

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS**

Mariana Manzoni Maroneze

**MODULAÇÃO DE CICLOS DE LUZ COMO UMA ESTRATÉGIA PARA
REDUÇÃO DE CUSTOS ENERGÉTICOS EM FOTOBIOREATORES**

Santa Maria, RS
2016

Mariana Manzoni Maroneze

**MODULAÇÃO DE CICLOS DE LUZ COMO UMA ESTRATÉGIA PARA REDUÇÃO
DE CUSTOS ENERGÉTICOS EM FOTOBIOREATORES**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Área de Concentração em Qualidade de Alimentos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos**

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Jacob-Lopes

Santa Maria, RS
2016

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Manzoni Maroneze, Mariana
MODULAÇÃO DE CICLOS DE LUZ COMO UMA ESTRATÉGIA PARA
REDUÇÃO DE CUSTOS ENERGÉTICOS EM FOTOBIOREATORES /
Mariana Manzoni Maroneze.-2016.
83 p.; 30cm

Orientador: Eduardo Jacob Lopes
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-
Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, RS, 2016

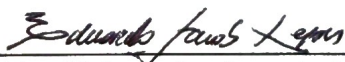
1. Bioprocessos 2. Microalgas 3. Fotoperíodos 4.
Demanda energética I. Jacob Lopes, Eduardo II. Título.

Mariana Manzoni Maroneze

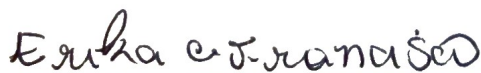
**MODULAÇÃO DE CICLOS DE LUZ COMO UMA ESTRATÉGIA PARA
REDUÇÃO DE CUSTOS ENERGÉTICOS EM FOTOBIORREATORES**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Área de Concentração em Qualidade de Alimentos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos**

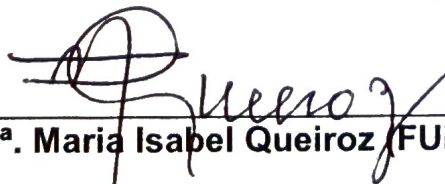
Aprovado em 4 de março de 2016:



Prof. Dr. Eduardo Jacob-Lopes (UFSM)
(Presidente/Orientador)



Prof. Dr^a. Erika Cristina Francisco (UPF)



Prof. Dr^a. Maria Isabel Queiroz (FURG)

Santa Maria, RS
2016

AGRADECIMENTOS

A *Deus* por iluminar meu caminho e me dar forças quando em mim já não havia.

Ao meu orientador, Prof. Eduardo pela orientação, dedicação e amizade durante todos esses anos, muitas vezes acreditando em mim quando nem eu mesma acreditava.

A meus pais, Gilberto e Cláudia, meus maiores exemplos, pelo amor e dedicação incondicional. Vocês me dão forças para seguir sempre em frente.

Ao pessoal do lab. 111, por toda cumplicidade e parceria, em especial a “minha equipe” Cristina, Gabriele e Stefania, por toda ajuda nos experimentos.

Aos colegas e professores do NTA pela amizade, conhecimentos trocados e pelos momentos de descontração, que tornaram essa caminhada mais leve. Especialmente a Dani, a Raquel e a Mari, que dividiram comigo todos os perrengues diários.

Ao Prof. Roger Wagner pela disponibilização do GC para a análise de ácidos graxos.

A minha família pelo carinho, apoio e torcida sempre.

Aos amigos, que estiveram sempre comigo, me apoiando e vibrando a cada conquista.

Aos órgãos de fomento a pesquisa: CAPES, FAPERGS e CNPq.

Aos professores membros da banca, pela disponibilidade e por contribuírem para a qualidade desta dissertação.

A Universidade Federal de Santa Maria pela formação proporcionada.

Muito obrigada!

RESUMO

MODULAÇÃO DE CICLOS DE LUZ COMO UMA ESTRATÉGIA PARA REDUÇÃO DE CUSTOS ENERGÉTICOS EM FOTOBIOREATORES

AUTORA: Mariana Manzoni Maroneze

ORIENTADOR: Eduardo Jacob Lopes

Microalgas são micro-organismos fotossintéticos, que por sua vez, apresentam versatilidade de associar os processos de sequestro de CO₂ com a produção paralela de insumos. Entretanto, um dos problemas operacionais deste tipo de tecnologia, refere-se à indisponibilidade da energia luminosa em períodos integrais de tempo. Para isso, é sabido que, o metabolismo fotossintético permite um acúmulo de energia durante o fornecimento de luz, garantindo assim, que o processo possa ser continuado por algum tempo na ausência de luminosidade. Em face disto, o trabalho teve por objetivos: (i) avaliar o efeito de ciclos de luz de longa duração no cultivo fotossintético da microalga *Scenedesmus obliquus* (CPCC05), (ii) avaliar o efeito dos fotoperíodos de frequência no cultivo fotossintético microalgal, (iii) avaliar o efeito de ciclos de luz de curta duração no cultivo fotossintético microalgal, (iv) avaliar a síntese de lipídeos, (v) definir o perfil qualitativo da fração lipídica, (vi) avaliar a demanda por energia elétrica dos diferentes ciclos de luz. Os resultados obtidos demonstraram que a microalga *Scenedesmus obliquus* (CPCC05) foi capaz de armazenar energia suficiente para manter seu metabolismo por até 2 horas contínuas de escuro. Dentre todos os fotoperíodos, os de 22:2 h fracionados em 24 e 48 ciclos por dia apresentaram a maior produtividade lipídica (2,56 mg/L.h). Considerando a demanda de energia elétrica, os fotoperíodos de 0,50:0,50 s (claro: escuro) e o 22:2 h (claro: escuro) em 24 ciclos por dia apresentaram os melhores custo benefício para produção de biomassa microalgal. Os resultados evidenciaram que a modulação dos ciclos de luz é uma alternativa viável para minimizar substancialmente os custos energéticos em fotobiorreatores.

ABSTRACT

LIGHT CYCLES MODULATION AS A STRATEGY TO REDUCE ENERGY COSTS IN PHOTOBIOREACTORS

AUTHOR: Mariana Manzoni Maroneze

ADVISOR: Eduardo Jacob Lopes

Microalgae are photosynthetic microorganisms, which in turn, have versatility to associate CO₂ sequestration processes with parallel production of inputs. However, one of the operational problems of this technology refers to availability of light energy in whole periods of time. For this, it is known that photosynthetic metabolism allows accumulation of energy during the supply of light, thus ensuring that the process can be continued for some time in the absence of light. In this sense, the aims of this work were: (i) evaluate the effect of long term light cycles in the cultivation of photosynthetic microalgae *Scenedesmus obliquus* (CPCC05), (ii) evaluate the effect of frequency photoperiod on *Scenedesmus obliquus* (CPCC05), (iii) evaluate the effect of short light cycles in photosynthetic microalgae cultivation of *Scenedesmus obliquus* (CPCC05), (iv) evaluate the lipids synthesis, (v) determine the qualitative profile of the lipid fraction, (vi) evaluate the electrical energy demand of different cycles of light. The results demonstrated that the microalgae *Scenedesmus obliquus* (CPCC05) was able to store enough energy to keep your metabolism for up to 2 hours of continuous darkness. Among all photoperiods, the 22:2 h fractionated at 24 and 48 cycles per day presented the highest lipid productivity (2:56 mg/L.h). Considering the electric energy demand, the photoperiods 0.50: 00:50 s (light: dark) and 22:2 h at 24 frequencies per day showed the best cost benefit for the production of microalgal biomass. The results showed that the modulation of the light cycles is a viable alternative to significantly reduce energy costs in photobioreactors.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figure 1. Productivity in biomass at different frequency photoperiods	39
Figure 2. Electric energy demand for biomass production	45
Figure 3. Electric energy demand for lipids production.....	46

LISTA DE TABELAS

Table 1. Kinetic parameters for <i>Scenedesmus obliquus</i> (CPCC05) in different photoperiods.....	35
Table 2. Lipid composition and lipid productivities at different long term photoperiods	36
Table 3. Fatty acids composition of long term photoperiods	37
Table 4. Kinetic parameters for <i>Scenedesmus obliquus</i> (CPCC05) in different frequency light/dark cycle	39
Table 5. Lipid content and lipid productivity at different frequency light/dark cycle....	40
Table 6. Fatty acids profile of <i>Scenedesmus obliquus</i> (CPCC05) subjected to different frequencies light/dark cycle	41
Table 7. Kinetic parameters for <i>Scenedesmus obliquus</i> (CPCC05) in different short light/dark cycle.....	42
Table 8. Lipid production in short light/dark cycle	43
Table 9. Fatty acids profile of <i>Scenedesmus obliquus</i> (CPCC05) subjected to different short light/dark cycle.....	44

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	11
CAPÍTULO 1	14
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
1 Microalgas	15
2 Metabolismo fotossintético.....	16
3 Sistemas de cultivo: biorreatores, operação e parâmetros de processo	18
4 Fotoperíodos.....	20
5 Microalgas e suas aplicações comerciais	21
CAPÍTULO 2: THE ROLE OF PHOTOPERIODS ON THE GROWTH AND LIPID CONTENT OF MICROALGAE SCENEDESMUS OBLIQUUS – A POTENTIAL STRATEGY TO COSTS REDUCE.....	29
1 Introduction	30
2 Material and Methods	32
2.1 Microorganisms and culture media	32
2.2 Photobioreactor design	32
2.3 Obtaining of the kinetic data in an experimental photobioreactor	32
2.4 Kinetic parameters	33
2.5 Analytical methods	33
2.6 Statistical analysis	34
3 Results and Discussion.....	34
3.1 Effects of long term light/dark cycle.....	34
3.2 Effects of frequency light/dark cycle	38
3.3 Effects of short light/dark cycle.....	41
3.4 Electric energy demand analysis.....	44
4 Conclusions	47
References	47
CONCLUSÃO GERAL	50
REFERÊNCIAS.....	25
ANEXO A – PATENTE DEPOSITADA NO INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL	51

INTRODUÇÃO

As microalgas têm atraído grande interesse como ferramentas potenciais para a conversão de poluentes em uma vasta gama de produtos. Estes produtos incluem ingredientes alimentares, ração animal, fertilizantes, biocombustíveis e produtos químicos de alto valor, tais como a astaxantina, β -caroteno, pigmentos, vitaminas e ácidos graxos poli-insaturados (HLAVOVA et al., 2015). Atualmente, o biodiesel de terceira geração ainda é o produto microalgal de maior interesse, devido as suas vantagens perante as fontes convencionais de produção desse biocombustível. As quais incluem a elevada taxa de crescimento, alto teor de lipídeos, baixas demandas por terras aráveis, e alta resistência a condições ambientais adversas, além da possibilidade de mitigar os problemas ambientais associados às emissões de CO₂ e poluição da água (HO et al., 2014).

Contudo, ainda existe uma baixa aplicabilidade dos processos mediados por microalgas em escala industrial. Esse problema está diretamente relacionado com a necessidade do aporte de energia luminosa as células, uma vez que no ambiente natural, a intensidade luminosa e o regime de luz sofrem alterações contínuas, e a manutenção artificial de luz em períodos integrais de tempo pode inviabilizar processo, sob o ponto de vista econômico (JACOB-LOPES et al., 2009; GROBBELAAR, 2009).

Em contrapartida, é sabido que o metabolismo fotossintético é constituído de duas fases, a fase luminosa e a fase escura. Na primeira fase, a energia luminosa é convertida em energia química, que é armazenada em compostos de alto valor energético. Na fase escura, a energia química é utilizada para a fixação do CO₂ e paralela formação de carboidratos (WILLIANS & LAUREN, 2010). Essas características metabólicas que os micro-organismos fotossintéticos possuem tornam possível o uso de ciclos de claro e escuro em bioprocessos baseados em microalgas (JACOB-LOPES et al., 2009).

Além disso, os regimes de luminosidade os quais as culturas são submetidas são considerados um fator determinante na produtividade celular e composição química da biomassa (ZHOU et al., 2015). Vários autores relatam que além de reduzir os custos operacionais do processo, o uso de fotoperíodos pode melhorar o rendimento das reações fotossintéticas, bem como dos produtos intracelulares (KRZEMINSKA et al., 2014; MITRA et al., 2015).

Neste sentido, esta adaptação biológica expande tecnologicamente as possibilidades de reações para conversão de CO₂ em bioprodutos, uma vez que permite a utilização de ciclos de claro/escuro, como maneira alternativa de iluminação. Assim, uma comparação entre diferentes fotoperíodos faz-se necessário visando determinar os regimes de luminosidade mais eficientes para propósitos industriais.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Elucidar o efeito de ciclos de luz no desempenho de fotobiorreatores, com o intuito de reduzir seus custos energéticos.

Objetivos específicos

-Avaliar o efeito de ciclos de luz de longa duração no cultivo fotossintético da microalga *Scenedesmus obliquus* (CPCC05);

-Avaliar o efeito dos fotoperíodos de frequência no cultivo fotossintético microalgal;

-Avaliar o efeito de ciclos de luz de curta duração no cultivo fotossintético microalgal;

-Avaliar a síntese de lipídeos;

-Definir o perfil qualitativo da fração lipídica;

-Avaliar a demanda por energia elétrica dos diferentes ciclos de luz.

CAPÍTULO 1
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1 Microalgas

O termo microalga é desprovido de valor taxonômico. Uma vez que constituem um grupo polifilético e altamente diversificado de seres microscópicos presentes em sistemas aquáticos, fotossintetizantes em sua grande maioria e apresentam estrutura vegetativa conhecida como talo, cuja diferenciação celular é caracteristicamente pequena ou nula (LOURENÇO, 2006).

Os principais critérios para classificar estes micro-organismos são pigmentação, natureza química dos produtos de reserva e estrutura celular básica (CHACON-LEE & GONZALEZ-MARINO, 2010). Segundo Mutanda (2010), sob a denominação de microalgas estão incluídos organismos com dois tipos de estrutura celular: estrutura procariótica, com representantes nos grupos *Cyanophyta* e *Prochlorophyta*; estrutura eucariótica, com representantes nos grupos *Glaucophyta*, *Rhodophyta*, *Ochrophyta*, *Haptophyta*, *Criptófitas*, *Dinophyta*, *Euglenophyta*, *Chlorarachniophyta* e *Chlorophyta*. No entanto, destacam-se sob o aspecto de exploração biotecnológica os grupos: cianobactérias (*Cyanophyta*), clorofíceas (*Chlorophyta*) e diatomáceas (*Ochrophyta*) (MATA et al., 2010).

As cianobactérias são classificadas no reino das eubactérias. Nunca apresentam flagelos e por terem sua organização celular do tipo procarionte, não possuem núcleo, nem organelas. Apresentam em sua estrutura a clorofila a e os fotossistemas I e II, ao contrário de outras bactérias fotossintetizantes, o que as permite realizar a fotossíntese na presença de oxigênio. Algumas espécies são estritamente fototróficas, enquanto outras atuam de modo facultativo, podendo crescer heterotroficamente (WIJFFELS et al., 2013).

Por outro lado, as clorofíceas, apresentam grande variedade nos níveis de organização, desde unicelulares, microalgas flageladas ou não, até talos morfológicamente complexos. Assim como as cianobactérias, as clorofíceas podem ser encontradas em quase todos os ambientes, contudo, cerca de 90% do total de espécies (sobretudo as formas microscópicas) ocorrem em água doce (REVIERS, 2006).

Com relação às diatomáceas, apresentam em sua estrutura uma frustula silicosa, e além da clorofila a e c, os plastídios contém fucoxantina e outras xantinas, como neofucoxantina, diadinoxantina e diatoxantina. A principal substância de reserva de tais organismos é a crisominarina, mas as células também podem

acumular lipídeos, e de um modo geral, são desprovidas de flagelos e quase sempre autotróficas. As diatomáceas habitam a zona fótica dos oceanos (até cerca de 200m de profundidade), mares, lagos e rios, apresentando tanto formas bentônicas como planctônicas (RIVIERS, 2006).

Microalgas também podem ser classificadas quanto ao fornecimento de carbono. Algumas espécies utilizam carbono inorgânico, como o CO₂ e são consideradas autotróficas, pois realizam a fotossíntese para obtenção de energia. Alguns destes micro-organismos possuem, no entanto, uma versatilidade no que se refere à manutenção de suas estruturas, usufruindo de diferentes metabolismos energéticos, como a respiração e fixação de nitrogênio (RAZZAK et al., 2013; RASHID et al., 2014).

As espécies de microalgas do género *Scenedesmus*, pertencentes à classe *Chlorophyceae* do filo *Chlorophyta*, são microalgas bastante comuns em ambientes de água doce e, devido a sua robustez são relativamente fáceis de cultivar. A *Scenedesmus obliquus*, em particular, é caracterizada pelas altas taxas de crescimentos e elevados teores de lipídeos (RIVIERS, 2006).

2 Metabolismo fotossintético

A reação global da fotossíntese é dividida em duas fases, que compreendem um conjunto de reações luminosas, que ocorrem apenas quando as células são iluminadas e reações de fixação de carbono, também chamadas de reações de escuro, que ocorrem tanto presença de luz quanto no escuro (JACOB-LOPES et al., 2009; WILLIANS & LAUREN, 2010).

As reações fotossintéticas ocorrem em organelas especiais, chamadas de cloroplastos. Onde, estes são envoltos por uma membrana, contendo um fluido aquoso chamado estroma, o qual contém o aparato bioquímico necessário para a fixação de CO₂, através das reações de carboxilação da fotossíntese, também conhecidas como ciclo de Calvin-Benson. O estroma contém pilhas de discos achatados delimitadas por uma membrana chamada tilacóide. Embebidos nas membranas tilacóides estão os pigmentos fotossintetizantes que promovem as reações luminosas e a síntese de ATP (FAY, 1983).

