



UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO  
FACULDADE DE ENGENHARIA E ARQUITETURA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA  
CIVIL E AMBIENTAL

FRANCISCO GERHARDT MAGRO

CULTIVO DA MICROALGA *Spirulina platensis* EM  
*RACEWAYS* PARA A OBTENÇÃO DE MATÉRIA-PRIMA  
PARA PRODUÇÃO DE BIOETANOL

Passo Fundo

2016

FRANCISCO GERHARDT MAGRO

CULTIVO DA MICROALGA *Spirulina Platensis* EM  
*RACEWAYS* PARA A OBTENÇÃO DE MATÉRIA-PRIMA  
PARA PRODUÇÃO DE BIOETANOL

Orientadora: Prof. Dr<sup>a</sup>. Luciane Maria Colla  
Coorientador: Prof. Dr. Jorge Alberto Vieira Costa

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil e Ambiental da Faculdade de Engenharia e Arquitetura da Universidade de Passo Fundo, como requisito para obtenção do título de Mestre em Engenharia.

Passo Fundo

2016

FRANCISCO GERHARDT MAGRO

CULTIVO DA MICROALGA *Spirulina Platensis* EM  
RACEWAYS PARA A OBTENÇÃO DE MATÉRIA-PRIMA  
PARA PRODUÇÃO DE BIOETANOL

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil e Ambiental da Faculdade de Engenharia e Arquitetura da Universidade de Passo Fundo, como requisito para obtenção do título de Mestre em Engenharia.

Prof. Dr<sup>a</sup>. Luciane Maria Colla  
Orientadora

Prof. Dr. Jorge Alberto Vieira Costa  
Coorientador

Prof. Dr<sup>a</sup>. Lucielen Oliveira dos Santos  
Universidade Federal do Rio Grande-FURG

Prof. Dr. Paulo Fernando Marques Duarte Filho  
Universidade Federal do Pampa - UNIPAMPA

Prof. Dr. Vandrê Barbosa Brião  
Universidade Passo Fundo - UPF

Passo Fundo

2016

## AGRADECIMENTOS

- ✓ *Agradeço em primeiro lugar a Deus.*
- ✓ *Aos meus pais Gilmar e Ivana, por tudo que representam pra mim.*
- ✓ *A minha família pela educação, formação e apoio que sempre recebi.*
- ✓ *A minha Orientadora, professora Luciane Maria Colla e Coorientador professor Jorge Alberto Vieira Costa pela orientação, confiança, ensinamentos, amizade e paciência.*
- ✓ *Aos meus estagiários que se tornaram grandes amigos Fábio, Gabriel e Grazieli por estarem sempre junto me apoiando e contribuindo de diversas formas.*
- ✓ *A Ana Cláudia Margarites pelos auxílios, ensinamentos e amizade.*
- ✓ *Aos Colegas de laboratório pelo convívio e pelas incansáveis conversas sobre os anseios para o futuro.*
- ✓ *Agradeço ao corpo de professores que me acompanharam durante esse período e a Universidade de Passo Fundo (UPF).*
- ✓ *A todos os amigos e colegas que de alguma forma me apoiaram, auxiliaram e compreenderam nesta caminhada.*

## RESUMO

A busca por fontes energéticas renováveis foi impulsionada nas últimas décadas, pois as fontes de combustíveis não renováveis tendem a se esgotar, surgindo assim a busca pelos biocombustíveis obtidos através da biomassa de microrganismos, como as microalgas. Essa forma de produção de biocombustíveis torna-se viável uma vez que pode ser realizada em terras com baixo potencial agrícola. Porém, as produções em grande escala, necessárias para a implementação da indústria de biocombustíveis algais, possuem várias limitações e demandam estudos e pesquisas para tornarem viáveis. A tecnologia mais difundida para o cultivo em grande escala de microalgas são os *raceways*, sendo que nesses fotobiorreatores, alguns fatores, como os processos de agitação, a definição dos ciclos de luz e escuros ótimos, a fotoinibição, a redução da sedimentação e a maximização das produtividades, precisam ser estudados. O objetivo do trabalho foi o desenvolvimento de uma estratégia de aumento na escala de produção da microalga *Spirulina platensis* cultivada em *raceways* para o aproveitamento da biomassa e do carboidrato extracelular (solúvel) visando a produção de bioetanol. A realização do experimento foi em mini *raceways* e em planta piloto. O fluxo do fluido foi simulado nos mini *raceways* que foram confeccionados em acrílico com sistema de agitação na forma de pás. A microalga utilizada foi a *Spirulina platensis* LEB 52, cultivada em meio Zarrouk em condições apropriadas para o acúmulo de carboidratos. Ao final das fases estacionária e de declínio do cultivo, a biomassa foi utilizada para determinação de carboidratos, lipídios e proteínas. No líquido resultante do processo de centrifugação também foi determinado o carboidrato extracelular no meio de cultivo. Como resultado é possível relatar que a velocidade de agitação interferiu na concentração celular, pois o cultivo com menor velocidade (0,10 e 0,15 m.s<sup>-1</sup>) atingiu uma concentração menor, isto devido ao maior volume no *raceway* de zonas de estagnação. A velocidade de agitação e a fase de cultivo influenciaram na concentração de carboidrato na célula, nas velocidades de 0,10 e 0,15 m.s<sup>-1</sup> a quantidade de carboidratos intracelulares foram inferiores às cultivadas com maiores velocidades em ambas as fases de cultivo. A biomassa cultivada até o início da fase de declínio apresentou maior concentração de carboidratos, devido à maior restrição de nutrientes, o que pode ter afetado positivamente no acúmulo de carboidrato. As concentrações de proteína obtiveram relação inversa com a concentração de carboidratos. A concentração dos carboidratos extracelulares foi maior na fase de declínio do cultivo, o que configura que foram mais produzidos na fase estacionária do cultivo, ou esse carboidrato extracelular não seja somente proveniente dos exopolissacarídeos, e sim de carboidrato celular que foi liberado ao meio. O cultivo foi realizado no *raceway* com volume de 250 L, atingiu a concentração de biomassa na fase estacionária de 1,10±0,004 g.L<sup>-1</sup>, o desempenho foi inferior quando comparado como ao mini *raceway* piloto devido a profundidade do fluido que limitou a luz recebida pelas células. A concentração menor de carboidrato no *raceway* da planta piloto quando comparado ao cultivo realizado no mini *raceway*. A concentração dos carboidratos extracelulares se assemelha ao cultivo nos mini *raceways*, onde na fase de declínio obteve-se a maior concentração.

Palavras-Chaves: Algas; Simulação do fluxo; Exopolissacarídeos; Bioetanol.

## ABSTRACT

The search for renewable energy sources was boosted in recent decades, as the sources of non-renewable fuels tend to run out, thus resulting in the search for biofuels made from biomass of microorganisms such as microalgae. Biofuel production this form becomes viable as it can be done on land with low agricultural potential. However, the production on a large scale, necessary for the implementation of the algal biofuel industry, have several limitation. The most widespread technology for the large scale cultivation of microalgae are the raceways, and these photobioreactors, some factors, such as the stirring process, the definition of the cycles of light and fine dark, photoinhibition, the reduction of sedimentation and maximization productivities, need to be studied. The objective was to develop a strategy increase in microalgae production scale *Spirulina platensis* grown in raceways for the use of biomass and extracellular carbohydrate (soluble) aimed at the production of bioethanol. The completion of the experiment was carried out in mini raceways and pilot plant. The flow was simulated in miniature raceways which were made of acrylic with stirring system in the form of blades. The microalgae *Spirulina platensis* LEB 52 was used, Zarrouk grown in medium under conditions appropriate for the accumulation of carbohydrates. At the end of the stationary phase and decline in cultivation, the biomass was used for determination of carbohydrates, lipids and proteins. In the resulting liquid centrifuge process it was also determined in exopolysaccharides carbohydrate or soluble in the culture medium. As a result it is possible to report that the stirring speed affect cell concentration, for cultivation at a lower rate (0.10 to 0.15 m.s<sup>-1</sup>) had a lower concentration, due to the larger volume in the raceway stagnant zones. The stirring rate and the growing phase influence the carbohydrate concentration in the cell, at the speeds of 0.10 and 0.15 m.s<sup>-1</sup> the amount of intracellular carbohydrate were lower than those cultured with increasing speeds in both phases of cultivation. Biomass grown until early decline phase showed a higher concentration of carbohydrates due to greater restriction of nutrients, which may have impacted positively on carbohydrate accumulation. Protein concentrations obtained an inverse relationship with the concentration of carbohydrates. The concentration of extracellular carbohydrates was higher in all experiments in the decline phase of cultivation, which sets that were more produced in stationary cultivation phase, or that extracellular carbohydrate is not only from the exopolysaccharides, but cell carbohydrate that has been released. Cultivation was carried out in the raceway with volume of 250 L, reached the concentration of biomass in stationary phase of 1.10±0.004 g.L<sup>-1</sup>, the performance was lower as compared to mini raceway because the depth of the fluid which limited the incoming light by the cells. The lowest concentration of carbohydrate in the pilot plant compared raceway cultivation performed in mini raceway. The extracellular concentration of carbohydrates resembling the cultivation in the mini raceways where the decline phase yielded the highest concentration.

Key Words: Algae; Simulation flow; Exopolysaccharides; Bioethanol.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1-Ciclo de Calvin .....	21
Figura 2 -Fotobiorreatores utilizados no cultivo de microalgas: (a) <i>raceway pond</i> (b) tipo de placa plana, (c) tipo tubular inclinado e (d) tipo horizontal / contínuo.....	26
Figura 3 - Fluxograma geral proposto para os métodos da pesquisa.....	28
Figura 4 - Imagem geral do interior da estufa para cultivo de microalgas.....	29
Figura 5 - Modelo padrão e modificado de <i>raceway</i> utilizados por Duarte Filho (2002) para cultivos com <i>Spirulina</i> .....	30
Figura 6 – Imagem do <i>raceway</i> de 350 L de fibra de vidro .....	31
Figura 7 - Imagem dos mini <i>raceways</i> em acrílico e do sistema de agitação.....	32
Figura 8 - Imagem do <i>raceway</i> em 3D e discretização do volume em células .....	40
Figura 9 - Comportamento fluidodinâmico no <i>raceway</i> modificado com velocidade inicial de 0,30 m.s <sup>-1</sup> .....	41
Figura 10 - Comportamento fluidodinâmico no <i>raceway</i> padrão com velocidade inicial de 0,30 m.s <sup>-1</sup> .....	42
Figura 11 – Relação entre a velocidade inicial e o volume do <i>raceway</i> com velocidade menor que 0,1 m.s <sup>-1</sup> .....	44
Figura 12 - Volume no <i>raceway</i> modificado com velocidade <0,1 m.s <sup>-1</sup> , com a velocidade inicial de 0,30 m.s <sup>-1</sup> .....	45
Figura 13 - Volume no <i>raceway</i> modificado com velocidade <0,1 m.s <sup>-1</sup> , com a velocidade inicial de 0,15 m.s <sup>-1</sup> .....	45
Figura 14 – Curvas de crescimento dos cultivos realizados a 0,10; 0,15; 0,20 e 0,25 m.s <sup>-1</sup> ....	47
Figura 15 – Curvas de crescimento dos cultivos realizados a 0,30; 0,35; 0,40 e 0,45 m.s <sup>-1</sup> ....	48
Figura 16 – Concentração de carboidratos extracelulares (mg.L <sup>-1</sup> ) obtida nas fase estacionária (FE) e de declínio (FD) para as diferentes velocidades de agitação estudadas nos cultivos de <i>Spirulina</i> .....	51
Figura 17 – Concentração de carboidratos intracelulares (%) obtida na fase estacionária (FE) e de declínio (FD) para as diferentes velocidades de agitação estudadas nos cultivos de <i>Spirulina</i> .....	53
Figura 18 – Produtividade em carboidratos intracelulares (g.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> ) obtida nas fase estacionária (FE) e de declínio (FD) para as diferentes velocidades de agitação estudadas nos cultivos de <i>Spirulina</i> .....	54
Figura 19 – Concentração de proteínas (%) obtida na fase estacionária (FE) e de declínio (FD) para as diferentes velocidades de agitação estudadas. ....	55
Figura 20 – Concentração de lipídios (%) obtida na fase estacionária (FE) e de declínio (FD) para as diferentes velocidades de agitação estudadas nos cultivos de <i>Spirulina</i> .....	56
Figura 21 – Curvas de crescimento do cultivo realizado na planta piloto e a 0,35 m.s <sup>-1</sup> .....	57

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição do meio de Zarrouk.....	35
Tabela 2: Data e a radiação solar média em que os blocos e as réplicas dos experimentos foram realizados.....	36
Tabela 3: Rotação das pás, velocidades iniciais, velocidade máxima, velocidade mínima e volume com a velocidade menor que $0,1 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ no mini <i>raceway</i> .....	43
Tabela 4: Tempos de cultivo até início das fases estacionária e de declínio celular (d) e concentração final de biomassa ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) obtida nas duas fases de cultivo.....	49
Tabela 5: Intervalo da fase exponencial (d), tempo da fase log (d), produtividade máxima em células ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ), velocidade específica máxima de crescimento ( $\text{d}^{-1}$ ) e tempo de geração (d).....	50

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	10
2	OBJETIVOS .....	13
2.1	Objetivo Geral .....	13
2.2	Objetivos Específicos .....	13
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	14
3.1	Microalgas como matéria-prima para a produção de bioetanol .....	14
3.2	Condições para produção da biomassa microalgal .....	15
3.2.1	Condições de agitação nos <i>raceways</i> .....	16
3.2.1.1	Fluidodinâmica Computacional .....	19
3.3	Potencial de acúmulo de carboidrato nas microalgas .....	20
3.3.1	Utilização dos exopolissacarídeos na produção de bioetanol.....	23
3.4	Sistema de cultivo das microalgas .....	24
3.5	Obtenção de biocombustíveis no contexto de biorrefinarias .....	26
4	MATERIAL E MÉTODOS .....	28
4.1	Planta piloto <i>raceways</i> .....	28
4.2	Projeto e construção dos <i>raceways</i> .....	29
4.3	Simulação do fluxo nos mini <i>raceways</i> .....	32
4.3.1	Pré-processamento da Simulação .....	32
4.3.2	A solução da simulação .....	33
4.3.3	Pós-processamento da simulação .....	34
4.3.4	Quantificação das zonas de estagnação .....	34
4.4	Ajuste na velocidade de agitação nos <i>raceways</i> .....	34
4.5	Condições de cultivo .....	35
4.6	Determinações analíticas .....	37
4.6.1	Determinação dos parâmetros de crescimento .....	37
4.6.2	Quantificação dos exopolissacarídeos .....	38
4.6.3	Caracterização da biomassa de microalga .....	38
4.7	Análise dos dados .....	39
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	40
5.1	Estudo da simulação do fluxo.....	40
5.1.1	Quantificação das zonas mortas .....	42
5.2	Cultivo em mini <i>raceways</i> .....	46
5.2.1	Efeitos das condições de cultivo nos carboidratos extracelulares .....	50
5.2.2	Efeitos das condições de cultivo nos carboidratos intracelulares.....	52
5.2.3	Efeitos das condições de cultivo nas concentrações de proteínas e lipídios da biomassa .....	54
5.3	Cultivo realizado com o aumento de escala .....	56
5.4	Rendimentos teóricos de bioetanol.....	59
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	60
6.1	Recomendações para trabalhos futuros .....	61
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	62
	APÊNDICE A – Projeto <i>raceways</i> planta piloto.....	72
	APÊNDICE B – Projeto <i>raceways</i> planta piloto.....	73
	APÊNDICE C – Projeto dos mini <i>raceways</i> .....	74
	APÊNDICE D – Comportamento fluidodinâmico nos mini <i>raceways</i> .....	75

# 1 INTRODUÇÃO

A tendência dos combustíveis fósseis se esgotarem impulsionou a busca por fontes renováveis de biocombustíveis líquidos, entre eles o biodiesel e o bioetanol, sendo atualmente produzidos em grande escala, a partir de matérias-primas como grãos de soja e mamona, cana-de-açúcar e milho, respectivamente. Porém, o cultivo destas culturas necessita de terras agriculturáveis, o que segundo alguns autores, competem com a produção de alimentos (ESCOBAR et al., 2009; SOUZA et al., 2014). Desta forma, pesquisas estão sendo realizadas, a fim de buscar novas fontes de biocombustíveis líquidos, viáveis de serem utilizadas em grande escala, dentre elas destacam-se as microalgas.

A partir da biomassa microalgal podem ser produzidos os dois tipos de biocombustíveis líquidos: o biodiesel, através dos lipídios presente na biomassa (CHISTI, 2008; GONG; JIANG, 2011) e o bioetanol, obtido através da sacarificação dos carboidratos da biomassa (HERNÁNDEZ et al., 2015; MIRANDA et al., 2012).

A produção em escala industrial, necessária para a implementação da indústria de biocombustíveis algais, possui vários pontos críticos, limitando o desenvolvimento de plantas de cultivo comerciais. Mas alguns fatores, como o estudo dos processos de agitação, a definição dos ciclos de luz e escuros ótimos, a limitação da fotossaturação e fotoinibição, a redução da sedimentação e a maximização das produtividades, precisam ser estudados (MOLINA GRIMA et al., 1996; TREDICI, 2010; PRUSSI, et al., 2014; YUSUF, 2007).

A iluminação homogênea, frequentemente usada em laboratório para testar novas espécies ou novos conceitos para o desempenho bioquímico, dificilmente é obtida em escala industrial (ZHANG, 2013). Em *raceways* em escala industrial, as microalgas são expostas à luz incidente com intensidade variável (luz solar) (BOROWITZKA, 1999). O movimento das microalgas que estão fluindo no meio de cultura no *raceway* agitado mecanicamente depende da velocidade de agitação.

A velocidade de mistura deve ser suficientemente alta para as células não se acumularem nas áreas onde o fluxo é baixo. Estas áreas são conhecidas como "zonas mortas" ou zonas de estagnação nas quais se desenvolvem condições anaeróbicas que levam a propagação de bactérias anaeróbicas e, numa extensão limitada, também reduzem a quantidade física do biorreator, diminuindo assim a eficiência de cultura (HADIYANTO, 2013).

No contexto de melhorar a hidrodinâmica em biorreatores, a fluidodinâmica computacional (CFD) é uma ferramenta de baixo custo poderosa que já provou a sua eficácia no que diz respeito ao design de fotobiorreatores (BITOG, et al., 2011)

Os cultivos das microalgas como a *Spirulina*, *Chlorella* e *Haematococcus* estão entre as microalgas comumente produzidas. Após a colheita da biomassa seus meios de crescimento são simplesmente descartados, mas uma vasta gama de microalgas é capaz de produzir grandes quantidades de substâncias poliméricas extracelulares (exopolissacarídeos -EPS), os quais são constituídos principalmente por polissacarídeos, proteínas e /ou outros biopolímeros em proporções diferentes (LI et al., 2011). Porém os mesmos possuem potencial de serem utilizados para a produção de bioetanol, tornando assim o processo mais sustentável e inserido num conceito de biorrefinaria.

O efeito das variáveis de fluxo sobre o crescimento celular associado ao acúmulo de carboidratos intracelulares, ou ainda relacionados à liberação de exopolissacarídios, ainda não foi esclarecido pela literatura, embora haja vasta literatura à respeito da influência dessas variáveis sobre a produção de biomassa.

Melhorias e inovações para o processo de produção de biocombustíveis devem ser alcançadas incluindo o desenvolvimento da abordagem de biorrefinaria, para a utilização de todas as frações da biomassa de microalgas (SOH et al., 2014).

Dentre essas frações, os exopolissacarídios (EPS), metabólitos secundários produzidos durante a fase estacionária de crescimento do microrganismo, precisam ser considerados (DE PHILIPPIS; VINCENZINI, 1998; PARIKH; MADAMWAR, 2006). O potencial de produção de EPS e a conversão deste substrato para glicose pode permitir uma maior exploração das microalgas para a produção de bioetanol (GOO et al., 2013; LAMMENS et al., 2012; YEN et al., 2013).

Além da vantagem das microalgas possuírem potencial para a produção de biocombustíveis, os cultivos podem ser inseridos entre a infraestrutura urbana ou fazer parte dela, auxiliando na remoção do CO<sub>2</sub> atmosférico nos grandes centros urbanos. E até mesmo utilizando efluentes urbanos e industriais como fonte de nutrientes para os cultivos, contribuindo para o desenvolvimento sustentável das cidades (CHISTENSON; SIMS, 2012).

Por essas razões as microalgas têm sido indicadas como uma potencial alternativa para a produção de combustíveis devido à sua capacidade de serem utilizadas como matéria-prima para a produção de biodiesel e bioetanol.

Este projeto faz parte da linha de pesquisa em Infraestrutura Sustentável, e ao grupo de pesquisa em Saneamento Ambiental, uma vez que para a produção de biocombustíveis a

partir de microalgas podem ser consideradas diversas alternativas de composição de meios de cultivos, incluindo estratégias de operação de biorreatores, bem como o uso de efluentes agroindustriais, buscando uma valoração destes. Ainda, faz parte das pesquisas vinculadas ao Laboratório de Fermentações da Universidade de Passo Fundo, como parte do projeto intitulado “Planta piloto de produção de microalgas e uso da biomassa em aquicultura, na produção de bioetanol e como antioxidante”, aprovado na chamada 56 linha 2 do CNPq.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral foi o desenvolvimento de uma estratégia de aumento de escala de produção da microalga *Spirulina platensis* cultivada em *raceways* para o aproveitamento da biomassa e do carboidrato extracelular (solúvel) visando a produção de bioetanol.

### 2.2 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos foram:

- a) Realizar a simulação computacional do fluxo a partir da geometria de *raceways* visando identificar zonas de estagnação de biomassa;
- b) A partir das velocidades definidas pela simulação de fluxo, realizar ensaios em *raceways* de 10 L para avaliar a influência da velocidade de agitação e da fase de cultivo na produção de carboidratos intra e extracelulares;
- c) Avaliar o aumento de escala da produção (*raceways* de 250 L) nas melhores condições de velocidade definidas anteriormente.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Microalgas como matéria-prima para a produção de bioetanol

Estudos recentes têm demonstrado que algumas espécies microbianas, tais como leveduras, fungos, e microalgas podem ser usadas como matérias-primas potenciais para a produção de biodiesel e bioetanol, devido à capacidade das mesmas de armazenar grandes quantidades de lipídios e carboidratos na sua biomassa (CHISTI, 2008; DRAGONE et al., 2011; TSIGIE et al., 2013). A maioria dos estudos é em relação à produção de biocombustíveis de microalgas (CHISTI, 2008; DRAGONE et al., 2011; HO et al., 2013; YEH; CHANG, 2011). Margarites (2014), em experimentos de produção de etanol a partir de biomassa de *Spirulina* sp., apresentou produtividade de 1,18 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> de etanol, utilizando 50% dos carboidratos provindos da sacarificação da biomassa e 50% a partir da glicose.

Fatores como a elevada eficiência de conversão fotossintética, o rápido crescimento, o elevado teor de lipídios e carboidratos, o uso de áreas com reduzida ou nula produtividade agrícola e a conseqüentemente a baixa competição com as culturas terrestres, fazem das microalgas uma das matérias-primas mais promissoras para a produção de biodiesel e bioetanol (ABREU et al., 2012; CHISTI, 2008). As microalgas também possuem a capacidade de modificação da composição bioquímica das células através da variação das condições de crescimento, e a possibilidade de utilizar CO<sub>2</sub> dos gases de combustão de centrais elétricas ou outras fontes industriais para aumentar a taxa de crescimento (STEPHENSON et al., 2010).

Além dessas vantagens, as microalgas (cianobactérias) são capazes de produzir polissacarídeos extracelulares (EPS), e estes podem formar cápsulas que são estruturas compactas associadas com a superfície celular ou como massa mucilaginosa amorfa, fracamente ligada às células e em muitos casos, podem ser liberados para o meio (DE PHILIPPIS; VINCENZINI, 1998; FAY, 1983).

De Philippis e Vincenzini (1998) relataram que, até 1998, 70 cepas haviam sido estudadas com relação à produção de EPS sendo a maior parte dos estudos referentes à determinação da composição em açúcares dos polímeros. Os açúcares encontrados em EPS de cianobactérias, no geral, são as hexoses, glicose, galactose e manose; as pentoses, ribose, xilose e arabinose; as desoxihexoses, fucose e ramnose e os açúcares ácidos, ácido glicurônico e galacturônico. Esses açúcares presentes nos EPS podem ser utilizados para a geração do bioetanol através do processo de fermentação.

### 3.2 Condições para produção da biomassa microalgal

As microalgas requerem condições de cultivo adequadas para crescer. Com condições otimizadas de cultivo maior é a taxa de crescimento e produtividade (FERNANDEZ et al., 2012).

O cultivo de microalgas requer condições ambientais específicas, que variam de espécie para espécie. Os parâmetros principais que influenciam a produção de biomassa incluem intensidade da luz e comprimento de onda adequado, a temperatura, a concentração de CO<sub>2</sub>, a quantidade de nutrientes, condições de mistura e contaminação (SINGH; DHAR, 2011).

Além da água, um dos fatores mais importantes para o crescimento microbiano é o carbono, sendo este o esqueleto estrutural da matéria viva, ele é necessário para todos compostos orgânicos que constituem uma célula viva.

