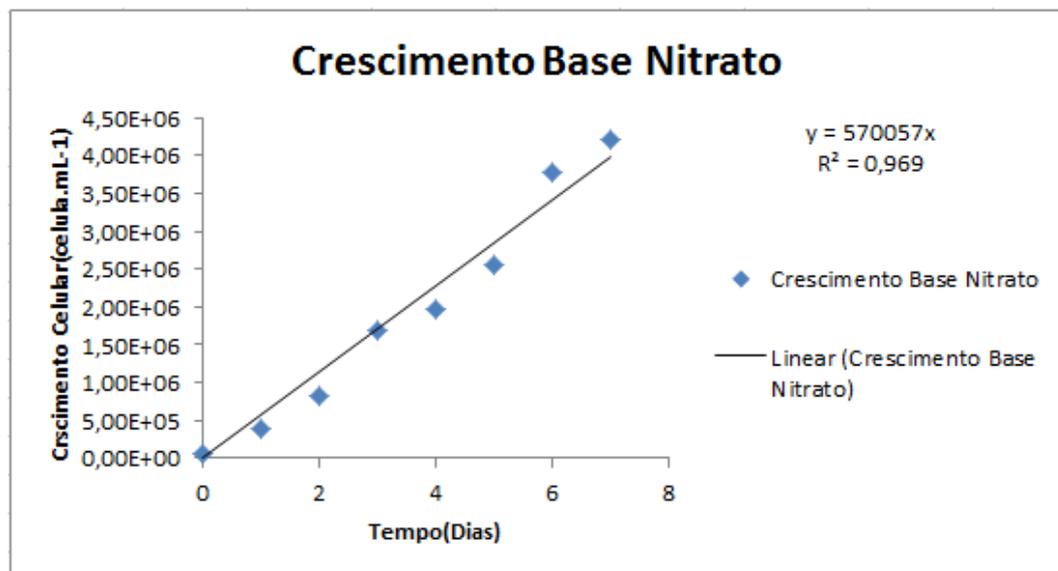


Alimentação diferenciada de Nitrato:

Tabela 10: Contagem por dias de cultivo(Nitrato)

N4:P1:M1	
Dia	Células.mL ⁻¹
Adaptação	6,09E+05
0	7,00E+04
1	3,78E+05
2	8,21E+05
3	1,70E+06
4	1,97E+06
5	2,55E+06
6	3,77E+06
7	4,21E+06

Figura 13: Curva de crescimento para alimentação diferenciada de Nitrato.



O gráfico de crescimento nos proporciona ver que em comparação com a alimentação padrão, adotada a partir do modelo $f/2$ modificado, o crescimento das microalgas com alimentação diferenciada para fosfato teve leve decréscimo na produção de biomassa se analisarmos numericamente o coeficiente angular da linha de tendência sob os pontos da dispersão.