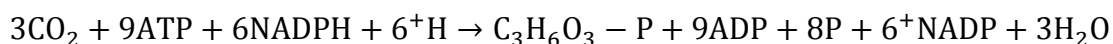
As reações luminosas são a etapa na qual ocorre a formação de compostos de alta energia, como ATP (adenosina trifosfato) e NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato). Nesta etapa, a energia luminosa é absorvida pelas estruturas

altamente organizadas dos pigmentos fotossintéticos e transportadores de elétrons, chamados fotossistemas. Os fotossistemas são constituídos pelo complexo do centro de reação e pelo complexo antena. Fazem parte do complexo antena os pigmentos acessórios: clorofilas b, c e d, carotenóides e ficobiliproteínas. Estes têm como função principal absorver os fótons e transferir a energia para o complexo do centro de reação. Onde, então as moléculas de clorofila a, que são excitadas e seus elétrons são transferidos para uma molécula aceptora de elétrons (ZHAO & SU, 2014).

Os elétrons então fluem através de uma série de transportadores ligados à membrana, incluindo citocromos, quinonas e proteínas ferro-enxofre. Simultaneamente, prótons são bombeados pela membrana tilacóide, a fim de gerar um potencial eletroquímico. Parte da energia liberada é incorporada durante este transporte de elétrons em ATP no processo de fosforilação. A última fonte de elétrons para a fotossíntese é a H₂O, o qual cede no processo de fotólise (reação de Hill), átomos de hidrogênio, elétrons e libera O₂, produto da fotossíntese das microalgas e das plantas verdes (FAY, 1983). A equação geral das reações dependentes de luz é (WILLIAMS & LAUREN, 2010):



Na etapa independente de luz ou ciclo de Calvin, ocorre a síntese de açúcares monossacarídeos a partir da fixação de CO₂. O ciclo inicia-se com a reação da ribulose 1,5-bisfosfato (Ru5BP), que é catalisada pela enzima ribulose 1,5-difosfato carboxilase/oxigenase (rubisco), com o CO₂. O produto da reação é quebrado em duas moléculas de três carbonos, 3-fosfoglicerato (PGA). Na presença de ATP e NADPH, o PGA é reduzido em gliceraldeído 3-fosfato (G3P). A maior parte (5 de 6 moléculas) do G3P produzido é utilizado para regenerar Ru5BP, de modo que o ciclo possa ser fechado. Uma das seis moléculas de Ru5BP não é reciclada e, então se condensa para formar açúcares fosforados intermediários e, posteriormente glicose. A equação geral para as reações independentes de luz é (WILLIAMS & LAUREN, 2010):



3 Sistemas de cultivo: biorreatores, operação e parâmetros de processo

A escolha do fotobiorreator ideal é um fator crucial para o bom desempenho de qualquer sistema de cultura de microalgas, uma vez que este é uma função das condições ambientais e de cultivo. Sem levar em consideração qualquer aspecto econômico, fotobiorreatores devem apresentar alguns requisitos básicos de projeto: eficiente fornecimento de energia luminosa e CO₂, temperatura controlada, adequado sistema de mistura, disponibilidade de nutrientes, facilidade de controle das condições da reação e facilidade no aumento de escala (BOROWITZKA, 1999).

O fornecimento de energia luminosa, devido ao seu caráter limitante no cultivo é o fator mais importante que regula a produtividade de culturas de microorganismos fotossintéticos (FERNÁNDEZ et al., 2013). Tanto a quantidade quanto a qualidade da fonte luminosa afetam a taxa de crescimento celular. Quando a intensidade da luz é baixa, a velocidade de crescimento é proporcional à intensidade luminosa. Porém, quando a intensidade luminosa é muito maior do que o valor da constante de saturação, ocorre a fotoinibição do crescimento, a qual, geralmente é causada pelo dano reversível ao aparato fotossintético. Iluminação natural ou artificial pode ser utilizada em função das características requeridas nos sistemas de cultivo (POSTEN et al., 2009).

No que se refere à nutrição, apesar das diferenças entre as espécies, para um crescimento ótimo o meio de cultura deve fornecer todos os macronutrientes e micronutrientes demandados. No grupo dos macronutrientes, estão C, N, O, H e P, que são considerados como essenciais, e também Ca, Mg, S e K. No caso dos micronutrientes, tem-se Fe, Mn, Cu, Mo e Co, algumas espécies também necessitam de baixas concentrações de vitaminas (GEORGE et al., 2014).

A fonte de carbono mais utilizada em cultivos fotossintéticos é o dióxido de carbono, que pode estar em sua forma normal ou dissociada (HCO₃⁻) no meio de cultivo. A concentração ideal de CO₂ no meio ainda não está bem elucidada e varia de acordo com a espécie de microalga, porém, geralmente utiliza-se concentrações entre 2 e 15% (ZHAO & SU, 2014). Considerando a baixa solubilidade do CO₂ em líquidos, é necessário que haja uma eficiente transferência de CO₂ para o meio, de modo a elevar os coeficientes volumétricos de transferência de massa (K_{La}) para garantir um crescimento celular ótimo (FERNÁNDEZ et al., 2013).

O controle de temperatura também é imprescindível no sentido de garantir a estabilidade do cultivo. Em geral a ótima temperatura de cultivo ocorre na região mesófila (25-35°C), embora algumas linhagens termófilas resistam a temperaturas na faixa dos 60°C. A grande maioria dos sistemas de cultivo assume a variação da temperatura como um resultado da variação do ambiente, embora o uso de camisas de aquecimento, serpentinas e trocadores de calor externo possam ser instalados para o controle da temperatura de biorreatores microalgais (POSTEN et al., 2009).

Finalmente, agitação é uma operação necessária no cultivo de microorganismos fotossintéticos, uma vez que assegura a uniformidade espacial dos vasos de reação, favorecendo a exposição das células a luz, a transferência de calor e estratificação térmica, além de melhorar a troca de gases. Uma mistura adequada minimiza ainda a formação de agregados celulares que aumentam a ineficiência global do biorreator. Embora fundamental para o adequado desenvolvimento do processo, a operação de mistura está relacionada a estresses hidrodinâmicos associados ao cisalhamento celular, que danifica e inibe o crescimento microalgal. Os biorreatores microalgais são normalmente equipados com sistemas de aeração pneumática e agitação mecânica, ou ainda uma combinação entre estes sistemas (BOROWITZKA, 1999).

Os cultivos de microalgas em larga escala, tiveram início antes da metade do século XX, desde então, uma ampla gama de sistemas de cultivo já foi relatado. A diferenciação destes sistemas de cultivo depende principalmente do custo, do tipo de produtos desejados, da fonte de nutrientes e da captura de CO₂. Os sistemas de cultura são geralmente classificados de acordo com suas condições de projeto como sistemas abertos ou fechados (RAZZAK et al., 2013).

Tradicionalmente, os sistemas abertos têm sido amplamente utilizados para o cultivo em larga escala, devido à simplicidade e baixo custo. Estes sistemas de cultivo apresentam duas configurações principais: as lagoas circulares e os tanques *raceway*, que consistem em um tanque raso (20-30 cm de profundidade), de geometria circular ou oval, dotado de sistemas de agitação mecânica, que expõem o meio de cultura ao ar por turbilhonamento. Infelizmente, esses fotobiorreatores permitem apenas um controle limitado das condições de operação. Além disso, a produtividade é baixa devido à baixa absorção de luz no fundo do tanque e pela maior probabilidade de contaminação. Outras limitações desse tipo de cultivo

incluem a grande necessidade de espaço de terra para o cultivo, perdas por evaporação, alta temperatura e, conseqüente baixa eficiência de transferência de massa (VASUMACHI et al., 2012).

Uma alternativa aos fotobiorreatores abertos são sistemas fechados, que possibilitam uma grande variedade de configurações e incrementam significativamente o desempenho dos cultivos. Três configurações principais dominam arranjos dos fotobiorreatores fechados, os sistemas tubulares, de placas planas e as colunas verticais. Estes sistemas são caracterizados por elevadas eficiências fotossintéticas associadas à maior precisão e controle das variáveis operacionais, menor risco de contaminação e minimização das perdas de água por evaporação (JACOB-LOPES et al., 2008; RAZZAK et al., 2013).

4 Fotoperíodos

Para o desenvolvimento de um bioprocessamento microalgal baseado em conceitos de tecnologia limpa, a fonte de energia ideal deve ser provida pela luz solar (ESSAM et al., 2007). A energia solar é um dos recursos naturais mais abundantes do planeta. Onde, a intensidade luminosa pode chegar a 1100 W m^{-2} durante o período do meio-dia, o que excede a intensidade necessária para a produção eficiente de microalgas. As vantagens desse tipo de abordagem são relacionadas principalmente ao fato de que a luz solar é livre, enquanto fontes de luz artificiais são onerosas (CHEN et al., 2013).

No entanto, as oscilações contínuas que a intensidade luminosa sofre ao longo do dia (fotoperíodo) são consideradas um fator limitante no uso da iluminação natural. O fotoperíodo é a quantidade de luz e escuro em um ciclo diário de 24 horas. No equador (latitude zero) o fotoperíodo é uma constante 12 horas de luz e 12 horas de escuro, mas, sofre alterações em função da localização específica, condições meteorológicas, estação do ano e espectro solar (OGBONNA et al., 1999; JANSSEN et al., 2003).

A eficiência de sistemas de cultivo de microalgas pode ser mensurada através da produtividade ou da eficiência de conversão de energia luminosa em biomassa. Dentre os vários fatores que afetam a eficiência de fotobiorreatores, a energia luminosa é o substrato limitante do crescimento, uma vez que fornece toda a energia necessária para suportar seu metabolismo.

Por outro lado, as flutuações nos níveis de irradiação em sistemas de iluminação natural podem ser evitadas pela aplicação de iluminação artificial (BARBOSA et al., 2004; KRZEMIŃSKA et al., 2014). O uso de iluminação contínua e controlada resulta em aumentos na produtividade do sistema. A exploração extensiva de luz artificial, no entanto, resulta em um aumento nos custos com eletricidade, aumentando consequentemente, os custos dos produtos finais (BLANKEN et al., 2013). Com o intuito de mitigar esse problema, diversas pesquisas têm sido desenvolvidas para utilizar ciclos de luz em cultivos microalgais. Além do apelo pela redução de custos com energia elétrica, a seleção de um fotoperíodo ideal pode melhorar significativamente o rendimento do processo e dos produtos nele gerado (ZHOU et al., 2015). Tais fotoperíodos podem ser classificados em três principais grupos: os de longa duração, os de frequência e os de curta duração.

Os fotoperíodos de longa duração compreendem os períodos de luminosidade e escuro em uma proporção de horas. Os ciclos mais utilizados em cultivos microalgais são 24 h: 0 h, 22 h: 2 h, 16 h: 8 h e 12 h: 12 h, de claro: escuro. Nesta linha de trabalho, Jacob-Lopes et al. (2008) estudaram todos estes fotoperíodos no cultivo da cianobactéria *Aphanotece microscopia Nägelli* e verificaram que esta espécie conseguiu manter sua alta produtividade mesmo com fotoperíodo de 22: 2 h de claro/escuro.

Já os fotoperíodos de frequência apresentam dois ou mais ciclos de claro/escuro por dia. Neste sentido Zhou et al. (2015) avaliaram cinco diferentes fotoperíodos de frequência: 2, 4, 8, 24 e 48 ciclos por dia. Estes autores verificaram que quanto maior o número de ciclos por dia, maior é a produtividade celular.

Por fim, os fotoperíodos de curta duração são assim denominados, pois abrangem os ciclos de claro/escuro em uma proporção de segundos ou milissegundos. Esse tipo de regime de luminosidade também é chamado de efeito *flashing*. Diversos estudos (JANSSEN et al., 1999; JANSSEN et al., 2001; JANSSEN et al., 2003) tem mostrado que esse tipo de iluminação favorece o crescimento de microalgas, podendo ter sua produtividade celular aumentada, quando comparada a sistemas com iluminação constante.

5 Microalgas e suas aplicações comerciais

As características metabólicas das microalgas fazem com que estes micro-organismos apresentem uma importante fonte de recursos a serem explorados.

Associado ao metabolismo fotossintético, a respiração e a fixação de nitrogênio constituem importantes rotas metabólicas, passíveis de serem exploradas biotecnologicamente para diversos propósitos (SUBRAMANIAN & THAJUDDIN, 2005; TRAN et al., 2010).

A utilização de microalgas para tratamento de águas residuais é particularmente atraente devido as suas habilidades em assimilar nutrientes como matéria orgânica, NO_3^- , PO_4^{3-} , NH_4^+ , CO_2 e metais pesados (PEÑA-CASTRO et al., 2004). O bio-tratamento de efluentes líquidos se dá em biorreatores heterotróficos, onde a matéria orgânica e os nutrientes inorgânicos são simultaneamente convertidos em biomassa na ausência de luminosidade. Esses processos são considerados uma alternativa barata para as formas convencionais de tratamento de efluentes secundários e terciários (QUEIROZ et al., 2013). Por outro lado, os cultivos fotossintéticos de microalgas demonstram ser uma das tecnologias de mitigação de CO_2 mais promissoras, uma vez que esses micro-organismos apresentam elevadas taxas fotossintéticas quando comparado a outras plantas superiores, além de possuírem alta resistência a elevadas concentrações de carbono (JACOB-LOPES et al., 2008).

Neste sentido, microalgas apresentam versatilidade para associar os processos de tratamento de resíduos com a produção paralela de insumos. As principais biomoléculas de interesse comercial são as substâncias intracelulares (pigmentos, ácidos graxos, proteínas, minerais e carboidratos), as substâncias extracelulares (carboidratos e compostos voláteis) e os biocombustíveis (ZEPKA et al., 2008; ABDEL-RAOUF et al., 2012; DRAAISMA et al., 2013; ONCEL, 2013; RODRIGUES et al., 2014).

Quando processadas através de reações químicas ou biológicas, as microalgas podem fornecer diferentes tipos de biocombustíveis renováveis, chamados de biocombustíveis de terceira geração. Estes incluem biodiesel, biohidrogênio e bioetanol (HO et al., 2014). O biodiesel é uma mistura de ésteres de alquila e de ácidos graxos obtidos por transesterificação. A transesterificação é uma reação em múltiplos passos, onde triglicerídeos são convertidos em diglicerídeos, em seguida, estes são convertidos em monoglicéridos, que então, são convertidos em ésteres (biodiesel) e glicerol (subproduto) (MATA et al., 2010). O bioetanol é obtido via processo bioquímico, através da fermentação dos açúcares (celulose,

xilose, galactose, arabinose, glicose e manose) da biomassa e posterior hidrólise do conteúdo amiláceo e celulósico por processo termoquímico (ONCEL, 2013). Por outro lado, o biohidrogênio pode ser produzido através de duas vias enzimáticas: fotólise direta ou fotólise indireta. A biofotólise direta é um processo biológico que quebra a molécula de água para a produção de hidrogênio e oxigênio pela utilização da luz solar, Este um método simples, porém com baixa produção de hidrogênio. Já a biofotólise indireta é um processo muito eficiente para separar as fases de formação do H₂ e O₂, esse processo ocorre em duas fases, uma fotossintética e outra catabólica (ONCEL, 2013; RASHID et al., 2014).

A exploração comercial em larga escala do conteúdo intracelular microalgal teve início na década de 1950, motivada pelo elevado teor de proteínas da biomassa, para utilização como recurso alimentar alternativo (SPOLAORE et al., 2006). Desde então, abriu-se um grande leque de produtos passíveis de serem explorados. Dentre eles, encontram-se os pigmentos, onde, então classificados em carotenóides, ficobilinas e clorofila, que são responsáveis pelas cores amarelo/laranja, vermelho/azul e verde, respectivamente (KOLLER et al., 2014). Além do potencial de aplicação como corantes na aquicultura e nas indústrias alimentícias e farmacêuticas, esses compostos têm sido relacionados a efeitos benéficos à saúde, os quais são atribuídos principalmente às suas propriedades antioxidantes. Outra classe de compostos com efeito positivo na saúde humana são os ácidos graxos. Dentro deste grupo, para a maioria das espécies, os ácidos graxos poliinsaturados, das famílias ω 3 e ω 6, correspondem à maior fração, podendo chegar a 60 % dos lipídeos totais (PEREZ-GARCIA et al., 2011). Por outro lado, microalgas também são classificadas como uma boa fonte de sais minerais, como fósforo, ferro, manganês, cobre, zinco, magnésio e cálcio. Essa composição torna a biomassa uma fonte passível de ser utilizada como suplemento alimentar na aquicultura e também como fertilizante (FABREGAS & HERRERO, 1986). Os carboidratos também podem ser produzidos intracelularmente. Eles são encontrados na forma de amido ou de açúcares simples, como arabinose, xilose, manose, galactose e glicose, bem como açúcares menos comuns, como ramnose, fucose e ácidos urônicos (DRAAISMA et al., 2013).

Além disso, as microalgas apresentam a capacidade de acumular substâncias poliméricas extracelulares (SPE) na superfície da célula, como uma forma de

proteção para as mesmas. SPE's são matrizes heterogêneas de polímeros de polissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos e fosfolípidos (MCSWAIN et al., 2005). Os exopolímeros microalgais têm múltiplas aplicações industriais. Neste sentido, podem ser aplicados na indústria de alimentos como espessantes e gelificantes. Na indústria farmacêutica, podem ser empregados como matriz hidrofílica de liberação controlada de medicamentos e no desenvolvimento de vacinas bacterianas e para aumentar a imunidade inespecífica. Além disso, algumas SPE's têm características de biosurfactantes e estão sendo utilizados na biorremediação de águas e solos (MISHRA et al., 2011).