O CO<sub>2</sub> está presente no ar atmosférico em baixas concentração o que pode limitar o crescimento rápido, e como cerca de 45% a 50% da biomassa das microalgas é de carbono, muitas vezes é necessário suplementar este carbono para que se possa atingir uma taxa de crescimento maior. Este CO<sub>2</sub> é geralmente misturado com ar em culturas gaseificadas ou injetado nas culturas de microalgas através de vasos de troca gasosa em fotobiorreatores ou tanques abertos (CHAE et al., 2006; DOUCHA et al., 2005)

A fonte de energia para as microalgas fotoautotróficas é disponibilidade e a intensidade da luz, sendo este um dos principais parâmetros que afetam o sucesso ou fracasso de culturas das microalgas. Com o aumento da intensidade de luz, aumenta a fotossíntese até que um ponto é alcançado onde a taxa máxima de crescimento é atingida (ponto de saturação) (LEE, 2001; RICHMOND, 2000). O aumento da intensidade da luz para além deste ponto não aumenta a taxa de crescimento e pode levar à foto-oxidação, danificando os receptores de luz diminuindo a velocidade de fotossíntese e produtividade (fotoinibição) (SINGH; DHAR, 2011).

Outro parâmetro que afeta o crescimento é a temperatura, que se geralmente aumentada conduz a um aumento exponencial do crescimento das microalgas, até que um nível ótimo seja atingido, após o crescimento diminui. Para culturas ao ar livre e sistemas abertos, a capacidade de controlar as temperaturas é muitas vezes é limitado, e é determinado pela temperatura atmosférica, radiação solar, e umidade. A flutuação na temperatura ambiente

pode resultar em temperaturas diurnas com diferenças de até 20 °C para as noturnas, o que pode afetar a produtividade (OLAIZOLA, 2000).

Além do carbono, as microalgas necessitam de outros nutrientes como nitrogênio, enxofre, fósforo, potássio, magnésio, cálcio e sódio. Além disso, requerem quantidades muito pequenas de elementos traços (micronutrientes), como ferro, cobre, cobalto, manganês, molibdênio e zinco. Embora necessários em pequeníssimas quantidades, os elementos traços são fundamentais para o funcionamento celular adequado, algumas microalgas ainda necessitam baixas concentrações de vitaminas no meio de cultura. As microalgas de uma mesma espécie possuem diferentes quantidades de proteínas, carboidratos e lipídeos, quando cultivadas em meios com diferentes quantidades de nutrientes (PROCHÁZKOVÁ et al., 2014; TORTORA et al., 2012).

A contaminação por espécies indesejáveis principalmente no sistema de tanques aberto é outro parâmetro que afeta a taxa de crescimento. Quando um tanque aberto é inoculado com a cepa desejada de microalgas com o objetivo de iniciar o crescimento e dominar a flora do biorreator, pode acontecer de que algumas espécies indesejadas sejam inevitavelmente introduzidas, reduzindo o rendimento e competindo com as espécies inoculadas (SCHENK et al., 2008). A *Spirulina platensis* possui a vantagem de ser cultivada em pH alcalino e meio altamente salino, fatores importantes na prevenção na contaminação do cultivo, pois limita o crescimento de microrganismos somente nessas condições (BOROWITZKA, 1999).

Em concentrações elevadas de algas, quase toda a luz disponível é absorvida somente por uma fina camada superior de células nos reatores, que pode ser evitada por meio de uma agitação adequada. A agitação deve ser suficiente para manter as células de algas em suspensão, proporcionar uma exposição uniforme de luz em todas as células, aumentar a transferência de massa para reduzir o gradiente de nutriente na cultura e para evitar a sedimentação das células. No entanto, o fornecimento de energia excessiva pode produzir danos celulares as microalgas que são suscetíveis às forças de cisalhamento, afetando o desempenho da cultura (MOLINA GRIMA et al., 2001).

### **3.2.1 Condições de agitação nos *raceways***

A agitação deve ser suficiente para manter as células de algas em suspensão e para fornecer exposição uniforme de luz de todas as células. Em fotobiorreatores a agitação evita a sedimentação das células e suporta distribuição de CO<sub>2</sub> e O<sub>2</sub> (MOLINA GRIMA et al., 1996).

A maioria dos *raceways* possuem canais com largura e profundidade constantes e curvas fechadas. Em tais sistemas, a resistência à circulação da água tem duas partes distintas: nas seções retas e nas curvas fechadas (BOROWITZKA, 2005). A maior parte da perda de energia ocorre nas curvas, por isso é necessário as modificações de designs e da velocidade de agitação para minimizar essa perda de energia (ZHANG, 2013). O desempenho da mistura pode ser determinado pela variação das propriedades hidrodinâmicas (velocidade de circulação e a presença de zonas mortas), que são influenciados pela geometria do fotobiorreator e pela velocidade de agitação (PRUVOST et al., 2008).

O rendimento da produção de microalgas inicialmente aumenta com o aumento da turbulência, provavelmente devido à melhoria do abastecimento de CO<sub>2</sub> ou a frequência do ciclo escuro-luz, mas ao atingir valor ideal, o rendimento se diminui rapidamente, com aumento de turbulência (HADIYANTO et al., 2013).

O consumo de energia também é importante uma vez que desempenha importante papel econômico na produtividade de biomassa. O consumo de energia é em grande parte determinada pela energia hidráulica necessária para manter o fluido com velocidade. Um *raceway* longo implica em mais energia consumida para movimentar a água ao longo do canal, e em adição, a forma de curvas também irá afetar a energia necessária para fazer circular o fluxo de água no canal (HADIYANTO et al., 2013).

As microalgas necessitam de uma agitação adequada, a fim de evitar fotoinibição e fotolimitação e atingir alta eficiência fotossintética, o que poderia ser atendido com diferentes soluções para manter as velocidades de fluxo elevadas e, por conseguinte, os níveis de turbulência, mas por outro lado é necessário promover a produtividade celular. Assim, a otimização fluidodinâmica não pode ser realizada sem uma verificação experimental paralela dos efeitos sobre a produção de microalgas (CHIARAMONTI et al., 2013). Em tanques de cultivo da microalga *Spirulina*, Richmond e Vonshak (1978) verificaram que dobrando a velocidade de 15 cm.s<sup>-1</sup> para 30 cm.s<sup>-1</sup> o rendimento em biomassa aumentou em 50%, e isto foi, provavelmente, devido ao regime de luz mais favorável possibilitando que a cultura fosse mais rapidamente misturada dentro do *raceway*.

O desenho do *raceway* deve abordar o problema da "zonas mortas" que se desenvolvem perto da parede jusante de curvas, uma vez que aumentam a dissipação de energia e reduzem a capacidade do *raceway*. Além disso, o campo de velocidade não uniforme resultante leva a desigualdade no tempo de residência das células no reator, o que é prejudicial para a produtividade dos *raceways*, especialmente se o reator funciona em modo contínuo. Diferentes estratégias têm sido propostas para minimizar a extensão das zonas

mortas, entre instalação de defletores de fluxo, retificadores ou palhetas guias, modificando o projeto das curvas (HADIYANTO et al., 2013; LIFFMAN et al., 2013).

Mas o alto nível de mistura, e, subsequentemente, um fluido de alta velocidade, no *raceway* é conhecido por apresentar limitação sobre o crescimento de células de algas sensíveis ao estresse hidrodinâmico, danificando a estrutura de célula, liberando o material intracelular para o meio de cultivo (SASTRE et al., 2007). Richmond (1988) mencionou que alta taxa de mistura na cultura da *Spirulina* pode resultar em danos celulares causados mecanicamente pela força de cisalhamento. Portanto, a investigação das características hidrodinâmicas e de geometria são muito importante na concepção de *raceway* para a produção de microalgas.

Na literatura, a intensidade da agitação é normalmente definida pelo número de Reynolds (Re): elevado Re está associado com nível elevado de agitação e vice-versa (RICHMOND; HU, 2013).

O número Re é definido como a razão entre a relação forças de inércia para as forças viscosas. O fluxo de Re pode ser estimado pela Equação 1.

$$Re = V \cdot D \cdot \nu^{-1} \quad (1)$$

Em que, D é o diâmetro hidráulico do canal aberto, V a velocidade de fluxo média e  $\nu$  a viscosidade cinemática A equação (1) representa um parâmetro adimensional chave na fluidodinâmica: se Re é proporcional à velocidade de fluxo, um alto Re (>3000), consequentemente, uma elevada velocidade da cultura no tanque.

A turbulência também é usada como sinônimo de Re, em muitas obras sobre a agitação de algas. Um elevado Re corresponde a fluxos turbulentos, enquanto um baixo Re corresponde a fluxos laminares (PRUSSI, et al., 2014). De modo geral, para o crescimento de algas apenas a agitação vertical é considerada como interessante, para descrever a probabilidade de uma célula de algas para captar a luz, e Re não é suficiente para resolver os problemas da agitação vertical em um *raceway* (MENDOZA, et al., 2013; VOLETI, 2012).

No contexto de melhorar a hidrodinâmica em biorreatores, a fluidodinâmica computacional (CFD) é uma ferramenta de baixo custo poderosa que já provou a sua eficácia no que diz respeito ao design de fotobiorreatores (BITOG, et al., 2011). Os modelos CFD permitem a caracterizar/estimar diversas variáveis-chave que são praticamente inacessíveis para as medições experimentais, como as tensões de cisalhamento. Recentemente o CFD tem sido aplicado para avaliar as geometrias dos *raceways* (HADIYANTO et al., 2013;

LIFFMAN et al., 2013), no entanto estes trabalhos foram apenas voltados para a avaliação de diferentes geometrias em termos de uniformidade de fluxo, mas nenhum dos resultados numéricos foi confrontado com dados experimentais de produção de biomassa (HIREIZ, et al., 2014).

Os trabalhos realizados nesta área abordam a produção de biomassa microalgal, porém nenhum deles traz a influência da agitação no acúmulo de carboidrato e na produtividade em carboidrato, sendo este um fator importante na viabilização da produção de bioetanol.

### **3.2.1.1 Fluidodinâmica Computacional**

A CFD resolve problemas que envolvem o movimento dos fluidos, utilizando um modelo computacional que representa um sistema ou dispositivo que pode ser construído, e aplica o fluxo de fluido utilizando princípios físicos e químicos para este protótipo virtual, e uma predição da dinâmica dos fluidos e os fenômenos físicos relacionados podem ser determinados (BITOG, et al., 2011).

O método utilizado pela CFD pode ser o método dos elementos finitos (MEF) que consiste em diferentes métodos numéricos que aproximam a solução de problemas de valor de fronteira descritos, tanto por equações diferenciais ordinárias, quanto por equações diferenciais parciais. Através da subdivisão da geometria do problema em elementos menores, chamados elementos finitos, nos quais a aproximação da solução exata pode ser obtida por interpolação de uma solução aproximada (KANAYAMA; MIYAOKA, 2011).

Para os escoamentos de fluidos, o modelo matemático é estabelecido com base nas equações de conservação da quantidade de movimento, da massa e da energia (HIRSCH, 1988). O escoamento turbulento é caracterizado pela formação de turbilhões devido à elevada velocidade de escoamento do fluido e engloba maior parte dos estudos de fluido em movimento. Como há grande variação das características físicas do fluido em um pequeno intervalo de tempo, o domínio deve apresentar malha fina de elementos finitos a fim de obter melhores resultados. Porém, é necessária elevada capacidade computacional na resolução das equações de Navier-Stokes que são utilizadas para modelar o fluxo (KANAYAMA; MIYAOKA, 2011).

O modelo de turbulência k- $\epsilon$  (k: energia cinética turbilhonar e  $\epsilon$ : taxa de dissipação da energia cinética turbilhonar) é provavelmente, o modelo mais amplamente utilizado e validado empregado para a turbulência e a dinâmica dos fluidos. O modelo é o favorito para aplicações industriais, devido necessitar um baixo esforço computacional e alta estabilidade

numérica. A formulação numérica deste modelo inclui duas equações de transporte para representar as propriedades de turbulência do fluxo de fluido dinâmico (HADIYANTO et al., 2013; LAUNDER; SPALDING, 1974).

A utilização dos softwares de CFD possui pelo menos três elementos principais: o pré-processamento, a solução e o pós-processamento. O pré-processamento consiste na escolha de um modelo, dentre os propostos pelo software, que caracterize de forma adequada o problema estudado, a criação da geometria através de um conjunto de ferramentas disponíveis, a determinação das condições de contorno e propriedades físicas e químicas relevantes dos elementos estudados no escoamento e a geração de uma malha sobre a geometria estudada (CUNHA, 2012; SIMÕES et al., 2004).

A fase de solução consiste na escolha de um método numérico, dentre diversos disponíveis nos softwares, para resolução das equações envolvidas no problema. Esta solução é calculada nos nós de cada elemento da malha gerada sobre o domínio, sendo desta maneira a qualidade da solução do problema governada pelo número de elementos na malha. Geralmente, quanto maior o número de elementos, maior será a qualidade do resultado, porém maior será também o custo computacional em tempo de processamento (CUNHA, 2012; SIMÕES et al., 2004).

No pós-processamento são extraídos os mapas das propriedades (físicas, químicas, entre outros), os parâmetros de interesse para serem analisados (CUNHA, 2012; SIMÕES, 2004).

A CFD é considerada uma ferramenta eficaz para complementar as limitações do campo e experiências laboratoriais (BITOG, et al., 2011). Sompetch et al. (2012) investigaram o fluxo em *raceway* com deflectores e concluíram que a proporção da área zona morta diminuiu de 14,2% para 0%, em comparação com a lagoa controle.

### **3.3 Potencial de acúmulo de carboidrato nas microalgas**

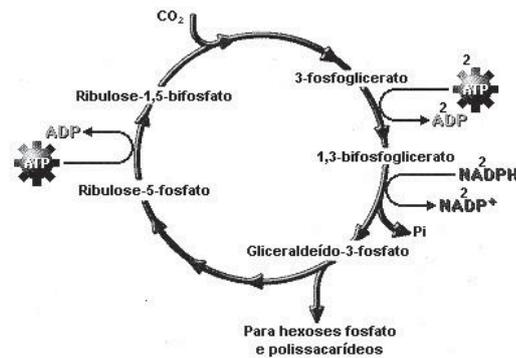
O potencial de conversão de biomassa algal em bioetanol está primeiramente ligado à obtenção de grandes quantidades de biomassa com elevado teor de carboidratos. O crescimento algal é dependente da realização da fotossíntese, que é um processo metabólico pelo qual os organismos fotoautotróficos são capazes de converter energia luminosa em energia química na forma de carboidratos (CHEN et al., 2013; MIRANDA et al., 2012).

Duas fases distintas podem ser identificadas durante a fotossíntese: a fase clara e a fase escura. Na fase clara ocorre primeiramente a absorção da energia luminosa pelos pigmentos

fotossintetizantes, seguida da transferência parcial desta energia para a ligação pirofosfato. Na fase escura, o dióxido de carbono é reduzido para carboidratos no ciclo de Calvin, utilizando a energia derivada do NADPH e ATP (ALBERTS et al., 1997).

No ciclo de Calvin, o primeiro passo é a fixação do dióxido de carbono, a molécula de  $\text{CO}_2$  condensa-se com a ribulose-1,5-bifosfato (RUBP), formando um composto instável, com seis carbonos, que é rapidamente hidrolisado a duas moléculas de 3-fosfoglicerato pela enzima ribulose 1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase, uma das moléculas é utilizada como substrato para a formação de carboidratos, enquanto a outra é usada para realizar o ciclo seguinte. Os carboidratos são formados dentro do cloroplasto, mas também no citosol (MARKOU et al., 2012a) (Figura 1).

Figura 1-Ciclo de Calvin



Fonte: WELLS e TUPY, 1998.

A produção de carboidratos serve a dois objetivos principais para as microalgas: atuam como componentes estruturais nas paredes celulares e como componentes de armazenamento no interior da célula. Os carboidratos, como os compostos armazenados, fornecem a energia necessária para os processos metabólicos dos organismos e para permitir, se necessário, a sobrevivência temporária em ambientes escuros (GEIDER; LA ROCHE, 2002).

Para obter uma maior quantidade de biomassa das microalgas rica em açúcar, que é utilizada como matéria-prima para a produção de bioetanol, a produtividade de carboidratos na célula deve ser alta.

A porcentagem de carboidratos na biomassa depende das espécies de microalgas e das condições de cultivo e ambientais. Várias espécies de microalgas, tais como *Porphyridium cruentum* (40% - 57%), *Spirogyra* sp. (33% - 64%), têm teor elevado de carboidratos (HARUN et al., 2010). As microalgas como *Chlorella*, *Chlamydomonas*, *Dunaliella*, *Scenedesmus*, e *Tetraselmis* apresentaram em estudos a capacidade de acumular grande

quantidade de carboidratos (> 40% do peso seco) (JOHN et al., 2011; RAZEGHIFARD, 2013). Pesquisadores relataram que o gênero *Chlorella* possui elevado teor de carboidratos, especialmente as espécies de *C. vulgaris*, com carboidratos de 37% - 55% do seu peso seco (BRENNAN; OWENDE, 2010; DRAGONE et al., 2011).

No entanto, para a produção de biocombustíveis ser maximizada, o elevado teor de carboidrato tem de ser combinado com a capacidade das espécies de microalgas a ter elevada produção de biomassa. Portanto, as espécies conhecidas de microalgas que possuem taxas elevadas de crescimento podem ser manipuladas para produzir os maiores valores de carboidratos (MARKOU et al., 2012a).

O controle do cultivo ou das condições ambientais é a forma comumente utilizada para a manipulação da composição da biomassa de microalgas, e maior acúmulo de carboidratos na biomassa. Os cultivos e fatores ambientais mais frequentemente relatados, que afetam o teor de carboidratos, são o tipo e a concentração da fonte de nutrientes, intensidade de luz e temperatura. Além disso, o modo metabólico (autotróficos, heterotróficos, e mixotróficos) afeta a composição da biomassa (MARKOU et al., 2012a).

A estratégia de limitação de nutrientes é considerada como sendo uma abordagem razoável para a produção de microalgas rica em carboidratos. Esta técnica é exequível porque é relativamente fácil de controlar os nutrientes no meio de cultura (DRAGONE et al., 2011; MARKOU et al., 2012a).

Vários estudos recentes têm demonstrado que o cultivo sob condições deficientes de nitrogênio eleva o teor de lipídios ou carboidratos, porque o nitrogênio em condição de esgotamento favorece que lipídios ou carboidratos sejam sintetizados preferencialmente ao invés de proteínas (DRAGONE et al., 2011; YEH; CHANG, 2011; HO et al., 2013). Estudos relacionados ao acúmulo de carboidratos relataram que com déficit de nitrogênio, culturas de *Chlorella vulgaris* acumularam carboidratos de até 38% - 41% (BRÁNYIKOVÁ et al., 2011; DRAGONE et al., 2011), cerca de 35% em *Tetraselmis cordiformis* (JI et al., 2011), enquanto que a *Spirulina platensis* acumulou 55% - 65% de carboidratos (SASSANO et al., 2010).

O fósforo é um elemento essencial para o ATP e a restrição deste nutriente afeta a estratégia global de energia das microalgas, resultando na diminuição da síntese de proteínas e acúmulo de carboidratos e/ou lipídios. Em cultivos de *Spirulina* com limitação de fósforo, foi obtido aumento nos teores de carboidratos de 9% para 65%, enquanto o teor de proteínas diminuiu de 46,5% para 25% em cultivos semi-contínuos (MARKOU, 2012).

A concentração de dióxido de carbono afeta o acúmulo de carboidratos nas microalgas. Diminuições na concentração de dióxido de carbono causaram aumento do conteúdo de carboidratos na biomassa de microalgas (THYSSEN et al., 2001). Conforme Abreu et al., (2012) a *Chlorella* acumula mais carboidratos em condições metabólicas mixotróficas. Choix et al., (2012) obtiveram maior acúmulo de carboidratos no modo heterotrófico do que sob condições fotoautotróficas, utilizando carbono inorgânico.

Em geral é conhecido que intensidades luminosas elevadas resultam em aumento no conteúdo de carboidratos (HU, 2004). Em culturas de espécies *Porphyridium*, foi observado aumento de 3 vezes de carboidratos, quando a intensidade da luz aumentou cerca de 4 vezes (FRIEDMAN et al., 1991). Conforme Ho et al. (2012), a *Scenedesmus obliquus* obteve a maior produção de biomassa e carboidratos com o aumento da intensidade da luz, até atingir  $420 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , após essa intensidade ocorreu o fenômeno da fotoinibição, diminuindo a produção e o acúmulo de carboidratos.

Embora seja certo que a temperatura afeta a composição da biomassa, resultados contraditórios são relatados em diferentes espécies de microalgas. Em culturas de *Spirulina* sp. o aumento da temperatura de 25°C para 40°C resultou em ligeiro aumento dos carboidratos na biomassa onde passou de 14% para 21% (OGBONDA et al., 2007), enquanto que no *Chaetoceros cf. wighamii* o acúmulo de carboidratos foram maiores nas temperaturas mais baixas testadas (DE CASTRO ARAÚJO; GARCIA, 2005).

### 3.3.1 Utilização dos exopolissacarídeos na produção de bioetanol

Muitos exopolissacarídeos (EPS) microbianos são atualmente utilizados, pois além de apresentarem propriedades físicas e químicas para sua utilização industrial na forma convencional, como gelificantes, emulsificantes, floculantes e hidratantes, a natureza aniônica dos EPS os faz interessantes para aplicações biomédicas, bem como para aplicações no campo da biorremediação para a remoção de metais tóxicos de águas poluídas (MAJDOUB et al., 2009; SINGH et al., 1999; YANG et al., 2009).

Os EPS de microalgas podem ter uma variedade de funções diferentes dependendo da cepa, das características físico-químicas e do seu habitat natural. O açúcar mais frequentemente encontrado é a glicose, em mais de 90% dos EPS, seguido por galactose, manose e ramnose (DE PHILIPPIS; VINCENZINI, 1998).

Segundo Nicolaus et al. (1999) a *Spirulina* sp. apresenta quantidade de exopolissacarídeo semelhante em condição de crescimento padrão em relação ao aumento de

nitrogênio e também em relação ao aumento de fosfato. Já a ausência de NaCl e aumento da temperatura causou pequena diminuição na produção de EPS. Quando o conteúdo de nitrogênio foi diminuído ou estava ausente houve forte aumento na quantidade total de polissacarídeo.

Conforme Rippka e Herdman (1992) a produção de EPS pela *Spirulina* sp. atingiu 55 mg.L<sup>-1</sup> e concentração celular de 12 g.L<sup>-1</sup>. E a razão molar de açúcar dos EPS da *Spirulina* sp. cultivadas sob condições normais, para galactose, glicose e manose foi 1; 5,8 e 3,6 respectivamente, vale ressaltar que *Spirulina* sp. não contém pentoses como resíduos de açúcar, mas apenas hexoses (MORVAN et al., 1997).

Trabelsi et al., (2009a) avaliaram as características físico-químicas dos exopolissacarídeos (EPS) extracelulares produzidas pela *Spirulina platensis*, a qual indicou que os EPS contem carboidratos (13%) e proteínas (55%). E a análise por cromatografia gasosa indicou que a porção de carboidratos dos EPS era composta de sete açúcares: galactose (14,9%), xilose (14,3%), glicose (13,2%), fructose (13,2%), ramnose (3,7%), arabinose (1%) e manose (0,3%) e dois ácidos urônicos, ácido galacturônico (13,5%) em ácido glucurônico (0,9%).

Goo et al. (2013) avaliaram a viabilidade de transformar os EPS produzidos por *D. tertiolecta* em bioetanol, e evidenciaram que o glucano presente no EPS pode ser convertido em glicose e em seguida em bioetanol.

### **3.4 Sistema de cultivo das microalgas**

A escolha do sistema de cultivo é um aspecto importante, que afeta significativamente a eficiência e eficácia do custo do processo de produção de biocombustíveis de microalgas (CARVALHO et al., 2006; LEE, 2001).

As microalgas têm sido tradicionalmente cultivadas em fotobiorreatores abertos, como tanques abertos, devido à simplicidade e baixo custo deste tipo de design. Infelizmente, esses fotobiorreatores permitem apenas controle limitado das condições de operação. Além disso, as culturas podem ser facilmente contaminadas (FERNANDEZ et al., 2012; TREDICI, 2004). No entanto, para a produção de produtos de alto valor a partir de microalgas que não podem ser mantidas em tanques abertos, é necessário empregar sistemas fechados, tais como fotobiorreatores tubulares, que permitem o controle das condições de funcionamento, evitando contaminações (FERNANDEZ et al., 2012).

O cultivo em larga escala de microalgas em sistemas ao ar livre, tanques abertos está bem estabelecido (BOROWITZKA, 2005). Os tanques podem ser escavados e revestidos com materiais impermeáveis ou podem ser construídos com paredes, e normalmente é utilizado um sistema de pás para realizar a agitação. Os tanques abertos são adequados para um pequeno número de espécies de algas que podem tolerar as condições ambientais extremas. Tais espécies de algas incluem crescimento rápido, como a *Chlorella*, *Spirulina* e *Dunaliella* que prosperam em ambientes altamente alcalinos ou salinos (CHISTI, 2007).