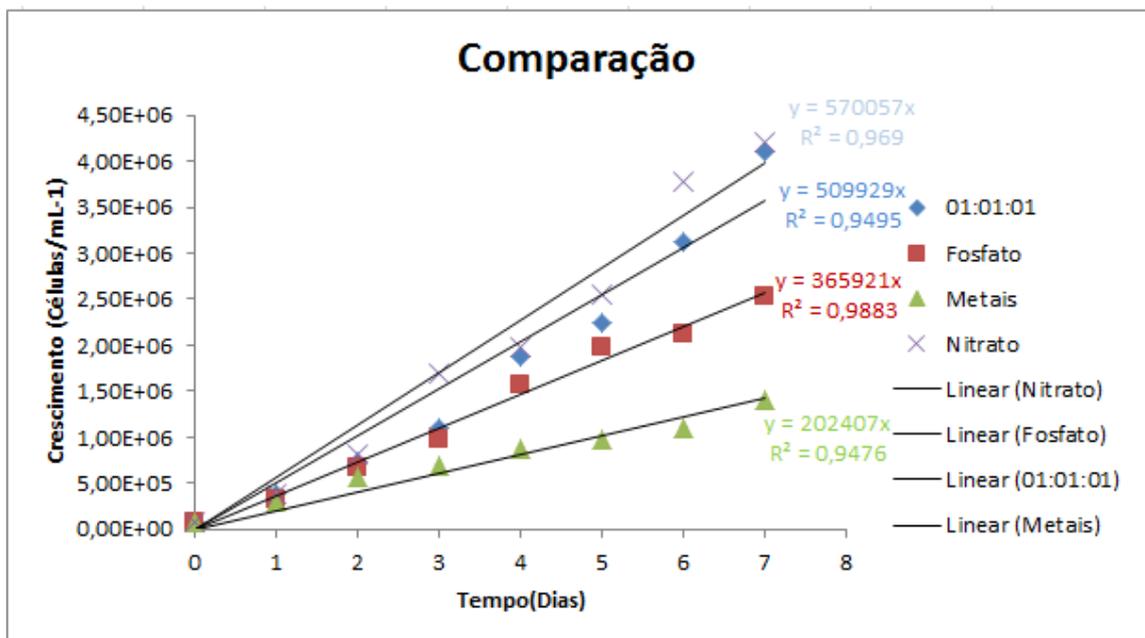
Através desta mesma análise, vemos que os metais influenciam de maneira menos significativa no crescimento, podendo até simbolizar um futuro prejuízo ao cultivo, visto que a alta concentração de metais não se mostra benéfica à seres fotossintetizantes.

Em oposição a solução de metais, que tem menor influencia, a solução de nitrato mostra uma maior influencia no crescimento do cultivo e na produção de biomassa, tornando a fase exponencial de crescimento mais vantajosa se for feita uma diferenciação de nitrato para a alimentação.

Com isto podemos ver que mesmo com todos os nutrientes sendo importantes para o crescimento do cultivo, o nitrato tem maior influencia, sendo seguido pelo fosfato e depois a solução de metais.

Abaixo, vemos uma comparação gráfica do crescimento dos métodos de alimentação adotados.

Figura 14: Comparação gráfica de crescimento



5 – CONCLUSÃO

O Sistema se mostrou satisfatório no acondicionamento do cultivo e manteve sua temperatura, confirmando o teste de crescimento, o cultivo se mostrou eficiente para se reproduzir e crescer.

A atual configuração do reator satisfaz as necessidades do cultivo quanto ao aspecto de luminosidade, troca gasosa com o meio, para se obter carbono atmosférico(CO₂), e controle de temperatura com o volume de trabalho de 4 litros, onde não permitiu exceder o máximo suportado pela microalga, mas também que se trabalhe com uma faixa de temperatura próxima e com margem de segurança para um maior rendimento, visto que a melhor faixa de operação para esta microalga compreende entre 20°C e 35°C como revisado anteriormente.

Chegando a gerar quase 5 milhões de células em um período de 7 dias, as estimativas são as melhores possíveis para a configuração adotada, frente a um crescimento exponencial firme e promissor ao cultivo. Fato esse que permitiu ser feita a análise de influência de cada nutriente para o crescimento e produção de biomassa, onde pudemos ver que uma alimentação rica em nitrato permite uma maior produção e a alimentação rica em solução de metais afeta menos o crescimento.

Com isso pudemos concluir que o cultivo necessita dos nutrientes utilizados para crescer, porém vimos a influência de cada um com os experimentos realizados em uma configuração satisfatória para se cultivar microalgas à iluminação natural.

REFERENCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS (ANP). **Dados Estatísticos**, Página <http://www.anp.gov.br> em 15/03/2005.

AGÊNCIA NACIONAL DE PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS (ANP). **Biocombustíveis**, Pagina <http://www.anp.gov.br/?pg=60467&m=&t1=&t2=&t3=&t4=&ar=&ps=&cachebust=1406767624892> em 28/05/2012.

AQUACULTURE. **Microalgues**. Disponível em: <<http://aquaculture.ifremer.fr/les-Filieres/Filiere-Algues/La-decouverte-des-algues/Microalgues>>. Acesso em: 10 outubro 2011.