REFERÊNCIAS

- ABDEL-RAOUF, N.; AL-HOMAIDAN, A. A.; IBRAHEEM, I.B.M. Microalgae and wastewater treatment. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v.19, p.257–275, 2012.
- BARBOSA, M, J; ZIJFFERS, J. W.; NISWORO, A.; VAES, W.; SCHOONHOVEN, J. V.; WIJFFELS, R. H. Optimization of Biomass, Vitamins, and Carotenoid Yield on Light Energy in a Flat-Panel Reactor Using the A-Stat Technique. **Biotechnology and Bioengineering**, v.89, p.233-242, 2004.
- BLANKEN, W.; CUARESMA, M.; WIJFFELS, R. H.; JANSSEN, M. Cultivation of microalgae on artificial light comes at a cost. **Algal Research**, v. 2, p.333-340, 2013.
- BOROWITZKA, M. A. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. **Journal of Biotechnology**. v.70, p.313-321, 1999.
- CHACON-LEE, T. L.; GONZALEZ-MARINO, G. E. Microalgae for “healthy” foods: possibilities and challenges. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety** v. 9, n. 6, p. 655–675, Oct. 2010.
- CHEN, Y.; WANG, J.; ZHANG, W.; CHEN, L.; GAO, L.; LIU, T. Forced light/dark circulation operation of open pond for microalgae cultivation. **Biomass and bioenergy**, v.56, p.464-470, 2013.
- DRAAISMA, R. B.; WIJFFELS, R. H.; SLEGERS, P. M.; BRENTNER, L. B.; ROY, A.; BARBOSA, M. J. Food commodities from microalgae. **Current Opinion in Biotechnology**, v.24, p.169–177, 2013.
- ESSAM, T.; AMIM, M. A.; TAYEB, O.; MATTIASSON, B.; GUIEYSSE, B. Solar-based detoxification of phenol and *p*-nitrophenol by sequential TiO₂ photocatalysis and photosynthetically aerated biological treatment. **Water Research**, v.41, p.1697-1704, 2007.
- FABREGAS, J; HERRERO, C. Marine microalgae as a potential source of minerals in fish diets. **Aquaculture**, v.51, p. 237-243, 1986.
- FAY, P. **The blue-greens(Cyanophytacyanobacteria)**. 5^a ed. London: ed. Edward Arnold, (Publishers), 88p. (Studies in Biology n^o 160). 1983.
- FERNÁNDEZ, F, G, A.; SEVILLA, J. M. F.; GRIMA, E, M. Photobioreactors for the production of microalgae. **Environ Sci Biotechnol**, v.12, p.131-151, 2013.
- GEORGE, B.; PANCHA, I.; DESAI, C.; CHOKSHI, K.; PALIWAL, C.; GHOSH.; MISHRA, S. Effects of different media composition, light intensity and photoperiod on morphology and physiology of freshwater microalgae *Ankistrodesmus falcatus* – A potential strain for bio-fuel production. **Bioresource Technology**, v.171, p.367-374, 2014.
- GROBBELAAR, J. U. Upper limits of photosynthetic productivity and problems of scaling. **Journal of Applied Phycology**, v.21, p.519-522, 2009.

HLAVOVA, M.; TUROCZY, Z.; BISOVA, K. Improving microalgae for biotechnology - From genetics to synthetic biology. **Biotechnology Advances**, v.33, p.1194-1203, 2015.

HO, S. H.; YE, X.; HASUNUMA, T.; CHANG, J. S.; KONDO, A. Perspectives on engineering strategies for improving biofuel production from microalgae – A critical review. **Biotechnology Advance**, v. 32, p.1448-1459, 2014.

JACOB-LOPES, E.; LACERDA, L. M. C. F.; FRANCO, T. T. Biomass production and carbon dioxide fixation by *Aphanothece microscopica Nägeli* in a bubble column photobioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 40, p.27-34, 2008.

JACOB-LOPES, E.; SCOPARO, C. H, G.; LACERDA, L. M. C. F.; FRANCO, T. T. Effect of light cycles (night/day) on CO₂ fixation and biomass production by microalgae in photobioreactors. **Chemical Engineering and Processing**, v. 48, p.306-310, 2009.

JANSSEN, M.; KUIJPERS, T. C.; VELDHOEN, B.; TERNBACH, M. B.; TRAMPER, J.; MUR, L. R.; WIJFFELS, R. H. Specific growth rate of *Chlamydomonas reinhardtii* and *Chlorella sorokiniana* under medium duration light:dark cycles: 13–87 s. **Journal of Biotechnology**, v.70, p.323-333, 1999.

JANSSEN, M.; SLENDERSA, P.; TRAMPER, J.; MUR, L. R.; WIJFFELS, R. H. Photosynthetic efficiency of *Dunaliella tertiolecta* under short light/dark cycles. **Enzyme and Microbial Technology**, v.29, p.298-305, 2001.

JANSSEN, M.; TRAMPER, J.; MUR, L. R.; WIJFFELS, R. H. Enclosed outdoor photobioreactors: Light regime, photosynthetic efficiency, scale up and future prospects. **Biotechnology and Bioengineering**, v.81, p.193-210, 2003.

KOLLER, M. M.; MUHR, A.; BRAUNEGG, G. Microalgae as versatile cellular factories for valued products. **Algal Research**, v.6, p.52-63, 2014.

KRZEMINSKA, I.; PAWLIK-SKOWRONSKA, B.; TRZCINSKA, M.; TYS, J. Influence of photoperiods on the growth rate and biomass productivity of green microalgae. **Bioprocess Biosystem Engineering**, v.37, p.735-741, 2014.

LOURENÇO, S.O. **Cultivo de Microalgas Marinhas: Princípios e Aplicações**. Editora RiMa, p. 51-60, 2006.

MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other application: A review. **Reviews of Sustainable Energy**, v. 14, p. 217-232, 2010.

MCSWAIN, B. S., IRVINE, R. L., HAUSNER, M., & WILDERER, P. A. Composition and distribution of extracellular polymeric substances in aerobic flocs and granular sludge. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, p.1051-1057, 2005.

MISHRA, A.; KAVITA, K.; JHA, B. Characterization of extracellular polymeric substances produced by micro-algae *Dunaliella salina*. **Carbohydrate Polymers**, v.83, p.852–857, 2011.

MITRA, M.; PATIDAR, S. K.; GEORGE, B.; SHAHA, F.; MISHRA, S. A euryhaline *Nannochloropsis gaditana* with potential for nutraceutical (EPA) and biodiesel production. **Algal Research**, v.8, p. 161-167, 2015.

OGBONNA, J. C.; SOEJIMA, T.; TANAKA, H. An integrated solar and artificial light system for internal illumination of photobioreactors. **Journal of biotechnology**, v.70, p.289-297, 1999.

ONCEL, S. S. Microalgae For a macroenergy world. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.26, p.241–264, 2013.

PEÑA-CASTRO, J. M.; MARTÍNEZ-JERÓNIMO, F.; ESPARZA-GARCÍA, F.; CAÑIZARES-VILLANUEVA, R.O. Heavy metals removal by the microalga *Scenedesmus incressatulus* in continuous cultures. **Bioresource Technology**, v.94, p.219-222, 2004.

PEREZ-GARCIA, O.; ESCALANTE, F. M., DE-BASHAN, L. E.; BASHAN, Y. Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products. **Water research**, v. 45, n. 1, p. 11-36, 2011.

POSTEN, C. Design principles of photobioreactors for cultivation of microalgae. **Engineering in Life Sciences**, v.9, p.165-177, 2009.

QUEIROZ, M.I. HORNES, M., MANETTI, A.G.S., ZEPKA, L.Q., JACOB-LOPES, E. Fish processing wastewater as a platform of the microalgal biorefineries. **Biosystems Engineering**, v.115, p.195-202, 2013.

RASHID, N. Current status, issues and developments in microalgae derived biodiesel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.40, p.760–778, 2014.

RAZZAK, S. A. Integrated CO₂ capture, wastewater treatment and biofuel production by microalgae culturing - A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.27, p.622–653, 2013.

RIVIERS, B. **Biologia e Filogenia das Algas**. Tradução: FRANCESCHINI, I. M. Porto Alegre, MG, Ed. Artmed, p.21-27; 66-94; 153-183, 2006.

RODRIGUES, D. D.; FLORES, E. M. M.; BARIN, J. S. MERCADANTE, A. Z.; JACOB-LOPES, E.; ZEPKA, L. Q. Production of carotenoids from microalgae cultivated using agroindustrial wastes. **Food Research International**, v. 65, p.144-148, 2014.

SPOLAORE, P.; CASSAN, C.J.; DURAN, E.; ISAMBERT, A. Commercial applications of microalgae. **Journal of Bioscience and bioengineering**, v.101, p.87-96, 2006.

SUBRAMANIAN, G.; THAJUDDIN, N. Cyanobacterial biodiversity and potential applications in biotechnology. **Current Science**, v.89, p.47-57, 2005.

TRAN, N. H.; BARTLETT, J. R.; KANNANGARA, G. S. K.; MILEV, A. S.,VOLK, H.; WILSON, M. A. Catalytic upgrading of biorefinery oil from micro-algae. **Fuel**, v.89, p.265-274, 2010.

under medium-duration light:dark cycles. **Journal of Biotechnology**, v.78, p.123-137, 2000.

VASUMATHI, K. K.; PREMALATHA, M.; SUBRAMANIAN, P. Parameters influencing the design of photobioreactor for the growth of microalgae. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.16, p.5443–5450, 2012.

WIJFFELS, R, H.; KRUSE, O; HELLINGWERF, K, J. Potential of industrial biotechnology with cyanobacteria and eukaryotic microalgae. **Current Opinion in Biotechnology**, v.24, p.405–413, 2013.

WILLIAMS, P. B. LAURENS, M. L. Microalgae as biodiesel and biomass feedstocks & analysis of the biochemistry, energetic and economics. **Energy & Environmental Science**, v.3, p.554-590, 2010.

ZEPKA, L. Q. et al. Production and biochemical profile of the microalgae *Aphanothece microscopica Nägeli* submitted to different drying conditions. **Chemical Engineering and Processing**, v.47, p.1311-1316, 2008.

ZHAO, B.; SU, Y. Process effect of microalgal-carbon dioxide fixation and biomass production: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.31, p.121–132, 2014.

ZHOU, Q.; ZHANG, P.; ZHAN, G.; PENG, M. Biomass and pigments production in photosynthetic bacteria wastewater treatment: Effects of photoperiod. **Bioresource Technology**, v.190, p.196-200, 2015.

CAPÍTULO 2

THE ROLE OF PHOTOPERIODS ON THE GROWTH AND LIPID CONTENT OF MICROALGAE *Scenedesmus Obliquus* – A POTENTIAL STRATEGY TO COSTS REDUCE

O artigo será submetido para a revista Bioresource Technology

The role of photoperiods on the growth and lipid content of microalgae *Scenedesmus obliquus* (CPCC05) – A potential strategy to costs reduce

Mariana Manzoni Maroneze¹ and Eduardo Jacob-Lopes^{1*}

¹*Department of Food Science and Technology, Federal University of Santa Maria (UFSM), 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil*

e-mail: jacoblopes@pq.cnpq.br

ABSTRACT: The aim of this work was evaluate the role of photoperiods on the growth and lipid content of microalgae *Scenedesmus obliquus* (CPCC05). Different long term photoperiods, light/dark cycle frequencies and short photoperiods were examined. The results demonstrated that *Scenedesmus obliquus* (CPCC05) is capable of storing sufficient energy to sustain cell growth for periods of up to a maximum of 2 h continuous in the dark, without affecting the rate of photosynthetic metabolism. The maximal biomass (9.58 mg/L.h) and lipid productivities (2.56 mg/L.h) were obtained at photoperiod of 0.91:0.09 s (light: dark) and frequency light/dark cycle of 48 times per day, respectively. The best trade-off between biomass productivity and light energy economy were at photoperiods of 0.5:0.5 and 0.91:0.09 s (light: dark). Thus, the use of the photoperiods shown to be an effective strategy for reducing microalgal biomass production costs.

1 Introduction

Microalgae are functionally diverse and phylogenetically heterogeneous groups of organisms that are primarily unicellular, aquatic and photosynthetic eukaryotes. These photosynthetic microorganisms have gained considerable attention and have been studied over the last decade by virtue of their wide variety of applications (Rizwan et al., 2015). Microalgae playing an important role in controlling environmental pollution, since that can be used in CO₂ capture from the atmosphere or from flue gas emissions and can remove nutrients from wastewaters. The high energetic value of microalgal biomass makes it suitable for application in human food and animal feed. The high growth rate and high lipid and carbohydrate content make this technology able of being exploited for the production of biofuels like biogas, biodiesel, bio-hydrogen, and bioethanol (Ho et al., 2014; Koller et al., 2014). Finally, microalgae and cyanobacteria produce different compounds, such as

pigments, antioxidants, b-carotenes, proteins and vitamins, which can be used to produce high-value products (Golçalves et al., 2016).

However, the success of any algae-based process is dependent on two key factors; high biomass productivity and quality with a low production cost. To support the photosynthetic metabolism, microalgae primarily require CO₂ and a light source. Sunlight is the most cost-effective energy source for microalgal production but the exploitation of sunlight as a light source has drawbacks, including changes in weather, day and night cycles, and seasonal changes, which affect light intensity and its spectrum. On the other hand, the artificial illumination can result in enhanced photosynthesis and thus higher biomasses and valuable-content productivities. At the same time, the high energy demand results in an increase in the cost of cultivations, and this may cripple the process at industrial scale (Abu-Ghosh et al., 2016).

In contrast, it is recognized that photosynthetic metabolism consists of two phases, the light phase and the dark phase. In the first stage, the light energy is converted into chemical energy, which is stored in high energy compounds. In the dark phase, the chemical energy is used in the carbon-fixation reactions (Wijffels et al., 2013). These photosynthetic pathways make possible to modulate the light regimes to develop cheaper and more efficient process, since the use of appropriate photoperiods can reduce the demand for light energy with similar or even higher productivity (Jacob-Lopes et al., 2009; Takache et al., 2015).

The photoperiods can be classified into three main groups: long term, frequency and short photoperiods. Photoperiods long term encompass the periods of light and dark on a proportion of hours (Jacob-Lopes et al., 2009). Already the frequency photoperiod feature two or more cycles of light/dark per day (Zhou et al., 2015). Finally, the short photoperiods are so named because they cover the cycles of light/dark in a proportion of seconds or milliseconds (Janssen et al., 2001).

In this sense, the aim of this work was evaluate the role of photoperiods on the growth and lipid content of microalgae *Scenedesmus obliquus* (CPCC05). The study focused on evaluation the influence of different light regimes (long term, frequency and short photoperiods) on biomass production, lipid production and fatty acids profile, as well on electric energy demand.

2 Material and Methods

2.1 Microorganisms and culture media

Axenic cultures of *Scenedesmus obliquus* (CPCC05) were obtained from the Canadian Phycological Culture Centre. Stock cultures were propagated and maintained in synthetic BG11 medium (Braun-Grunow medium) (Ripka et al., 1979). The incubation conditions used were 30°C, photon flux density of 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ and a photoperiod of 12 h.

2.2 Photobioreactor design

Measurements were made in a bubble column photobioreactor. The system was built in 4 mm thick glass, an internal diameter of 7.5 cm, height of 75 cm and nominal working volume of 2.0 L. The dispersion system for the reactor consisted of a 1.5 cm diameter air diffuser located in the centre of the column. The reactor was illuminated with 90 LED lamps of 1W, located in a photoperiod chamber. The CO₂/air mixture was adjusted to achieve the desired concentration of carbon dioxide in the airstream, through three rotameters that measured the flow rates of the carbon dioxide, the air and the mixture of gases, respectively.

2.3 Obtaining of the kinetic data in an experimental photobioreactor

The experiments were carried out in bioreactors operating in a batch mode, fed with 2.0 L synthetic BGN medium. The experimental conditions were the following: initial cell concentration of 100 mg/L, isothermal reactor operating at a temperature of 26°C, photon flux density of 150 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ and continuous aeration of 1VVM (volume of air per volume of culture per minute) with the injection of air enriched with 15% carbon dioxide.

In the long term photoperiods experiments, the light cycles evaluated were (h:h) 24:0, 22:2, 20:4, 18:6 and 12:12 (light: dark). In the light/dark cycle frequency experiments, the optimal light/dark cycle from above tests was used, where were evaluated six frequencies: 2, 4, 8, 12, 24 and 48 times per day (t/d). To study the effects of short light/dark cycles, four different cycle of (s:s) 0.91:0.09, 0.83:0.17, 0.75:0.25 and 0.50:0.50 (light: dark) were set every one second.

The cell concentration and the carbon-fixation rate were monitored every 24 h during the growth phase of the microorganism. The tests were carried out in duplicate and the kinetic data referred to the mean of four repetitions.

2.4 Kinetic parameters

Biomass data were used to calculate the biomass productivity [$P_X = (X_i - X_{i-1}) / (t_i - t_{i-1})^{-1}$, mg/L.h] and the lipid productivity [$P_L = P_X \cdot L_C$, mg/L.h], in which X_i is the biomass concentration at the time t_i (mg/L) and X_{i-1} is the biomass concentration at the time t_{i-1} (mg/L), t is the residence time (h) and L_C is the lipid content of the biomass (%).

The carbon fixation rate [$R_C = C_C P_X (M_{CO_2} / M_C)$, mg/L.h], was evaluated from the relationship between the carbon content of the cells and the volumetric growth rate of the microorganism.

2.5 Analytical methods

The cell concentration was evaluated gravimetrically by filtering a known volume of culture medium through a 0.45 μm filter (Millex FG, Billerica-MA, USA) and drying at 60°C for 24 h. The luminous intensity was determined using a quantum sensor (Apogee Instruments, Logan-UT, USA), measuring the light incident on the external reactor surface. The temperature was controlled using thermostats. The flow rates of the carbon dioxide, air and CO₂ enriched air were determined using rotameters (AFSG 100 Key Instruments, Trevose-PA, USA).

The composition of the elements of the *Scenedesmus obliquus* (CPCC05) cells was determined using a PerkinElmer 2400 CHNS/O element analyser (PerkinElmer, Shelton, CT, USA). Two milligrams sample of biomass were oxidized at 1000°C and the resulting gases were determined using a thermal conductivity probe for carbon. The standard used was acetanilide, with a composition of 71.09% carbon, 11.84% oxygen, 6.71% hydrogen and 10.36% nitrogen.

Total lipid concentration of the biomass was determined gravimetrically by the modified Bligh and Dyer method (1959), using the ratio between methanol, chloroform and distilled water of 2:1:0.8 (v/v/v). The method of Hartman and Lago (1976) was used to saponify and esterify the dried lipid extract to obtain the fatty acid methyl esters. Fatty acid composition was determined using a VARIAN 3400CX gas chromatograph (Varian, Palo Alto-CA, USA). Fatty acid methyl esters were identified

by comparison of the retention times with the authentic standards from FAME Mix-37 (P/N 47885-U, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) and quantified through area normalization by software T2100p Chromatography Station (Plus Edition) v9.04.

