

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE FÍSICA

GABRIELA CUNHA POSSA

**DESENVOLVIMENTO DE FOTOBIORREATOR
AUTOMATIZADO E DINÂMICA DE
CRESCIMENTO DE MICROALGAS**

Brasília
2017

GABRIELA CUNHA POSSA

**DESENVOLVIMENTO DE FOTOBIORREATOR
AUTOMATIZADO E DINÂMICA DE
CRESCIMENTO DE MICROALGAS**

Tese submetida ao Instituto de Física da Universidade de Brasília como parte dos requisitos para obtenção do grau de Doutora em Física.

Orientador: Luiz Roncaratti

Brasília

2017

Desenvolvimento de Fotobiorreator Automatizado e Dinâmica de Crescimento de Microalgas

Por

Gabriela Cunha Possa

Tese submetida ao Instituto de Física da Universidade de Brasília como parte dos requisitos para obtenção do grau de Doutora em Física.

Aprovada por:

Prof. Luiz Fernando Roncaratti Júnior
IF/UnB

Prof. José Leonardo Ferreira
IF/UnB

Prof. Geraldo Magela e Silva
IF/UnB

Prof. Jonathan Fernando Teixeira
IFB

Prof. Geraldo Magela e Silva
Coordenador de Pós-Graduação
Instituto de Física
Universidade de Brasília

Agradecimentos

Este trabalho é fruto do apoio de várias pessoas que acompanharam e colaboraram para o seu desenvolvimento.

Em primeiro lugar, agradeço imensamente ao meu orientador e amigo por todas as horas de reflexões, pela paciência, pelo companheirismo e por me contagiar com um pouquinho da sua paixão única pela ciência.

Ao Wiliam, meu grande e querido amigo, agradeço por ter me apresentado este projeto desafiador e intrigante.

Agradeço ao Edilson e ao Alexandre por, através do trabalho na oficina mecânica, tornarem possível a execução deste trabalho.

À Embrapa Agroenergia e ao Bruno Brasil, agradeço pelo trabalho de identificação das microalgas.

Aos colegas, amigos e parceiros Gargano, Magela, Pedro, Demétrio e Aquilanti, agradeço cada uma das muitas discussões estimulantes que tivemos ao longo dos últimos tempos.

Aos alunos de iniciação científica Tiago, Rodrigo, Israel, Lucas e Pedro, agradeço por trazerem energia e jovialidade ao laboratório.

Agradeço a motivação e compreensão que recebi dos colegas da FGA durante a minha dedicação ao doutorado.

Ao Rodrigo, agradeço por acreditar em mim e por me aturar durante os momentos de estresse em que nem eu gostaria de estar perto de mim.

Agradeço também à FAP-DF e ao CNPq pelos apoios financeiros que viabilizaram a realização deste trabalho.

Para finalizar, agradeço àqueles que sempre me ofereceram amor incondicional e torceram pelo meu sucesso: À minha mãe, ao meu pai, à tia Socorro, à Mirian, às minhas avós, à minha madrinha e a todos os meus demais familiares. O carinho de cada uma dessas pessoas foi, e continua sendo, fundamental em cada uma das minhas conquistas.

Resumo

Este trabalho consiste no desenvolvimento e uso de um fotobiorreator automatizado para o estudo da dinâmica de crescimento de microalgas. Com ele, os parâmetros físicos e químicos que condicionam o desenvolvimento da cultura podem ser controlados de forma precisa e autônoma a partir de um programa de controle. Como exemplo do uso do dispositivo e das metodologias desenvolvidas, foi feito um estudo detalhado da dinâmica de crescimento da microalga *Nannochloropsis oceanica* em função da temperatura e do padrão de iluminação. Neste estudo foram feitas medidas relacionadas à taxa de crescimento, a mudanças no espectro de absorção da cultura e de sua interação com gases de interesse.

Abstract

This work is based on the development and use of an automated photobioreactor for the study of microalgae growth dynamics. With it, the physical and chemical parameters that condition the development of the culture can be controlled in a precise and autonomous way based on a control software. As an example of the use of the device and the methodologies that were developed, a detailed study of the growth dynamics of the microalgae *Nannochloropsis oceanica* was carried out as a function of temperature and lighting pattern. In this study, measurements concerning the growth rate, changes in the absorption spectrum of the culture and its interaction with gases of interest were made.