ASSEMANY, P.P. **Efeito da radiação solar e pré-desinfecção na caracterização lipídica de biomassa cultivadas em lagoas de alta taxa utilizando esgoto domestico**. 2013. 102f. Dissertação (Pós-Graduação em Engenharia Civil) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2013.

AZEREDO, V. B. S. **Produtividade de biodiesel a partir do cultivo de microalgas: Estimativa de custos e perspectivas para o Brasil**. 2012. 171f. Dissertação (Mestrado em Planejamento Energetico) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

BRENNAN, L. & OWENDE, P. 2010. **Biofuels from microalgae – A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products**. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 14: 557-577.

CAROLINO, L.R.V. **Cultivo de microalgas unicelulares para determinação da produção lipídica e sequestro de carbono**. 2011. 80f. Dissertação (Mestrado de Biologia Celular e Biotecnologia) – Faculdade de Ciências - Universidade de Lisboa, Lisboa, 2011.

CHAGAS, B.M.E. **Influência do estresse nutricional programado na composição da Microalga Marinha *Isochrysis galbana***. 2010. 107f Dissertação (Mestrado Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal, 2010.

DA FRÉ, N.C. et al. **Influência da temperatura e da salinidade no cultivo da microalga *Dunaliella tertiolecta* em fotobiorreator airlift**. In: Seminário do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, 10. 2011. Porto Alegre Resumos e Artigos. Porto Alegre, RS: UFRGS/EE/PPGEQ, 2011.

CHEN, C.Y., YEH, K.L., AISYAH, R., LEE, D.J. & CHANG, J.S. 2011. **Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review**. Bioresource Technology, 102: 71-81.

CHISTI, Yusuf. **Biodiesel from microalgae**. In:2007. Biotechnology Advances. Volume 25(2007). Fevereiro 2007. Páginas 294 – 306.

CHISTI, Y. **Microalgae as sustainable cell factories**. *Environmental Engineering and Management Journal*. v.5, n.3, p.261-274, 2006.

DERMIBAS, Ayhan & M. Fatih. **Algae Energy: Algae as a new source of biodiesel**. London: Springer, 2010.

FUKUDA H, KODNO A, NODA H. **Biodiesel fuel production by transesterification of oils**. J Biosci Bioeng 2001;92:405–16.

GUILLARD, R. R. L. **Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates**. In: SMITH, WL & MH CHANLEY (Eds.) Culture of Marine Invertebrate Animals. New York. Plenum, p. 29-60, 1975.

MIAO, X. & WU, Q. 2006. **Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil**. *Bioresource Technology*, 97: 841-846.

PICARDO, M. C. **Desempenho de isochrysis galbana na produção de óleo e sequestro de CO2 com fotobiorreator piloto**. 2012. 200f. Tese (Doutorado em Ciências em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

PROCÓPIO, Z.S.D. **Estudo do biodiesel obtido a partir da biomassa da microalga Isochrysis galbana por meio da transesterificação in situ**. Dissertação (Mestrado) – Curso de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2014.

ROLEDA, M.Y. et al. **Effects of temperature and nutrient regimes on biomass and lipid production by six oleaginous microalgae in batch culture employing a two-phase cultivation strategy**. In: 2013. *Bioresource Technology* Volume 129, February 2013, Pages 439–449

ROEHE, P. M. BMM 5777: **Culturas celulares e suas aplicações em Microbiologia**. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/labvir/material/contagem_celulas.pdf>. Acesso em: 13 abril 2013.

RUKMINASARI, Nita. **Effect of nutrient depletion and temperature stressed on growth and lipid accumulation in marine-green algae Nannochloropsis sp**. In: American Journal of Research Communication. 2013. Makassar – Indonesia. 2013.

SCHIMIDELL, Wilibaldo. **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. 1.ed. São Paulo: Blücher, 2001.

SUGAI, M. H. **Modelagem matemática de coluna de gaseificação de fotobiorreatores tubulares para cultivo de microalgas**. 2012. 222 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