The electricity energy demand required to produce one kilogram of dry microalgae biomass (in kilowatts per kilogram of dry weight biomass, kW kg-DW⁻¹) and to produce one kilogram of microalgae oil (in megawatts per kilogram of oil) was obtained by correlation between the biomass productivity, lipid productivity, the potency of energy light; and lighting time.

2.6 Statistical analysis

Analysis of variance (one-way ANOVA) and Tukey's test ($p < 0.05$) were used to test differences between the photoperiods. The multivariate cluster analysis was used for determination of the similarity between light regimes. Single linkage as an amalgamation rule and Euclidean linkage distances as a measure of similarity were used in the analysis. The analyses were performed using Statistica 7.0 software (StatSoft, Tulsa-OK, USA).

3 Results and Discussion

3.1 Effects of long term light/dark cycle

In photosynthetic cultures, the amount of light energy received and stored by the cells has a direct relationship with the microalgal growth, metabolism and morphology, including the accumulation of lipids. In this sense, the effects of light/dark cycle on carbon fixation, biomass and lipid production were examined. The results are summarized in the Tables 1, 2 and 3.

3.1.1 Effects of long term light/dark cycle on biomass production and carbon fixation in biomass

As Table 1 shows, the majority of kinetic parameters can be seen as a function of the duration of the light periods. Maximum growth (1425.0 mg/L) was observed at the photoperiod of 24:00 h (light: dark) with the specific growth rate, generation time, residence time and productivity of 0.033 h⁻¹, 21 h, 192 h, 6.9 mg/L.h), respectively. However, the cultures cultivated under photoperiod of 22: 2 (light: dark) showed no significant difference (Tukey's test $P < 0.05$) on the maximum cellular concentration, residence time and productivity, compared with cultivation

under constant illumination. These results demonstrate that *Scenedesmus obliquus* (CPCC05) is capable of storing sufficient energy to sustain cell growth for periods of up to a maximum of 2 h in the dark, without affecting the rate of photosynthetic metabolism.

Table 1. Kinetic parameters for *Scenedesmus obliquus* (CPCC05) in different photoperiods

Photoperiod (light: dark) (h)	$X_{m\acute{a}x}$ (mg/L)	$\mu_{m\acute{a}x}$ (h ⁻¹)	GT (h)	RT (h)	P_x (mg/L.h)	r_c (mg/L.h)
24:0	1425.00 ^a	0.033 ^a	21.00 ^a	192 ^a	6.90 ^a	12.62 ^a
22:2	1414.00 ^a	0.025 ^b	27.70 ^b	192 ^a	6.77 ^a	12.38 ^b
20:4	778.00 ^b	0.017 ^c	40.80 ^c	120 ^b	5.65 ^b	10.34 ^c
18:6	1218.00 ^c	0.012 ^d	57.80 ^d	240 ^c	4.66 ^c	8.52 ^d
12:12	200.00 ^d	0.009 ^e	77.00 ^e	96 ^d	1.04 ^d	1.90 ^e

Within the same column, means having different superscripts are significantly different ($p < 0.05$) by Tukey test

$X_{m\acute{a}x}$: maximum cell biomass; $\mu_{m\acute{a}x}$: maximum specific growth rate (h⁻¹); GT: generation time (h); RT: cellular residence time (h); P_x : productivity in biomass (mg/L.h); r_c : carbon fixation rate (mg/L.h).

On the other hand, for the other photoperiods all kinetic parameters were significantly different. Table 1 show a linear behavior between photoperiods and maximum specific growth rate and biomass productivity, where these are reduced as it reduces periods of luminosity. This is associated to photolimitation condition, which occurs when there is insufficient light.

The cultures subjected to 12 hours of dark showed a low growth (200 mg/L) in a residence time of 96 h, resulting in a productivity (1.04 mg/L.h) 85% lower than cultivation with a constant supply of light energy. These results suggest that algae are not able to store sufficient energy to use during the long dark period. A consequence of the long dark period is that basic carbon compounds, which have been synthesized in the light, will be respired for maintenance purposes and reduce the overall growth rate and biomass yield.

3.1.2 Effects of long term light/dark cycle on lipid production

Changes in light quantity induce alterations in the metabolism and morphology and consequently on biochemical composition of microalgae. The Table 2 shows the

total lipid content under different long term photoperiods and lipid productivity. The results indicated that the lipid content and productivity was inversely proportional to dark periods.

Table 2. Lipid composition and lipid productivities at different long term photoperiods

Parameter	Photoperiod (light: dark) (h)				
	24:0	22:2	20:4	18:6	12:12
Lipid content (%wt)	23.08 ^a	21.90 ^b	21.60 ^c	18.57 ^d	4.10 ^e
Lipid productivity (mg/L.h)	1.59 ^a	1.48 ^b	1.22 ^c	0.86 ^d	0.04 ^e

Within the same line, means having different superscripts are significantly different ($p < 0.05$) by Tukey test

This may be due to the fact that light will normally stimulate fatty acid synthesis, growth and the formation of (particularly chloroplast) membranes. Moreover, it is known that together with the processes of carbon fixation, glucan biosynthesis, the lipid biosynthesis occurs during the light period (He et al., 2015). The same behavior was observed by Atta et al. (2013) when evaluated the influence of photoperiods of 24: 0, 18:6 and 12:12, under light intensity of $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. This situation was reversed when it was increased light intensity to $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, where the higher lipid content was obtained with 12:12 followed by 18:6 then 24:0. It is believed that this behavior occurs to protect microalgal cells of the photochemical damage.

Table 3 shows the fatty acids composition of the oil extracts from the five long term photoperiods evaluated here. Twenty three FAs were identified and, as expected, variability in the FA composition was observed for the different light conditions.

Table 3. Fatty acids composition of long term photoperiods

Methyl ester (%)	24:0	22:2	20:4	18:6	12:12
C8:0	ND	ND	ND	ND	35.7
C10:0	ND	ND	ND	ND	5.7
C12:0	ND	ND	ND	0.69	ND
C13:0	1.16	1.24	1.16	0.33	ND
C14:0	0.95	1.88	0.95	1.24	ND
C14:1	ND	0.93	1.10	ND	ND
C15:0	ND	0.70	0.55	ND	ND
C16:0	33.83	36.82	29.05	49.34	34.0
C16:1	9.98	3.57	5.13	2.97	5.8
C17:0	ND	ND	ND	ND	1.5
C18:0	2.47	2.58	1.35	1.77	2.6
C18:1n9c	12.26	10.05	10.62	15.52	5.7
C18:2n6t	17.50	14.71	17.41	ND	0.6
C18:2n6c	5.54	6.37	6.48	6.07	1.1
C18:3n6	1.31	1.64	0.60	0.86	0.3
C18:3n3	20.49	19.62	25.60	21.20	0.4
C20:0	ND	ND	ND	ND	0.7
C20:2	ND	ND	ND	ND	0.5
C20:5n3	ND	ND	ND	ND	0.5
C22:0	ND	ND	ND	ND	0.4
C22:1	ND	ND	ND	ND	0.3
C22:2	ND	ND	ND	ND	4.1
C22:3n6	ND	ND	ND	ND	0.3
SFAs	38.41	43.22	33.06	53.37	80.5
MUFAs	16.24	14.45	16.85	18.50	18.8
PUFAs	44.84	42.34	50.09	28.13	7.7

ND: not detected; SFAs: saturated fatty acids; MUFAs: monounsaturated fatty acids; PUFAs: polyunsaturated fatty acids.

The photoperiods of 24:0, 22:2 and 20:4 h (light: dark) exhibited a similar profile which is predominantly polyunsaturated (42.34-50.9%). Already photoperiod

of 18:6 presented a profile predominantly saturated (53.37%), followed by polyunsaturated FA (28.13%).

On the other hand, the light cycle of 12:12 h was the condition with the highest fraction of SFA (80.5%), followed by MUFA (18.8%). In terms of lipid content, this photoperiod presented the lowest value among the long term photoperiods. This could possibly be explained by the reason that lipids and fatty acids were oxidized when cells require energy in the dark during insufficiency of light for photosynthesis (Lim and Zaleha, 2013). As the unsaturations are prone to oxidation, the polyunsaturated FA are the first to be degraded. At the same time, in this condition was found the production of long-chain fatty acids (20 to 22 carbons), with up to 5 unsaturations in concentrations ranging from 0.3 to 4.1%.

3.2 Effects of frequency light/dark cycle

Increase the frequency of light and dark cycles can be a strategy to improve the performance of the process (Krzeminska et al., 2014). As Table 1 shows, 22:2 h was optimal long term photoperiod. In the following study, the optimal photoperiod was used, and different frequencies light/dark cycle were studied. The effects of light/dark cycle frequency on carbon fixation, biomass and lipid production were summarized in Table 4-5, and Fig 1.

3.2.1 Effects of frequency light/dark cycle on biomass production and carbon fixation in biomass

The performance parameters of the process in different frequency light/dark cycle are shown in Table 2. Although not all kinetic parameters have presented a linear behavior according to the number of frequencies per day, it can be seen an improvement in performance of the process, as it increases the number of frequencies per day. Maximum specific growth rates were higher from 8 times per day, which did not differ statistically from the following (12, 24 and 48 t/d). The cellular residence time decreases with increasing the number of frequencies, except for the 8 t/d which showed the highest concentration of cells (1718 g/L) at an elevated residence time (192 h). Considering the parameters, generation time, biomass productivity and carbon fixation rate, the best values were obtained at 24 and 48 t/d, without statistical difference (Tukey's test $P < 0.05$).

Table 4. Kinetic parameters for *Scenedesmus obliquus* (CPCC05) in different frequency light/dark cycle

Frequency photoperiod	$X_{\text{máx}}$ (mg/L)	$\mu_{\text{máx}}$ (h^{-1})	RT (h)	GT (h)	P_x (mg/L.h)	r_c (mg/L.h)
1 t/d	1338.0 ^a	0.025 ^a	192 ^a	27.73 ^a	6.45 ^a	11.80 ^a
2 t/d	1254.16 ^b	0.016 ^b	168 ^b	43.32 ^b	6.87 ^{ab}	12.57 ^b
4 t/d	1336.48 ^c	0.019 ^{bc}	168 ^b	36.48 ^c	7.36 ^b	13.46 ^c
8 t/d	1718.0 ^d	0.023 ^{ac}	192 ^c	30.14 ^d	8.42 ^c	15.40 ^d
12 t/d	1548.0 ^e	0.025 ^a	168 ^b	27.72 ^a	8.61 ^c	15.75 ^e
24 t/d	1638.0 ^f	0.027 ^a	168 ^b	25.67 ^e	9.15 ^d	16.74 ^f
48 t/d	1420.0 ^g	0.027 ^a	144 ^d	25.67 ^e	9.16 ^d	16,76 ^f

Within the same column, means having different superscripts are significantly different ($p < 0.05$) by Tukey test

X_{max} : maximum cell biomass; $\mu_{\text{máx}}$: maximum specific growth rate (h^{-1}); GT: generation time (h); RT: cellular residence time (h); P_x : productivity in biomass (mg/L.h); r_c : carbon fixation rate (mg/L.h).

The cell productivity is the main parameter to evaluate the performance of photosynthetic process and to select the optimal operational conditions. In face of this, the Figure 1 presented the cell productivity in different frequency light/dark cycle.

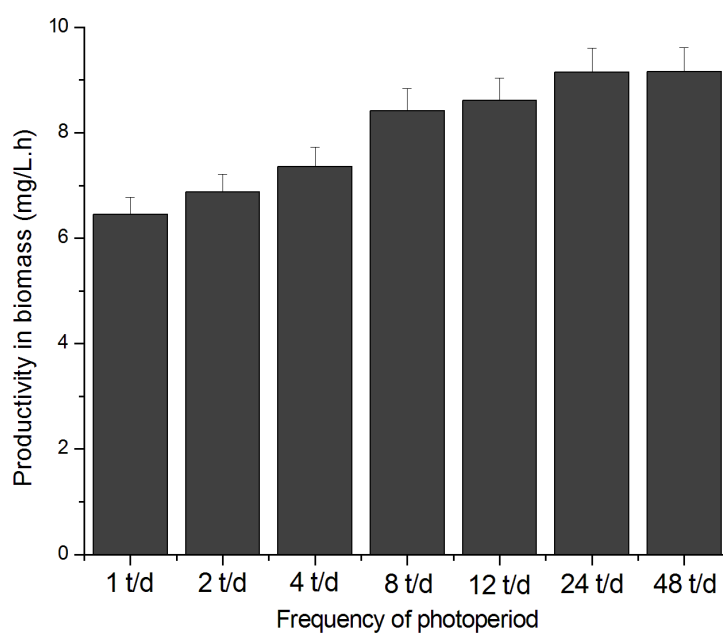


Figure 1. Productivity in biomass at different frequency photoperiods

As de Figure 1 show, 24-48 times per day of light/dark cycle frequencies were much more beneficial to the *Scenedesmus obliquus* (CPCC05) production, compared with lower frequencies. These results is in accordance with the study of Zhou et al. (2015), where, the highest biomass production and carbon organic demand (COD) removal were at a frequency of 48 times per day, using photosynthetic bacteria.

In addition, if we compare the frequency cycles of 24 and 48 times per day with constant illumination, there was a gain of 32.7 in biomass productivity. Probably this behavior is associated with photoinhibition phenomenon in the constant illumination condition. This occurs when the photosynthetic organisms are exposed to strong light and results in inhibition of the activity of photosystem II (Murata et al., 2007).

3.2.2 Effects of frequency light/dark cycle on lipid production

The lipid content obtained for different frequency light cycle indicate that the highest lipid percentage (28.02%) occurs at a frequency of 24 times per day, but, in terms of lipid productivity, the best performance (2.56 mg/L.h) was observed both in 24 and 48 times.

Table 5. Lipid content and lipid productivity at different frequency light/dark cycle

Parameter	Frequency photoperiod						
	1 t/d	2 t/d	4 t/d	8 t/d	12 t/d	24 t/d	48 t/d
Lipid content (%wt)	21.60 ^a	15.60 ^b	23.00 ^c	22.56 ^d	20.00 ^e	28.02 ^f	27.32 ^g
Lipid productivity (mg/L.h)	1.39 ^a	1.07 ^b	1.45 ^{ac}	1.89 ^d	1.58 ^{ac}	2.56 ^e	2.56 ^e

Within the same line, means having different superscripts are significantly different ($p < 0.05$) by Tukey test

The lipid content was not a function of the frequency of light/dark cycle per day. However, the lipid productivity presents this linear behavior since that the lipid productivity is the product of productivity in biomass and lipid content. Generally, the biomass productivity influenced the lipid productivity more than the lipid content (Hempel et al., 2012).

The fatty acids profile (Table 6) of lipid fraction of biomass subjected to different frequencies light/dark cycle indicated 15 different compounds with carbon

chain lengths from 10 up to 20 carbons. The dominant fatty acids were palmitic acid (C16:0), α -linolenic acid (C18:3n6) and linoleic acid (C18:2n6), for all the treatments. In this set of data have not been verified pronounced differences between the lighting conditions.

Table 6. Fatty acids profile of *Scenedesmus obliquus* (CPCC05) subjected to different frequencies light/dark cycle

Methyl ester (%)	1 t/d	2 t/d	4 t/d	8 t/d	12 t/d	24 t/d	48 t/d
C10:0	ND	ND	ND	ND	ND	2.76	2.3
C12:0	ND	0.63	0.18	0.16	0.26	ND	ND
C13:0	1.24	0.51	0.33	0.41	0.53	ND	ND
C14:0	1.88	1.60	1.22	1.30	1.30	2.07	1.56
C14:1	0.93	ND	ND	ND	ND	0.88	1.18
C15:0	0.70	ND	ND	ND	ND	ND	1.24
C16:0	36.82	47.36	43.50	42.42	42.17	34.26	39.28
C16:1	3.57	2.76	1.31	1.66	1.72	3.02	2.54
C18:0	2.58	1.50	2.26	2.53	1.93	5.64	3.09
C18:1n9	10.05	14.01	23.28	15.91	13.01	16.69	14.49
C18:2n6	21.08	8.18	5.98	10.92	12.15	19.05	23.25
C18:3n6	1.64	0.75	0.58	1.28	1.38	2.59	1.49
C18:3n3	19.62	22.69	21.37	23.42	25.75	10.89	16.40
C20:0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1.35
C20:3n6	ND	ND	ND	ND	ND	2.14	0.61
SFAs	48.22	51.60	47.48	46.81	45.99	44.73	48.82
MUFAs	14.45	16.77	24.58	17.58	14.73	20.59	20.44
PUFAs	42.34	31.62	27.93	35.61	39.28	34.67	30.75

ND: not detected; SFAs: saturated fatty acids; MUFAs: monounsaturated fatty acids; PUFAs: polyunsaturated fatty acids.

3.3 Effects of short light/dark cycle

The short light/dark cycles are very fast alternations between high light intensities and darkness, also called of flashing light effect. This effect can greatly enhance the photosynthetic efficiency, mainly under very short light/dark cycles from

less than 40 μ s up to 1 s. For this reason, the effects of short light/dark cycle on carbon fixation, biomass and lipid production were presented in Table 7 and 8 and 9.

3.3.1 Effects of short light/dark cycle on biomass production and carbon fixation in biomass

The performance parameters of the process in different short light/dark cycle are shown in Table 7. The best results are evidenced in 0.91:0.09 s (light: dark). In this condition, were obtained maximum cell density of 1940 mg/L, maximum specific growth rate of 0.027 h⁻¹, generation time of 25.67 h, biomass productivity of 9.58 mg/L.h and carbon fixation rate of 17.53 mg/L.h.