Sumário

1	Introdução	21
2	Contextualização	25
2.1	Fotossíntese	25
2.2	Microalgas	27
2.3	Fotobiorreatores	29
2.4	Estado da arte	30
3	Metodologia	31
3.1	Dinâmica da cultura	31
3.2	Identificação da cepa de microalgas utilizada	34
3.3	Manutenção da cultura	36
3.4	Fotobiorreator automatizado: Hardware	37
3.4.1	Módulo de circulação do ar	39
3.4.2	Módulo de controle da temperatura	40
3.4.3	Módulo de densidade óptica	41
3.4.4	Módulo de iluminação	43
3.4.5	Sensores	44
3.4.6	Módulo de controle de CO ₂	44
3.4.7	Módulo de diluição	45
3.4.8	Sistema de alimentação	45
3.4.9	Sistema de integração	45
3.4.10	Espectrofotômetro	46
3.5	Fotobiorreator automatizado: Software	46

4	Resultados	51
4.1	Estudos preliminares	51
4.1.1	Densidade óptica	52
4.1.2	Meio de Cultura	53
4.2	Dinâmica de crescimento	54
4.2.1	Temperatura ótima	55
4.2.2	Iluminação	56
4.2.3	Efeitos conjuntos da temperatura e da luz	80
4.3	Variações no espectro de absorção	82
5	Discussões e Perspectivas Futuras	87
	Referências Bibliográficas	91
A	Artigo 1	101
B	Artigo 2	107

Lista de Figuras

- 2.1 Interações entre dinâmica de fluidos, reações bioquímicas e interações com a luz determinam a dinâmica de crescimento da cultura num FBR 30
- 3.1 Fases de crescimento de uma cultura de microalgas. A taxa de crescimento μ durante a fase exponencial é influenciada por diversos parâmetros externos. 32
- 3.2 Principais variáveis envolvidas no funcionamento de FBRs. 33
- 3.3 *Nannochloropsis oceanica*: Microalgas unicelulares esféricas com poucos microns de diâmetro e sem características morfológicas particulares. 35
- 3.4 Fotobiorreatores básicos utilizados na manutenção da cultura. Os potes cilíndricos contêm microalgas antes (direita) e depois (esquerda) da limpeza e diluição periódica e a diferença de coloração entre eles é devida ao crescimento semanal da cultura. É possível visualizar também o meio de cultura (no Erlenmeyer), o compressor e filtro usados na circulação de ar, a bomba peristáltica utilizada na diluição e o timer que determina os períodos de claro e escuro. 36
- 3.5 Primeiro fotobiorreator: corpo em acrílico com capacidade para um litro de microalgas. 37
- 3.6 Segundo fotobiorreator: corpo em Teflon e capacidade para uma cultura de meio litro. 38
- 3.7 Foto do aparato experimental completo. Na prateleira no alto estão as bombas peristálticas de diluição, de circulação de ar e ao lado o reservatório de ar. Em baixo, na bancada, estão o FBR à esquerda, a fonte luminosa para medição dos espectros de absorção e o espectrofotômetro e o espectrômetro de massa, à direita (atrás dos monitores). 39

3.8	Módulo para controle da temperatura. Um trocador de calor é colocado em contato com o vidro que contém as algas e resfriado por células Peltiers. Na imagem, pode-se ver também a saída e entrada de água utilizadas para a manutenção de uma temperatura constante nas faces das células Peltiers opostas à cultura de microalgas.	40
3.9	Módulo de densidade óptica construído para o monitoramento da densidade da cultura. À esquerda vê-se o termômetro, LEDs, sensores ópticos e a peça em alumínio que fornece rigidez ao conjunto. À direita se encontra o módulo finalizado, com os circuitos e a sílica para controle de umidade posicionados no interior das cuvetas de quartzo.	41
3.10	Calibração do módulo de densidade óptica do fotobiorreator. Os valores de I_0 (intensidade luminosa que atravessa o meio de cultura) e I_{ref} (intensidade lida pelo sensor posicionado próximo ao LED) foram obtidos pelos sensores para diversas intensidades do LED enquanto o fotobiorreator estava preenchido apenas com meio de cultura. a) Curvas $I_0 = f(I_{ref})$ obtidas para diferentes temperaturas. b) Coeficientes angulares das retas obtidas em (a) em função da temperatura do sistema.	42
3.11	Funcionamento das torres de iluminação utilizadas para iluminar as algas com os diversos LEDs disponíveis.	43
3.12	Espectro de emissão dos diferentes LEDs utilizados nas torres de iluminação do fotobiorreator automatizado. A intensidade de cada um dos conjuntos de LEDs disponíveis pode ser modulada individualmente.	44
4.1	Curva de calibração utilizada para a obtenção da densidade da cultura. Foram realizadas sucessivas contagens de células de <i>Nannochloropsis</i> em câmara de Neubauer.	52
4.2	Concentração de oxigênio dissolvido encontrada no meio de cultura puro em diferentes temperaturas. O ajuste obtido corresponde a um decaimento exponencial.	53
4.3	Valores de equilíbrio do pH do meio de cultura (na ausência de algas) em função da temperatura para diferentes concentrações de CO_2	54