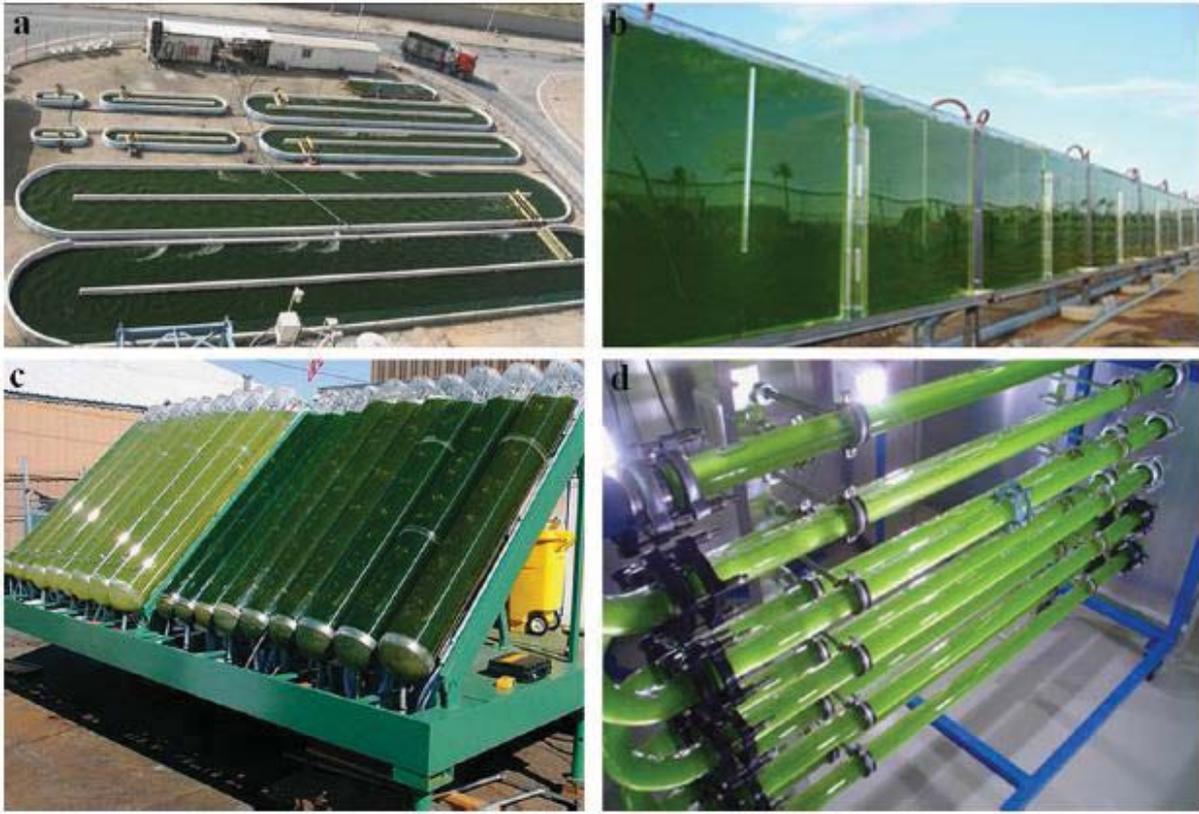
Os problemas associados com os sistemas abertos incluem a contaminação, ambientes não controlados, a evaporação, a adequação limitada das espécies, baixas produtividades volumétricas, e a necessidade de uma grande área de terra, o que têm estimulado o desenvolvimento de fotobiorreatores fechados, a fim de superar a ineficiência dos sistemas anteriores (SINGH; DHAR, 2011).

Há dois tipos principais de fotobiorreatores fechados, são os dos tipos tubulares e em placas. Devido à estrutura fechada e o ambiente relativamente controlável, os fotobiorreatores fechados pode atingir alta densidade celular e são de fácil manutenção da monocultura (LEE, 2001; UGWU et al., 2008).

Os fotobiorreatores fechados podem ser construídos com vidro ou plástico transparente, podem ser horizontal, vertical, cônico, e inclinados. A mistura pode ser realizada através do transporte aéreo ou sistema de bomba (UGWU et al., 2008). Os fotobiorreatores fechados permitem a concentração de células muito mais elevadas do que o sistema tanques abertos, devido à grande área de iluminação, e menores problemas de contaminação. As desvantagens são gradientes de pH, oxigênio dissolvido e CO<sub>2</sub> ao longo dos tubos, o crescimento de incrustações nas paredes e estresse hidrodinâmico (LEE, 2001; UGWU et al., 2008)

Existem vários relatos a respeito do design, eficiência e eficácia de custo de um processo de produção de microalgas através de tanques abertos (LEE, 2001; CHISTI, 2007). Mesmo que o sistema de tanques abertos pareça ser favorecido para o cultivo comercial de microalgas no presente devido aos seus baixos custos de capital, o sistema fechado oferece melhor controle sobre a contaminação, a transferência de massa e outras condições de cultivo. A combinação do fotobiorreatores fechado e de tanques abertos combinam as vantagens dos dois e tem demonstrado ser eficaz (HUNTLEY; REDALJE, 2007) (Figura 2).

Figura 2 -Fotobiorreatores utilizados no cultivo de microalgas: (a) *raceway pond* (b) tipo de placa plana, (c) tipo tubular inclinado e (d) tipo horizontal / contínuo.



Fonte: BITOG et al., 2011.

### 3.5 Obtenção de biocombustíveis no contexto de biorrefinarias

Estudos indicaram que a produção de biocombustíveis de microalgas está relativamente perto de ser economicamente viáveis, dada à evolução esperada em relação às condições de mercado e tecnologia de produção (STEPHENS et al., 2010). Além dos carboidratos, considerados matéria prima para a produção de bioetanol, a biomassa de microalgas também contém vários outros componentes valiosos, incluindo os lipídios, que podem ser convertidos em biodiesel; os pigmentos e as proteínas possuem aplicações como alimentos funcionais e para a obtenção de nutracêuticos e fármacos (LAMMENS et al., 2012; YEN et al., 2013). Além da biomassa, os EPS gerados por algumas espécies de microalgas devem ser considerados para obtenção de diversos produtos (YANG et al., 2009)

A melhoria da viabilidade econômica pode ser alcançada pelo acoplamento de produção de biocombustíveis com a produção simultânea de produtos de alto valor em um conceito de biorrefinaria. A integração do cultivo de microalgas com piscicultura, instalações de processamento de alimentos e estações de tratamento de águas residuais, oferece a

possibilidade de processamento de resíduos através da reciclagem da matéria orgânica e, ao mesmo tempo o fornecimento de nutrientes de baixo custo (CARRIQUIRY et al., 2011).

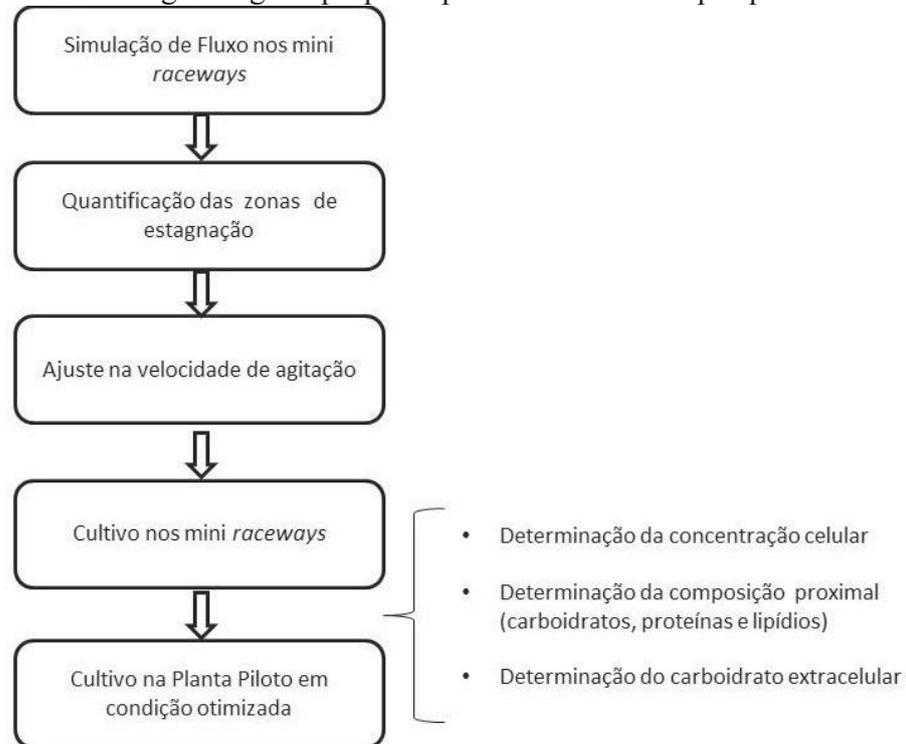
Vários compostos das microalgas são úteis, tais como pigmentos ( $\beta$ -caroteno, astaxantina, ficobiliproteínas), ácidos graxos (ácido  $\gamma$ -linolénico, ácido eicosapentaenóico, ácido araquidônico), vitaminas e aminoácidos essenciais podem ser aplicados em humanos e nutrição de animais, no setor farmacêutico, cosméticos e aquicultura (CARDOZO et al., 2007; SKJÅNES et al., 2012).

Portanto, o conceito tecnológico de biorrefinarias de microalgas merece maiores investigações. Em particular, a utilização dos EPS na produção de bioetanol, pois esse processo pode auxiliar na viabilidade econômica e comercial de converter os componentes de microalgas para biocombustíveis e em outros produtos de valor comercial.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

Na Figura 3 é apresentado um fluxograma da metodologia proposta na pesquisa.

Figura 3 - Fluxograma geral proposto para os métodos da pesquisa



### 4.1 Planta piloto *raceways*

Os mini-tanques e tanques em escala piloto estão instalados em uma planta piloto de cultivo de microalgas, localizada nas dependências do Parque Científico e Tecnológico da UPF (UPF Parque). Os recursos para a instalação da Planta Piloto foram provenientes do projeto aprovado na chamada 56 linha 2 do CNPq (2013), intitulado “Planta piloto de produção de microalgas e uso da biomassa em aquicultura, na produção de bioetanol e como antioxidante”.

A estufa construída em filme plástico transparente foi adquirida de empresa especializada, e possui sistema automático de controle de temperatura, que é necessário para os cultivos utilizados na pesquisa, pois minimiza os efeitos ambientais na produtividade. A estufa contém painel evaporativo e exaustores para diminuir a temperatura e um aquecedor de 24.000 W, com isso é possível manter a temperatura interna em aproximadamente 30° C (Figura 4). A estufa possui 9 m de comprimento e 6,4 m de largura.

Os *raceways* de fibra de vidro foram projetados com volume útil de 350 L e 2900 L com um sistema de pás para realizar a agitação do cultivo.

Os mini *raceways* em acrílico, foram construídos com as mesmas relações de diâmetro e comprimento dos *raceways* da planta piloto, para que as condições de cultivo otimizadas nos mini *raceways*, fossem utilizadas na planta piloto.

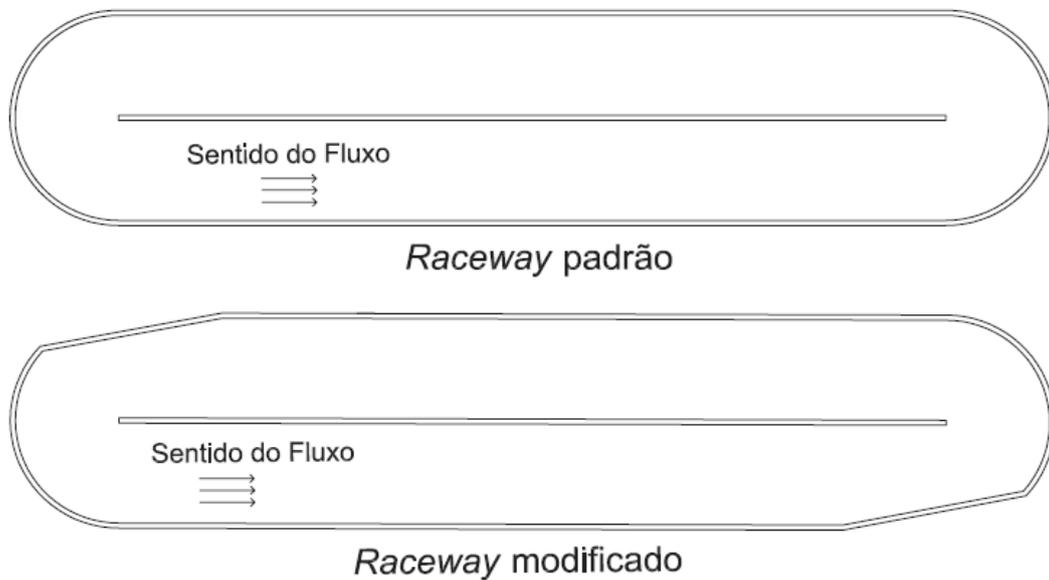
Figura 4 - Imagem geral do interior da estufa para cultivo de microalgas.



#### 4.2 Projeto e construção dos *raceways*

A geometria dos *raceways* é um parâmetro importante por tornar possível evitar a deposição de sólidos que ocorre em áreas de estagnação. Esta deposição pode ocasionar degradação de matéria orgânica com fermentações indesejáveis, podendo causar depleção da cultura. A partir destas considerações buscou-se na literatura geometrias já testadas de forma a minimizar esses efeitos negativos. Duarte Filho (2002) testou quatro diferentes geometrias de *raceways* para a microalga *Spirulina*, tendo observado que a inclusão de curvas concêntricas e estreitamentos evitaram a deposição de material, quando comparados ao desenho padrão. Comparando-se a melhor configuração testada com a dos tanques de desenho padrão, observou aumento de 31,08% de biomassa, obtidas em 600 h de cultivo (Figura 5).

Figura 5 - Modelo padrão e modificado de *raceway* utilizados por Duarte Filho (2002) para cultivos com *Spirulina*



Fonte: Adaptado de Duarte Filho, 2002.

A partir da geometria modificada foram projetados quatro *raceways* com capacidade útil de 350 L e capacidade total de 580 L (Apêndice A) e um com capacidade de útil 2900 L e capacidade total de 3650 L (Apêndice B). Os *raceways* foram construídos em Fibra de vidro manta 450 com resina especial isoftálica e o acabamento com Gel Isoftálico com UV que protege os tanques contra a radiação ultravioleta. O sistema de agitação é realizado por pás de aço inox e eixo movido por motor de corrente alternada (Figura 6).

Figura 6 – Imagem do *raceway* de 350 L de fibra de vidro



Mini *raceways* foram projetados em escala laboratorial possuindo as mesmas relações de diâmetro e comprimento dos *raceways* da planta piloto, com a capacidade útil de 10 L e capacidade total de 18,65 L (Apêndice C). Os mini *raceways* foram construídos em acrílico com a espessura de 4 mm, o sistema de agitação foi através de pás de aço carbono, movidas por um motor de 12 V de corrente contínua e 75 rpm. O sistema de alimentação do motor possui uma fonte com entrada de 220 V e saída de 12 V e 20 A, e um regulador de tensão responsável por alterar a rotação do motor. Através do regulador de tensão foi possível estabelecer diferentes rotações para o motor e por consequência diferentes velocidades de agitação do cultivo (Figura 7).

Figura 7 - Imagem dos mini raceways em acrílico e do sistema de agitação



### 4.3 Simulação do fluxo nos mini *raceways*

A simulação do fluxo é uma ferramenta que auxiliou na definição das velocidades de agitação nos *raceways*, aferindo assim a melhor velocidade a ser empregada nos *raceways* de acordo com sua geometria, corroborando com dados experimentais de produção de biomassa e carboidrato.

O *software* utilizado para realizar a simulação do fluxo foi COMSOL Multiphysics 4.3, sendo que a simulação foi dividida em três etapas: o pré-processamento, a solução e pós-processamento.

#### 4.3.1 Pré-processamento da Simulação

O fluxo foi simulado nos mini *raceways* confeccionados de acrílico, com sistema de agitação na forma de pás.

No *software* para realizar a simulação o primeiro passo foi a definição e criação da geometria da região do escoamento, exportando arquivos com extensão compatível de CAD ou na própria área do *software* específica para construção da geometria. Também foi necessário especificar o fluxo do fluido, isto é, definir as condições de contorno disponíveis para a simulação, que são as paredes do *raceway*. No escoamento interno, as condições de entrada (*inlet*) e de saída (*outlet*) do fluido foram definidas para estudar o comportamento do

escoamento no domínio, a condição de entrada e saída definidas foram as diferentes velocidades empregadas pelo sistema de agitação variando de  $0,1 \text{ m.s}^{-1}$  a  $0,45 \text{ m.s}^{-1}$ .

O próximo passo foi criar a malha que consiste em subdividir o domínio em pequenas e inúmeras células necessárias à aplicação das equações. Nesta discretização os valores das propriedades deste escoamento, como a velocidade do fluido, foram determinados em cada célula, sendo que o número de células foi definido pelo *software*, sendo utilizada a opção normal do número de células disponíveis.

O último passo antes da solução da simulação foi definir as propriedades físicas do fluido como densidade e viscosidade do fluido, para fins de simplificação foram utilizados a densidade ( $998,2 \text{ kg.m}^{-3}$ ) e a viscosidade da água ( $0,001002 \text{ N.s.m}^{-2}$ ) a  $20^\circ\text{C}$ , e as propriedades do material dos mini *raceways* (acrílico), densidade ( $1190 \text{ kg.m}^{-3}$ ), coeficiente de expansão termal ( $1420 \text{ J.kg}^{-1}.\text{k}^{-1}$ ), módulo de elasticidade ( $3.10^9 \text{ Pa}$ ), e condutividade térmica ( $0,19 \text{ W.m}^{-1}.\text{k}^{-1}$ ).

#### 4.3.2 A solução da simulação

Nas etapas da simulação computacional os modelos consideram um meio contínuo ocupando todo o domínio de cálculo. Para as condições das simulações, o *software* resolveu a equação de Reynolds Médio Navier-Stokes (*Reynolds Averaged Navier–Stokes*) e o modelo de turbulência  $k-\varepsilon$ , as quais descrevem o escoamento de um fluido e permitem calcular campos de velocidade e pressão de um escoamento.

O modelo de turbulência para as simulações foi o  $k-\varepsilon$  padrão, que segundo Launder e Spalding (1974) é um modelo semi-empírico baseado nas equações do modelo de transporte para a energia cinética turbulenta e sua taxa de dissipação. O modelo  $k-\varepsilon$  padrão, tem sido amplamente usados para modelagem de turbulência, e foi adotado para descrever o comportamento do fluido nos *raceways* (HUANG et al., 2014; WANG et al., 2014; ZHANG et al., 2015). Conforme Prussi et al., (2014) que realizaram em um *raceway* uma comparação entre os resultados quantitativos de dados experimentais obtidos através de velocímetro acústico doppler e os numéricos da simulação, onde observaram que os dados numéricos são próximos aos dados experimentais para a maior parte dos pontos no domínio, mostrando a capacidade do modelo para prever os valores dentro de vasta gama de velocidades medidas.

### 4.3.3 Pós-processamento da simulação

Após as etapas de processamento foi possível visualizar a solução numérica na forma de gráficos, como de superfície e gráficos de vetores, de qualquer variável envolvida na simulação, o que facilita o entendimento do fluxo nos *raceways*.

### 4.3.4 Quantificação das zonas de estagnação

A quantificação das “zonas mortas” foi realizada utilizando a seguinte suposição: uma vez que a velocidade do fluido mais baixa necessária para evitar a sedimentação e manter as células em suspensão no tanque é de  $0,1 \text{ m.s}^{-1}$  (DODD, 1986; WEISSMAN et al., 1988), foi utilizado esse valor como o limite para a existência de zonas mortas, sendo que para quantificar o volume morto foi utilizada a Equação (2) (HADIYANTO et al., 2013).

$$\% \text{ Zona Morta} = \frac{V_{|v < 0,1}}{V_{\text{reator}}} \cdot 100\% \quad (2)$$

Em que  $V_{|v < 0,1}$  é o volume de líquido com velocidade inferior a  $0,1 \text{ m.s}^{-1}$  e  $V_{\text{reator}}$  é o volume total do reator.

## 4.4 Ajuste na velocidade de agitação nos *raceways*

A velocidade do fluido no mini *raceway* foi realizada pelas rotações das pás. Foram utilizadas diferentes rotações para atingir uma mistura eficiente do meio de cultura, com uma transferência de massa adequada.

As rotações do sistema de agitação foram testadas a fim de verificar se há influência da velocidade de agitação na produção da biomassa e na produtividade de carboidratos intra e extracelulares. As velocidades iniciais estudadas foram  $0,1 \text{ m.s}^{-1}$ ;  $0,15 \text{ m.s}^{-1}$ ;  $0,20 \text{ m.s}^{-1}$ ;  $0,25 \text{ m.s}^{-1}$ ;  $0,30 \text{ m.s}^{-1}$ ;  $0,35 \text{ m.s}^{-1}$ ;  $0,40 \text{ m.s}^{-1}$  e  $0,45 \text{ m.s}^{-1}$ .

Para estimar a velocidade empregada ao fluido pelas pás, foi utilizado a Equação (3), na qual a velocidade periférica das pás é a velocidade empregada ao fluido.

$$V_p = \frac{\pi \times D \times n}{60} \quad (3)$$

Em que, D é o diâmetro do rotor (m), n é a velocidade de rotação (rpm) e Vp é a velocidade periférica ou tangencial ( $\text{m.s}^{-1}$ ).

A partir da especificação da velocidade, nos ensaios em mini *raceways*, que apresentou a maior produtividade em carboidratos intracelulares da microalga, esta foi aplicada no aumento de escala, em *raceways* de 350 L.

#### 4.5 Condições de cultivo

A microalga *Spirulina platensis* LEB 52 foi cultivada em meio Zarrouk (ZARROUK, 1966) (Tabela 1) com concentrações inferiores de nutrientes (Zarrouk 20%) utilizadas para elevar o acúmulo de carboidratos pela microalga.

Tabela 1: Composição do meio de Zarrouk

Reagentes	Concentração ( $\text{g.L}^{-1}$ )
NaHCO <sub>3</sub>	16,8
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5
NaNO <sub>3</sub>	2,5
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,0
NaCl	1,0
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,2
CaCl <sub>2</sub>	0,04
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,01
EDTA	0,08
*Solução A <sub>5</sub>	1,0 ml
*Solução B <sub>6</sub>	1,0 ml

\***Solução A5:** ( $\text{g.L}^{-1}$ ): H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 2,86; MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O 1,81; ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,222; CuCO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O 0,079; MnO<sub>3</sub> 0,015.

\***Solução B6:** ( $\text{mg.L}^{-1}$ ): NH<sub>4</sub>VO<sub>3</sub> 22,86; KCr(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>.12H<sub>2</sub>O 192; NiSO<sub>4</sub>.6H<sub>2</sub>O 44,8; Na<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O 17,94; TiSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.8H<sub>2</sub>O 61,1; CO(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O 43,98.

A concentração inicial do inóculo de *Spirulina platensis* LEB 52 foi 0,20  $\text{g.L}^{-1}$ , sendo o cultivo mantido com agitação contínua por meio de pás. O cultivo foi em estufa de filme transparente, com luminosidade em condições ambientais não controladas, sendo que a radiação solar média dos dias nos quais os ensaios foram realizados está apresentada na Tabela 2.

Os cultivos foram realizados em blocos devido à disponibilidade de apenas dois conjuntos de mini *raceways*, com ensaios em duplicata, exceto para os ensaios realizados nas velocidades de  $0,30 \text{ m.s}^{-1}$  e  $0,25 \text{ m.s}^{-1}$ , nos qual um dos conjuntos apresentou falha mecânica da agitação, que acarretou no descarte do experimento. As laterais dos mini *raceways* foram fechadas com papel pardo para evitar a entrada de luz, sendo assim o cultivo ficou em contato com a luz só na parte superior dos mini *raceways*.

Tabela 2: Data e a radiação solar média em que os blocos e as réplicas dos experimentos foram realizados

<b>Experimento</b>	<b>Data</b>	<b>Radiação média (<math>\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}</math>)*</b>
$0,30 \text{ m.s}^{-1}$	25/05 a 09/06/2015	365,07
$0,20$ e $0,45 \text{ m.s}^{-1}$	07/07 a 21/07/2015	341,87
$0,25 \text{ m.s}^{-1}$	27/08 a 07/09/2015	617,21
$0,10$ e $0,40 \text{ m.s}^{-1}$	22/09 a 03/10/2015	502,54
$0,15$ e $0,35 \text{ m.s}^{-1}$	16/10 a 27/10/2015	670,88
$0,35 \text{ m.s}^{-1}$ **	04/01 a 10/02/2016	772,52

\*Nos dados de radiação foram considerados as transmissividades da tela anti-granizo (82%) e do plástico filme (80%). \*\* Experimento realizado em escala de 250 L. Os demais experimentos foram realizados nos mini *raceways* de 10 L.

Fonte: EMBRAPA Trigo (2016).

Os cultivos realizados nos *raceways* em escala piloto (250 L) foram realizados em duplicata, com as mesmas condições de cultivo, aos realizados nos mini *raceways* com a velocidade de  $0,35 \text{ m.s}^{-1}$ .

Os cultivos foram realizados até as microalgas atingirem a fase estacionária (FE), sendo que nessa fase foi retirada parte do cultivo para determinação da concentração de carboidratos extra e intracelulares, proteínas, lipídios e umidade da biomassa da microalga. O restante do cultivo permaneceu até atingir a fase de declínio (FD), onde foram novamente realizadas estas determinações, a fim de avaliar se havia influência das fases de crescimento sobre a composição bioquímica da microalga.

A separação da biomassa foi feita por filtração em tela de nylon 180 fios com posterior secagem em estufa a  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  por 24 h. O meio livre de células de microalga foi utilizado para a determinação dos carboidratos extracelulares e a biomassa seca para as determinações da composição bioquímica da biomassa.