Table 7. Kinetic parameters for *Scenedesmus obliquus* (CPCC05) in different short light/dark cycle

Short light cycle (light: dark) (s)	$X_{\text{máx}}$ (mg/L)	$\mu_{\text{máx}}$ (h ⁻¹)	RT (h)	GT (h)	P_x (mg/L.h)	r_c (mg/L.h)
0.91:0.09	1940 ^a	0.027 ^a	192 ^a	25.67 ^a	9.58 ^a	17.53 ^a
0.83:0.17	1320 ^b	0.019 ^b	168 ^b	36.48 ^b	7.26 ^b	13.28 ^b
0.75:0.25	1290 ^c	0.018 ^{bc}	168 ^b	38.50 ^c	7.08 ^c	12.96 ^c
0.50:0.50	1200 ^d	0.022 ^{abc}	216 ^c	31.5 ^d	5.09 ^d	9.31 ^d

Within the same column, means having different superscripts are significantly different ($p < 0.05$) by Tukey test

X_{max} : maximum cell biomass; $\mu_{\text{máx}}$: maximum specific growth rate (h⁻¹); GT: generation time (h); RT: cellular residence time (h); P_x : productivity in biomass (mg/L.h); r_c : carbon fixation rate (mg/L.h).

On the other hand, if we compare these results with the continuous lighting experiment, the higher biomass productivities were obtained in photoperiods of 0.91:0.09, 0.83:0.17 and 0.75:0.25 s (light: dark). This suggests that under flashing light, the microalgae *Scenedesmus obliquus* (CPCC05) is able to maintain high cell productivities for up to 6 hours in darkness for a period of 24 hours.

The cycle of 0.50:0.50 s showed a slightly lower productivity of others. However, considering the electrical energy demand of the process, this lighting condition has advantage, since it remains in the absence of light for 12 hours per day. Additionally, the long term photoperiod of 12:12 h shows biomass productivity 489.4% smaller, comparing with the short light/dark cycle of 50:50 s.

3.3.2 Effects of short light/dark cycle on lipid production

The lipid production in short light/dark cycle condition (Table 8) indicate that lipid content of microalgal biomass ranged from 13.0 to 15.74%, resulting in lipid productivities of 1.2, 1.14, 1.06 and 0.67 mg/L.h for 0.91:0.09, 0.83:0.17, 0.75:0.25 and 0.50:0.50 s (light: dark), respectively.

Table 8. Lipid production in short light/dark cycle

Parameter	Photoperiod (light: dark) (s)			
	0.91:0.09	0.83:0.17	0.75:0.25	0.50:0.50
Lipid content (%wt)	13.0 ^a	15.74 ^b	15.06 ^c	13.29 ^a
Lipid productivity (mg/L.h)	1.24 ^a	1.14 ^b	1.06 ^c	0.67 ^d

Within the same line, means having different superscripts are significantly different ($p < 0.05$) by Tukey test

The condition that presented the best lipid content (15.74%) was 0.83:0.17 s (light: dark), but it is known that the lipid productivity is the major indicator of feasibility for single-cell oil production (Queiroz et al., 2011). So, among all short light/dark cycle, the best lipids producer was 0.91:0.091 s (light: dark), because their productivity in biomass is the highest.

Finally, in terms of the fatty acids profile (Table 9), the lipid fraction of biomasses indicated that this lipid profile was completely different from the others kinds of photoperiods tested. Saturated fatty acids were majority for all short light/dark cycle, followed by monounsaturated.

Table 9. Fatty acids profile of *Scenedesmus obliquus* (CPCC05) subjected to different short light/dark cycle

Methyl ester (%)	0.91:0.09	0.83:0.17	0.75:0.25	0.50:0.50
C8:0	39.2	1.2	31.9	33.1
C10:0	4.8	0.2	3.4	4.1
C14:0	ND	1.3	0.91	ND
C15:0	ND	0.6	ND	ND
C16:0	36.6	44.7	28.64	34.0
C16:1	3.0	9.1	6.61	6.2
C17:0	1.5	0.5	ND	1.8
C18:0	2.9	2.8	1.35	2.8
C18:1n9c	5.8	19.6	11.93	5.7
C18:2n6t	0.1	ND	0.1	0.3
C18:2n6c	0.3	13.8	6.48	0.9
C18:3n6	0.7	1.2	0.60	0.6
C18:3n3	0.2	ND	0.61	0.2
C20:0	0.4	0.1	0.9	1.3
C20:2	0.7	0.1	1.4	2.6
C20:5n3	0.2	0.1	0.5	0.3
C22:0	0.2	0.2	0.5	0.7
C22:1	0.1	ND	0.2	0.4
C22:2	2.9	0.3	3.4	3.3
C22:3n6	0.4	0.1	0.5	0.8
SFAs	85.7	51.6	67.6	78.8
MUFAs	8.9	32.7	18.9	12.3
PUFAs	4.5	15.7	13.5	8.9

ND: not detected; SFAs: saturated fatty acids; MUFAs: monounsaturated fatty acids; PUFAs: polyunsaturated fatty acids.

3.4 Electric energy demand analysis

To assess the ideal light regime both biomass, lipid productivity and electric demand should be considered and a trade-off, generally determined by economic considerations, must be established between both parameters in the selection of operational conditions of phototrophic processes. In this sense, the Figures 2 and 3

presents the electric energy demand (upper right side) and the dendograms for electric energy consumption for the fifteen light regimes.

The cluster analysis technique aims to get a better view of the data. The objects can be summarized into a relatively small number of groups or clusters, which are grouped according to their similarities (Francisco et al., 2014).

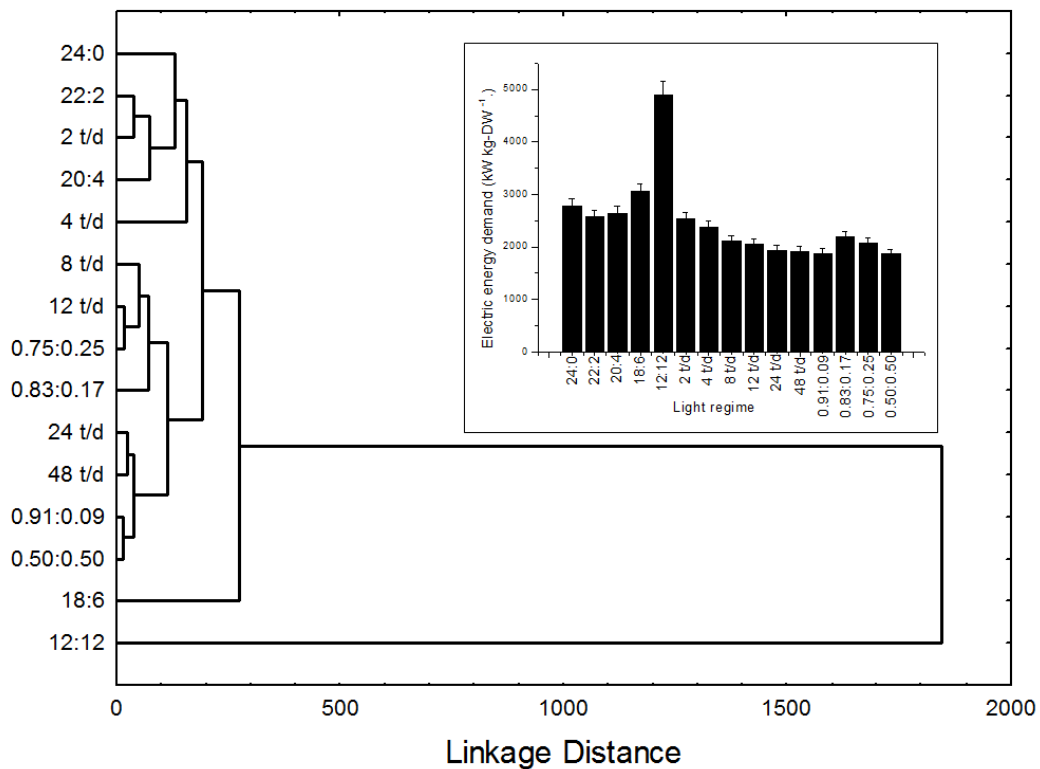


Figure 2. Electric energy demand for biomass production

For biomass production (Figure 2) the electric energy demand for all conditions tested, range from 1863 to 4900 KW per kilogram of biomass in dry weight. The dendogram shows three sets of clusters are visibly apparent: cluster 1 (12:12), cluster 2 (18:6, 0.50:0.50, 0.91:0.09, 48 t/d, 24 t/d, 0.83:0.17, 0.75:0.25, 12 t/d and 8 t/d) and cluster 3 (4 t/d, 20:4, 2 t/d, 22:2 and 24:0). However, in cluster 2 it is possible to view the formation of three subclusters: subcluster 1 (18:6), subcluster 2 (0.50:0.50, 0.91:0.09, 48 t/d and 24 t/d), subcluster 3 (0.83:0.17, 75:25, 12 t/d and 8 t/d).

The best conditions to biomass produce is in subcluster 2, wich is characterized for a small periods in darkness. The lowest electric energy demand is at 0.50:0.50 s, because although their productivity is not the highest, the energy saving is far superior to other light regimes, once the cultivation remains half the time

in the dark. On the other hand, the greatest electric energy consumption was at the long term photoperiod of 12:12 h (light: dark).

Conversely, the electric energy demand for lipid production presented a different behavior, as show the dendrogram on Figure 3. The dendrogram shows three distinct sets of clusters: cluster 1 (12:12), cluster 2 (0.50:0.50, 0.83:0.17, 0.75:0.25 and 0.91:0.09) and cluster 3 (48 t/d, 24 t/d, 12 t/d, 8 t/d, 4 t/d, 2 t/d, 18:6, 20:4, 22:2 and 24:0). In cluster 3, it is possible to view the formation of four subclusters: subcluster 1 (48 t/d and 24 t/d), subcluster 2 (12 t/d, 8 t/d and 4 t/d), subcluster 3 (2 t/d and 18:6) and subcluster 4 (20:4, 22:2 and 24:0).

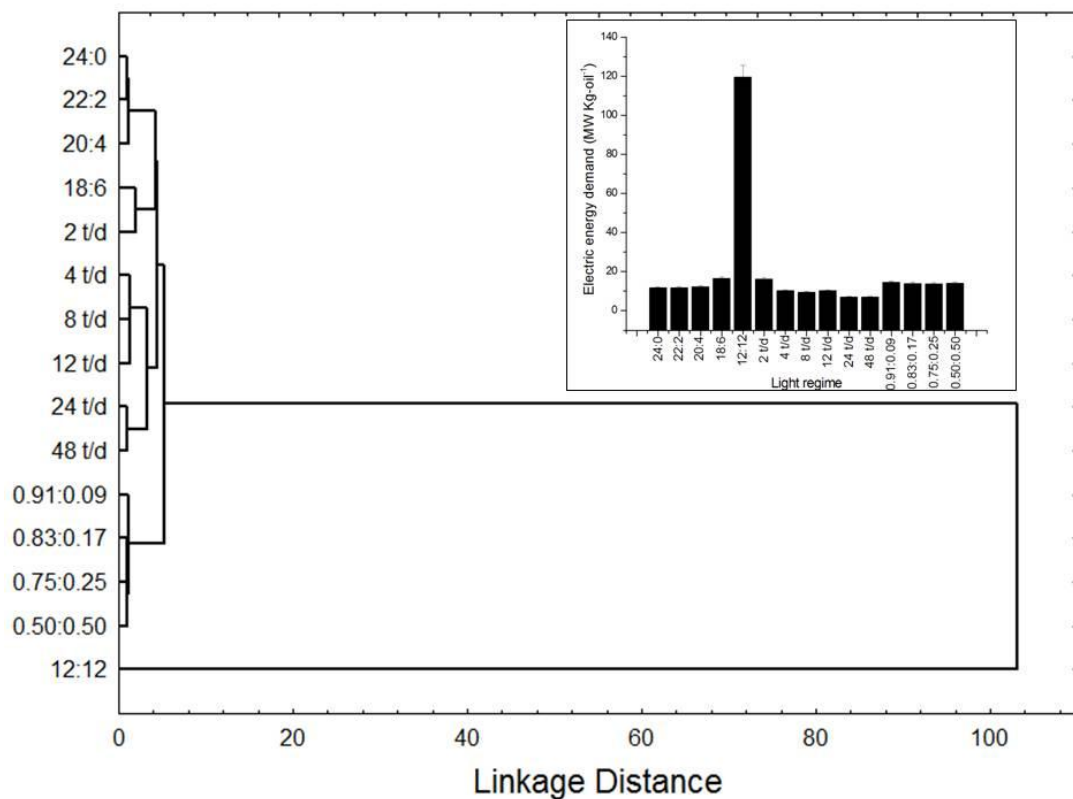


Figure 3. Electric energy demand for lipids production

As the Figure 3 (upper right side), the electric energy consumption ranged from 6.9 to 119.5 MW per kilogram of oil. The best values to lipid production are obtained in subcluster 1, which is composed for the frequency photoperiods of 24 and 48 t/d. Even as biomass production, the photoperiod of 12:12 h (light: dark) presented the worst performance among all conditions tested.

Therefore, the equilibrium conditions for the production of biomass and lipids are the frequency photoperiods of 24 and 48 t/d, since they are inserted in the clusters of lower energy demand.

4 Conclusions

The kinetics of the process and lipid content were significantly influenced by the photoperiod. Under the experimental conditions used, the best cost benefit to biomass production was at short light/dark cycle of 0.50:0.50 s (light: dark), with a reduction of 33% in electric energy demand. However for the lipid production, the best trade-off was at frequency photoperiod of 24 t/d, with an energy saving of 40.66%.

References

Abu-Ghosh, S., Fixler, D., Dubinsky, Z., Iluz, D., 2016. Flashing light in microalgae biotechnology. *Bioresour. Technol.* 203, 357-363.

Atta, M., Idris, A., Bukhari, A., Wahidin, S., 2013. Intensity of blue LED light: A potential stimulus for biomass and lipid content in fresh water microalgae *Chlorella vulgaris*. *Bioresour. Technol.* 148. 373-378.

Bligh, E.G., Dyer, J.W., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37, 911-917.

Francisco, E.C., Franco, T.T., Wagner, R., Jacob-Lopes, E., 2014. Assessment of different carbohydrates as exogenous carbon source in cultivation of cyanobacteria. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 37, 1497-505.

Gonçalves, A.L., Pires, J.C.M., Simões, M., 2016. Biotechnological potential of *Synechocystis salina* co-cultures with selected microalgae and cyanobacteria: Nutrients removal, biomass and lipid production. *Bioresour. Technol.* 200, 279-186.

Hartman, L.; Lago, R.C.A. 1976. Rapid preparation of fatty acids methyl esters. *Lab. Practice.* 22, 475-476.

Hempel, N., Petrick, I., Behrendt, F., 2012. Biomass productivity and productivity of fatty acids and amino acids of microalgae strains as key characteristics of suitability for biodiesel production. *J. Appl. Phycol.* 24, 1407-1418.

- Ho, S.H., Ye, X., Hasunuma, T., Chang, J.S., Kondo, A., 2014. Perspectives on engineering strategies for improving biofuel production from microalgae – A critical review. *Biotechnol. Adv.* 32, 1448–1459
- Jacob-Lopes, E., Scoparo, C.H.G., Lacerda, L.M.C.F., Franco, T.T., 2009. Effect of light cycles (night/day) on CO₂ fixation and biomass production by microalgae in photobioreactors. *Chem. Eng. Process.* 48, 306-310.
- Janssen, M., Slendersa, P., Tramper, J., Mur, L.R., Wijffels, R.H., 2001. Photosynthetic efficiency of *Dunaliella tertiolecta* under short light/dark cycles. *Enzyme Microb. Technol.* 29, 298-305.
- Koller, M.M., Muhr, A., Braunegg, G., 2014. Microalgae as versatile cellular factories for valued products. *Algal Res.* 6, 52-63.
- Krzeminska, I., Pawlik-Skowronska, B., Trzcinska, M., Tys, J., 2014. Influence of photoperiods on the growth rate and biomass productivity of green microalgae. *Bioprocess Biosyst. Eng.*, 37, 735-741.
- LIM, K.C.; ZALEHA, K. 2013. Effect of photoperiod on the cellular fatty acid composition of three tropical marine microalgae. *Malays. Appl. Biol.* 42, 41-49.
- Murata, N., Takahashi, S., Nishiyama, Y., Allakhverdiev, S. I., 2007. Photoinhibition of photosystem II under environmental stress. *BBA-Bioenergetics.* 1767, 414-421.
- Queiroz, M.I., Hornes, M.O., Silva-Manetti, A.G., Jacob-Lopes, E., 2011. Single-cell oil production by cyanobacterium *Aphanothece microscopica Nāgeli* cultivated heterotrophically in fish processing wastewater. *Appl. Energy.* 88, 3438-3443.
- Rippka, R.; Deruelles, J.; Waterbury, J.B.; Herdman, M.; Stainer, R.Y. 1979. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.* 111, 1-61.
- Rizwan, M., Lee, J.H., Gani, R., 2015. Optimal design of microalgae-based biorefinery: Economics, opportunities and challenges. *Appl. Energy.* 150, 69-79.
- Takache, H., Pruvost, J., Marec, H., 2015. Investigation of light/dark cycles effects on the photosynthetic growth of *Chlamydomonas reinhardtii* in conditions representative of photobioreactor cultivation. *Algal Res.* 8, 192-204.

Wijffels, R, H., Kruse, O., Hellingwerf, K, J., 2013. Potential of industrial biotechnology with cyanobacteria and eukaryotic microalgae. *Curr. Opin. Biotech.* 4, 405-413.

Zhou, Q., Zhang, P., Zhan, G., Peng, M., 2015 Biomass and pigments production in photosynthetic bacteria wastewater treatment: Effects of photoperiod. *Bioresour. Technol.* 190, 196-200.