LISTA DE FIGURAS

- 4.4 Variações de temperatura impostas à cultura em experimento para detecção da influência da temperatura na taxa de crescimento das microalgas. 55
- 4.5 Taxa média de crescimento da cultura obtida para as diferentes temperaturas estudadas. 56
- 4.6 Padrão de iluminação durante o regime 12/12. As linhas laranjas mostram os períodos claros e as pretas os períodos escuros. 57
- 4.7 Dados experimentais (cinza) e ajustes dos valores de equilíbrio (laranja/preto) referentes ao pH da cultura no ciclo 12/12 (claro/escuro). A fotossíntese nos períodos claros (laranja) faz com que o CO₂ presente no meio seja consumido, elevando assim o pH do sistema. Nos períodos escuros (preto), o CO₂ fornecido pelo ar e liberado pela respiração das microalgas não é mais consumido, acidificando portanto o meio e reduzindo o pH da cultura. 58
- 4.8 Dados experimentais (em cinza) e ajustes (laranja/preto) referentes à concentração de oxigênio dissolvido (OD) na cultura submetida ao ciclo 12/12 (claro/escuro). Parte do oxigênio produzido pela fotossíntese nos períodos claros permanece dissolvida no meio líquido. 59
- 4.9 A mudança no equilíbrio químico do meio causada pela modulação 12/12 da luz pode ser vista claramente no espaço OD×pH. Durante o dia (laranja) a ocorrência da fotossíntese eleva a concentração de O₂ e diminui a concentração de CO₂ (observada pelo aumento no pH) na cultura. Durante os períodos noturnos (preto) a respiração das algas consome o oxigênio dissolvido no meio líquido e libera CO₂ (detectado pela diminuição do pH). 60
- 4.10 Dados experimentais (cinza) e ajustes (laranja/preto) referentes à contagem cumulativa do tempo de acionamento do sistema de diluição ao longo de experimento em regime 12/12 (claro/escuro). O acionamento da diluição, sempre que a densidade de células supera o valor preestabelecido ($1,5 \times 10^7$ células/mL), permite que a densidade da cultura seja mantida constante ao longo do tempo. 61

- 4.11 Taxas de crescimento das algas quando submetidas ao regime 12/12 (claro/escuro) obtidas a partir das derivadas de cada período representado na Figura 4.10. Note a ausência de crescimento durante os períodos escuros (preto) em contraste com o crescimento com taxas bem definidas (laranja) durante os períodos claros. 62
- 4.12 Dados experimentais (cinza) e ajustes (laranja/preto) referentes ao acionamento da válvula de adição de CO₂ ao longo do experimento 12/12 (claro/escuro). Para manter a concentração de CO₂ no ar que circular pela cultura constante em 1500 ppm é necessário que este seja adicionado ao sistema durante os períodos claros (laranja) uma vez que esse gás é fixado pelas microalgas e removido do sistema pela diluição. 63
- 4.13 Taxa de consumo de CO₂ pela cultura durante o experimento 12/12 de claro/escuro. É possível notar que existe consumo de CO₂ apenas nos períodos claros (laranja). 63
- 4.14 Relação entre a taxa de consumo de CO₂ e a taxa de crescimento da cultura durante os períodos claros (laranja) e escuros (preto) no regime 12/12 de claro/escuro. Conforme esperado, durante os períodos claros a ocorrência da fotossíntese implica na divisão das microalgas e na captura das moléculas de CO₂, enquanto nos períodos escuros a densidade da cultura permanece constante e não há consumo de CO₂. 64
- 4.15 Quadro resumo com os principais parâmetros observados durante o regime 12/12 de claro/escuro. a) Potência dos LEDs de iluminação da cultura. b) pH da cultura. c) Concentração de oxigênio dissolvido na cultura. d) Crescimento específico das células. e) Taxa de consumo de CO₂. 65
- 4.16 Padrão de iluminação imposto à cultura durante o modo *step*. 66
- 4.17 Dados experimentais (cinza) e ajustes dos valores de equilíbrio do pH da cultura quando submetida ao modo *step*. A realização da fotossíntese pelas microalgas se intensifica à medida que ocorre o aumento da luz incidente sobre a cultura. Os períodos mais claros (laranja) correspondem aos valores máximos de pH. Durante os períodos escuros (preto) o pH da cultura é mínimo. 67