## 4.6 Determinações analíticas

### 4.6.1 Determinação dos parâmetros de crescimento

A concentração de biomassa das microalgas durante os cultivos foi determinada a cada 24 h através da medida de densidade ótica em espectrofotômetro a 670 nm (COSTA et al., 2002), utilizando-se uma relação pré-estabelecida entre a massa seca de biomassa e a absorbância.

As curvas de crescimento microalgal foram construídas ao longo do tempo, das quais foram obtidas as concentrações finais de biomassa, a velocidade específica máxima de crescimento e o tempo de geração para cada experimento.

Os parâmetros avaliados foram concentração final de biomassa ( $X_f$ , g.L<sup>-1</sup>); produtividade máxima de biomassa ( $P_{m\acute{a}x}$ , g.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>), obtida segundo a Equação (4), velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{m\acute{a}x}$ , d<sup>-1</sup>), obtida por regressão exponencial aplicada à fase logarítmica de crescimento, através da Equação (5). O tempo de geração (d) foi calculado a partir das velocidades específicas máximas de crescimento, o qual é definido como sendo o tempo necessário para a duplicação da biomassa, conforme a Equação (6) (SCHMIDELL et al., 2001).

$$\text{Produtividade em biomassa}_{m\acute{a}x} (\text{g. L}^{-1}. \text{d}^{-1}) = \frac{X - X_0}{t - t_0} \quad (4)$$

Em que, X é concentração de biomassa (g.L<sup>-1</sup>) no tempo t (d), e X<sub>0</sub> é a concentração de biomassa (g.L<sup>-1</sup>) no tempo t<sub>0</sub> (d).

$$\text{Velocidade específica máxima de crescimento}_{m\acute{a}x} (\text{d}^{-1}) = \frac{1}{\Delta t} \cdot \text{Ln} \frac{X_2}{X_1} \quad (5)$$

Em que, X<sub>i</sub> é concentração de biomassa (g.L<sup>-1</sup>), e t é tempo (h).

$$\text{Tempo de geração} (\text{d}) = \frac{\text{Ln} 2}{\mu_{m\acute{a}x}} \quad (6)$$

Em que,  $\mu_{m\acute{a}x}$  = velocidade específica máxima de crescimento (d<sup>-1</sup>).

#### 4.6.2 Quantificação dos exopolissacarídeos

O preparo da amostra para a quantificação dos carboidratos extracelulares liberados (exopolissacarídeos solúveis - EPS) foi realizado conforme Mota et al. (2013). A biomassa foi separada através de filtração em tela de nylon 180 fios e o líquido resultante foi concentrado em rotaevaporador a 40 °C, com posterior diálise em membrana (12-14 kDa), utilizando-se um volume mínimo de 10 vezes durante 24 h em água corrente e 24 h em água destilada para retirada de sais e materiais de baixo peso molecular. A determinação dos exopolissacarídeos foi realizada pelo método fenol-sulfúrico, descrito por Dubois et al. (1956).

#### 4.6.3 Caracterização da biomassa de microalga

O preparo da amostra para quantificar o teor de carboidrato e proteínas foi através da sonicação da biomassa seca para rompimento celular. Para tal, 5 mg de biomassa foi adicionada de 10 mL de água destilada e então sonicada por cinco ciclos de 59 s em Sonicador de Ponteira Unique - Modelo: DES500.

O teor de carboidratos foi determinado pelo método fenol-sulfúrico (Dubois et al., 1956) (ANEXO I).

A produtividade em carboidratos nos cultivos ( $\text{g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ ) foi obtida de acordo com a Equação (7) (MARGARITES, 2014).

$$\text{Produtividade em carboidratos (g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}) = \frac{X_f \times \text{CHO}}{100 \times t_c} \quad (7)$$

Em que,  $X_f$  é a concentração final de biomassa ( $\text{g.L}^{-1}$ ), CHO é a concentração de carboidratos (%) e  $t_c$  é tempo de cultivo (d).

O teor de proteínas na biomassa algal foi determinado conforme metodologia proposta por Lowry et al. (1951) (ANEXO II). A concentração de lipídios da biomassa microalgal foi determinada através do método de Folch et al. (1957) (ANEXO III). A umidade foi determinada por metodologia oficial da AOAC (2000). Os teores de carboidrato, proteína e lipídios foram apresentados em base seca.

#### **4.7 Análise dos dados**

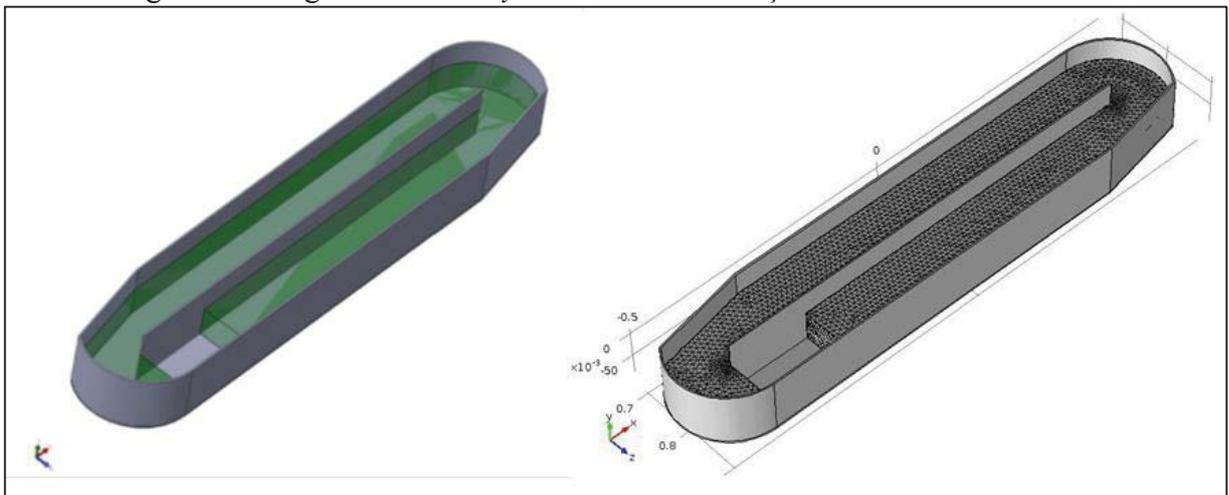
As diferenças entre as médias foram avaliadas pela Análise de Variância no nível de 95% de confiança e com posterior comparação entre estas pelo Teste de Tukey.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Estudo da simulação do fluxo

A geometria 3D do *raceway* foi importada para o *software* COMSOL Multiphysics 4.3. O volume que representa o líquido foi discretizado em 162.722 células de malha tetraédrica, definindo o domínio da simulação (Figura 8).

Figura 8 - Imagem do *raceway* em 3D e discretização do volume em células



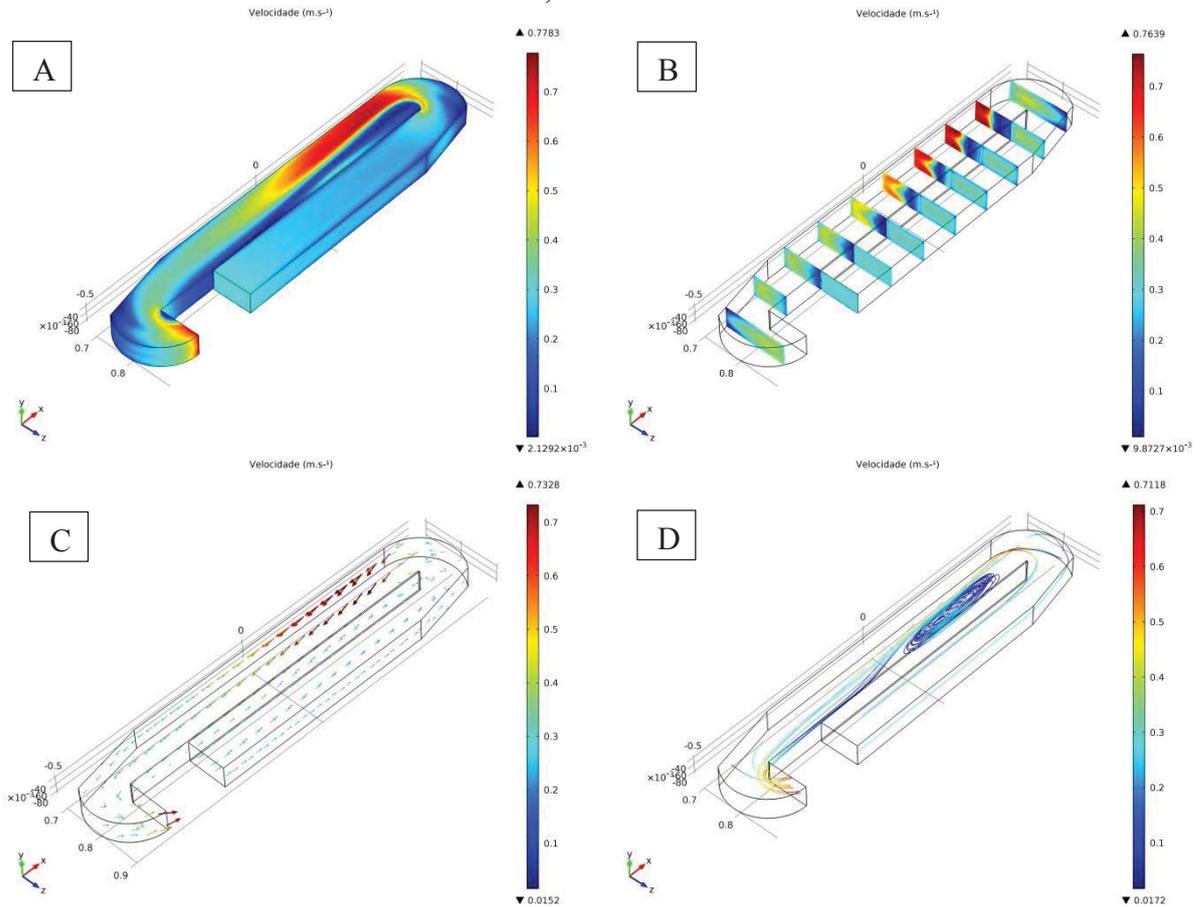
Para cada condição de entrada, que variou de  $0,1 \text{ m.s}^{-1}$  a  $0,45 \text{ m.s}^{-1}$  foi realizada uma simulação, para obter o volume do *raceway* em que velocidades inferiores a  $0,1 \text{ m.s}^{-1}$  poderiam ser observadas. Com relação ao comportamento fluidodinâmico (Figura 9) do escoamento foi possível observar que há zonas em que a velocidade aumenta no interior do *raceway*, mas também há zonas onde a velocidade diminui em relação à velocidade inicial empregada. Os pontos mais problemáticos são aqueles onde a velocidade diminui a ponto de criar zonas com velocidade inferior a  $0,1 \text{ m.s}^{-1}$ , criando zonas de estagnação da biomassa, o que pode afetar a produtividade (Apêndice D).

As zonas de menor velocidade no *raceway* (Figura 9), representadas pela cor azul escuro, estão presentes nas curvas, onde observa-se a maior perda de carga, e ao lado oposto do sistema de agitação, pois devido a geometria do *raceway*, ocorre um fenômeno de vórtice no fluxo como pode ser observado na Figura 9D.

As maiores velocidades ocorreram no lado oposto do sistema de agitação, provavelmente ocasionado pela diminuição da secção de escoamento no lado do sistema de agitação. Zhang et al. (2015) observaram a mesma influência na simulação do fluxo com a

adição de deflectores nos *raceways*, onde foram observadas maiores velocidades no estrangulamento da secção de escoamento.

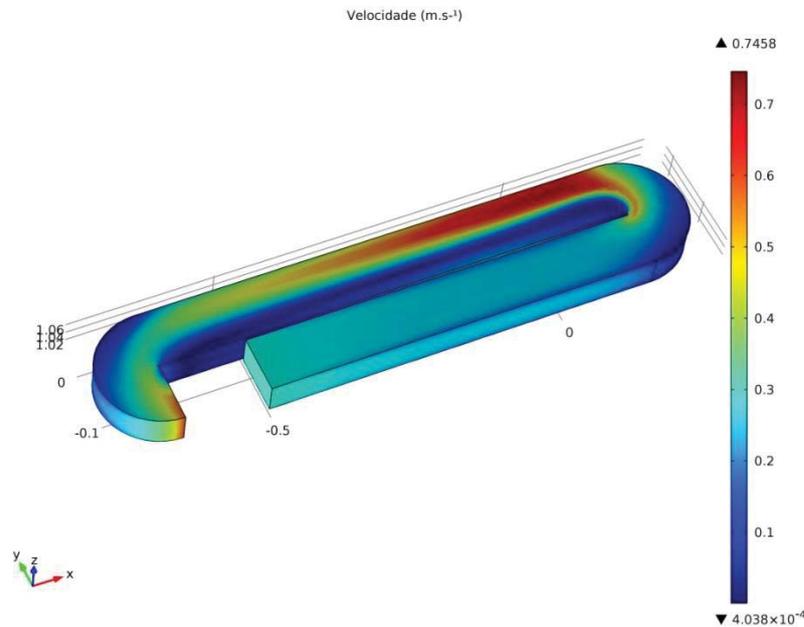
Figura 9 - Comportamento fluidodinâmico no *raceway* modificado com velocidade inicial de  $0,30 \text{ m.s}^{-1}$ .



A mesma simulação foi realizada no tanque de modelo padrão com o intuito de verificar o comportamento do fluxo no interior do *raceway*, sendo possível verificar que com a mesma velocidade inicial ( $0,30 \text{ m.s}^{-1}$ ) o *raceway* padrão apresentou zonas com menores velocidades quando comparado com o *raceway* modificado, sendo esse um dos possíveis motivos para que o tanque modificado e testado por Duarte Filho (2002) para a microalga *Spirulina*, tenha possibilitado maior produtividade de biomassa (Figura 10).

Empregando a velocidade inicial de  $0,15 \text{ m.s}^{-1}$  nos dois *raceways*, o *raceway* padrão apresentou 21,7% do volume com velocidades inferiores a  $0,1 \text{ m.s}^{-1}$ , enquanto que no *raceway* modificado esse volume é de 15,08%, demonstrando-se através da simulação de fluxo que o *raceway* modificado é mais eficiente em relação à redução das zonas de estagnação.

Figura 10 - Comportamento fluidodinâmico no *raceway* padrão com velocidade inicial de  $0,30 \text{ m.s}^{-1}$ .



### 5.1.1 Quantificação das zonas mortas

O diâmetro das pás responsável pela agitação do cultivo foi  $0,287 \text{ m}$ , obtendo-se assim as rotações necessárias para atingir as velocidades estipuladas. O volume do reator considerado para os cálculos foi  $9,35 \text{ L}$ , pois foi necessário desconsiderar a área ocupada pelas pás.

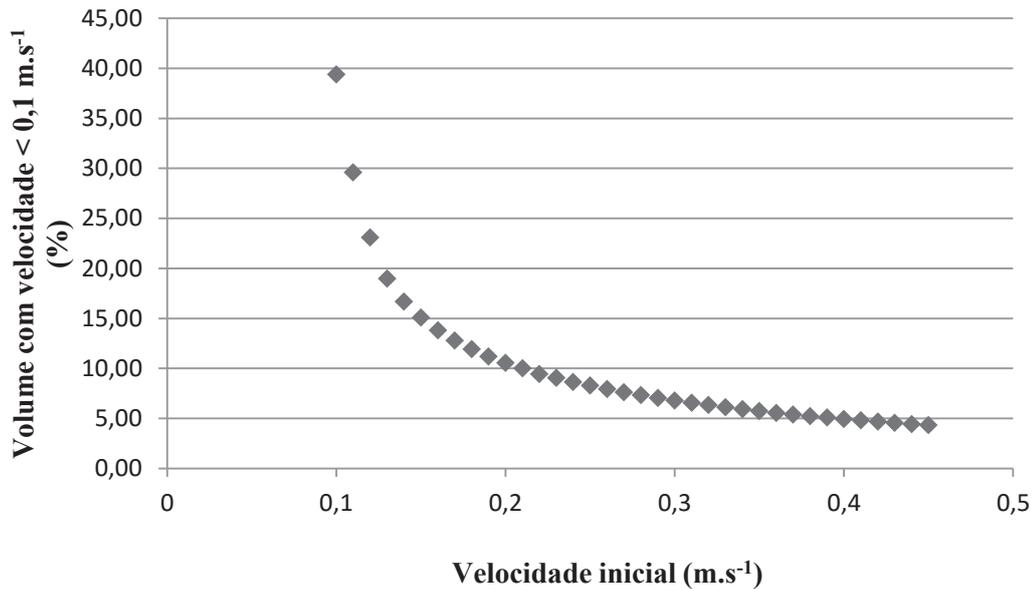
Após a simulação do fluxo foram obtidas as velocidades máximas e mínimas dentro do *raceway*, bem como o volume com a velocidade menor que  $0,1 \text{ m.s}^{-1}$ . Com isso foi possível estimar o percentual do *raceway* que possui velocidade menor que  $0,1 \text{ m.s}^{-1}$ , em cada uma das velocidades estipuladas na simulação, ou seja, aquele volume com velocidade igual ou menor que  $0,1 \text{ m.s}^{-1}$  que são consideradas zonas mortas no reator, afetando a produtividade da microalga (Tabela 3). Velocidades maiores que  $0,1 \text{ m.s}^{-1}$  são necessárias para que ocorra a exposição frequente das células das microalgas a luz, evitando o assentamento de células de algas para o fundo do reator, além de homogeneizar a distribuição de nutrientes e aumentar a utilização de  $\text{CO}_2$  no reator (BRUNE et al., 2003).

Tabela 3: Rotação das pás, velocidades iniciais, velocidade máxima, velocidade mínima e volume com a velocidade menor que 0,1 m.s<sup>-1</sup> no mini *raceway*.

rpm	Velocidade Inicial (m.s <sup>-1</sup> )	Velocidade máxima (m.s <sup>-1</sup> )	Velocidade mínima (m.s <sup>-1</sup> )	Volume com velocidade < 0,1 m.s <sup>-1</sup> (m <sup>3</sup> )	Volume < 0,1 m.s <sup>-1</sup> (%) “zonas mortas”
6,7	0,1	0,2434	0,0000980	0,0036788	39,38
7,3	0,11	0,2803	0,0000696	0,0027659	29,61
8,0	0,12	0,3061	0,0000614	0,0021562	23,08
8,7	0,13	0,3320	0,0000686	0,0017739	18,99
9,3	0,14	0,3579	0,0000125	0,0015590	16,69
10,0	0,15	0,3839	0,0000253	0,0014090	15,08
10,7	0,16	0,4100	0,0001362	0,0012902	13,81
11,3	0,17	0,4362	0,0002016	0,0011947	12,79
12,0	0,18	0,4624	0,0000532	0,0011150	11,94
12,7	0,19	0,4886	0,0001795	0,0010453	11,19
13,3	0,2	0,5149	0,0004170	0,0009860	10,55
14,0	0,21	0,5411	0,0002112	0,0009359	10,02
14,6	0,22	0,5674	0,0001638	0,0008810	9,43
15,3	0,23	0,5937	0,0001417	0,0008460	9,06
16,0	0,24	0,6201	0,0003010	0,0008070	8,64
16,6	0,25	0,6464	0,0001619	0,0007729	8,27
17,3	0,26	0,6728	0,0003163	0,0007416	7,94
18,0	0,27	0,6991	0,0003735	0,0007122	7,62
18,6	0,28	0,7255	0,0001699	0,0006842	7,32
19,3	0,29	0,7518	0,0001350	0,0006582	7,05
20,0	0,3	0,7782	0,0001920	0,0006350	6,80
20,6	0,31	0,8046	0,0002507	0,0006127	6,56
21,3	0,32	0,8310	0,0002285	0,0005921	6,34
22,0	0,33	0,8574	0,0004138	0,0005712	6,12
22,6	0,34	0,8838	0,0005176	0,0005527	5,92
23,3	0,35	0,9103	0,0002965	0,0005350	5,73
24,0	0,36	0,9367	0,0001542	0,0005190	5,56
24,6	0,37	0,9631	0,0002507	0,0005035	5,39
25,3	0,38	0,9895	0,0003664	0,0004888	5,23
26,0	0,39	1,0160	0,0004377	0,0004749	5,08
26,6	0,4	1,0424	0,0003783	0,0004615	4,94
27,3	0,41	1,0689	0,0002868	0,0004491	4,81
28,0	0,42	1,0953	0,0004136	0,0004377	4,69
28,6	0,43	1,1218	0,0003762	0,0004258	4,56
29,3	0,44	1,1482	0,0004023	0,0004145	4,44
30,0	0,45	1,1747	0,0002023	0,0004042	4,33

O volume no *raceway* com velocidade menor 0,1 m.s<sup>-1</sup> não segue uma relação linear com o aumento da velocidade inicial, e pode ser observado que há uma diferença significativa no volume com a velocidade menor 0,1 m.s<sup>-1</sup> com o aumento da velocidade (Figura 11).

Figura 11 – Relação entre a velocidade inicial e o volume do *raceway* com velocidade menor que  $0,1 \text{ m.s}^{-1}$



Conforme Becker (1994) e Hireiz et al. (2014) uma velocidade de agitação entre  $0,1$  e  $0,4 \text{ m.s}^{-1}$  geralmente é necessária para alcançar uma boa mistura e evitar a sedimentação das células de algas, e como no interior no *raceway* ocorrem gradientes de velocidade, o volume com velocidade menor que  $0,1 \text{ m.s}^{-1}$  é alterado conforme a velocidade inicial.

Por exemplo, no *raceway* modificado, quando a velocidade inicial é de  $0,15 \text{ m.s}^{-1}$ , o volume ocupado por fluido com velocidade menor que  $0,1 \text{ m.s}^{-1}$  é de  $15,08\%$ . Quando a velocidade inicial é multiplicada por dois, esse volume diminui para  $6,8\%$ , ou seja o volume ocupado por fluido com velocidade menor que  $0,1 \text{ m.s}^{-1}$  diminui em  $54,90\%$ , contribuindo assim para uma melhor homogeneização dos cultivos algais.

Nas Figuras 12 e 13, podem ser visualizados os volumes de fluido com velocidade menor que  $0,1 \text{ m.s}^{-1}$ , utilizando-se velocidade inicial de  $0,30 \text{ m.s}^{-1}$  e  $0,15 \text{ m.s}^{-1}$ , evidenciando que as zonas de menor velocidade são as do lado apostado do sistema de agitação e na divisória interna do tanque, e que com o aumento da velocidade o volume com velocidade menor que  $0,1 \text{ m.s}^{-1}$  diminui.

Figura 12 - Volume no *raceway* modificado com velocidade  $<0,1 \text{ m.s}^{-1}$ , com a velocidade inicial de  $0,30 \text{ m.s}^{-1}$ .

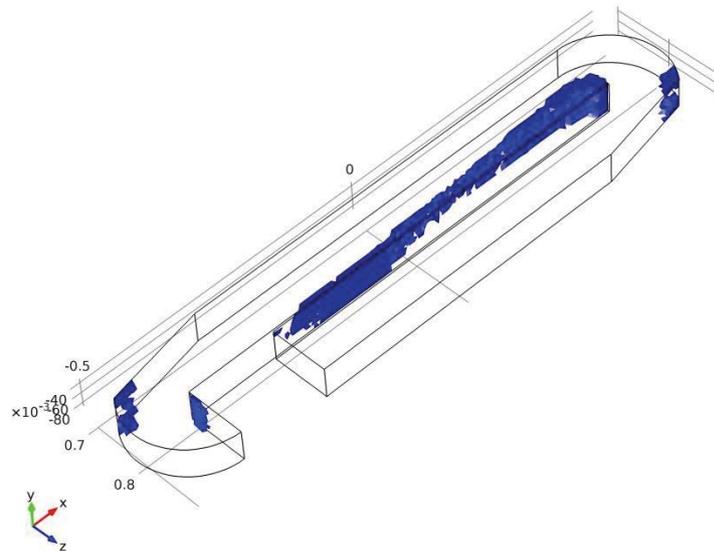
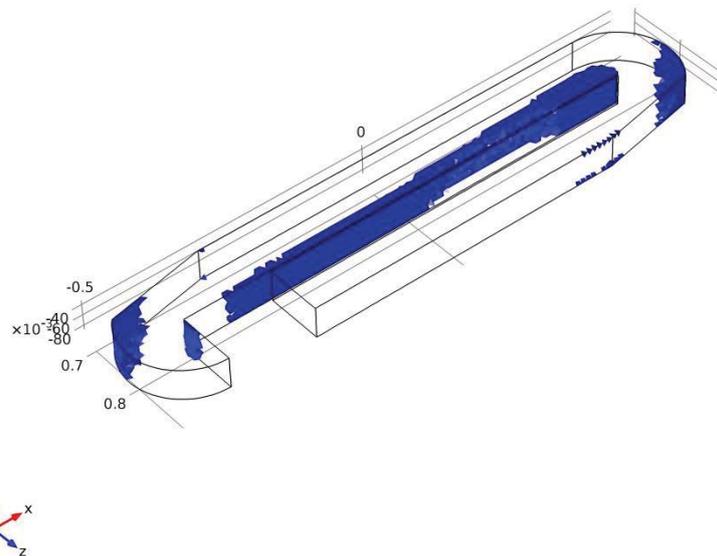


Figura 13 - Volume no *raceway* modificado com velocidade  $<0,1 \text{ m.s}^{-1}$ , com a velocidade inicial de  $0,15 \text{ m.s}^{-1}$ .