CONCLUSÃO GERAL

O uso de fotoperíodos demonstrou ser uma estratégia eficiente para a redução dos custos de produção de biomassa microalgal;

Considerando os fotoperíodos de longa duração, a microalga *Scenedesmus obliquus* foi capaz de armazenar energia suficiente para sustentar o crescimento celular por períodos de até 2h no escuro, sem afetar as taxas de metabolismo fotossintético;

Ao fracionar o fotoperíodo de 22:2 h (claro: escuro) em vários ciclos por dia, verificou-se um aumento progressivo na produtividade celular à medida que aumentava o número de ciclos;

Em termos de demanda de energia elétrica, os fotoperíodos de 0.50:0.50 s (claro: escuro) e o 22:2 h (claro: escuro) em 24 ciclos por dia apresentaram os melhores custo benefício para produção de biomassa microalgal. Onde pode-se obter uma economia de até 33% no processo. Já para a produção de lipídeos o fotoperíodo com maior economia de energia foi o de 22:2 h (claro: escuro) em 24 ciclos por dia. O qual apresentou uma redução na demanda energética de 40,6%.

Embora a redução na demanda energética tenha apresentado um ganho expressivo, esses processos ainda apresentam reduzida viabilidade econômica para produção de *commodities*, sendo viáveis em um primeiro momento apenas produção de produtos de química fina.

ANEXO A – PATENTE DEPOSITADA NO INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL.



Receipt of a PCT International Application Submission

It is hereby acknowledged that a PCT International Application has been received via the Secure Electronic Submission Software of the BR. Upon receipt, Application Number and a Date of Receipt (Administrative Instructions, Part 7) has been automatically assigned.

Submission Number:	ROBR20120001530		
Application Number:	PCT/BR2014/000333		
Date of Receipt:	15 September 2014		
Receiving Office:	National Institute of Industrial Property (Brazil)		
Your Reference:	PP382		
Applicant:	INTERCEMENT BRASIL S.A.		
Number of Applicants:	2		
Title:	BIOPROCESSO DE CONVERSÃO DE DIÓXIDO DE CARBONO DE EMISSÕES INDUSTRIAIS, BIOPRODUTOS, SEUS USOS E FOTOBIOREATOR HÍBRIDO		
Method of submission:	EASY(FD) / Visit		
Documents Submitted:	PP382-appb.xml	0,56KB	15 September 2014
	PP382-fees.xml	2,46KB	15 September 2014
	PP382-pkda.xml	2,76KB	15 September 2014
	PP382-pkgh.xml	1,41KB	15 September 2014
	PP382-requ.xml	5,66KB	15 September 2014
	PP382-vlog.xml	2,54KB	15 September 2014
Signed by:	Thury, Cintia		
Timestamp of Receipt:	15 September 2014 15:22		
Date of sending of this receipt:	18 September 2014		
Official Digest of Submission:			

PCT/BR2014/000333

PATENT COOPERATION TREATY

From the RECEIVING OFFICE

To:
RICCI, Helcio Ferro

Avenida Indianópolis, 2504, Planalto
Paulista, São Paulo,
04062002
Brazil

PCT

NOTIFICATION OF THE INTERNATIONAL
APPLICATION NUMBER AND OF THE
INTERNATIONAL FILING DATE

(PCT Rule 20.2(c))

Date of mailing
(day/month/year) 18 September 2014 (18.09.2014)

Applicant's or agent's file reference PP382		IMPORTANT NOTIFICATION	
International application No. PCT/BR2014/000333	International filing date (day/month/year) 15 September 2014 (15.09.2014)	Priority date (day/month/year)	
Applicant INTERCEMENT BRASIL S.A. et al			
Title of the invention BIOPROCESSO DE CONVERSÃO DE DIÓXIDO DE CARBONO DE EMISSÕES INDUSTRIAIS, BIOPRODUTOS, SEUS USOS E FOTOBIORREATOR HÍBRIDO			

1. The applicant is hereby notified that the international application has been accorded the international application number and the international filing date indicated above.
2. The applicant is further notified that the record copy of the international application:
 - was transmitted to the International Bureau on 18 September 2014
 - has not yet been transmitted to the International Bureau for the reason indicated below and a copy of this notification has been sent to the International Bureau*:
 - because the necessary national security clearance has not yet been obtained.
 - because (reason to be specified):

* The International Bureau monitors the transmittal of the record copy by the receiving Office and will notify the applicant (with Form PCT/IB/301) of its receipt. Should the record copy not have been received by the expiration of 14 months from the priority date, the International Bureau will notify the applicant (Rule 22.1(c)).

Name and mailing address of the receiving Office INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial Rua Sao Bento 1, Andar 17, 20090-010, Rio de Janeiro, RJ, Brasil Facsimile No. 55 21 3037-3319	Authorized officer Thury, Cintia Telephone No. 552130373319
--	---

Form PCT/RO/105 (July 2008)

PP382

1/5

PCT REQUERIMENTO

Original (para APRESENTAÇÃO)



0	Reservado para o Organismo receptor	
0-1	Pedido internacional No.	PCT/BR2014/000333
0-2	Data do depósito internacional	15 SET 2014 15 09 14
0-3	Nome do Organismo receptor e "Pedido internacional PCT"	INPI/BRAZIL-PCT INTERNATIONAL APPLICATION
0-4	Formulário PCT/RO/101 Requerimento PCT	
0-4-1	Preparado Utilizando	PCT-SAFE [EASY mode] Versão 3.51.063.239 MT/FOP 20140613/0.20.5.21
0-5	Petição O abaixo assinado solicita que o presente pedido internacional seja processado de acordo com o Tratado de Cooperação em matéria de Patentes	
0-6	Organismo receptor (especificado pelo requerente)	Instituto Nacional de Propriedade Industrial (Brasil) (RO/BR)
0-7	Referência do processo do requerente ou do mandatário	PP382
I	Título da invenção	BIOPROCESSO DE CONVERSÃO DE DIÓXIDO DE CARBONO DE EMISSÕES INDUSTRIAIS, BIOPRODUTOS, SEUS USOS E FOTOBIOREATOR HÍBRIDO
II	Requerente	
II-1	Esta pessoa é:	Apenas requerente
II-2	Requerente para	Todos os Estados designados
II-4	Nome	INTERCEMENT BRASIL S.A.
II-5	Endereço	Av. Nações Unidas, 12.495, 13° e 14° andares Torre Nações Unidas - Torre A, Centro Empresarial Berrini 04578-000 São Paulo Brasil
II-6	Nacionalidade (nome do Estado)	BR
II-7	Domicílio (nome do Estado)	BR
II-8	No. de telefone	(5511) 55815707
II-9	No. de fax	(5511) 22769864
II-10	Endereço de correio electrónico	helcio.ricci@riccipi.com.br
II-10(a)	Autorização relativa ao correio electrónico O Organismo receptor deve obter junto de uma biblioteca digital e transmitir à Secretaria Internacional uma cópia autenticada do(s) pedido(s) anterior(es) acima identificado(s) no(s) ponto(s):	como notificações prévias por via electrónica seguidas de notificações em papel

PCT REQUERIMENTO

Original (para APRESENTAÇÃO)

III-1	Requerente e/ou inventor	
III-1-1	Esta pessoa é:	Apenas requerente
III-1-2	Requerente para	Todos os Estados designados
III-1-4	Nome	UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
III-1-5	Endereço	Av. Roraima, 1000 Camobi 97105-900 Santa Maria Brasil
III-1-6	Nacionalidade (nome do Estado)	BR
III-1-7	Domicílio (nome do Estado)	BR
III-2	Requerente e/ou inventor	
III-2-1	Esta pessoa é:	Apenas inventor
III-2-3	Inventor para	Todos os Estados designados
III-2-4	Nome (APELLIDO, nome próprio)	LOPES, Eduardo Jacob
III-2-5	Endereço	Av. Roraima, n° 1000, Prédio 42, sala 3210 Camobi 97105-900 Santa Maria Brasil
III-3	Requerente e/ou inventor	
III-3-1	Esta pessoa é:	Apenas inventor
III-3-3	Inventor para	Todos os Estados designados
III-3-4	Nome (APELLIDO, nome próprio)	ZEPKA, Leila Queiroz
III-3-5	Endereço	Av. Roraima, n° 1000, Prédio 42, sala 3210 Camobi 97105-900 Santa Maria Brasil
III-4	Requerente e/ou inventor	
III-4-1	Esta pessoa é:	Apenas inventor
III-4-3	Inventor para	Todos os Estados designados
III-4-4	Nome (APELLIDO, nome próprio)	MERIDA, Luis Guillermo Ramirez
III-4-5	Endereço	Rua Arsenio Machado Soares, n° 90, Apto 103 Camobi 97110-110 Santa Maria Brasil
III-5	Requerente e/ou inventor	
III-5-1	Esta pessoa é:	Apenas inventor
III-5-3	Inventor para	Todos os Estados designados
III-5-4	Nome (APELLIDO, nome próprio)	MARONEZE, Mariana Manzoni
III-5-5	Endereço	Rua Floriano Peixoto, n° 1311, Apto 402 Centro 97015-373 Santa Maria Brasil


PCT REQUERIMENTO

Original (para APRESENTAÇÃO)

III-6	Requerente e/ou inventor	
III-6-1	Esta pessoa é:	Apenas inventor
III-6-3	Inventor para	Todos os Estados designados
III-6-4	Nome (APELLIDO, nome próprio)	NEVES, Cristina
III-6-5	Endereço	Rua Carlos Lauda, n° 292 Itararé 97045-110 Santa Maria Brasil
IV-1	Mandatário ou representante comum; ou endereço para a correspondência A pessoa abaixo-identificada é/foi, por este meio, designada para actuar em nome do(s) requerente(s) perante as Autoridades Internacionais competentes, na qualidade de:	Mandatário
IV-1-1	Nome (APELLIDO, nome próprio)	RICCI, Helcio Ferro
IV-1-2	Endereço	Avenida Indianópolis, 2504 Planalto Paulista 04062002 São Paulo Brasil
IV-1-3	No. de telefone	(55-11) 55815707
IV-1-4	No. de fax	(55-11) 22769864
IV-1-5	Endereço de correio electrónico	helcio.ricci@riccipi.com.br
IV-1-6	No. do registo do requerente junto do Organismo	API 614
V	DESIGNAÇÕES	
V-1	O depósito deste requerimento constitui, de acordo com a Regra 4.9.a), a designação de todos os Estados Contratantes vinculados pelo PCT na data do depósito interna- cional, para os fins da concessão de qualquer tipo de protecção disponível e, se for caso disso, para os fins da concessão tanto de patentes regionais como de patentes nacionais.	
VI-1	Reivindicação de prioridade	NENHUMA (S)
VII-1	Autoridade Responsável pela Pesquisa Internacional Escolhida	Instituto Nacional de Propriedade Industrial (Brasil) (ISA/BR)

PCT REQUERIMENTO

Original (para APRESENTAÇÃO)

VIII	Declarações	Número de declarações	
VIII-1	Declaração relativa à identidade do inventor	-	
VIII-2	Declaração relativa ao direito do requerente, na data do depósito internacional, de pedir e obter uma patente	-	
VIII-3	Declaração relativa ao direito do requerente, na data do depósito internacional, de reivindicar a prioridade do pedido anterior	-	
VIII-4	Declaração de autoria da invenção (apenas para os fins da designação dos Estados Unidos da América)	-	
VIII-5	Declaração relativa a divulgações não prejudiciais ou exceções à falta de novidade	-	
IX	Lista de controle	Número de folhas	Ficheiro(s) electrónico(s) anexado(s)
IX-1	Requerimento (incluindo as folhas de declaração)	5	✓
IX-2	Descrição	17	-
IX-3	Reivindicações	4	-
IX-4	Resumo	1	✓
IX-5	Desenhos	2	-
IX-7	TOTAL	29	
	Itens anexos	Documento(s) em papel anexado(s)	Ficheiro(s) electrónico(s) anexado(s)
IX-8	Folha de cálculo das taxas	✓	-
IX-18	Suporte físico PCT-SAFE	-	✓
IX-20	Figura dos desenhos que deve acompanhar o resumo	1	
IX-21	Língua do depósito do pedido internacional	Português	
X-1	Assinatura do requerente, do mandatário ou do representante comum	 RICCI, Helcio Ferro	
X-1-1	Nome (APELIDO, nome próprio)		
X-1-2	Nome de quem assina		
X-1-3	Qualidade (se tal qualidade não for evidente para quem ler o requerimento)		

PP382

PCT/BR2014/000388

5/5

PCT REQUERIMENTO

Original (para APRESENTAÇÃO)

RESERVADO PARA O ORGANISMO RECEPTOR

10-1	Data efectiva de recepção do alegado pedido internacional	15 SET 2014 15 09 14
10-2	Desenhos:	
10-2-1	Recebida	
10-2-2	Não recebida	
10-3	Data efectiva de recepção, corrigida devido à recepção ulterior, mas dentro do prazo, de documentos ou desenhos que completam o alegado pedido internacional	
10-4	Data da recepção, dentro do prazo, das correcções exigidas de acordo com o Artigo 11.2) do PCT	
10-5	Autoridade responsável pela pesquisa internacional	ISA/BR
10-6	Transmissão da cópia de pesquisa diferida até ao pagamento da taxa de pesquisa	

RESERVADO PARA A SECRETARIA INTERNACIONAL

11-1	Data da recepção da via original pela Secretaria Internacional	
------	--	--

PP382

1/1

PCT (ANEXO - FOLHA DE CÁLCULO DAS TAXAS)

Original (para APRESENTAÇÃO)

(Esta folha não faz parte de, e não conta como, uma folha do pedido internacional)

0	Reservado para o Organismo receptor	PCT/BR2014 / 000333		
0-1	Pedido internacional No.			
0-2	Carimbo datador do Organismo receptor			
0-4	Formulário PCT/RO/101 (Anexo)			
0-4-1	Folha de cálculo das taxas PCT Preparado Utilizando	PCT-SAFE [EASY mode] Versão 3.51.063.239 MT/FOP 20140613/0.20.5.21		
0-9	Referência do processo do requerente ou do mandatário	PP382		
2	Requerente	INTERCEMENT BRASIL S.A.		
12	Cálculo das taxas prescritas	Valor de taxa/multiplicador	Valor total (BRL)	Valor total (EQF)
12-1	Taxa de transmissão T	⇒	175	
12-2-1	Taxa de pesquisa S	⇒	1685	
12-2-2	Pesquisa internacional a ser efectuada por	BR		
12-3	Taxa de depósito internacional (primeiras 30 folhas) i1	1330 EQF		
12-4	Restantes folhas	0		
12-5	Valor adicional (X) i2	0 EQF		
12-6	Total do valor Adicional i2	0 EQF		
12-7	i1 + i2 = i	1330 EQF		
12-12	Redução por depósito EASY R	EQFO		
12-13	Valor total da taxa de depósito internacional (i-R) I	⇒		1330
12-14	Taxa pelo documento de prioridade			
	Quantidade de documentos de prioridade solicitados	0		
12-15	Taxa por documento (X)	180 BRL		
12-16	Total da taxa relativa ao documento de prioridade: P	⇒		
12-17	Taxa pelo restabelecimento do direito de prioridade RP			
	Número de pedidos para restabelecimento de direitos de prioridade	0		
	Valor total de taxas para restabelecimento de direitos de prioridade			
12-19	TOTAL DAS TAXAS DEVIDAS (T+S+I+P+RP)	⇒	1860	1330
12-21	Modo de pagamento	Outro : Taxas pagas diretamente ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial		

PCT

13-2-1	Mensagens de validação Requerimento	Verde? O título da invenção deve ser curto e preciso. Queira verificar.
13-2-3	Mensagens de validação Nomes	Verde? Agente 1: a casa da autorização relativa ao correio electrónico não foi marcada. Este endereço de correio electrónico será utilizado apenas para os tipos de comunicação que poderiam ser feitos pelo telefone.
13-2-4	Mensagens de validação Prioridade	Verde? Não foi reivindicada a prioridade de um pedido anterior. Queira verificar.
13-2-7	Mensagens de validação Conteúdo	Amarelo O resumo deveria ser anexado em forma electrónica.
	Mensagens de validação Conteúdo	Verde? Uma procuração ou uma cópia de uma procuração geral pode ser exigida pelo Organismo receptor a não ser que pelo menos um dos requerentes assine o formulário de requerimento. Queira contactar o Organismo receptor para mais informações.
13-2-8	Mensagens de validação Taxas	Verde? Queira assegurar-se de que a tabela das taxas utilizada é a mais recente disponível.
	Mensagens de validação Taxas	Verde? Queira verificar que os valores das taxas modificados estão correctos.
	Mensagens de validação Taxas	Verde? Taxa int'l: a redução do PCT-EASY não foi aplicada porque o resumo não foi anexado em forma electrónica na página do conteúdo.

**BIOPROCESSO DE CONVERSÃO DE DIÓXIDO DE CARBONO DE EMISSÕES
INDUSTRIAIS, BIOPRODUTOS, SEUS USOS E FOTOBIORREATOR
HÍBRIDO**

CAMPO DA INVENÇÃO

5 [001] A presente invenção encontra seu campo de
aplicação dentre os fotobiorreatores para a conversão
fotossintética de gases do efeito estufa em bioprodutos do
metabolismo microalgal. De forma mais específica a invenção
trata de reatores e processo para produção e utilização
10 como insumos industriais de biomassa, sais inorgânicos,
exopolímeros e compostos orgânicos voláteis, a partir da
conversão de gases do efeito estufa, principalmente o
dióxido de carbono, gerados por diversas fontes de emissões
industriais, tais como, siderúrgicas, termoelétricas,
15 indústrias de processamento de cimento, etc.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

[002] A atual preocupação mundial com as mudanças
climáticas e as emissões de gases de efeito estufa pela
queima de combustíveis fósseis e as emissões industriais
20 têm acelerado a busca e desenvolvimento de tecnologias
alternativas que possam mitigar este problema. Um dos
principais gases geradores do efeito estufa é o dióxido de
carbono (CO₂). Do total das emissões antropogênicas do CO₂,
as usinas de processamento de cimento são responsáveis pela
25 produção mundial de aproximadamente cinco por cento. A
elaboração do cimento e a extração dos agregados para o
concreto têm impactos ambientais significativos que
precisam ser bem gerenciados. Alguns impactos, como as
emissões de CO₂ dos fornos cimenteiros, têm importância
30 global. Dependendo do processo, uma tonelada métrica de
cimento produz aproximadamente 700 quilogramas de CO₂.