LISTA DE FIGURAS

- 4.18 Dados experimentais (cinza) e ajustes da concentração de oxigênio dissolvido na cultura submetida ao modo *step*. Quanto maior a intensidade da luz incidente sobre a cultura, maior a concentração de O₂ dissolvido no meio líquido. 67
- 4.19 Correlação entre o pH e a concentração de oxigênio dissolvido na cultura durante o modo *step*. O equilíbrio químico do meio é definido pela potência dos LEDs. 68
- 4.20 Dados experimentais (cinza) e ajustes (tons de laranja) referentes à contagem cumulativa do tempo de acionamento do sistema de diluição ao longo do experimento no modo *step*. O acionamento da diluição sempre que a densidade de células supera o valor preestabelecido ($1,5 \times 10^7$ células/mL) permite que a densidade da cultura seja mantida constante ao longo do tempo. A taxa de acionamento é proporcional a potência dos LEDs. 69
- 4.21 Taxa de crescimento da cultura quando submetida ao modo de iluminação *step*. Para cada potência de iluminação, as taxas de crescimento foram obtidas a partir da inclinação da reta que melhor se ajusta à contagem de diluição durante o respectivo intervalo de tempo. Nota-se que a taxa de crescimento máxima ocorre quando a luz incidente sobre a cultura é mais intensa (laranja) e nula nos períodos escuros (preto). 70
- 4.22 Dados experimentais (cinza) e ajustes (tons de laranja) referentes ao acionamento da válvula de adição de CO₂ ao sistema ao longo de experimento no modo *step*. Vê-se que a frequência de acionamento da válvula é proporcional a potência dos LEDs. 70
- 4.23 Consumo de CO₂ pela cultura durante o experimento em modo *step*. Percebe-se que a taxa de consumo é máxima durante os períodos mais claros (laranja) e nula durante os períodos escuros (preto). 71

4.24	Correlação entre o consumo de CO ₂ e a taxa de crescimento da cultura durante experimento em modo <i>step</i> do fotobiorreator. Conforme esperado, nos períodos mais luminosos a ocorrência da fotossíntese implica na divisão mais frequente das células e na captura das moléculas de CO ₂ presentes na cultura com taxas mais elevadas. Nos períodos sem iluminação a densidade da cultura permanece constante e não há consumo de CO ₂	71
4.25	Quadro resumo com os principais parâmetros observados durante o modo <i>step</i> de funcionamento do fotobiorreator. a) Potência dos LEDs de iluminação da cultura. b) pH da cultura. c) Concentração de oxigênio dissolvido na cultura. d) Crescimento específico das células. e) Taxa de consumo de CO ₂	72
4.26	Padrão da iluminação à qual a cultura foi submetida durante o modo senoidal do fotobiorreator. Foram utilizados LEDs cujas intensidades variaram suavemente com um período de 24 horas.	73
4.27	Dados experimentais (cinza) e ajuste (tons de laranja) referentes ao pH da cultura submetida ao modo de iluminação senoidal.	74
4.28	Dados experimentais (cinza) e ajuste (tons de laranja) da concentração de oxigênio dissolvido na cultura submetida ao modo de iluminação senoidal.	74
4.29	Correlação entre o pH e a concentração de oxigênio dissolvido na cultura submetida ao modo de iluminação senoidal. Pode-se ver neste caso que o equilíbrio químico do meio varia continuamente entre os extremos.	75
4.30	Dados experimentais (cinza) e ajuste (tons de laranja) referentes à contagem cumulativa do tempo de acionamento do sistema de diluição ao longo do experimento modo de iluminação senoidal. O acionamento da diluição sempre que a densidade de células supera o valor preestabelecido ($1,5 \times 10^7$ células/mL) permite que a densidade da cultura seja mantida constante indefinidamente. A taxa de acionamento é proporcional à potência dos LEDs	76
4.31	Taxa de crescimento da cultura quando submetida ao modo de iluminação senoidal, obtida a partir da derivada da curva mostrada na Fig. 4.30.	76