A mistura pode ser melhorada através do aumento da velocidade das pás, e uma velocidade de mistura maior do que  $0,1 \text{ m.s}^{-1}$  normalmente é necessária para evitar a sedimentação de células de algas. Contudo, as taxas mais elevadas de mistura podem causar danos da membrana celular de algas, como no caso *Spirulina*, que tem uma fraca membrana e forma espiral (ALI et al., 2015). Portanto, é necessário otimizar a velocidade de rotação das pás, para que as microalgas possam detectar luz solar suficiente sem danificar a estrutura.

Além da velocidade de rotação, a mistura também depende da geometria dos *raceway*, sendo que para obter maior eficiência na produtividade, a geometria pode ser alterada a fim de diminuir as zonas mortas, minimizando esse efeito negativo. Liffeman et al (2013) e Sompech et al. (2012) alteraram a geometria do *raceway*, adicionando defletores semicirculares aumentando assim a eficiência energética e minimizando as zonas estagnação.

Conforme Zhang et al. (2015) que realizaram a simulação em *raceway* utilizando a velocidade inicial de  $0,30 \text{ m.s}^{-1}$ , a instalação de defletores aperfeiçoou o fluxo, a área de zona morta diminuiu 60,42% em comparação com o *raceway* padrão, fornecendo assim mais luz para as células. Já a concentração de biomassa foi 30,11% maior que o do controle, portanto uma maior agitação e modificações na geometria beneficiaram a taxa de crescimento microalgal.

## 5.2 Cultivo em mini *raceways*

Nas velocidades de agitação mais baixas ( $0,10 \text{ m.s}^{-1}$  e  $0,15 \text{ m.s}^{-1}$ ) foi possível observar que o cultivo atingiu menor concentração celular (Figuras 14 e 15), corroborando os dados da simulação de fluxo, indicando que a existência de zonas de estagnação de biomassa influenciam a eficiência dos cultivos.

Esta tendência, entretanto, é observada após os períodos iniciais dos cultivos, uma vez que durante as fases de adaptação, em concentrações celulares de no máximo  $0,7 \text{ g.L}^{-1}$ , todos os cultivos apresentam a mesma tendência de crescimento, independente das velocidades iniciais. Isto ocorre devido ao fato de que no início dos cultivos, as menores concentrações celulares permitiam a incidência luminosa em maiores profundidades. Conforme Chen et al. (2011) com o passar do tempo de cultivo e o aumento da concentração de células, ocorre o fenômeno do sombreamento celular, diminuindo a incidência da luz nas células no fundo do tanque.

De acordo com Aikawa et al. (2012), o crescimento da *Spirulina platensis* cultivada em intensidade luminosa de  $700 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  foi semelhante à cultivada a  $270 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  nos primeiros dias de cultivo. Entretanto, após 2 dias, as microalgas cultivadas em intensidade luminosa de  $270 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  sofreram diminuição da taxa de crescimento devido ao efeito de sombreamento ocasionado pelo aumento da densidade celular, que aos 2 dias de cultivo atingiu  $0,6 \text{ g.L}^{-1}$ . Estes dados estão de acordo com os obtidos em nosso estudo.

De acordo com o demonstrado na Figura 11, o volume do tanque com velocidades inferiores a  $0,10 \text{ m.s}^{-1}$  é maior nas velocidades entre  $0,10 \text{ m.s}^{-1}$  a  $0,20 \text{ m.s}^{-1}$ . O resultado da simulação foi comprovado, visto que nas velocidades de  $0,10 \text{ m.s}^{-1}$  e  $0,15 \text{ m.s}^{-1}$  as menores concentrações finais de biomassa foram observadas (Figura 14 e Tabela 4), conforme mencionado anteriormente, devido ao maior volume ocupado nos tanques pelas zonas de estagnação. Conforme Becker (1994) e Hireiz et al. (2014) a velocidade de agitação entre  $0,1 \text{ m.s}^{-1}$  e  $0,4 \text{ m.s}^{-1}$  é geralmente necessária para alcançar uma boa mistura e evitar a sedimentação das células de algas, porém neste estudo, apenas observou-se aumento na concentração celular em velocidades acima de  $0,20 \text{ m.s}^{-1}$ .

Os cultivos realizados com as velocidades de  $0,35 \text{ m.s}^{-1}$  e  $0,40 \text{ m.s}^{-1}$  atingiram a fase estacionária de crescimento em menor tempo, sendo esse um fator importante para a obtenção de maior produtividade em células.

Figura 14 – Curvas de crescimento dos cultivos realizados a  $0,10$ ;  $0,15$ ;  $0,20$  e  $0,25 \text{ m.s}^{-1}$

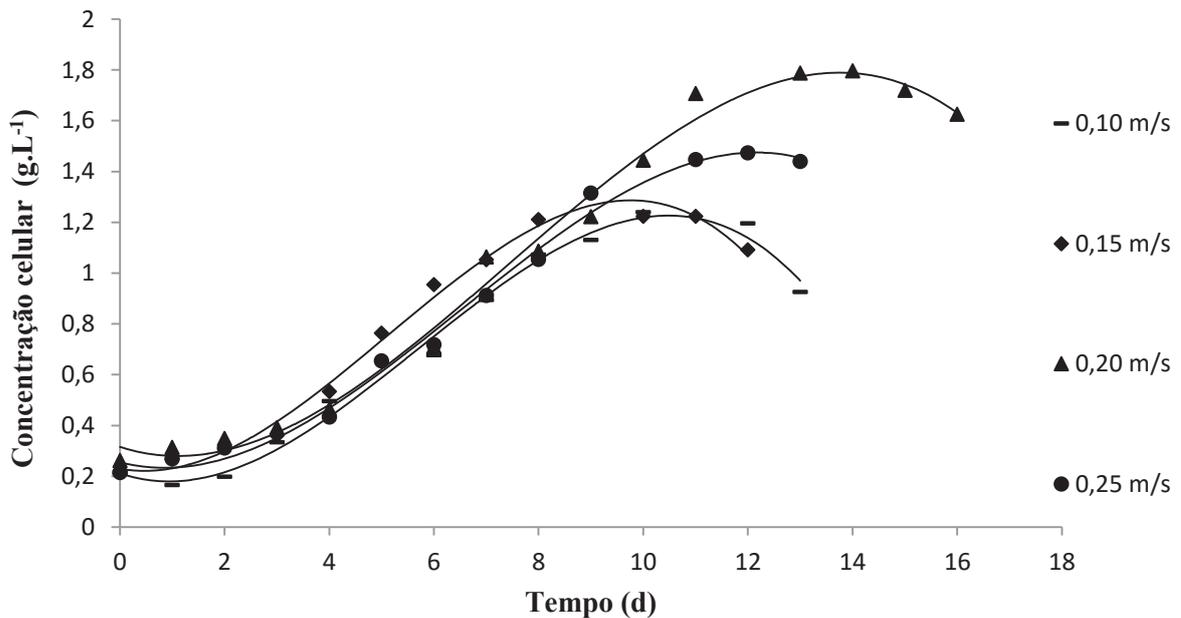
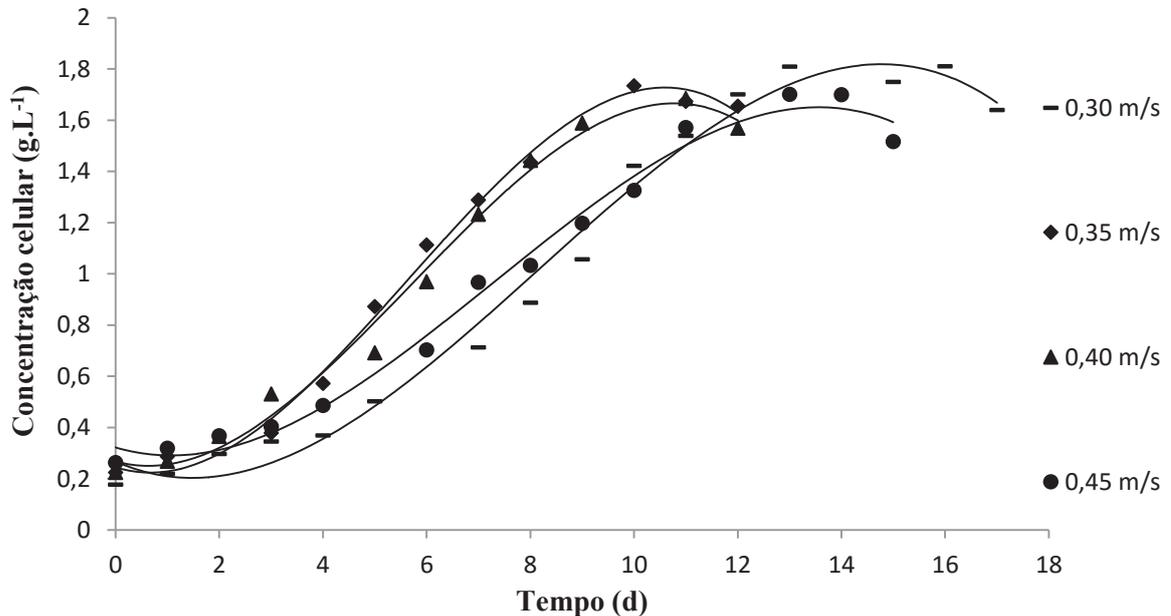


Figura 15 – Curvas de crescimento dos cultivos realizados a 0,30; 0,35; 0,40 e 0,45 m.s<sup>-1</sup>



As maiores concentrações finais de biomassa foram atingidas nos ensaios com velocidade 0,20; 0,30; 0,35 e 0,45 m.s<sup>-1</sup> (Figura 15 e Tabela 4), não havendo diferença significativa entre as mesmas ( $p > 0,05$ ), demonstrando que nas maiores agitações testadas (consequentemente menor volume ocupado pelas zonas de estagnação), a produtividade em células foi maior, devido a melhor distribuição no fornecimento de luz para as células e a menor geração de gradientes de nutrientes no mini *raceway*. Porém o cultivo realizado com a velocidade inicial de 0,35 m.s<sup>-1</sup> atingiu a concentração final de biomassa em menor tempo de cultivo.

Segundo Huang et al. (2015) a agitação da cultura torna-se muito importante para otimizar todos os fatores essenciais relacionados à produção de biomassa de microalgas. A agitação da cultura, em meio líquido, mantém as células em suspensão evitando que algumas células fiquem depositadas no fundo do fotobiorreator e outras permaneçam na superfície recebendo luz em excesso.

Conforme Aikawa et al. (2012), a intensidade da luz é positivamente correlacionada com a produção de biomassa, sendo que com 700  $\mu\text{mol f\u00f4tons m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , maior intensidade luminosa estudada, foi observada a maior concentração celular (1,6 g.L<sup>-1</sup>), enquanto que as cultivadas a 270  $\mu\text{mol f\u00f4tons m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  e a 100  $\mu\text{mol f\u00f4tons m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  atingiram 0,7 g.L<sup>-1</sup> e 0,5 g.L<sup>-1</sup>, respectivamente.

Por\u00e9m n\u00edveis extremos de ilumin\u00e2ncia no cultivo de microalgas podem conduzir a um processo desfavor\u00e1vel ao crescimento, a fotoinibi\u00e7\u00e3o, que ocorre quando o fluxo de f\u00f4tons

absorvido pelos cloroplastos é tão alto que a concentração de elétrons de alta energia na célula é excessiva para ser consumida pelo Ciclo de Calvin. Estes elétrons de alta energia reagem com a água e formam peróxido de hidrogênio, tóxico às células (MOLINA GRIMA et al., 1996). Já níveis baixos de iluminância podem ocasionar o fenômeno de fotolimitação devido ao sombreamento que as células da superfície causam nas células em maiores profundidades no interior de meio de cultivo (RICHMOND; VONSHAK, 1978), ocasionado pela baixa agitação no cultivo.

Os cultivos realizados com as velocidades de 0,20, 0,30 e 0,45 m.s<sup>-1</sup>, foram os que demoram mais tempo para atingirem a fase de declínio (16, 17, 15 dias, respectivamente), isso se deve possivelmente a radiação média a quais foram submetidos (365 e 341 umol fótons m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>) que foi menor quando comparada ao demais cultivos realizados (617; 502 e 670 umol fótons m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>). A luminosidade inferior não afetou a concentração celular quando comparados estes ensaios ao ensaio com velocidade de 0,35 m.s<sup>-1</sup>, realizado com luminosidade média superior, porém esta diferença foi verificada na produtividade em células, que leva em consideração o tempo de cultivo.

Tabela 4: Tempos de cultivo até início das fases estacionária e de declínio celular (d) e concentração final de biomassa (g.L<sup>-1</sup>) obtida nas duas fases de cultivo

Experimento	Fase estacionária de crescimento		Fase de declínio de crescimento	
	Tempo de cultivo (d)	Concentração final de biomassa (g.L <sup>-1</sup> )	Tempo de cultivo (d)	Concentração final de biomassa (g.L <sup>-1</sup> )
0,10 m.s <sup>-1</sup>	10	1,24 ± 0,005 <sup>d</sup>	13	0,93 ± 0,090 <sup>c</sup>
0,15 m.s <sup>-1</sup>	10	1,22 ± 0,001 <sup>d</sup>	12	1,09 ± 0,007 <sup>c</sup>
0,20 m.s <sup>-1</sup>	14	1,79 ± 0,014 <sup>a</sup>	16	1,63 ± 0,009 <sup>a</sup>
0,25 m.s <sup>-1</sup>	11	1,45 ± 0,067 <sup>c</sup>	13	1,44 ± 0,007 <sup>b</sup>
0,30 m.s <sup>-1</sup>	15	1,75 ± 0,068 <sup>a</sup>	17	1,64 ± 0,052 <sup>a</sup>
0,35 m.s <sup>-1</sup>	10	1,73 ± 0,005 <sup>a</sup>	12	1,65 ± 0,048 <sup>a</sup>
0,40 m.s <sup>-1</sup>	9	1,59 ± 0,027 <sup>bc</sup>	12	1,57 ± 0,044 <sup>ab</sup>
0,45 m.s <sup>-1</sup>	13	1,70 ± 0,019 <sup>ab</sup>	15	1,52 ± 0,010 <sup>ab</sup>

Valores médios de análises realizadas em triplicata ± desvio padrão. Letras iguais na mesma coluna indicam que não apresentaram diferença significativa ao nível de 95% de confiança (p>0,05).

A produtividade máxima em células foi maior para os cultivos realizados com 0,20 m.s<sup>-1</sup>, 0,30 m.s<sup>-1</sup> e 0,35 m.s<sup>-1</sup> (Tabela 5).

Em estudo realizado por Lanlan et al. (2015), a máxima produtividade em células *Spirulina platensis* (18 g.m<sup>2</sup>.d<sup>-1</sup>) foi alcançada com luminosidade de 200 μmol fótons m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>, sendo que a utilização de intensidade luminosa superior, não elevou a produtividade em biomassa.

O tempo de geração foi menor nos experimentos realizados com as velocidades iniciais de 0,10; 0,15; 0,35 e 0,40  $\text{m.s}^{-1}$  ( $p>0,05$ ) variando entre 2,60 d e 3,02 d (Tabela 5). Valores inferiores deste parâmetro são desejáveis, visto que a duplicação celular ocorre em menor tempo. Porém os realizados com 0,10  $\text{m.s}^{-1}$  e 0,15  $\text{m.s}^{-1}$  atingiram menores concentrações celulares finais, sendo esse um fator importante para viabilizar a produção de bioetanol.

O tempo que os cultivos permaneceram na fase log pode ter sido influenciado pela radiação média recebida, influenciando os parâmetros cinéticos de crescimento. Verificou-se que os cultivos realizados com menor radiação (0,30  $\text{m.s}^{-1}$  e 0,45  $\text{m.s}^{-1}$ ) permaneceram por mais tempo na fase log. Apenas o cultivado com 0,20  $\text{m.s}^{-1}$  não apresentou o mesmo padrão.

Tabela 5: Intervalo da fase exponencial (d), tempo da fase log (d), produtividade máxima em células ( $\text{g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ ), velocidade específica máxima de crescimento ( $\text{d}^{-1}$ ) e tempo de geração (d)

Experimento	Intervalo da Fase exponencial (d)	Tempo que os cultivos permanecerem na fase log (d)	Produtividade máxima em células ( $\text{g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ )	Velocidade específica máxima de crescimento ( $\text{d}^{-1}$ )	Tempo de geração (d)
0,10 $\text{m.s}^{-1}$	3-8	5	$0,22 \pm 0,010$ <sup>b</sup>	$0,23 \pm 0,010$ <sup>b</sup>	$2,98 \pm 0,128$ <sup>bc</sup>
0,15 $\text{m.s}^{-1}$	3-8	5	$0,23 \pm 0,015$ <sup>b</sup>	$0,24 \pm 0,001$ <sup>ab</sup>	$2,86 \pm 0,001$ <sup>bc</sup>
0,20 $\text{m.s}^{-1}$	6-11	5	$0,35 \pm 0,024$ <sup>a</sup>	$0,18 \pm 0,005$ <sup>c</sup>	$3,96 \pm 0,106$ <sup>a</sup>
0,25 $\text{m.s}^{-1}$	4-9	5	$0,26 \pm 0,003$ <sup>b</sup>	$0,22 \pm 0,006$ <sup>b</sup>	$3,12 \pm 0,078$ <sup>b</sup>
0,30 $\text{m.s}^{-1}$	5-12	7	$0,37 \pm 0,050$ <sup>a</sup>	$0,17 \pm 0,009$ <sup>c</sup>	$3,99 \pm 0,216$ <sup>a</sup>
0,35 $\text{m.s}^{-1}$	3-8	5	$0,30 \pm 0,005$ <sup>ab</sup>	$0,27 \pm 0,003$ <sup>a</sup>	$2,60 \pm 0,029$ <sup>c</sup>
0,40 $\text{m.s}^{-1}$	2-8	6	$0,28 \pm 0,005$ <sup>b</sup>	$0,23 \pm 0,001$ <sup>b</sup>	$3,02 \pm 0,018$ <sup>bc</sup>
0,45 $\text{m.s}^{-1}$	4-11	7	$0,25 \pm 0,009$ <sup>b</sup>	$0,17 \pm 0,009$ <sup>c</sup>	$4,13 \pm 0,213$ <sup>a</sup>

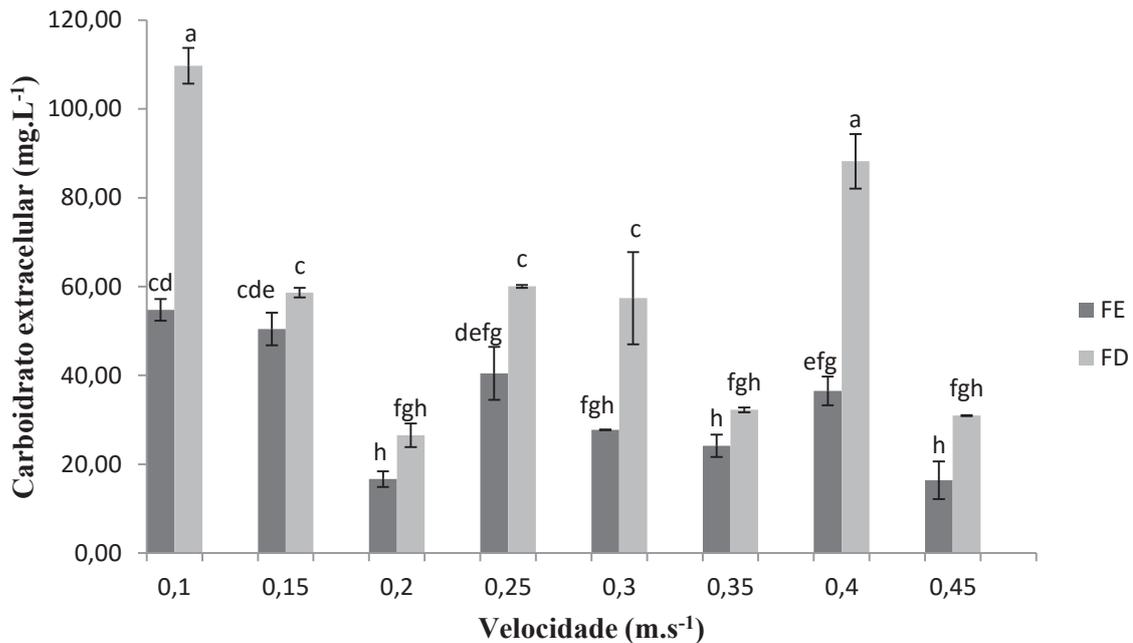
Valores médios de análise realizados em triplicata  $\pm$  desvio padrão. Letras iguais na mesma coluna indicam que não apresentaram diferença significativa ao nível de 95% de confiança ( $p>0,05$ ).

### 5.2.1 Efeitos das condições de cultivo nos carboidratos extracelulares

A concentração dos carboidratos extracelulares foi maior em todos os experimentos mantidos até a fase de declínio celular, o que indica que a microalga mantida em condições insuficientes de nutrientes, característica desta fase de crescimento em cultivos descontínuos, liberam mais exopolissacarídeos. Além disso, podem somar-se aos exopolissacarídeos os carboidratos intracelulares liberados no rompimento celular, pois nessa fase já ocorreu a morte celular, como é possível verificar nas curvas de crescimento com a diminuição da concentração de células no cultivo (Figura 16).

Trabelsi et al. (2009a) mostraram que os EPS foram produzidos durante a fase estacionária e início da morte celular do cultivo e a produção máxima de EPS ( $210 \text{ mg.L}^{-1}$ ) foi observada após 21 dias de cultivo, havendo correlação com a concentração celular.

Figura 16 – Concentração de carboidratos extracelulares ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) obtida nas fase estacionária (FE) e de declínio (FD) para as diferentes velocidades de agitação estudadas nos cultivos de *Spirulina*



Valores médios de análise realizados em triplicata  $\pm$  desvio padrão. Letras iguais nos ensaios indicam que não apresentaram diferença significativa ao nível de 95% de confiança ( $p > 0,05$ ).

As maiores concentrações de carboidratos extracelulares foram obtidas nos cultivos realizados nas velocidades  $0,10 \text{ m.s}^{-1}$  e  $0,40 \text{ m.s}^{-1}$ , ambos na fase de declínio atingindo  $109 \text{ mg.L}^{-1}$  e  $88 \text{ mg.L}^{-1}$ , respectivamente. Esses cultivos foram realizados no mesmo período, no qual a iluminância média foi  $502,54 \mu\text{mol fótons m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . Esta elevada luminosidade, pode ter contribuído para a maior concentração de carboidratos extracelulares, pois as menores concentrações foram observadas nos cultivos realizados a  $0,20 \text{ m.s}^{-1}$  e  $0,45 \text{ m.s}^{-1}$ , ambos realizados com a menor luminosidade ( $341,87 \mu\text{mol fótons m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ).

Trabelsi et al. (2009b) avaliaram a influência da temperatura e da luminosidade no cultivo da *Spirulina platensis* e observaram pequena diminuição do crescimento celular associado com o aumento significativo na concentração de EPS a partir do 22º dia de um total de 25 dias de cultivo, provavelmente causado pelo rompimento celular. A concentração máxima foi atingida após 21 dias de cultivo, no experimento realizado a  $35 \text{ }^\circ\text{C}$  e  $180 \mu\text{mol}$

fótons  $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  atingindo aproximadamente  $297 \text{ mg.L}^{-1}$ . Os autores verificaram que a produção de EPS teve um efeito linear positivo com o aumento da intensidade da luz.

### 5.2.2 Efeitos das condições de cultivo nos carboidratos intracelulares

As Figuras 17 e 18 apresentam as concentrações de carboidratos e produtividades, respectivamente, obtidas nas fases estacionária (FE) e de declínio (FD) para as diferentes velocidades de agitação estudadas nos cultivos de *Spirulina*.

Nas velocidades de  $0,10 \text{ m.s}^{-1}$  e  $0,15 \text{ m.s}^{-1}$  as concentrações de carboidratos intracelulares foram inferiores àquelas obtidas nos cultivos realizados com maiores velocidades, em ambas as fases de cultivo, influenciados pela velocidade de agitação ser inferior. Nestas velocidades, as concentrações de carboidratos foram estatisticamente iguais ( $p > 0,05$ ), na fase estacionária 29% e 37%, respectivamente, e na fase de declínio 50% e 60% respectivamente.

As maiores concentrações de carboidratos foram atingidas nas velocidades de  $0,20$ ;  $0,25$ ;  $0,30$ ;  $0,35$ ;  $0,40$  e  $0,45 \text{ m.s}^{-1}$  durante a fase de declínio do cultivo. As maiores concentrações de carboidratos nessas velocidades deve-se a maior agitação nos cultivos, pois proporcionou às células maior quantidade de luz.

Em geral, é conhecido que altas intensidades de luz ( $>300 \text{ } \mu\text{mol fótons m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) resultam em aumento do teor de carboidratos (HU, 2004). Em culturas de *Spirulina* um aumento de cerca de até 58% em carboidratos foi obtido quando a luminosidade foi aumentada de  $24 \text{ } \mu\text{mol fótons m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  para  $192 \text{ } \mu\text{mol fótons m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  (LEE et al, 2012). Ho et al. (2012) mencionaram que a microalga *Scenedesmus obliquus* aumentou a concentração de carboidratos intracelulares com aumento da intensidade e restrição de nitrogênio passando de 53% de carboidrato cultivando a  $60 \text{ } \mu\text{mol fótons m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  para 73% de carboidrato cultivando a  $540 \text{ } \mu\text{mol fótons m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ .

A biomassa cultivada no início da fase de declínio apresentou maior concentração de carboidratos, devido à maior restrição de nutrientes que estava disponível nesta etapa do cultivo.

A fase de crescimento na qual a colheita é realizada e a velocidade de agitação alteram o teor de carboidratos intracelulares, pois a maioria das microalgas é fonte de proteínas quando cultivadas em condições repletas de nutrientes, porém, quando se realiza a restrição de alguns nutrientes, estes cultivos podem ser facilmente induzidos para alterar a composição

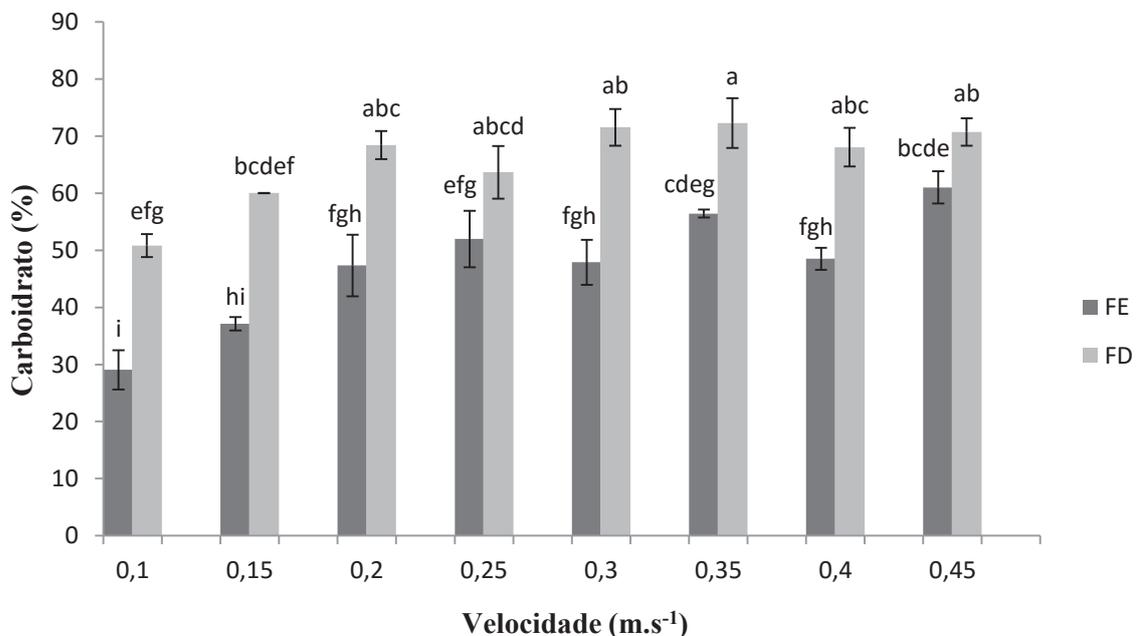
microalgal, e o conteúdo de proteína pode ser convertido a compostos de armazenamento de energia, como carboidratos (DISMUKES et al., 2008).

Markou (2012) observou alterações na composição da biomassa de *Spirulina* em cultivos com limitação de fósforo ( $3 \text{ mg.L}^{-1}$ ), sendo obtido aumento nos teores de carboidratos de 9% para 65%, enquanto o teor de proteínas diminuiu de 46,5% para 25%, quando comparado com o controle ao cultivado com  $9 \text{ mg.L}^{-1}$ . Moura Júnior et al. (2006) e Renaud et al. (1999) afirmaram que em cultivos o teor de proteínas de microalgas é maior durante a fase exponencial de crescimento e o teor de carboidratos é maior quando, as células são mais velhas.

A maior concentração de carboidratos obtida nesse estudo foi 72% com velocidade de  $0,35 \text{ m.s}^{-1}$  mantida até a fase de declínio, com luminosidade de  $670,88 \text{ } \mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , em estudo semelhante de Aikawa et al.(2012), alcançaram mais de 65% de carboidrato controlando a intensidade da luz ( $700 \text{ } \mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) e o fornecimento de nitrato ( $3 \text{ mM}$ ) em cultivo de escala laboratorial.

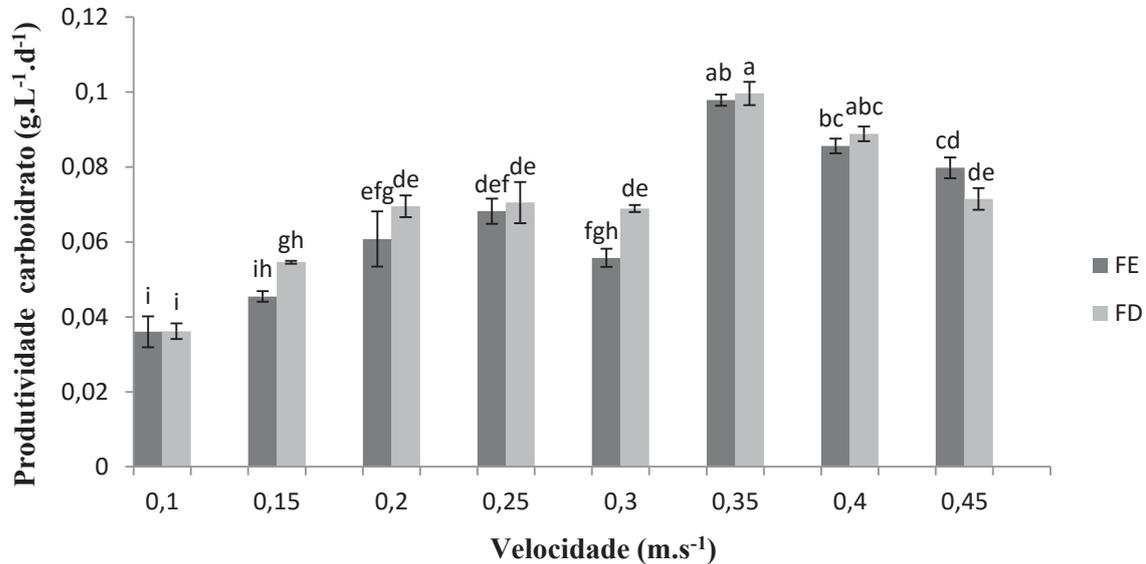
Porém os estudos citados foram realizados em escala laboratorial, onde o fornecimento de luz ocorreu de forma artificial e controlada, diferente deste realizado em estufa e luz solar.

Figura 17 – Concentração de carboidratos intracelulares (%) obtida na fase estacionária (FE) e de declínio (FD) para as diferentes velocidades de agitação estudadas nos cultivos de *Spirulina*.



Valores médios de análise realizados em triplicata  $\pm$  desvio padrão. Letras iguais nos ensaios indicam que não apresentaram diferença significativa ao nível de 95% de confiança ( $p > 0,05$ ).

Figura 18 – Produtividade em carboidratos intracelulares ( $\text{g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ ) obtida nas fase estacionária (FE) e de declínio (FD) para as diferentes velocidades de agitação estudadas nos cultivos de *Spirulina*.



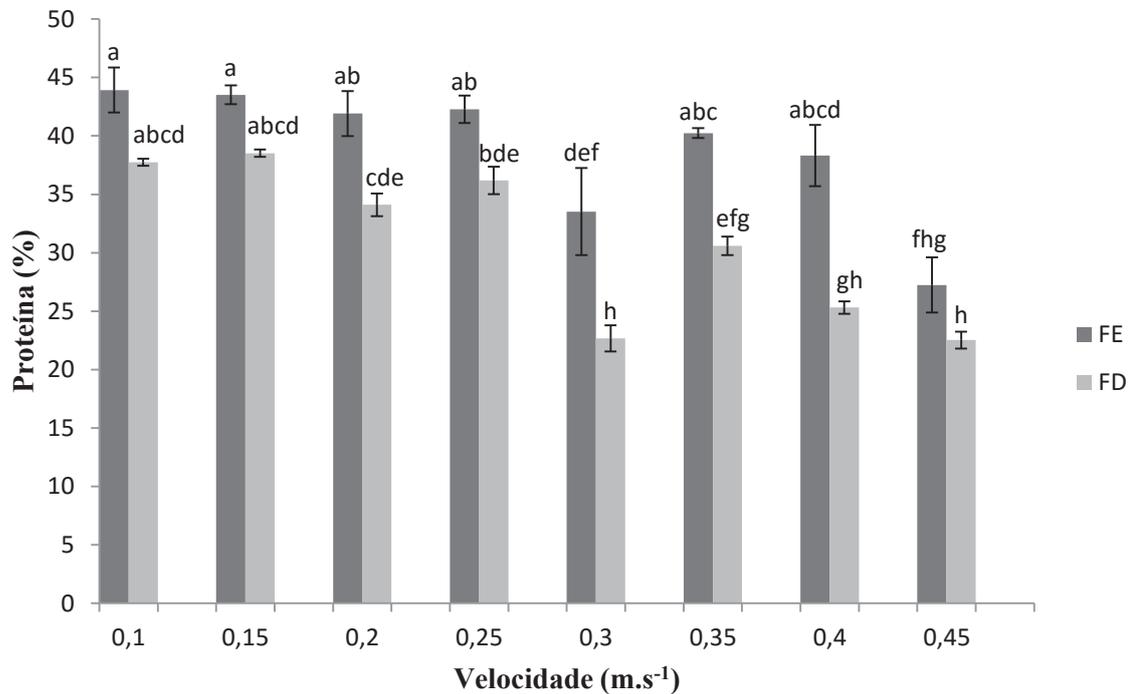
Valores médios de análise realizados em triplicata  $\pm$  desvio padrão. Letras iguais nos ensaios indicam que não apresentaram diferença significativa ao nível de 95% de confiança ( $p > 0,05$ ).

As maiores produtividades foram obtidas nos experimentos realizados a  $0,35 \text{ m.s}^{-1}$  e  $0,40 \text{ m.s}^{-1}$  e biomassa colhida na fase de declínio ( $0,100 \pm 0,003 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$  e  $0,089 \pm 0,002 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ , respectivamente) e no experimento com velocidade de  $0,35 \text{ m.s}^{-1}$  colhida na fase estacionária ( $0,098 \pm 0,002 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ ). Margarites (2014) ao estudar cultivos de *Spirulina platensis* LEB 52 observou maior produtividade em carboidratos ( $0,116 \pm 0,002 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ ) quando esta foi cultivada com restrição de  $\text{NaNO}_3$  e acréscimo de  $\text{NaCl}$ .

### 5.2.3 Efeitos das condições de cultivo nas concentrações de proteínas e lipídios da biomassa

As concentrações de proteína apresentaram relação inversa com a concentração de carboidratos. Na fase de declínio há uma maior restrição da concentração de nutrientes o que induz a microalga a alterar sua composição bioquímica armazenando mais substâncias de reserva, como carboidratos, fato este observado por Markou (2012b). Sendo assim, a fase do cultivo na qual se realiza a recuperação da biomassa é um importante fator para que esta possa ser utilizada na produção de bioetanol, pois o objetivo é armazenar uma quantidade maior de carboidratos (Figura 19).

Figura 19 – Concentração de proteínas (%) obtida na fase estacionária (FE) e de declínio (FD) para as diferentes velocidades de agitação estudadas.

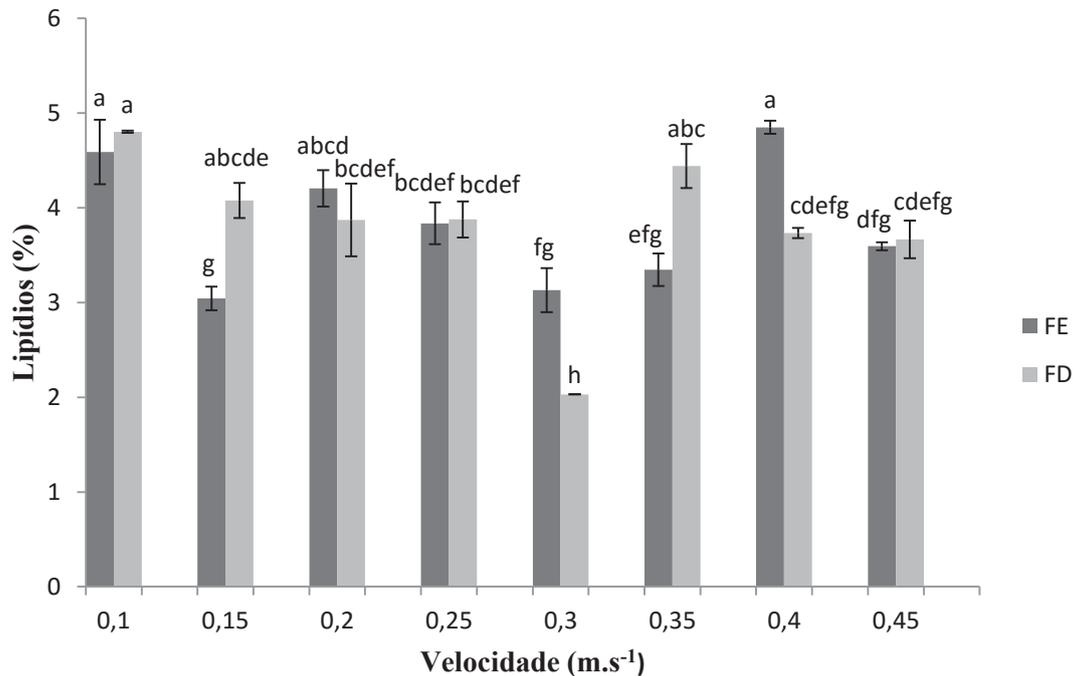


Valores médios de análise realizados em triplicata  $\pm$  desvio padrão. Letras iguais nos ensaios indicam que não apresentaram diferença significativa ao nível de 95% de confiança ( $p > 0,05$ ).

Além da restrição de nutrientes afetar a concentração de proteínas, a agitação também influenciou na disponibilidade de luz dos cultivos. As maiores concentrações de proteínas foram obtidas nas velocidades mais baixas de agitação, pois a disponibilidade de luz para as células foi menor, devido ao sombreamento. Conforme Markou, et al., (2012b), em intensidade de luz ( $60 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) o teor de proteínas foi inferior ao obtido quando a microalga foi cultivada a  $24 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . Resultado semelhante foi verificado por Olgu\u00edn et al. (2001) que observaram o mesmo comportamento para a biomassa da *Spirulina* cultivada em diferentes intensidades de luz e restrição de nitrog\u00e9nio.

A menor concentra\u00e7\u00e3o de lip\u00eddios (2,2%) foi obtida no experimento com velocidade de  $0,30 \text{ m.s}^{-1}$  e mantido at\u00e9 a fase de decl\u00ednio e a maior concentra\u00e7\u00e3o (4,85%) foi no experimento  $0,40 \text{ m.s}^{-1}$ . Conforme Vonshak (2002) \u00e9 t\u00edpico que a *Spirulina platensis* conter baixas quantidades de lip\u00eddios entre 6% e 13% (Figura 20).

Figura 20 – Concentração de lipídios (%) obtida na fase estacionária (FE) e de declínio (FD) para as diferentes velocidades de agitação estudadas nos cultivos de *Spirulina*.



Valores médios de análise realizados em triplicata  $\pm$  desvio padrão. Letras iguais nos ensaios indicam que não apresentaram diferença significativa ao nível de 95% de confiança ( $p > 0,05$ ).

No geral, neste estudo, o teor de lipídios não foi afetado pela variação da velocidade de agitação nem pela fase do cultivo, exceto em alguns experimentos, na qual nenhuma relação clara foi delineada.

Schmitz (2013), modificando as condições de cultivo atingiu o maior percentual de lipídios com a *Spirulina platensis* cepa Paracas de 9,51% com a adição de ferro (0,10 mmol/L) e glicerol (0,02 mmol/L). Enquanto que conforme Hsieh; Wu (2009), com modificações no meio de cultivo, restringindo nitrogênio, ocasionaram efeito muito mais evidente na microalga *Chlorella* sp, que acumulou 44% de lipídios.

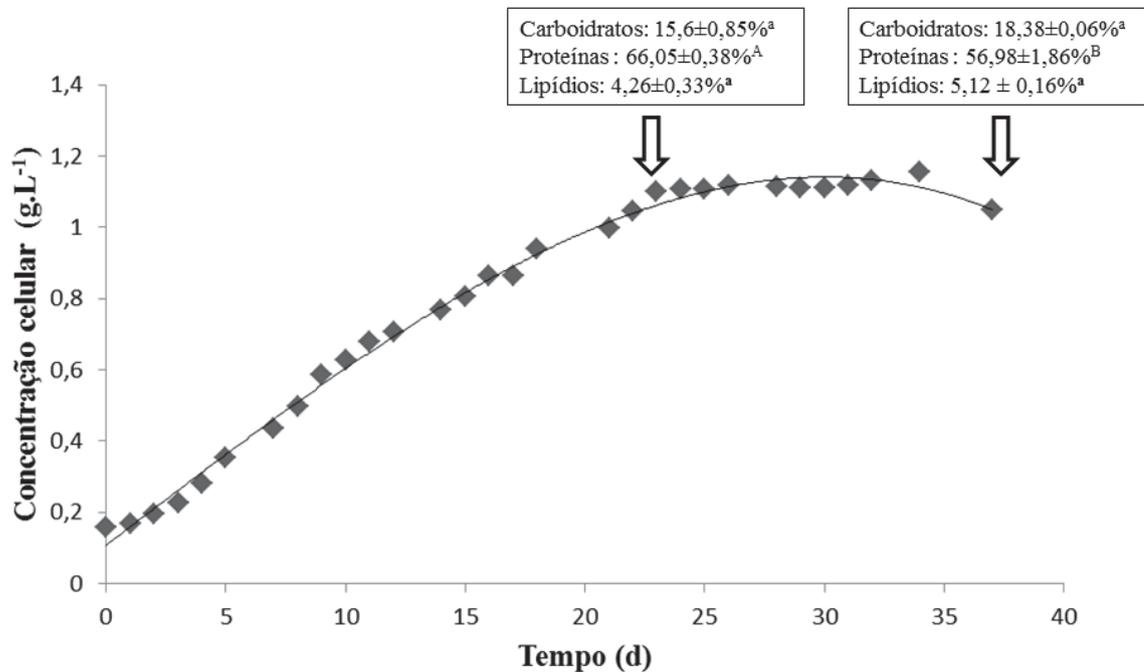
### 5.3 Cultivo realizado com o aumento de escala

O cultivo foi realizado em *raceway* de 250 L e com velocidade de 0,35 m.s<sup>-1</sup>, pois foi nesta velocidade que foi verificada a maior produtividade em carboidratos nos mini *raceways*.

A microalga atingiu a fase estacionária de crescimento em 22 dias e a fase de declínio iniciou no tempo de 37 dias, permanecendo 20 dias na fase exponencial de crescimento, sendo superior quando comparado ao ensaio realizado no mini *raceway*, o qual atingiu a fase

estacionária de crescimento em 10 dias e a fase de declínio iniciou no tempo de 12 dias (Figura 21).

Figura 21 – Curvas de crescimento do cultivo realizado na planta piloto e a  $0,35 \text{ m.s}^{-1}$



Valores médios de análise realizados em triplicata  $\pm$  desvio padrão. Letras iguais (minúsculas para carboidratos, maiúsculas para proteínas e minúsculo em negrito para lipídios) indicam que não apresentaram diferença significativa ao nível de 95% de confiança ( $p > 0,05$ ).

No início da fase estacionária, a concentração de biomassa obtida foi  $1,10 \pm 0,004 \text{ g.L}^{-1}$ , produtividade máxima em células de  $0,87 \pm 0,017 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$  e tempo de geração  $8,2 \pm 0,12 \text{ d}$ , enquanto que o realizado no mini *raceway* foi  $1,73 \pm 0,005 \text{ g.L}^{-1}$ ;  $0,30 \pm 0,005 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$  e  $2,60 \pm 0,029$  respectivamente, apresentado valores estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

Os *raceways* são sistemas amplamente utilizados para cultivos em grande escala de microalgas e normalmente é utilizado profundidades entre 20 cm e 40 cm (LUNDQUIST, et al., 2010). O cultivo no *raceway* da planta piloto possuía a profundidade de 23 cm, porém quando comparado aos cultivado no mini *raceway* que possuía 7 cm e a mesma velocidade de agitação, foi verificado um desempenho inferior tanto na produtividade de biomassa e na concentração de carboidratos.

Esse desempenho inferior no crescimento da microalga em *raceways* de 250 L quando comparado ao obtido no mini *raceway* pode ser explicado pela luminosidade limitada devido a profundidade do fluido, pois o cultivo foi realizado em condições de radiação semelhante ao cultivo no mini *raceway* ( $772,52 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ). Essa profundidade limitou a luz

recebida pelas células, diminuindo o crescimento celular e aumentando o tempo de cultivo, permanecendo o mesmo mais dias na fase estacionária devido a essa limitação.

Alguns autores relataram que a velocidade de agitação necessária para o cultivo das microalgas deve ser entre  $0,10 \text{ m.s}^{-1}$  e  $0,40 \text{ m.s}^{-1}$  (BECKER, 1994; HIREIZ, et al., 2014). Porém estes autores não levam em consideração a altura do fluido no *raceway*, que neste estudo influenciou no crescimento da microalga.

Conforme Chiaramonti et al (2013), profundidades crescentes no *raceways* não aumentaram significativamente a produtividade de biomassa. Os autores relatam que *Tetraselmis suecica* e *Nannochloropsis* sp. apresentaram produtividade em células  $8,37 \text{ g.m}^{-2} \text{ d}^{-1}$  e  $14,1 \text{ g.m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ , respectivamente, quando cultivadas em profundidade de 15 cm, e  $8,9 \text{ g.m}^{-2} \text{ d}^{-1}$  e  $10,44 \text{ g.m}^{-2} \text{ d}^{-1}$  quando cultivadas com profundidade de 5 cm, respectivamente. Segundo Kumar et al. (2015) o uso de baixas profundidades em *raceways* é considerado mais eficiente em relação a produtividade em biomassa.

A concentração de carboidratos intracelular no início da fase estacionária foi  $15,6 \pm 0,85\%$  e no início da fase de declínio  $18,38 \pm 0,06\%$ , apresentado valores estatisticamente iguais ( $p > 0,05$ ). A concentração de proteína foi  $66,05 \pm 0,38\%$  e  $56,98 \pm 1,86\%$ , a de lipídios  $4,26 \pm 0,33\%$  e  $5,12 \pm 0,16\%$  para os inícios das fases estacionária e de declínio, respectivamente.

A concentração de carboidratos no mini *raceway* realizado com velocidade de  $0,35 \text{ m.s}^{-1}$  foi 3,6 vezes maior na fase estacionária e 3,95 vezes maior na fase de declínio quando comparado à obtida no *raceway* de 250 L. A produtividade em carboidratos foi  $0,0069 \pm 0,0003 \text{ g.L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  e  $0,0051 \pm 0,00007 \text{ g.L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ , para a fase estacionária e declínio respectivamente, sendo menor estatisticamente ( $p < 0,05$ ) quando comparadas às obtidas no mini *raceway*.

A concentração menor de carboidratos no *raceway* da planta piloto quando comparado ao cultivo realizado nos mini *raceways*, é devido a menor luminosidade recebida pela célula devido a altura de fluido no tanque. Hu (2004) e Lee et. al. (2012) afirmaram que com o aumento da luminosidade maior é o acúmulo de carboidrato pelas células.

A concentração dos carboidratos extracelulares foi diferente estatisticamente ( $p < 0,05$ ) entre as fases de cultivo, sendo que na fase estacionária e na fase de declínio obteve-se concentrações de  $13,85 \pm 1,22 \text{ } \mu\text{g.ml}^{-1}$  e  $21,87 \pm 1,14 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ , respectivamente, diferindo estatisticamente ( $p < 0,05$ ) das obtidas no cultivo realizado no mini *raceway*. Essa tendência de maiores concentrações de expolissacarídeos presentes no meio quando a microalga foi cultivada até na fase de declínio também foi verificada nos cultivos em mini *raceways*.

#### 5.4 Rendimentos teóricos de bioetanol

A *Spirulina platensis* é uma microalga considerada com alto potencial para a geração de biocombustível. E o rendimento na produção de bioetanol está diretamente vinculado ao teor de carboidrato presente da biomassa e na produtividade em carboidrato.

Neste estudo a maior concentração de carboidrato e produtividade em carboidrato foi de 72% e  $0,100 \pm 0,003 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ , respectivamente, na velocidade de agitação de  $0,35 \text{ m.s}^{-1}$ .

O rendimento teórico de bioetanol para esse experimento foi calculado a partir destas concentrações, considerando que 90% do carboidrato torna se açúcar redutor após a hidrólise, e que 51% deste açúcar redutor se transformam em bioetanol após a fermentação (MARKOU, et al., 2013). Os rendimentos teóricos obtidos para a biomassa deste experimento que obteve as maiores concentrações é de 0,335 g bioetanol/g de biomassa, e  $1,38 \text{ kg bioetanol.m}^{-3}.\text{mês}^{-1}$ .

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com a simulação do fluxo no *raceway* foi possível observar as zonas de estagnação da biomassa, bem como quantificar o volume considerado como “zona morta”. Nas velocidades de agitação mais baixas ( $0,10 \text{ m.s}^{-1}$  e  $0,15 \text{ m.s}^{-1}$ ) foi possível observar que o cultivo atingiu menor concentração celular, corroborando os dados da simulação de fluxo, que indicam que as zonas de estagnação de biomassa influenciam a eficiência dos cultivos, devido a menor luminosidade recebida pelas células.