[003] Em função da necessidade latente de reduzir a
pegada de carbono, acordos internacionais têm sido

propostos visando gerenciar estes poluentes. Desta forma, no ano de 1997, as Nações Unidas estabeleceram o Protocolo de Kioto com a ideia de reduzir em 5,2% os gases de efeito estufa com base nas emissões de 1990.

5 [004] Estes acordos, associados ao aumento da exigência no desenvolvimento de processos sustentáveis, têm pressionado o desenvolvimento de novas rotas tecnológicas visando integrar economia, meio ambiente e sociedade.

[005] Um dos processos que experimentou grande
10 desenvolvimento foi o de biotransformações de poluentes por microalgas, que podem gerar produtos de valor comercial como, por exemplo, óleos e proteínas unicelulares, carboidratos exocelulares, sais inorgânicos e compostos orgânicos voláteis. De uma forma geral, estes produtos são
15 obtidos por intermédio do cultivo de microalgas em reatores específicos. O metabolismo fotossintético destes microorganismos converte os compostos poluentes nos referidos produtos de interesse.

[006] Considerável fração dos processos conhecidos no
20 estado da técnica utiliza configurações de reatores adaptados da indústria química, como reatores de mistura, coluna de bolhas, *air-lifts* e reatores de fluxo pistonado. Estes sistemas bem como suas variações têm sido desenvolvidos e adaptados visando atender as peculiaridades
25 de bioprocessos que envolvem células microalgais. Em escala laboratorial e até escala piloto, estas configurações têm atendido as necessidades básicas do processo em questão.

[007] Entretanto, no aumento de escala dessas
configurações, visando atender projeções de uma demanda
30 industrial, todos esses arranjos não possuem viabilidade operacional. Essa questão decorre da necessidade do aporte de energia luminosa as células, que faz com que ocorram restrições geométricas que limitam o volume de trabalho dos

sistemas, uma vez que elevadas áreas superficiais são requeridas para um aporte adequado de luz.

[008] Tais problemas podem ser minimizados por uma característica que células microalgais possuem de armazenar parte da energia luminosa absorvida para uso posterior, fazendo com que parte da reação possa ser desenvolvida no escuro e outra parte em condições luminosas. Estas características tornam possível o uso de reatores híbridos de elevado volume útil que operam em ciclos de claro e escuro.

[009] Assim, um fotobiorreator híbrido, que opera em condições de claro/escuro para conversão fotossintética de resíduos gasosos industriais é algo ainda não conhecido do estado da técnica.

15 **TÉCNICA RELACIONADA**

[010] Diversas técnicas de sequestro do CO₂ têm sido desenvolvidas em todo o mundo. Entre elas, a conversão biológica por microalgas em fotobiorreatores têm sido considerada de elevado potencial de exploração. Estes processos consistem na transferência do dióxido de carbono para a fase aquosa de vasos de reação iluminados, onde estes micro-organismos convertem esta fonte de carbono em produtos do metabolismo fotossintético (biomassa, sais inorgânicos, exopolímeros e compostos orgânicos voláteis) (Jacob-Lopes, E.; Gimenes Scoparo, C.H.; Ferreira Lacerda, L.C.M.; Teixeira Franco, T. Effect of light cycles (night/day) on CO₂ fixation and biomass production by microalgae in photobioreactors. *Chem. Eng. Process.*, Vol. 48, pp. 306-310, 2009).

[011] A publicação acima referida demonstra a possibilidade de células microalgais armazenarem parte da energia luminosa captada no período de claro para posterior utilização em períodos de indisponibilidade da fonte de

luz. Esta adaptação biológica expande tecnologicamente as possibilidades de uso destes microrganismos como biocatalisadores de reações para conversão de CO₂, uma vez que permite projetar fotobiorreatores, que operam em

5 períodos parciais de escuro, facilitando a principal limitação destas reações que é o aporte adequado de energia luminosa as células, atualmente obtido em sistemas de elevada área superficial e reduzido volume reacional.

[012] Para que essa bioconversão ocorra

10 eficientemente, é necessário que a reação ocorra em condições controladas. Há duas configurações básicas de fotobiorreatores: os sistemas abertos no qual os *raceways* são os mais significativos e sistemas fechados cujas configurações do tipo *flat-plate*, tubular vertical tipo

15 *air-lift*, tubular vertical tipo coluna de bolhas, tubular horizontal e fotobiorreatores híbridos são os mais relevantes.

[013] Os sistemas abertos são de fácil construção e operação, porém são ineficientes do ponto de vista de

20 conversão do CO₂, uma vez que questões como disponibilidade de energia luminosa, variações de temperatura, problemas de contaminação por invasores, evaporação da água, difusão do CO₂ na atmosfera, além de grandes dimensões de terreno limitam sua aplicabilidade com propósito específico de

25 sequestro de CO₂ e/ou produção de bioprodutos de baixo valor agregado (Chisti, Y. Biodiesel from microalgae. *Biotechnol. Adv.* Vol. 25, pp. 294-306, 2007).

[014] Adicionalmente, o regime hidráulico dos fotobiorreatores abertos reflete em baixos tempos de

30 residência do gás injetado na fase líquida do sistema, resultando em baixos tempos de residência para que as microalgas convertam o CO₂ das emissões gasosas (Carvalho, A.P.; Meireles, L.A.; Malcata, F.X. Microalgal reactors: a

review of enclosed system designs and performances. *Biotechnol. Prog.* Vol. 22 pp.1490-1506, 2006).

[015] Por outro lado, os sistemas fechados foram desenvolvidos, visando contornar as limitações dos fotobiorreatores abertos, uma vez que um melhor controle das condições físico, químicas e biológicas da reação é normalmente obtido nesses arranjos.

[016] As diferentes configurações dos sistemas fechados incluem os fotobiorreatores tubulares verticais, que são considerados adequados sob os aspectos de variações de temperatura, problemas de contaminação por invasores, evaporação da água e transferência de CO₂. Porém, a elevada relação altura por diâmetro (L/D) normalmente de 10/1, requerida nessa configuração, visando aumentar a superfície de iluminação reflete em baixos volumes reacionais, limitando seu escalonamento.

[017] Os fotobiorreatores tubulares horizontais, por sua vez, embora apresentem elevada superfície de iluminação são limitados pela penetração e distribuição da luz, assim como pela dinâmica dos fluidos e acúmulo de oxigênio durante o processo. Possuem um elevado custo capital como reflexo da complexidade construtiva dos arranjos.

[018] Os fotobiorreatores fechados do tipo *flat-plate*, apresentam geometria retangular/plana que objetiva maximizar a superfície de exposição à luz, uma vez que possuem uma orientação vertical inclinada no ângulo adequado para maximizar a captura da radiação solar. Entretanto, limitações de volume reacional os tornam impraticáveis para a escala industrial.

[019] Os fotobiorreatores híbridos combinam dois ou mais configurações de fotobiorreatores na tentativa de compensar as desvantagens de um sistema e potencializar as virtudes do outro. No entanto, ainda persistem na maioria

das configurações os problemas no escalamento relacionados com a relação altura por diâmetro (L/D) (Ramírez, L.; Zepka, Q.L.; Jacob-Lopes, E. Fotobiorreator: herramienta para cultivo de cianobactérias. *Ciencia y Tecnología*, Vol. 6(2), pp. 9-19, 2013).

[020] Desta forma, no projeto e construção destes vasos de reação a principal variável a ser considerada está relacionada à geometria, expressa pelo equilíbrio entre a relação altura por diâmetro (L/D) que irá se refletir na superfície de iluminação, viabilizando o aumento de escala dos equipamentos.

[021] Recentemente, muitos pedidos de patentes têm sido depositados na tentativa de desenvolver um sistema aplicável a operações industriais, destinadas a conversão de CO₂.

[022] Na publicação WO2011086358A2, propõe-se um fotobiorreator e método de cultivo. Esse fotobiorreator apresenta um reservatório plano para manter o meio de cultura enquanto permite em paralelo a incidência da luz. Uma série de lentes é fixada numa matriz ao longo do tanque. Cada lente é adaptada para concentrar a luz que passa através do meio de cultura distribuindo para diferentes regiões com alta intensidade luminosa. Adicionalmente, a parede do reator é dotada de uma superfície refletora para refletir a luz que não é absorvida no meio de cultura.

[023] O documento alemão DE 102011002763A1 apresenta um fotobiorreator tubular com iluminação proporcionada por sistema de LED que ficam dispostos no interior do fotobiorreator. Esta disposição interna consiste em arranjos moldáveis contendo as unidades de iluminação dispostas a curtas distâncias entre si, garantindo assim, uma elevada relação superfície/volume.

[024] O documento norte-americano US 20090203116A1 descreve um sistema para melhorar o desempenho em fotobiorreatores dotados de iluminação interna por fibra ótica. A fibra ótica é recolhida para formar um conjunto
5 que passa através de um orifício próximo da posição superior da parede lateral do reator.

[025] O documento de patente norte-americano US 20130029404A1 revela um fotobiorreator para o cultivo de microrganismos fotossintéticos, que compreende um tanque
10 onde se mantem o meio de cultura e células fotovoltaicas que emitem luz em direção à superfície do tanque. As células fotovoltaicas estão dispostas em torno do fotobiorreator por meio de painéis de iluminação, que são colocados num tubo selado feito de material transparente,
15 que será imerso no meio de cultura.

[026] Estes quatro documentos de patentes acima descritos possuem limitações comuns, considerando basicamente a relação altura/diâmetro (L/D) dos fotobiorreatores. Esses protótipos de engenharia são
20 baseados em elevadas relações L/D, o que reflete invariavelmente em reduzidos volumes úteis de trabalho por unidade de fotobiorreator, limitando severamente o potencial de escalonamento e aplicação industrial dos sistemas. Adicionalmente, estão associados ao uso exclusivo
25 de iluminação artificial, que resultará em elevados custos capitais e operacionais.

[027] O documento espanhol P201200903 apresenta um fotobiorreator que combina o mecanismo de uma coluna de bolhas com um *air-lift* visando aumentar a produtividade em
30 biomassa, quando comparado aos sistemas operando em separado. Neste sentido, desenvolveu-se um fotobiorreator vertical de forma cilíndrica com fundo plano ou cônico construído com material transparente para transmissão de

luz. O fotobiorreator pode estar fechado com uma tampa transparente que evita a entrada de diversas substâncias, embora a tampa não feche hermeticamente o recipiente de modo que os gases possam sair. Esse documento também mostra
5 um duto de recirculação interno localizado no fundo que permite combinar os efeitos *air-lift* e coluna de bolhas; além de um trocador de calor para manter a temperatura ótima para o desenvolvimento das microalgas. Ao não considerar a relação L/D a instalação em escala industrial
10 precisaria de muitas unidades de fotobiorreator para obtenção de elevados volumes de reação. Ademais o projeto é limitado por razões estruturais, uma vez que a altura do fotobiorreator proporciona sombreamento entre as diversas subunidades.

15 [028] A publicação WO 2011/138477A1 descreve um fotobiorreator tipo *flat-plate* que apresenta recirculação contínua de um meio líquido que contém as microalgas através de lâminas de separação que facilitam a absorção de CO₂ e da iluminação para a produção de microalgas. A
20 invenção permite que os gases sejam adicionados à cultura a partir do interior da câmara de fornecimento de iluminação, gerando alta eficiência e facilidade de troca de CO₂ com o cultivo. As configurações *flat-plate* embora proporcionem elevada superfície de iluminação, não permitem a obtenção
25 de elevados volumes de trabalho em um único fotobiorreator.

[029] O documento de patente norte-americano US 20140017769A1 descreve um fotobiorreator tubular que compreende um tubo, um tanque de circulação e abastecimento de gás onde um tubo é ligado em circuito para o tanque de
30 circulação e a alimentação de gás conectada ao tubo. O tubo é construído em plástico e tem uma espessura de parede de no máximo 1 mm. Já o circuito tem um comprimento de pelo menos 100 metros, isto proporciona um aumento da proporção

de área de superfície/volume (S/V) de meio de cultura proporcionando um aumento na conversão do sistema. Esse arranjo, no entanto, não permite o aumento para as escalas industrialmente requeridas, pois desconsidera a relação
5 L/D, que é o principal critério que determina a ampliação de escala de fotobiorreatores.

[030] O documento japonês JP2008283937(A) mostra um fotobiorreator tubular formado por uma estrutura giratória dentro do reservatório que contém o meio de cultura e uma
10 lâmpada fixada na estrutura giratória. O eixo rotativo gira de maneira controlada fazendo que a lâmpada mova-se em torno do eixo de rotação, atuando como um elemento de agitação e de iluminação simultaneamente. Esta estrutura rotativa, entretanto, está relacionada a danos celulares
15 por cisalhamento, principalmente em microalgas com morfologia filamentosa, limitando severamente o potencial de aplicação industrial.

[031] O documento de patente brasileiro PI0701842-8 A2 mostra fotobiorreatores tubulares verticais ligados em
20 serie para proporcionar melhores condições para redução na emissão do principal gás responsável pelo aquecimento global, bem como de outros gases do efeito estufa. Nestes sistemas, a fixação de gás carbônico é incrementada pelo tempo que o gás permanece em contato com o líquido, uma vez
25 que os gases de exaustão são reutilizados para a alimentação das unidades subsequentes. Tendo que vista que esses sistemas basearem-se em elevadas relações L/D, dificilmente seriam escalonáveis a nível industrial.

[032] Diante das limitações do estado da técnica,
30 desenvolveu-se o presente bioprocesso de conversão de dióxido de carbono de emissões industriais, bioprodutos, seus usos e fotobiorreator híbrido.

[033] A presente invenção é uma solução tecnológica que permite obter simultaneamente elevadas áreas superficiais de iluminação e elevados volumes reacionais, possibilitando o escalonamento para condições industriais.

5 Essa solução baseia-se na relação geométrica L/D do fotobiorreator. As tecnologias existentes propõem sistemas com relações L/D elevadas, normalmente entre 5 a 10 para permitir elevadas áreas superficiais de iluminação. A invenção aqui mostrada compreende um fotobiorreator que

10 mantém relação L/D entre 1,0 e 1,5 acoplado a uma plataforma de iluminação, o que permite mediar fases de claro e escuro na reação fotossintética. Dessa forma, são obtidos elevados volumes de reação e também elevadas áreas superficiais na plataforma de iluminação.

15 **SUMÁRIO DA INVENÇÃO**

[034] O fotobiorreator híbrido revelado na presente invenção tem como objetivo a bioconversão de gases de efeito estufa, preferencialmente CO₂, em produtos do metabolismo fotossintético. O referido fotobiorreator visa

20 maximizar o volume de trabalho e a taxa fotossintética do sistema.

[035] A maximização do volume de reação é obtida por intermédio de um reator de mistura perfeita, construído em material não transparente, de geometria adequada,

25 preferencialmente cilíndrica, com proporções entre altura/diâmetro (L/D) de 1,0 a 1,5, acoplado a uma plataforma de iluminação do tipo torre de lâmina d'água, de dimensão variável, construída em concreto, aço ou polímero, com rugosidades na superfície para o controle da velocidade

30 de escoamento do fluido, operando com recirculação em circuito fechado. Esta plataforma de iluminação pode utilizar energia luminosa natural (solar) ou artificial (lâmpadas fluorescentes, LED, fibra ótica), ou ainda a

combinação alternada das duas formas. Adicionalmente, a plataforma de iluminação pode ser construída em uma geometria aberta (semicircular) ou fechada (tubo sólido), desde que permita o aporte de energia luminosa às células.

5 **BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS**

[036] As Figuras 1 e 2 mostram uma representação esquemática de um fotobiorreator híbrido da presente invenção. Há duas modalidades preferidas de arranjos. A primeira consiste de um sistema em que a recirculação do líquido ocorre na própria plataforma de iluminação de acordo com a Figura 1, onde pode ser observado um reator (1), sistema de aeração (2), plataforma de iluminação (3), sistema de bombeamento (4), um sistema de tubulação (5), sistema de controle (7) e sensores (8).

15 [037] A segunda modalidade consiste de um sistema no qual a recirculação ocorre com o auxílio de um tanque de apoio (6). Por meio do sistema de tubulação (5) o meio de cultura é reenviado de (6) ao reator principal (1), conforme apresentado na Figura 2.

20 **DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO**

[038] As características do fotobiorreator híbrido, objeto da presente invenção, serão mais bem percebidas a partir da descrição detalhada que se fará a seguir, a mero título de exemplo, associada aos desenhos acima referenciados, os quais são parte integrante do presente relatório.

[039] A descrição do fotobiorreator híbrido é feita de acordo com a identificação dos respectivos componentes, conforme identificados nas Figuras 1 e 2. A presente invenção refere-se ao equipamento principal e seus acessórios necessários para a condução do processo. O referido reator compreende basicamente os seguintes componentes:

- 5 - um reator (1) de mistura perfeita do tipo coluna de bolhas, contendo um difusor de gases (2), que pode ser do tipo tubo aberto, reto ou curvo, difusor em anel e/ou tubo aberto em Y, o dito reator (1) pode ser construído em material não transparente (concreto, aços inoxidáveis do tipo 304, 304L, 321, 316 e 316L e/ou polímeros reforçados ou não a base de polietileno (HD2), polipropileno, PVC rígido, PTFE, poliamidas), de
- 10 geometria adequada, tais como, retangular, quadrada, ou preferencialmente cilíndrica, com proporções altura e diâmetro (L/D) de 1,0 a 1,5, que proporciona a transferência de quantidade de movimento, calor e massa para a reação. Esta é
- 15 considerada a etapa química do sistema reacional. O reator pode ser operado de forma descontínua, descontínua alimentada e contínua;
- 20 - uma plataforma de iluminação (3), tipo torre de lâmina d'água, de dimensão variável, construída de material rígido rugoso (com elevação e declínio capazes de reduzir a velocidade de escoamento do meio de cultura), que permite a absorção de energia luminosa (natural e/ou artificial) para a reação. Esta plataforma pode
- 25 ter configuração de fundo plano com bordas laterais, estruturada em geometria semicircular ou ainda construída em tubulação transparente fechada. A dimensão dessa plataforma está associada à capacidade de armazenamento de
- 30 energia luminosa da espécie de microalga utilizada e suas proporções volumétricas relacionadas ao volume do fotobiorreator. Conseqüentemente, a relação volume reacional

iluminado/volume reacional no escuro será maximizada ou minimizada em função desta consideração;

- 5 - um tanque de armazenamento (6), componente apenas da segunda modalidade (Figura 2), construído em material não transparente, que serve como tanque de apoio para a contenção do meio de cultura;
- 10 - uma estação de bombeamento de fluídos líquidos e gasosos (4) dotada de bombas de deslocamento positivo, centrífugas, axiais, heliocentrífugas, e/ou volumétricas rotativas, de potência dimensionada de acordo com a capacidade operacional do sistema, suficiente para interligar o reator (1) com a plataforma de
15 iluminação (3) e um sistema de aeração, provido de um sistema de controle da vazão de ar, composto por difusores direcionais de ar comprimido.
- 20 - um conjunto de tubulações (5) para o deslocamento do fluído reacional, dotada de válvulas (gaveta, globo, pistão, agulha, esfera, diafragma e/ou válvula de fundo) e acessórios de controle de vazão, adequada para interligar o reator (1) com a plataforma de iluminação (3);
- 25 - um conjunto de medidores (8) de pH, temperatura, dióxido de carbono e oxigênio que são interligados a um sistema de controle, que auxilia nos ajustes dos parâmetros do processo.