LISTA DE FIGURAS

- 4.32 Dados experimentais (cinza) e ajustes (tons de laranja) referentes ao acionamento da válvula de adição de CO₂ ao sistema ao longo de experimento no modo de iluminação senoidal. 77
- 4.33 Consumo de CO₂ da cultura obtido a partir dos ajustes referentes ao acionamento da válvula de injeção de CO₂ (Fig. 4.32) durante o experimento no modo de iluminação senoidal. 77
- 4.34 Correlação entre o consumo de CO₂ e a taxa de crescimento da cultura no modo de iluminação senoidal. 78
- 4.35 Quadro resumo com os principais parâmetros observados durante o modo de iluminação senoidal. a) Potência dos LEDs de iluminação da cultura. b) pH da cultura. c) Concentração de oxigênio dissolvido na cultura. d) Crescimento específico das células. e) Taxa de consumo de CO₂. 79
- 4.36 a) Padrão de iluminação imposto às algas a cada dia. b) Taxas de crescimento obtidas durante os primeiros dias do experimento, enquanto a cultura era resfriada. c) Taxas de crescimento obtidas durante os dias em que a temperatura da cultura foi elevada. 81
- 4.37 Taxa de crescimento da cultura em função da potência luminosa em diferentes temperaturas estudadas. Percebe-se, em cada curva, que o comportamento das microalgas foi diferente durante os períodos de “amanhecer” e “anoitecer” do dia. 81
- 4.38 Espectro de absorção médio obtido para algas *Nannochloropsis* ao longo dos três últimos dias submetidas ao regime claro/escuro de 12 horas. Além do espectro total de absorção, estão representadas também as contribuições específicas de cada componente. 83
- 4.39 a) Exemplo de espectro de absorção obtido com a Eq. 3.4 e sua respectiva representação analítica (Eq. 4.1). A exemplo do espectro ilustrado, para os demais também foram encontradas boas representações analíticas, com forte concordância entre ajustes e dados experimentais. b) Sobreposição de todos os espectros obtidos ao longo das 72 horas finais do experimento (em preto). É possível observar que a única região com alterações significativas se encontra no pico de absorção dos carotenoides (em laranja). 84

4.40 Padrões circadianos associados ao ciclo 12/12 de claro/escuro. a) Valores do pH e da concentração de oxigênio dissolvido na cultura. b) Densidade das algas mantida constante por acionamentos do módulo de diluição do fotobiorreator. c) Comportamento circadiano da atividade óptica dos carotenoides. 85

Capítulo 1

Introdução

Nas últimas décadas houve um notável desenvolvimento da biotecnologia aplicada. Neste contexto, a sutil transição entre fenômenos físicos, químicos e biológicos é de fundamental importância. Técnicas experimentais capazes de medir fenômenos nessas dimensões são desafios tecnológicos especialmente importantes para realizações científicas e tecnológicas cada vez mais promissoras.

Existem diversos exemplos de fenômenos importantes nessa zona de transição entre áreas do conhecimento e, entre eles, a fotossíntese se destaca [1–4]. A sua importância para a vida na Terra é enorme. A fotossíntese é o principal processo de transformação de energia na biosfera e a principal fonte do oxigênio molecular atmosférico [5] utilizado na respiração. Sem ela, os animais e demais seres heterotróficos seriam incapazes de existir, visto que na base da maioria das cadeias alimentares conhecidas se encontram organismos fotossintetizantes. Não é exagero dizer que estes organismos “comem” o Sol para, posteriormente, serem comidos por outros.

Entre os vários organismos fotossintetizantes conhecidos, as microalgas tem recebido enorme atenção tanto da comunidade acadêmica como da indústria, devido ao seu papel fundamental na ecologia terrestre e aos possíveis impactos econômicos dos produtos delas derivados [6–10]. Há milhares de anos, esses organismos são parte fundamental de diversas cadeias alimentares e atuam como protagonistas na regulação da composição molecular da atmosfera terrestre. Elas contribuem com aproximadamente 50% do oxigênio da atmosfera do planeta, além de serem as fontes originais do carbono fóssil encontrado no petróleo e no gás natural. Isso tudo se deve ao fato das algas serem os produtores primários

nos oceanos, rios e lagos, que cobrem 70% da superfície terrestre. Nos últimos anos ficou claro o potencial desses organismos na produção de biocombustíveis, alimentos, compostos químicos especiais e no tratamento de efluentes.