A concentração dos carboidratos extracelulares foi maior em todos os experimentos mantidos até a fase de declínio celular, o que indica que a microalga mantida em condições insuficientes de nutrientes liberam mais exopolissacarídeos. E, além disso, a estes carboidratos extracelulares quantificados seja somado os carboidratos intracelulares liberados no rompimento celular.

Nas velocidades de  $0,10 \text{ m.s}^{-1}$  e  $0,15 \text{ m.s}^{-1}$  a concentração de carboidratos intracelulares foram inferiores às obtidas em cultivos realizados com maiores velocidades em ambas as fases de cultivo, influenciados pela velocidade de agitação ser inferior e conseqüentemente menor luminosidade recebida pelas células. As maiores concentrações de carboidratos foram atingidas nas velocidades de acima de  $0,20 \text{ m.s}^{-1}$ . A biomassa cultivada até o início da fase de declínio apresentou maior concentração de carboidratos, devido à maior restrição de nutrientes.

As maiores produtividades em carboidratos foram obtidas nos experimentos realizados a  $0,35 \text{ m.s}^{-1}$  e  $0,40 \text{ m.s}^{-1}$  ambos mantidos até a fase de declínio celular ( $0,100 \pm 0,003$  e  $0,089 \pm 0,002 \text{ g.L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  respectivamente).

O cultivo realizado no *raceway* com volume de 250 L obteve desempenho inferior na concentração final de células e na concentração de carboidrato quando comparado como os mini *raceways* devido a profundidade do fluido que limitou a luz recebida pelas células. A concentração dos carboidratos extracelulares se assemelha ao cultivo nos mini *raceways*, onde na fase de declínio obteve-se a maior concentração.

Com os cultivos realizados nos mini *raceways* foi alcançado concentrações elevadas de carboidratos intracelulares (72%), cultivo este realizado a  $0,35 \text{ m.s}^{-1}$  e mantido até a fase estacionária do cultivo, possibilitando a utilização dessa biomassa para a produção de bioetanol. Porém com o aumento de escala essa concentração não foi atingida, sendo esse um fator limitante e podendo inviabilizar a produção bioetanol em escala comercial.

## 6.1 Recomendações para trabalhos futuros

Após as conclusões do trabalho, observa-se que podem ser mencionadas algumas recomendações para trabalhos futuros, como:

- a) Aumentar a velocidade de agitação da planta piloto;
- b) Diminuir a concentração do meio Zarrouk no cultivo;
- c) Diminuir coluna de fluido nos *raceways* de 250L;
- d) Acompanhar o acúmulo de carboidrato durante toda a fase de crescimento;
- e) Realizar os estudos da sacarificação e produção do bioetanol a partir da biomassa.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, A.P.; FERNANDES, B.; VICENTE, A.A.; TEIXEIRA, J.; DRAGONE, G. Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* using industrial dairy waste as organic carbon source. **Bioresource Technology**, v. 118, p. 61–66, 2012.
- AIKAWA, S.; IZUMI, Y.; MATSUDA, F.; HASUNUMA, T.; CHANG, J.; KONDO, A. Synergistic enhancement of glycogen production in *Arthrospira platensis* by optimization of light intensity and nitrate supply. **Bioresource Technology**, v. 108, p. 211–215, 2012.
- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEXIS, J.; RASS, M.; ROBERT, K.; WATSON, J. D. **Biologia Molecular da Célula**, 3. ed., Editora Artes Médicas, Porto Alegre, 1997.
- ALI, H.; YOON, H.S.; DO, Y.; PARK, C.W. Numerical Prediction of Algae Cell Mixing Feature in Raceway Ponds Using Particle Tracing Methods. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 112, n. 2, 2015.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official Methods of Analysis of AOAC International. 17th. v. II., 2000.
- BECKER, E.W. *Microalgae: Biotechnology and Microbiology*, Cambridge University Press, 1994.
- BITOG, J.P.; LEE, I.B.; KIM, K.S.; HWANG, H.S.; HONG, S.W.; SEO, I.H.; KWO, K.S.; MOSTAFA, E. Application of computational fluid dynamics for modeling and designing photobioreactors for microalgae production: A review. **Computers and Electronics in Agriculture**, v. 76, p. 131–147, 2011.
- BRÁNYIKOVÁ, I.; MARŠÁLKOVÁ, B.; DOUCHA, J.; BRÁNYIK, T.; BIŠOVÁ, K.; ZACHLEDER, V.; VÍTOVÁ, M. Microalgae—novel highly efficient starch producers. **Biotechnology Bioengineering**, v. 108, n. 4, p. 766–776, 2011.
- BRENNAN, L.; OWENDE, P. Biofuels from microalgae – A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, p. 557–577, 2010.
- BRUNE, D.E.; SCHWARTZ G.; EVERSOLE A.G.; COLLIER J.A.; SCHWEDLER T.E. Intensification of pond aquaculture and high rate photosynthetic systems. **Aquacultural Engineering**, v. 28, p. 65–86, 2003.
- BOROWITZKA, M.A. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. **Journal of Biotechnology**, v. 70, p. 313–321, 1999.
- BOROWITZKA, M.A. Culturing microalgae in outdoor ponds. In: **Andersen RA (ed) Algal culturing techniques**. Elsevier Academic, New York, p. 205–218, 2005.
- CARDOZO, K.H.M.; GUARATINI, T.; BARROS, M.P.; FALCÃO, V.R.; TONON, A.P.; LOPES, N.P.; CAMPOS, S.; TORRES, M.A.; SOUZA, A.O.; COLEPICOLO, P.; PINTO, E. Metabolites from algae with economical impact. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 146, n.1–2, p. 60–78, 2007.

CARRIQUIRY, M.A.; DU, X.; TIMILSINA, G.R. Second generation biofuels: economics and policies. **Energy Policy**, v. 39. N. 7, p. 4222–4234, 2011.

CARVALHO, A.P.; MEIRELES, L.A.; MALCATA, F.X. Microalgal reactors: a review of enclosed system designs and performances. **Biotechnology Progress**, v. 22, p. 1490–1506, 2006.

CHAE, S.R.; HWANG, E. J.; SHIN, H. S.; Single cell protein production of *Euglena gracilis* and carbon dioxide fixation in an innovative photo-bioreactor. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 2, p. 322–329, 2006.

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

CHEN, C.; ZHAO, X.; YEN, H; HO, S.; CHENG, C.; LEE, D.; BAI, F.; CHANG, J. Microalgae-based carbohydrates for biofuel production. **Biochemical Engineering Journal**, n. 78, p. 1-10, 2013.

CHIARAMONTI, D.; PRUSSI, M.; CASINI, D.; TREDICI, M.R.; RODOLFI, L.; BASSI, N. ZITTELLI, G.; BONDIOLI, P. Review of energy balance in raceway ponds for microalgae cultivation: Re-thinking a traditional system is possible. **Applied Energy**, v. 102, p. 101–111, 2013.

CHISTENSON, L.; SIMS, R. Production and harvesting of microalgae for wastewater treatment, biofuels, and bioproducts. **Biotechnology Advances**, v.29, p. 686–702, 2012,

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, v. 25, p. 294–306, 2007.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae beats bioethanol. **Trends in Biotechnology**, v. 26, n. 3, p. 126–131, 2008.

CHOIX, F.J.; DE BASHAN, L.E.; BASHAN, Y. Enhanced accumulation of starch and total carbohydrates in alginate-immobilized *Chlorella spp.* induced by *Azospirillum brasilense*: II. Heterotrophic conditions. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 51, p. 300–309, 2012.

COSTA, J.A.V.; COLLA, L.M.; DUARTE FILHO, P.; KABKE, K.; WEBER, A. Modeling of *Spirulina platensis* growth in fresh water using response surface methodology. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, v. 18, p. 603-607, 2002.

CUNHA, R.M. **Desenvolvimento de microrreatores em tecnologia LTCC para a produção de biodiesel**. Tese apresentada Pólitécnica da universidade de São Paulo para obtenção de título em doutor em engenharia, São Paulo, 2012.

DE CASTRO ARAÚJO, S.; GARCIA, V.M.T. Growth and biochemical composition of the diatom *Chaetoceros cf. wighamii brightwell* under different temperature, salinity and carbon dioxide levels. I. Protein, carbohydrates and lipids. **Aquaculture**, v. 246, n. 1–4, p. 405–412, 2005.

- DE PHILIPPIS, R.; VINCENZINI, M. Exocellular polysaccharides from cyanobacteria and their possible applications. **FEMS Microbiology Reviews**, v.22, p.151-175, 1998.
- DISMUKES, G.C. ; CARRIERI, D.; BENNETTE, N.; ANANYEV, G.M.; POSEWITZ, M.C. Aquatic phototrophs: efficient alternatives to land-based crops for biofuels. **Current Opinion in Biotechnology**, n.19, p. 235-240, 2008.
- DRAGONE, G.; FERNANDES, B.D.; ABREU, A.P.;VICENTE, A.A.; TEIXEIRA, J.A. Nutrient limitation as a strategy for increasing starch accumulation in microalgae. **Applied Energy**, v. 88, n. 10, p. 3331–3335, 2011.
- DODD, J.C. **Elements of pond design and construction**, in: Handbook of Microalgal Mass Culture by Amos Richmond, CRC Press Inc., 1986.
- DOUCHA J.; STRAKA F.; LIVANSKY, K. Utilization of flue gas for cultivation of microalgae (*Chlorella sp.*) in an outdoor open thin layer photobioreactor. **Journal of Applied Physiology**, v. 17, p. 403–412, 2005.
- DUARTE FILHO, P.F.M. 2002. **Crescimento da cianobactéria *Spirulina platensis* em diferentes configurações de fotobiorreator e condições de cultivo**. Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Engenharia de Alimentos da Fundação Universidade Federal do Rio Grande. Rio Grande/RS.
- DUBOIS, M.; GILLES. K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; MITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 350-356, 1956.
- EMBRAPA TRIGO. Laboratório de Meteorologia Aplicada a Agricultura. **Boletim climático**. Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/pesquisa/agromet/app/principal/>. Acessado 20 de fev. 2016.
- ESCOBAR, J.C.; LORA, E.S.; VENTURINI, O.J.; YANEZ, E. E.; CASTILLO, E.F. Biofuels: environment, technology and food security. Renew. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 13, p. 1275–1287, 2009.
- FAY, P. **The Blue Greens**. London: Edward Arnold, 1983.
- FERNÁNDEZ, A.F.G.; FERNÁNDEZ S.J.M.; MOLINA GRIMA, E. Photobioreactors for the production of microalgae. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v. 12, p 131–15, 2012.
- FRIEDMAN, O.; DUBINSKY, Z.; ARAD, S. Effect of light intensity on growth and polysaccharide production in red and blue-green *Rhodophyta unicells*. **Bioresource Technology**, v. 38, n. 2–3, p. 105–110, 1991.
- FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANE STANLEY, G.H. A simple for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **Journal Biological Chemistry**, v. 226, p. 497-509, 1957.
- GEIDER, R.J.; LA ROCHE, J. Redfield revisited: variability of C:N:P in marine microalgae and its biochemical basis. **European Journal of Phycology**, v. 37, n. 01, p. 1–17, 2002.

GONG, Y.; JIANG, M. Biodiesel production with microalgae as feedstock: from strains to biodiesel. **Biotechnology Letters**, v. 33, p. 1269–1284, 2011.

GOO B.G.; BAEK, G.; CHOI, D.J.; PARK, Y.; SYNITSYA, A.; BLEHA, R.; SEONG, D.H.; LEE, C.G.; PARK, J.K. Characterization of a renewable extracellular polysaccharide from defatted microalgae *Dunaliella tertiolecta*. **Bioresource Technology**, v. 129, p. 343–350, 2013.

HADIYANTO, H.; ELMORE, S.; GERVEN, T.V.; STANKIEWICZ, A. Hydrodynamic evaluations in high rate algae pond (HRAP) design. **Chemical Engineering Journal**, v. 217, p. 231–239, 2013.

HARUN, R.; DANQUAH, M.K.; FORDE, G.M. Microalgal biomass as a fermentation feedstock for bioethanol production. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 85, n. 2, 199–203, 2010.

HERNÁNDEZ, D.; RIAÑO, B.; COCA, M.; GARCÍA-GONZÁLEZ, M.C. Saccharification of carbohydrates in microalgal biomass by physical, chemical and enzymatic pre-treatments as a previous step for bioethanol production. *Chemical engineering journal*, v. 262, p. 939–945, 2015

HIREIZ, R.; SIALVE, B.; MORCHAIN, J.; ESCUDIÉ, R.; STEYER, J.P.; GUIRAUD, P. Experimental and numerical investigation of hydrodynamics in raceway reactors used for algaculture. **Chemical Engineering Journal**, v. 250, p. 230–239, 2014.

HIRSH, C. Numerical computation of internal and external flows, vol.1, **Fundamentals of numerical discretization**, A Wiley-Interscience Publication (1988).

HO, S.H.; CHEN, C.Y.; CHANG, J.S. Effect of light intensity and nitrogen starvation on CO<sub>2</sub> fixation and lipid/carbohydrate production of an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N. **Bioresource Technology**, v. 113, p. 244–252, 2012.

HO, S.H.; HUANG, S.W, CHEN, C.; HASUNUMA, T.; KONDO, A.; CHANG, J. Bioethanol production using carbohydrate-rich microalgae biomass as feedstock. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 191–198, 2013.

HSIEH, C.H.; WU, W.T. Cultivation of microalgae for oil production with a cultivation strategy of urea limitation. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 3921–3926, 2009.

HU, Q. Environmental effects on cell composition. In: **Richmond A (ed) Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, 2004.

HUANG, J.K.; LI, Y.G.; WAN, M.X.; YAN, Y.; FENG, F.; QU, X.X.; WANG, J.; SHEN, G.M.; LI, W.; FAN, J.H.; WANG, W.L. Novel flat-plate photobioreactors for microalgae cultivation with special mixers to promote mixing along the light gradient. **Bioresource Technology**, v. 159, p. 8–16, 2014.

HUANG J.; QU, X.; WAN, M.; YING, J.; LI, Y.; ZHU, F.; WANG, J.; SHEN, G.; CHEN, J.; LI, W.. Investigation on the performance of raceway ponds with internal structures by the means of CFD simulations and experiments. **Algal Research**, v. 10, p. 64–71, 2015.

HUNTLEY, M.E.; REDALJE, D.G. CO<sub>2</sub> Mitigation and renewable oil from photosynthetic microbes: a new appraisal. **Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change**, v. 2, p. 573–608, 2007.

JI, C.F.; YU, X.J.; CHEN, Z.A.; XUE, S.; LEGRAND, J.; ZHANG, W. Effects of nutrient deprivation on biochemical compositions and photohydrogen production of *Tetraselmis subcordiformis*. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 36, n. 10, p. 5817–5821, 2011.

JOHN, R.P.; ANISHA, G.S.; NAMPOOTHIRI, K.M.; PANDEY, A. Micro and macroalgal biomass: a renewable source for bioethanol. **Bioresource Technology**, v. 102 n. 1, p. 186–193, 2011.

KANAYAMA, A.Y.; MIYAOKA, F.Y. 2011. **Simulação da distribuição da vazão de ar e da perda de carga em sistema de alimentação de dois queimadores de coque com utilização de dois códigos de CFD**. Dissertação de conclusão de curso apresentada à Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo.

KUMAR, K.; MISHRA, S.K.; SHRIVASTAV, A.; PARK, M.; WON YANG, J. Recent trends in the mass cultivation of algae in raceway ponds. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 51, p. 875–885, 2015.

LAMMENS, T.M.; FRANSSSEN, M.C.R.; SCOTT, E.L.; SANDERS, J.P.M. Availability of protein-derived amino acids as feedstock for the production of bio-based chemicals. **Biomass Bioenergy**, v. 44, p. 168–181, 2012.

LANLAN, Z.; LIN, C.; JUNFENG, W.; YU, C.; XIN, G.; ZHAOHUI, Z.; TIANZHONG, L. Attached cultivation for improving the biomass productivity of *Spirulina platensis*. **Bioresource Technology**, v. 181, p.136–142, 2015.

LAUNDER, B.E.; SPALDING, D.B. The numerical computation of turbulent flows. **Computer Method in Applied Mechanic and Engineering**, v. 3, p. 269–289, 1974.

LEE, Y. K. Microalgal mass culture systems and methods: Their limitation and potential. **Journal of Applied Physiology**, v. 13, n. 4, p. 307–315, 2001.

LEE, M.C; CHEN, Y.C; PENG, T.C. Two-stage culture method for optimized polysaccharide production in *Spirulina platensis*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 92, p. 1562–1569, 2012.

LI, H.; LI, Z.; XIONG, S.; ZHANG, H.; LI, N.; ZHOU, S.; LIU, Y.; HUANG, Z. Pilot-scale isolation of bioactive extracellular polymeric substances from cell free media of mass microalgal cultures using tangential-flow ultrafiltration. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 1104–1109, 2011.

- LIFFMAN, K.; PATERSON, D.A.; LIOVIC, P. BANDOPADHAYAY, P. Comparing the energy efficiency of different high rate algal raceway pond designs using computational fluid dynamics. **Chemical Engineering Research and Design**, v.91, p. 221–226, 2013.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v 193, p. 265-276, 1951.
- LUNDQUIST, T.J.; WOERTZ, I.C.; QUINN N.; BENEMANN, J.R. A realistic technology and engineering assessment of algae biofuel production. **Energy Biosciences Institute**, v.1, 2010.
- MAJDOUB, H.; MANSOUR, B.M.; CHAUBET, F.; ROUDESLI, S.M.; MAAROUFI, M.R. Anticoagulant activity of a sulfated polysaccharide from the green alga *Arthrospira platensis*. **Biochimimica Biophysica Acta**, v. 1790, p.1377-1381, 2009.
- MARGARITES, A.C.F. 2014. **Síntese de carboidratos por microalgas e produção de bioetanol**. Tese de Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande. Rio Grande/RS.
- MARKOU, G.; ANGELIDAKI, I.; GEORGAKAKIS, D. Microalgal carbohydrates: an overview of the factors influencing carbohydrates production, and of main bioconversion technologies for production of biofuels. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 96, p. 631–645, 2012a.
- MARKOU, G.; CHATZIPAVLIDIS, I.; GEORGAKAKIS, D. Effects of phosphorus concentration and light intensity on the biomass composition of *Arthrospira (Spirulina) platensis*. **World Journal Microbiol Biotechnol**, v. 28, p. 2661–2670, 2012b.
- MARKOU, G. Alteration of the biomass composition of *Arthrospira (Spirulina) platensis*. **Bioresource Technology**, n. 116, p. 533-535, 2012.
- MARKOU, G., ANGELIDAKI, I., NERANTZIS, E., GEORGAKAKIS, D. Bioethanol Production by Carbohydrate-Enriched Biomass of *Arthrospira (Spirulina) platensis*. **Energies**, v. 6, p. 3937-3950, 2013.
- MENDOZA, J.L.; GRANADOS, M.R.; GODOS, DE I.; ACIEN, F.G.; MOLINA GRIMA, E.; BANKS, C.; HEAVEN, S. Fluid-dynamic characterization of real-scale raceway reactors for microalgae production. **Biomass and Bioenergy**, v. 54, p. 267-275, 2013.
- MIRANDA, J.R.; PASSARINHO, P.C.; GOUVEIA, L. Bioethanol production from *Scenedesmus obliquus* sugars: the influence of photobioreactors and culture conditions on biomass production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 196, p. 555–564, 2012.
- MOLINA GRIMA, E.; SEVILLA, J.M.F.; PÉREZ, J.A.S.; CAMACHO, F.G. A study on simultaneous photolimitation and photoinhibition in dense microalgal cultures taking into account incident and averaged irradiances. **Journal of Biotechnology**, v. 45, n. 1, p. 59-69, 1996.
- MOLINA GRIMA, E.; FERNANDEZ, F.G.A.; CHISTI, Y. Tubular photobioreactor design for algalcultures. **Journal Biotechnology**, v. 92, n. 2, p. 113–131, 2001.

- MORVAN, H.; GLOAGUEN, V.; VEBRET, L.; JOSET, F.; HOËMANN, L. Structure-function investigation on capsular as a necessary step for new biotechnology applications of the case cyanobacterium *Mastigocladus Laminosus*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 35, 671-683, 1997.
- MOTA, R.; GUIMARÃES, R.; BÜTTEL, Z.; ROSSI, F.; COLICA, G.; SILVA, C.J.; SANTOS, C.; GALES, L.; ZILLE, A.; DE PHILIPPIS, R.; PEREIRA, S.B.; TAMAGNINI, P. Production and characterization of extracellular carbohydrate polymer from *Cyanothece* sp. CCY 0110. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, p. 1408–1415, 2013.
- MOURA JÚNIOR, A.M.; BEZERRA NETO, E.; KOENING, M.L.; LEÇA, E.E. Composição química de microalgas em cultivo semi-intensivo: *Chaetoceros gracilis* Schutt, *Isochrysis galbana* Parke e *Thalassiosira weissflogii* (Grunow). **Ciência Agronômica**, v. 37, n. 2, p.142-148, 2006.
- NICOLAUS, B.; PANICO, A.; LAMA, L.; ROMANO, I.; MANCA, M.C.; GIULIO, A.; GAMBOCORTA, A. Chemical composition and production of exopolysaccharides from representative members of heterocystous and non-heterocystous cyanobacteria. **Phytochemistry**, v.52, p.639-647, 1999.
- OGBONDA, K.H.; AMINIGO, R.E.; ABU, G.O. Influence of temperature and pH on biomass production and protein biosynthesis in a putative *Spirulina* sp. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 11, p. 2207–2211, 2007.
- OLAIZOLA, M. Commercial production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* using 25,000-liter outdoor photobioreactors. **Journal Applied Phycology**, v. 12, n. 3, p. 499–506, 2000.
- OLGUÍN, J.; GALICIA, S.; ANGULO-GUERRERO, O.; HERNANDEZ, E. The effect of low light flux and nitrogen deficiency on the chemical composition of *Spirulina* sp. (*Arthrospira*) grown on digested pig waste. **Bioresource Technology**, v. 77, p. 19–24, 2001.
- PARIKH, A.; MADAMWAR D. Partial characterization of extracellular polysaccharides from cyanobacteria. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 1822–1827, 2006.
- PROCHÁZKOVÁ, G.; BRÁNYIKOVÁ, I.; ZACHLEDER, V.; BRÁNYIK, T. Effect of nutrient supply status on biomass composition of eukaryotic green microalgae. **Journal Applied Phycology**, v. 26, p. 1359–1377, 2014.
- PRUSSI, M.; BUFFI, M.; CASINI, D.; CHIMAMONTI, D.; MARTELLI, F.; CARNEVALE, M.; TREDICI, M.R.; RODOLFI, L. Experimental and numerical investigations of mixing in raceway ponds for algae cultivation. **Biomass and bioenergy**, v. 67, p. 390-400, 2014.
- PRUVOST J.; CORNET J.F.; LEGRAND J. Hydrodynamics influence on light conversion in photobioreactors: an energetically consistent analysis. **Chemical Engineering Science**, v. 63, p. 3679–3694, 2008.
- RAZEGHIFARD, R. Algal biofuels. **Photosynthesis Research**, v. 117, p. 207–219, 2013.

- RENAUD, S.M.; THINH, L.; PARRY, D. L. The gross chemical composition and fattyacid composition of 18 species of tropical Australian microalgae for possible use in mariculture. **Aquaculture**, v. 170, p. 147-159, 1999.
- RICHMOND, A.; VONSHAK, A. (1978) *Spirulina* culture in Israel. **Archive Hydrobiology**, v. 11, p. 274-280, 1978.
- RICHMOND, A. *Spirulina*. In: **Borowitzka MA, Borowitzka L (eds), Micro-Algal Biotechnology**. Cambridge U.P., N.Y.: 85-121, 1988.
- RICHMOND, A. Microalgal biotechnology at the turn of the millennium: a personal view. **Journal Applied Phycology**, v. 12, n. 3–5, p 441–451, 2000.
- RICHMOND A, HU Q. **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. 2nd ed. oxford: john wiley & sons; 2013.
- RIPPKA, R.; HERDMAN, H. **Pasteur culture collection of cyanobacteria catalogue and taxonomic handbook**. Catalogue of strains. Paris Institute Pasteur, 1992, v.1, 103p.
- SASSANO, C.E.N.; GIOIELLI, L.A.; FERREIRA, L.S.; RODRIGUES, M.S.; SATO, S.; CONVERTI, A.; CARVALHO, J.C.M. Evaluation of the composition of continuously-cultivated *Arthrospira (Spirulina) platensis* using ammonium chloride as nitrogen source. **Biomass Bioenergy**, v. 34, n. 12, p. 1732–1738, 2010.
- SASTRE, R.R.; CSOGOR, Z.; PERNER-NOCHTA, I.; FLECK-SCHNEIDER, P.; POSTEN, C. Scale down of microalgae cultivations in tubular photo-bioreactors—a conceptual approach. **Journal of Biotechnology**, v. 132, p. 127–133, 2007.
- SCHENK, P.M.; THOMAS-HALL S.R.; STEPHENS E.; MARX U.C.; MUSSGNUMG J.H.; POSTEN C.; KRUSE O.; HANKAMER B. Second generation biofuels: high–efficiency microalgae for biodiesel production. **Bioenergy Research**, v. 1, p. 20–43, 2008.
- SCHMIDELL, W.; LIMA, A.U.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotechnologia Industrial**. v. 2. São Paulo: E. Blücher, 2001. 254 p.
- SCHMITZ, R. **Produção de biossurfactantes a partir da microalga *Spirulina platensis* e seu uso em biorremediação**. Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Engenharia Civil e Ambiental para obtenção do grau de Mestre em Engenharia da Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2013.
- SIMÕES, A.M.B.M.; FARIAS NETO, S.R.;CAVALCANTI, R.S. Avaliação da intensidade turbilhonar em um corpo cilindro-cônico via CFX. **II Congresso Brasileiro de Termodinâmica Aplicada – CBTERMO**, 2004.
- SINGH, N.K.; ASTHANA, R.K.; KAYASTHA, A.M.; PANDEY, S.; CHAUDHARY, A.K.; SINGH, S.P. Thiol and exopolysaccharide production in a cyanobacterium under heavy metal stress. **Process Biochemistry**, v.35, p.63-68, 1999.
- SINGH, N. K.; DHAR, D. W. Microalgae as second generation biofuel. A review. **Agronomy Sustainable Development**, v. 31, p. 31:605–629, 2011.