[040] O meio de cultura armazenado no reator (1) recebe uma mistura de ar e CO₂ proveniente das emissões
30 industriais que é bobeada continuamente por meio do difusor (2), proporcionando o aporte de carbono inorgânico as culturas, em paralelo a agitação e mistura para o meio reacional. Este meio de cultura é deslocado ao longo da

plataforma de iluminação (3), permitindo a captação da energia luminosa pelas células, que desencadeiam a reação fotossintética, convertendo o dióxido de carbono ou outros gases do efeito estufa nos bioprodutos do metabolismo fotossintético. Esta operação é repetida por tempos de residência variáveis através da recirculação do meio de cultura entre o reator (1) e a plataforma de iluminação (3) em circuito fechado. No caso da operação descontínua o tempo de residência será definido pela exaustão dos nutrientes presentes no meio de cultura. Por outro lado, no caso da operação contínua, haverá a alimentação de meio de cultura em taxas de diluição proporcionais a velocidade de crescimento das células, com a retirada de meio de cultura em vazões equivalentes as vazões de alimentação. A operação contínua será mantida por tempo de residência indefinido, que permita a manutenção das culturas em estado estacionário.

[041] A segunda realização da presente invenção trata de um bioprocessamento de conversão do CO₂ em uma reação de duas fases (escura e clara) de emissões gasosas geradas no processamento de cimento, através das etapas de:

- (a) seleção e adaptação de microalgas as condições físico, químicas e biológicas operacionais do sistema para gerar uma cepa mutante;
- (b) inserção no reator da cepa mutante gerada na etapa (a) com concentração inicial do inóculo de cerca de 0,1 a 0,3 g/L, juntamente com o meio de cultura líquido;
- (c) propagação da cepa mutante através da manipulação das condições operacionais de temperatura, pH, agitação por aeração de ar comprimido contaminado com dióxido de carbono (1-25%).

[042] Em um aspecto particular, os procedimentos de adaptação de microalgas as condições físico, químicas e biológicas operacionais da etapa (a) incluem, por exemplo, a exposição das células a concentrações crescentes de CO₂ oriundo de emissões gasosas de interesse, a condições de temperatura entre 10-40°C, pH entre 3 a 10, luminosidade entre 0 a 100 klux, com o objetivo de gerar uma cepa mutante pré-adaptada as condições de operação do sistema. Esta cepa mutante deverá estar previamente aclimatada às condições operacionais (físico, químicas e biológicas) requeridas e impostas pela usina de processamento de cimento.

[043] De forma opcional, o bioprocesso de conversão de efluentes gasosos provê uma etapa de tratamento preliminar da emissão gasosa, exceto o CO₂, através de sistemas de separação físico-química para a contenção de material particulado, metais pesados e outros constituintes do gás poluente.

[044] A proporção de inóculo/meio de cultura da etapa (b) do processo pode variar entre 10% (100/1000) a 30% (300/1000).

[045] Em uma incorporação do bioprocesso de conversão de CO₂, a etapa (c) de propagação da cepa mutante ocorre em temperaturas de cerca de 10 a 40°C, pH inicial do meio ajustado para aproximadamente 7,0 a 8,0 (preferencialmente, 7,8 a 8,0), agitação por aeração de ar comprimido de 0,5 a 1,5 VVM (volume de ar por volume de meio de cultura por minuto), sendo este ar enriquecido/contaminado com uma proporção de gases de emissão do processamento de cimento, que resulte em um teor de CO₂ entre 1 a 25%, preferencialmente 15%, e intensidades luminosas na plataforma de iluminação que variam de 10 a 100 klux.

[046] Operacionalmente, o ponto limitante do

processo está associado à capacidade particular de uma espécie em armazenar energia luminosa para posterior utilização no escuro, determinando a velocidade de escoamento do fluido na plataforma de iluminação (3) e o tempo de retorno ao reator (1).

[047] Outro aspecto do bioprocessamento de conversão de gases do efeito estufa, da presente invenção, é a utilização de microalgas pertencentes às classes das cianobactérias, clorofíceas e diatomáceas, como *Aphanothece*, *Synechocystis*, *Nostoc*, *Phormidium*, *Chlorella* e *Phaeodactylum*.

[048] Todas as etapas do bioprocessamento de conversão são realizadas em fotoperíodos, que alternam condições de claro e escuro com duração controlada.

15 **Exemplo**

[049] A título de exemplificação, um evento real pode ser descrito a partir de um reator (1) com relação L/D de 1,46, acoplado a uma plataforma de iluminação (3) capaz de comportar um volume equivalente a 10% do volume do reator (1), dotado de uma bomba de deslocamento positivo (4) e tubulações (5) que permitam a interligação entre as duas unidades reacionais. Este fotobiorreator híbrido, operado a partir de uma cepa mutante de *Chlorella vulgaris*, em meio sintético BG11, a 25°C e com vazão por unidade de volume de 1 VVM (com ar contaminado com 15% de CO₂) é capaz de fixar na biomassa microalgal 1,2 kg de carbono por metro cúbico de reator por dia, refletindo na produção de 0,66 kg de biomassa microalgal por metro cúbico de reator por dia.

[050] Em uma terceira realização, a presente invenção provê produtos de biorrefinaria microalgal gerados através do bioprocessamento de conversão de gases do efeito estufa, tais como biomassa integral (contendo proteína, lipídeos, minerais e carboidratos), sais inorgânicos (carbonatos e

bicarbonatos), exopolímeros (carboidratos, lipídeos e proteínas exocelulares), além de aminoácidos, ácidos nucléicos, óleos unicelulares, ácidos graxos, exopolissacarídeos, pigmentos naturais e compostos orgânicos voláteis (hidrocarbonetos, aldeídos, cetonas e álcoois) e semi-voláteis. Estes múltiplos bioprodutos são gerados simultaneamente durante os processos de biotransformação de CO₂ e podem ser usados na forma de alimentação humana e/ou animal, extração de químicos a granel, químicos finos e combustíveis.

[051] Em uma quarta realização, a atual invenção trata do uso dos bioprodutos resultantes do bioprocessamento como insumos industriais, em particular em fábricas de rações de animais, usinas de biocombustíveis e indústrias de base química em geral. Esta gama de possibilidades decorre da composição química da biomassa microalgal gerada, composta por elevadas concentrações de proteínas, lipídeos, carboidratos minerais e pigmentos, presentes intracelularmente, além dos bioprodutos de natureza extracelular, como biopolímeros, aldeídos, cetonas e hidrocarbonetos e outros compostos voláteis e semi-voláteis presentes nos gases de exaustão do fotobiorreator.

[052] A descrição que se fez até aqui do processo e reator, objeto da presente invenção, deve ser considerada apenas como uma possível concretização, e quaisquer características particulares nela introduzida devem ser entendidas apenas como algo que foi descrito para facilitar sua compreensão. Desta forma, não podem de forma alguma ser consideradas como limitantes da invenção, a qual está limitada ao escopo das reivindicações que seguem.

REIVINDICAÇÕES

1. **FOTOBIORREATOR HÍBRIDO**, caracterizado por operar em condições de claro e escuro compreendendo: um reator
5 (1) construído em material não transparente, com proporções altura e diâmetro (L/D) de 1,0 a 1,5, contendo um difusor de gases (2); uma plataforma de iluminação (3) tipo torre de lâmina d'água; uma
estação de bombeamento (4) e um conjunto de tubulações
10 (5) que interliga o reator (1) com a plataforma de iluminação (3).
2. **FOTOBIORREATOR HÍBRIDO**, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por compreender um tanque de armazenamento alternativo (6), construído em material
15 não transparente.
3. **FOTOBIORREATOR HÍBRIDO**, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de compreender um reator (1) de mistura perfeita do tipo coluna de bolhas construído, preferencialmente, em concreto, aço
20 inoxidáveis do tipo 304, 304L, 321, 316 e 316L e/ou polímeros reforçados ou não a base de polietileno (HD2), polipropileno, PVC rígido, PTFE ou poliamida, de geometria preferencialmente cilíndrica.
4. **FOTOBIORREATOR HÍBRIDO**, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato do difusor de gases (2) ser
25 do tipo tubo aberto, reto ou curvo, difusor em anel e/ou tubo aberto em Y.
5. **FOTOBIORREATOR HÍBRIDO**, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato da plataforma de iluminação
30 (3) ser construída preferivelmente de material rígido rugoso, com configuração de fundo plano com bordas laterais ou estruturada em geometria semicircular ou ainda construída em tubulação transparente fechada.

- 5
6. **FOTOBIOREATOR HÍBRIDO**, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato da dimensão da plataforma de iluminação (3) ser ajustada em função da capacidade de armazenamento de energia luminosa da espécie de microalga utilizada no presente fotobiorreator e em proporções volumétricas relacionadas ao volume do fotobiorreator.
- 10
7. **FOTOBIOREATOR HÍBRIDO**, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato da estação de bombeamento de fluídos líquidos e gasosos (4) ser dotada preferivelmente de bombas de deslocamento positivo, centrífugas, axiais, heliocentrífugas, e/ou volumétricas rotativas e um sistema de aeração, provido de um sistema de controle da vazão de ar, composto por difusores direcionais de ar comprimido.
- 15
8. **FOTOBIOREATOR HÍBRIDO**, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato do conjunto de tubulações (5) ser dotada de válvulas, preferivelmente do tipo gaveta, globo, pistão, agulha, esfera, diafragma e/ou válvula de fundo, além de acessórios de controle de vazão para a interligação do reator (1) com a plataforma de iluminação (3).
- 20
9. **FOTOBIOREATOR HÍBRIDO**, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de compreender um conjunto de medidores (8) de pH, temperatura, dióxido de carbono e oxigênio que são interligados a um sistema de controle.
- 25
10. **FOTOBIOREATOR HÍBRIDO**, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato do referido reator ser alternativamente operado de forma descontínua, descontínua alimentada e contínua.
- 30
11. **BIOPROCESSO DE CONVERSÃO DE DIÓXIDO DE CARBONO**, caracterizado pelo fato de compreender uma reação que

ocorre em duas fases (escura e clara), por meio das etapas de:

(a) seleção e adaptação das microalgas, as condições físico, químicas e biológicas do sistema para gerar uma cepa mutante;

(b) inserção no reator (1) da cepa mutante, juntamente com o meio de cultura líquido;

(c) propagação da cepa mutante através da manipulação das condições operacionais de temperatura, pH, agitação e concentração de CO₂ do reator (1) acoplado a uma plataforma de iluminação (3).

12. **BIOPROCESSO**, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que os efluentes gasosos compreendem, alternativamente, os gases do efeito estufa e as demais substâncias geradas pelas emissões industriais.

13. **BIOPROCESSO**, de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de compreender ou não uma etapa de remoção de poluentes da emissão gasosa, exceto o CO₂, por meio de sistemas de separação físico-química.

14. **BIOPROCESSO**, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato dos procedimentos de adaptação das microalgas às condições operacionais compreenderem a exposição das células a concentrações crescentes dos gases gerados pela emissão industrial, a temperaturas entre 10 a 40°C, pH entre 3 a 10 e luminosidade entre 0 a 100 klux.

15. **BIOPROCESSO**, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de compreender uma concentração inicial do inoculo de 0,1 a 0,3 g/L na etapa de inserção da cepa mutante no reator.

16. **BIOPROCESSO**, de acordo com a reivindicação 11,

- 5 caracterizado pelo fato da etapa de propagação da cepa mutante ocorrer em temperaturas entre 10 a 40°C, em pH inicial do meio ajustado entre 7,0 a 8,0, com aeração por ar comprimido de 0,5 a 1,5 VVM e enriquecimento do ar com proporções entre 1 a 25% de dióxido de carbono, preferencialmente 15%.
- 10 17. **BIOPROCESSO**, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato da etapa de propagação da cepa mutante ocorrer com aplicação de intensidades luminosas naturais e/ou artificiais de 10 a 100 klux.
- 15 18. **BIOPROCESSO**, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato das microalgas compreenderem os gêneros *Aphanothece*, *Synechocystis*, *Nostoc*, *Phormidium*, *Chlorella* e *Phaeodactylum*.
- 20 19. **BIOPRODUTOS**, gerados através do bioprocesso descrito nas reivindicações 11-18, caracterizado pelo fato de compreender produtos de biorrefinaria microalgal, tais como biomassa integral, proteínas, lipídeos, minerais, carboidratos, sais inorgânicos, carbonatos, bicarbonatos, exopolímeros, proteínas exocelulares, aminoácidos, ácidos nucleicos, óleos unicelulares, ácidos graxos, exopolissacarídeos, pigmentos naturais, compostos orgânicos voláteis e semivoláteis, hidrocarbonetos, aldeídos, cetonas e álcoois.
- 25 20. **USO DOS BIOPRODUTOS**, gerados através do bioprocesso descrito nas reivindicações 11-18, caracterizado com insumos industriais, em particular em fábricas de rações de animais, usinas de biocombustíveis, alimentação humana e/ou animal, extração de químicos a granel, químicos finos e combustíveis e indústrias de
- 30 base química em geral.

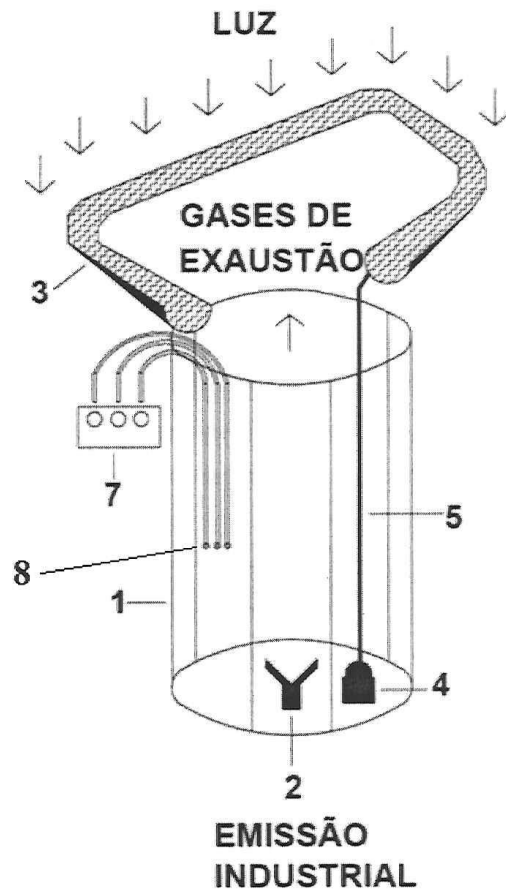


FIGURA 1

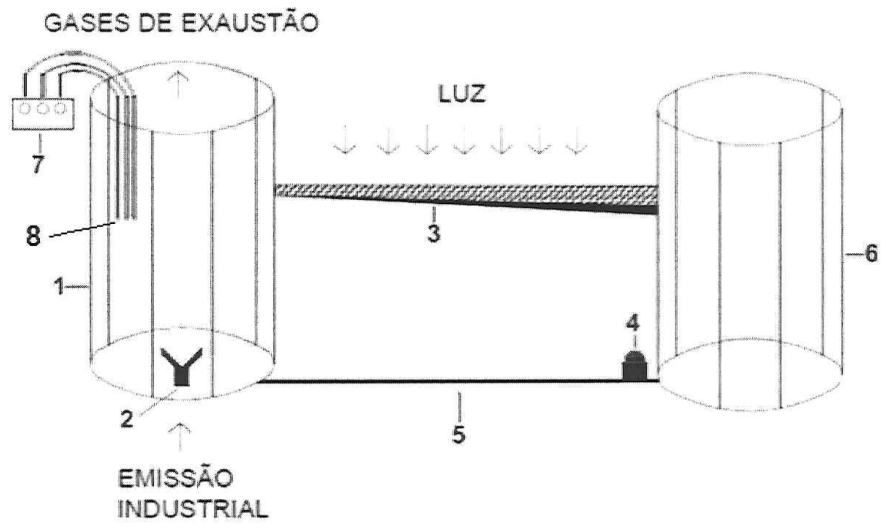


FIGURA 2

RESUMO**BIOPROCESSO DE CONVERSÃO DE DIÓXIDO DE CARBONO DE EMISSÕES INDUSTRIAIS, BIOPRODUTOS, SEUS USOS E FOTOBIOREATOR HÍBRIDO**

5 A presente invenção encontra seu campo de aplicação dentre os fotobiorreatores para a conversão fotossintética de dióxido de carbono gerado por diversas fontes de emissões industriais em bioprodutos do metabolismo microalgal.

10 O referido fotobiorreator híbrido visa maximizar o volume de trabalho e a taxa fotossintética do sistema. É descrito ainda um bioprocessamento de conversão fotossintética de gases de efeito estufa gerados por emissões industriais. Adicionalmente, esta invenção trata de bioprodutos obtidos
15 através do bioprocessamento de conversão e sua utilização como insumos industriais.