Estima-se a existência de mais de 70 mil espécies de microalgas distribuídas entre os diversos ambientes aquáticos do planeta. Dessas, mais de 30 mil já foram descritas [11, 12] e as espécies do gênero *Nannochloropsis* têm recebido particular atenção [13–21]. Elas são pequenas esferas de aproximadamente 5 μm de diâmetro sem qualquer característica morfológica particular, sendo distinguíveis através de sequenciamento genético [22–24]. Têm como características a ausência das clorofilas B e C, a presença de grandes concentrações de pigmentos auxiliares (carotenoides) como a astaxantina, a zeaxantina e a cantaxantina, e são capazes de acumular grandes quantidades de ácidos graxos poli-insaturados [11, 12, 25–31]. Atualmente essas microalgas são utilizadas na alimentação enriquecida para larvas de peixes e rotíferos, e na produção de biocombustíveis.

O Brasil possui uma longa costa (10.959 km no total), aproximadamente 12% das reservas de água doce de todo o mundo, recebe uma incidência solar média de 8-12 MJ/m²/dia, possui também uma flora riquíssima e 3.496 espécies catalogadas de algas [32]. Atualmente, o país conta com mais de 40 laboratórios e instituições onde culturas de algas (microalgas, macroalgas e cianobactérias) são mantidas. Entre essas localidades, cinco contam com bancos superiores a 150 cepas [33, 34]. Empresas brasileiras com a Petrobras e a Embrapa vêm conduzindo iniciativas paralelas com o objetivo de caracterizar e domesticar algas nativas produtivas. Enquanto o foco principal da Petrobras é voltado para microalgas marinhas para a produção de biodiesel, a Embrapa direciona suas pesquisas à caracterização de recursos genéticos provenientes de microalgas continentais e ao estabelecimento, a longo prazo, de um programa de produção de biocombustíveis e bioprodutos [35]. Além disso, estudos focados em cepas nativas relatam o isolamento de cepas de *Chlorella* com uma produção de lipídios de até 200 mg/L/dia, o que se compara às espécies mais promissoras já isoladas em outras partes do mundo, como a *Nannochloropsis gadinata* e a *Nannochloropsis salina* [14, 36].

Nesse contexto, o desenvolvimento de instrumentos e técnicas voltados para o estudo de microalgas são passos importantes na direção da realização de diversas maravilhas biotecnológicas associadas à fotossíntese. Fotobiorreatores (FBRs) são dispositivos utilizados

para o cultivo controlado de microalgas, o que permite o estudo preciso da dinâmica de crescimento da cultura. Dependendo dos objetivos a serem alcançados, eles podem ter diferentes formas, utilizar diferentes tipos de materiais e possuir diferentes graus de complexidade. Além do uso em pesquisa e desenvolvimento, fotobiorreatores podem ser utilizados como sistemas autônomos para o cultivo de microalgas em condições configuráveis.

Este trabalho consiste no desenvolvimento de um fotobiorreator automatizado, planejado e construído inteiramente no âmbito desta tese no Instituto de Física da Universidade de Brasília. Tal dispositivo possibilita o controle preciso e automatizado de diversos parâmetros físicos e químicos que condicionam o desenvolvimento de uma cultura de microalgas. Ele funciona a partir de sensores e atuadores que são correlacionados entre si via algoritmos de computador. Com ele, é possível investigar de forma precisa, sistemática e reprodutível diversos aspectos importantes da dinâmica de crescimento de uma cultura de microalgas, tais como a taxa de crescimento, mudanças no espectro de absorção da luz e interação da cultura com gases de interesse.

A linha de pesquisa descrita nesta tese é essencialmente experimental e os seus principais objetivos consistem em:

- Projetar e construir um fotobiorreator automatizado que seja altamente configurável, de simples manutenção e baixo custo;
- Desenvolver metodologias que permitam o estudo da dinâmica de crescimento de microalgas a partir do aparato experimental desenvolvido;
- Utilizar o fotobiorreator e as metodologias desenvolvidas no estudo da cultura de microalgas *Nannochloropsis oceanica*.