SKJÅNES, K.; REBOURS, C.; LINDBLAD, P. Potential for green microalgae to produce hydrogen, pharmaceuticals and other high value products in a combined process. **Critical Reviews in Biotechnology**, p. 1–44, 2012.

SOH, L.; MONTAZERI, M.; HAZNEDAROGLU, B.Z.; KELLY, C.; PECCIA, J.; ECKELMAN, M. J.; ZIMMERMAN, J.B. Evaluating microalgal integrated biorefinery schemes: Empirical controlled growth studies and life cycle assessment. **Bioresource Technology**, n. 151, p. 19-27, 2014.

SOMPECH K.; CHISTI Y.; SRINOPHAKUN T. Design of raceway ponds for producing Microalgae. **Biofuels**, v. 3, n. 4, p. 387–397, 2012.

SOUZA, A.P.; GRANDIS, A.; LEITE, D.C.C.; BUCKERIDGE M.S. Sugarcane as a Bioenergy Source: History, Performance, and Perspectives for Second-Generation Bioethanol. **Bioenergy Research**, v. 7, p. 24–35, 2014.

STEPHENS, E.; ROSS, I.L.; KING, Z.; MUSSGNUM, J.H.; KRUSE, O.; POSTEN, C.; BOROWITZKA, M.A.; HANKAMER, B. An economic and technical evaluation of microalgal biofuels. **Nature Biotechnology**, v. 28, p. 126–128, 2010.

STEPHENSON, A.L.; KAZAMIA, E.; DENNIS, J.S.; HOWE, C.J.; SCOTT, S.A. Life-cycle assessment of potential algal biodiesel production in the United Kingdom: a comparison of raceways and air-lift tubular bioreactors. **Energy and Fuels**, v. 24, p. 4062–4077, 2010.

THYSSEN, C.; SCHLICHTING, R.; GIERSCH, C. The CO<sub>2</sub>-concentrating mechanism in the physiological context: lowering the CO<sub>2</sub> supply diminishes culture growth and economises starch utilisation in *Chlamydomonas reinhardtii*. **Planta**, v. 213, n. 4, p.629–639, 2001.

TRABELSI, L.; M'SAKNI, N.H.; BEN OUADA H.; BACHA, H.; ROUDESLE, S. Partial Characterization of Extracellular Polysaccharides Produced by Cyanobacterium *Arthrospira platensis*. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 14, p. 27-31, 2009a.

TRABELSI, L.; OUADA, H.B.; BACHA, H.; GHOUL, M. Combined effect of temperature and light intensity on growth and extracellular polymeric substance production by the cyanobacterium *Arthrospira platensis*. **Journal of Applied Phycology**, p. 21, v. 405–412, 2009b.

TREDICI, M.R. Mass Production of Microalgae: Photobioreactors. **In: Richmond A (ed) Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, 2004.

TREDICI, M.R. Photobiology of microalgae mass cultures: understanding the tools for the next green revolution. **Biofuels**, v. 1, p. 43-62, 2010.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 10ed. Porto Alegre: Artmed, 934p. 2012.

TSIGIE, A.Y.; WUA, C.H.; HUYNH, L.H.; ISMADJI, S.; JU, Y. H. Bioethanol production from *Yarrowia lipolytica* P01g biomass. **Bioresource Technology**, v. 145, p. 210–216, 2013.

UGWU, C.U.; AOYAGI, H.; UCHIYAMA, H. Photobioreactors for mass cultivation of algae. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 4021–4028, 2008.

VOLETI, R.S. Experimental studies of vertical mixing in an open channel raceway for algae biofuel production [thesis]. Logan (UT): Utah State University; 2012.

VONSHAK A. *Spirulina platensis (Arthrospira): physiology, cellbiology and biotechnology*. Taylor & Francis, London, 2002.

WANG, L.L., TAO, Y., MAO, X.Z. A novel flat plate algal bioreactor with horizontal baffles: structural optimization and cultivation performance. **Bioresource Technology**, v. 164, p. 20–27, 2014.

WEISSMAN, J.C.; GOEBEL, R.P.; BENEMANN, J.R. Photobioreactor design: mixing, carbon utilization, and oxygen accumulation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 31, p. 336–344, 1988.

WELLS, M.A.; TUPY, J.L., 1998. **An Electronic Companion to Biochemistry**. Digital book by Cogito Learning Media, New York.

YANG, L. WANG, Y.; ZHOU, Q.; CHEN, P.; WANG, Y.; WANG, Y.; LIU, T.; XIE, L. Inhibitory effects of polysaccharide extract from *Spirulina platensis* on corneal neovascularization. **Molecular Vision**, v.15, p. 1951-1961, 2009.

YEH, K.L.; CHANG, J.S. Nitrogen starvation strategies and photobioreactor design for enhancing lipid content and lipid production of a newly isolated microalga *C. vulgaris* ESP-31: Implications for biofuels. **Biotechnology Journal**, v. 6, n. 11, p. 1358–1366, 2011.

YEN, H.; HU, I.C.; CHEN, C.Y.; HO, S.H.; LEE, D.J.; CHANG, J.S. Microalgae-based biorefinery – From biofuels to natural products. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 166–174, 2013.

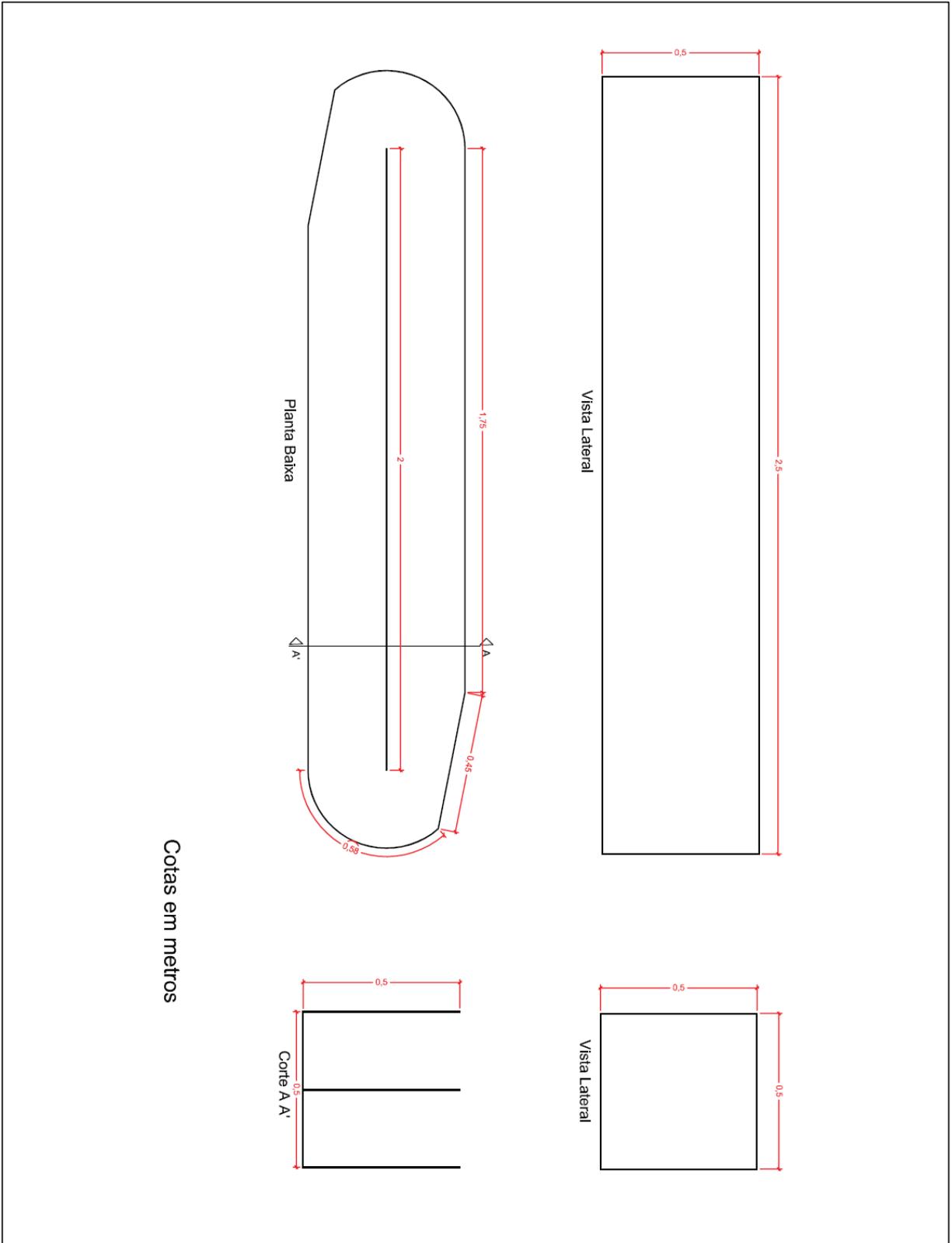
YUSUF, C. Biodiesel from microalgae. **Biotechnol Advances**, v. 25, n. 3, p. 294-306, 2007.

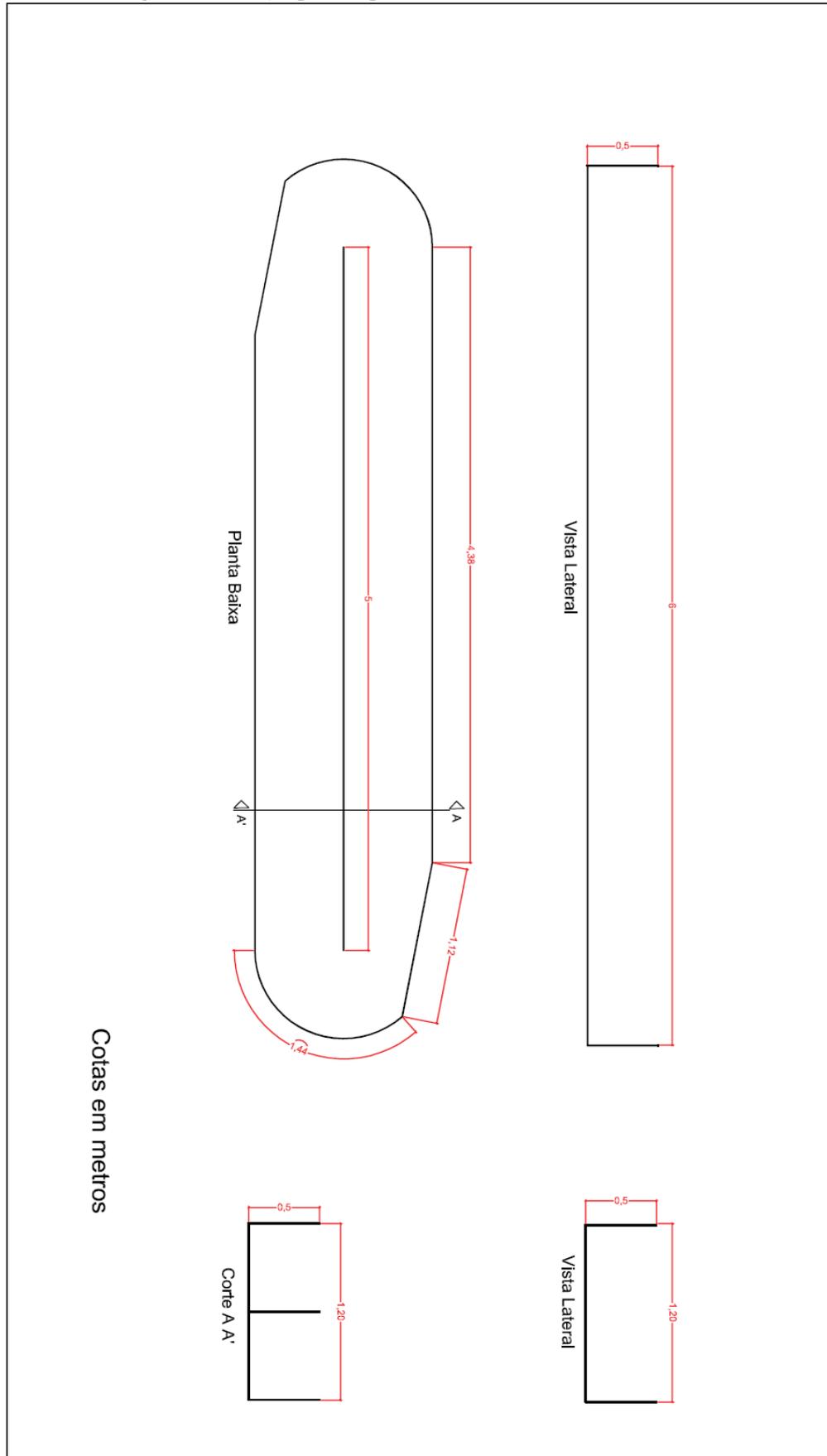
ZARROUK, C. **Contribution à l'étude d'une Cyanophycée: influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthèse de *Spirulina maxima***. 1966. Thesis (Ph.D) - Université Des Paris, Paris, 1966.

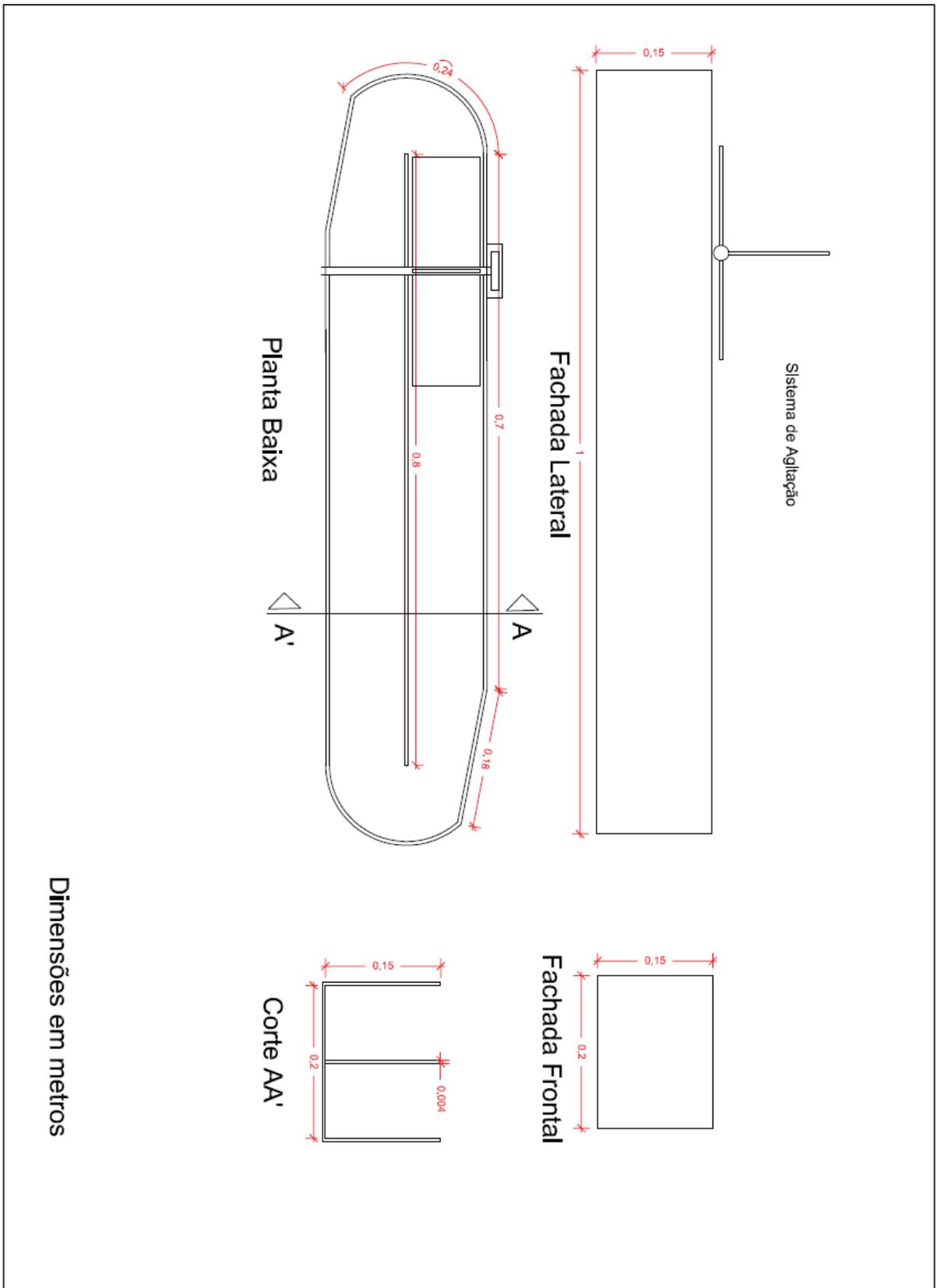
ZHANG, T. Dynamics of fluid and light intensity in mechanically stirred photobioreactor. **Journal of Biotechnology**, v. 168 p. 107– 116, 2013.

ZHANG, Q.; XUE, S.; YAN, C.; WU, X.; WEN, S.; CONG, W. Installation of flow deflectors and wing baffles to reduce dead zone and enhance flashing light effect in an open raceway pond. **Bioresource Technology**, v. 198, p. 150–156, 2015.

APÊNDICE A – Projeto *raceways* planta piloto

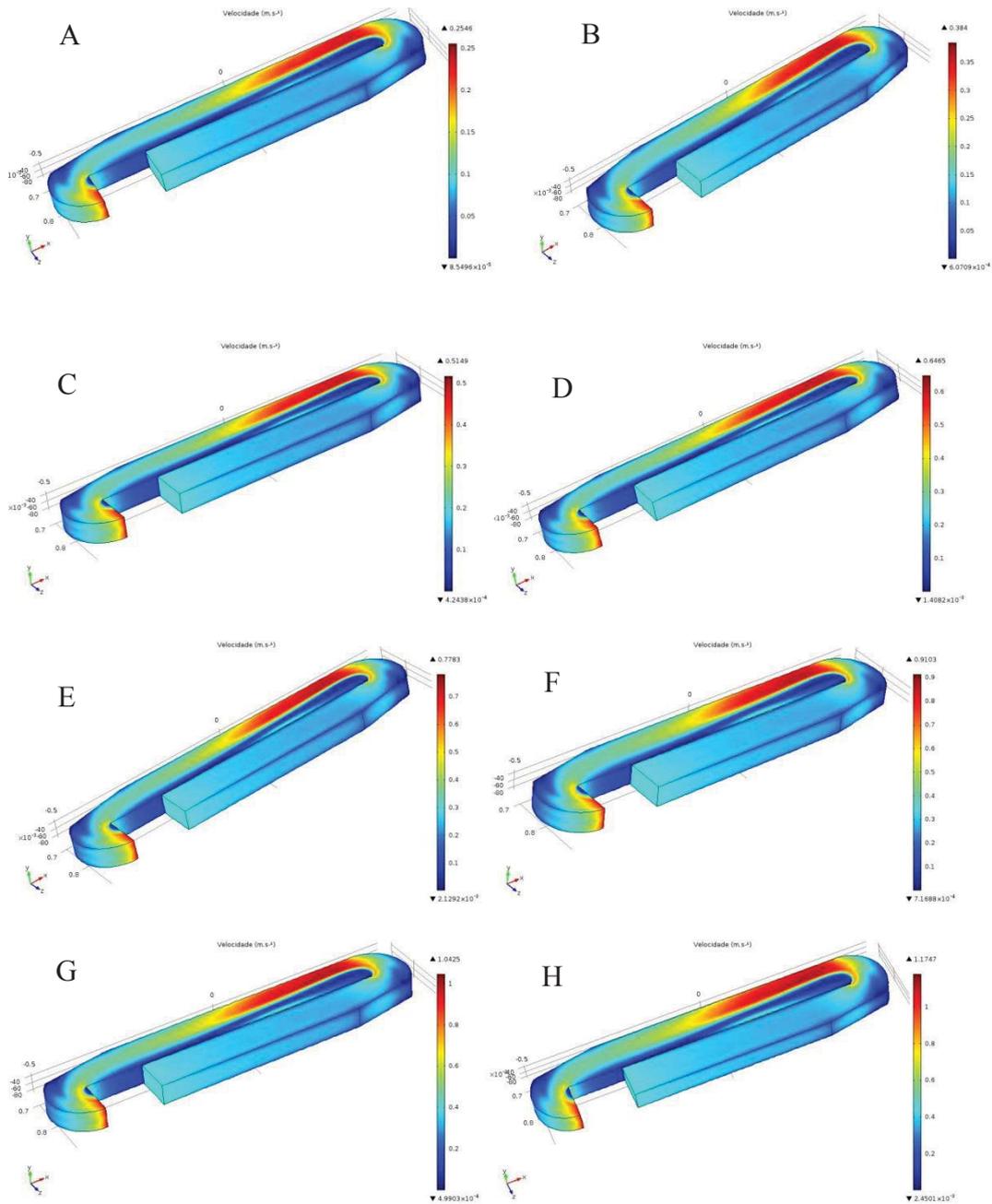


APÊNDICE B – Projeto *raceways* planta piloto

APÊNDICE C – Projeto dos mini *raceways*

## APÊNDICE D – Comportamento fluidodinâmico nos mini *raceways*

Comportamento fluidodinâmico no *raceway* modificado com velocidade inicial de  $0,10 \text{ m.s}^{-1}$  (A),  $0,15 \text{ m.s}^{-1}$  (B),  $0,20 \text{ m.s}^{-1}$  (C),  $0,25 \text{ m.s}^{-1}$  (D),  $0,30 \text{ m.s}^{-1}$  (E),  $0,35 \text{ m.s}^{-1}$  (F),  $0,40 \text{ m.s}^{-1}$  (G) e  $0,10 \text{ m.s}^{-1}$  (H).



## ANEXO I

### **Determinação de carboidratos**

Inicialmente foi preparada uma solução de fenol 5%, que se conservou em frasco escuro e sob refrigeração. Para a realização da análise foi adicionado 1 mL de amostra, devidamente diluída, e foi adicionado igual volume da solução de fenol. Aa mistura foi, posteriormente, homogeneizada em agitador de tubos e após foi adicionado 5 mL de ácido sulfúrico concentrado. A reação ocorreu durante 10 min, no fim, colocada num banho de água fria durante 20 min. A densidade óptica foi lida em um espectrofotómetro a 490 nm contra um ensaio branco em que a amostra foi substituída por água destilada. Foi construída uma curva padrão com concentrações entre  $4 \mu\text{g.L}^{-1}$  e  $140 \mu\text{g.L}^{-1}$  de glicose (Dubois et. al., 1956).

## ANEXO II

### Determinação de lipídios da microalga

A extração de lipídeos totais da biomassa foi realizado de acordo com o método descrito por Folch et al. (1957). Foi adicionado 0,5 g de biomassa em 5 ml de uma solução de clorofórmio:metanol (2:1 v/v) e essa mistura foi colocada em banho ultrassônico durante 5 min, em seguida, foi realizada a centrifugação a 5500 rpm por 10 minutos. O precipitado foi descartado e o sobrenadante foi filtrado em papel filtro após coletado em um funil de separação. O processo de extração inteiro foi repetido três vezes.

Em seguida, foi adicionada a solução de KCl (0,88%) numa proporção de 1:4 v/v do extrato lipídico. O extrato foi vigorosamente agitado por 1 minuto e deixado em repouso para a separação das fases, descartando-se o sobrenadante. Após, foi adicionado a solução de metanol: água (2:1 v/v), numa proporção de 1:4 v/v do extrato lipídico.

O extrato obtido foi filtrado em sulfato de sódio anidro, e acondicionado em balões previamente tarados, após o extrato foi colocado em rotaevaporador para evaporar o solvente. Os balões foram mantidos em estufa a 50 °C peso constante, e os lipídeos totais foram quantificados gravimetricamente.

## **ANEXO III**

### **Determinação de proteínas da microalga**

Para a determinação de proteínas da biomassa da microalga preparou-se, inicialmente, uma curva de calibração com solução padrão de albumina de soro bovino. A quantificação de proteínas na biomassa foi feita após a biomassa passar pela sonicação em sonda ultrassônica.

Acrescentando-se 0,5mL de NaOH 1N e 0,5mL de amostra em banho termostatizado a 100 °C por 5 min. Transcorrido esse tempo os tubos foram resfriados em banho de água fria por 10 min. Após adiciona-se 2,5mL de solução de tartarato de sódio e potássio em conjunto com sulfato de cobre, agita-se a amostra com o auxílio de um vortex e aguarda-se 10 minutos. Em seguida, adiciona-se 0,5mL do reagente folin-ciocalteau diluído em água (1:1), a amostra é homogeneizada com o auxílio de um vortex e mantida no escuro por 30 minutos. Após este período a absorbância da amostra é lida em espectrofotômetro a 750 nm.