Esta tese está organizada de forma que o capítulo 2 contextualiza o objeto de estudo e aborda os principais aspectos teóricos levados em consideração ao longo desta pesquisa. São apresentadas discussões acerca da fotossíntese, de microalgas e de fotobiorreatores em maneira geral. No capítulo 3 é apresentada a metodologia experimental adotada, com a descrição das diversas partes que compõem o fotobiorreator desenvolvido, dos seus modos de funcionamento e do seu software de controle. No capítulo 4 são apresentados resultados referentes a efeitos da temperatura e da iluminação na dinâmica de crescimento de microalgas *Nannochloropsis* e observações de alterações no espectro de absorção das

células, o que sugere a ocorrência de modificações na estrutura interna das algas. Para finalizar, o capítulo 5 apresenta discussões acerca dos resultados alcançados e traz algumas perspectivas futuras que podem suceder este trabalho.

Capítulo 2

Contextualização

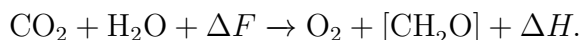
2.1 Fotossíntese

A fotossíntese é o principal processo de transformação de energia no planeta Terra e sua importância para a vida é enorme [1–4]. Organismos fotossintetizantes se encontram na base de praticamente todas as cadeias alimentares e, ao longo dos últimos 3 bilhões de anos, forneceram a maioria do oxigênio molecular encontrado na atmosfera [5]. Apesar do grande número de estudos realizados nos últimos cem anos, as pesquisas científicas envolvendo a fotossíntese continuam a todo vapor, uma vez que ainda existem aspectos do processo que carecem de esclarecimentos qualitativos e quantitativos. A quantidade de artigos publicados a respeito da fotossíntese a cada ano (milhares) faz com que a definição do atual estado da arte no assunto seja uma tarefa difícil. No entanto, alguns tópicos de ponta merecem ser citados, como o uso de espectroscopia óptica para estudar a estrutura e operação dos sistemas de antenas fotossintéticas [37], em particular, o uso de fluorescência como ferramenta não destrutiva de monitoramento de como ocorre a conversão de energia fotossintética [38] e o uso de técnicas radiométricas para medir a concentração de pigmentos *in vivo* [25,26,39]; o estudo dos processos não fotoquímicos de dissipação de energia [40]; a modelagem matemática e computacional [41]; a genômica funcional de sistemas fotossintéticos [42]; efeitos quânticos [43,43–47]; e processos artificiais de fotossíntese [48–51].

De maneira geral, mesmo com um bom entendimento qualitativo desse processo, suas análises quantitativas ainda são necessárias, em conjunto com sua dependência de

parâmetros físicos e químicos do ambiente, das singularidades de cada organismo fotossintetizante e de como ele pode evoluir e se adaptar a diferentes condições.

Durante a fotossíntese, os organismos que contêm clorofila convertem a energia eletromagnética em energia química. Na fotossíntese oxigênica [2], esse processo ocorre no interior de organelas celulares (cloroplastos) envolvendo os reagentes CO_2 , H_2O e energia luminosa, e resultando em O_2 e carboidratos (CH_2O). De maneira simplificada, tal processo pode ser escrito como [52]:



Os pigmentos fotossintetizantes, em especial a clorofila A, diversas enzimas e portadores de carga atuam nesse processo de forma catalítica. Neste processo, um arranjo estável dos átomos C, H e O (CO_2 e H_2O) é convertido em um arranjo menos estável dos mesmos elementos (CH_2O e O_2). A energia necessária para que isso ocorra é fornecida por n quantas de luz $h\nu$. A energia total armazenada ΔH corresponde a aproximadamente 110 kcal/mol (para cada mol de C, essa energia será armazenada nas ligações entre os grupos $[\text{CH}_2\text{O}]$ que formam o carboidrato), enquanto a energia livre $\Delta F = nh\nu$ vale aproximadamente 120 kcal/mol (pelo menos três fótons vermelhos com 680 nm). A diferença $\Delta F - \Delta H = -T\Delta S$ é igual a 10 kcal/mol, ou seja, $T\Delta S = -10$ kcal/mol. Isso significa que há uma diminuição na entropia do sistema, o que era de se esperar pois os átomos envolvidos se encontram mais organizados nos produtos do que nos reagentes. Porém, o mecanismo da fotossíntese envolve, na verdade, quatro quantas para obtenção de cada molécula de O_2 proveniente de duas de H_2O e outros quatro quantas para a redução do CO_2 . Desta forma, é necessário um mínimo de oito quantas para cada molécula de O_2 proveniente de CO_2 [52]. Ou seja, por mais que se tente explicar a fotossíntese de maneira simplificada no dia-a-dia, esse é um processo intrinsecamente complexo. Ele envolve fenômenos sequenciais intrincados de absorção, excitação e emissão de luz, em conjunto com transferências de energia que ocorrem em um complexo conjunto de membranas [2, 52]. A eficiência quântica (número de moléculas de O_2 produzidas para cada quanta de luz absorvido) da fotossíntese em plantas verdes, por exemplo, foi alvo de controvérsias durante muitos anos [53].

Desde o lançamento do livro de E. Schrödinger sobre a vida [54] e os primeiros trabalhos de I. Prigogine a respeito da termodinâmica de processos irreversíveis e estruturas

dissipativas [55], diversos autores buscaram desenvolver teorias físicas envolvendo o surgimento e a evolução de sistemas biológicos [56–73]. De forma geral, o ponto de partida de tais trabalhos são princípios termodinâmicos, ou alguma generalização de tais princípios justificada pela física estatística, que sejam capazes de explicar as configurações de matéria viva como sistemas adaptados a dissipar energia de fontes disponíveis, sugerindo um mecanismo de formação de estruturas que pode ser compreendido em termos termodinâmicos. De qualquer maneira, uma teoria geral que explique a matéria viva em termos físicos ainda parece distante de ser obtida e promete ser um grande avanço científico.

2.2 Microalgas

Dentre diversos organismos fotossintetizantes, as microalgas se destacam devido à sua sua grande variedade e simplicidade [6, 74]. Elas são organismos eucariontes que, assim como plantas, capturam CO_2 e liberam O_2 . A biodiversidade de microalgas é enorme e estima-se que existam entre 30 e 70 dezenas de milhares de espécies naturais [75, 76], de diversos tamanhos e formatos, distribuídas entre os mais diversos ambientes aquáticos do planeta [6, 74, 77]. Esta biodiversidade representa recursos valiosos para a humanidade [8, 78], que vêm sendo explorados ao longo das últimas décadas. Milhares de compostos vêm sendo extraídos da biomassa proveniente de culturas de microalgas. Dentre eles estão carotenoides, antioxidantes, ácidos graxos, toxinas, enzimas, polímeros, peptídeos e esteróis [10]. Além disso, microalgas podem ser convertidas em diferentes tipos de combustíveis, dependendo de técnicas e partes das células utilizadas. Biocombustíveis provenientes de microalgas representam uma alternativa promissora ao uso de combustíveis fósseis e outros biocombustíveis disponíveis [9, 19, 79–81]. Atualmente, diversas empresas e agências governamentais vêm se empenhando na busca pela redução de custos financeiros e operacionais para tornar a produção de combustíveis provenientes de algas comercialmente viável.

A produção de biomassa com microalgas possui diversas vantagens quando comparada à de outras matérias primas tais como uma grande produtividade (até cem vezes maior que a de cultivos terrestres); captura de carbono eficiente; alta concentração de lipídeos ou amido, o que pode ser utilizado para a produção de biodiesel ou etanol, respectivamente;

elas podem ser cultivadas em diferentes meios como água marinha, doce, salobra ou até mesmo em águas de efluentes. Outra vantagem das microalgas é que essas podem ser colhidas continuamente ao longo de qualquer estação do ano, o que as fazem adequadas para uma linha de produção contínua de biocombustíveis. Além disso, tanto o cultivo como o processamento de microalgas podem ser realizados no mesmo local, o que simplifica a logística e reduz custos de produção em biorrefinarias. Porém, ainda existem desafios tecnológicos significativos até que se produza biocombustíveis derivados de algas que sejam competitivos economicamente, tais como o desenvolvimento de cepas selecionadas e de métodos de cultivo adequados; a otimização das técnicas de colheita e extração de lipídios; e a otimização dos processos de produção dos combustíveis propriamente ditos.

A grande diversidade de tipos e condições de cultivo de microalgas as torna altamente atraentes para a utilização comercial, principalmente se a manipulação genética das cepas de interesse é possível [13, 14, 82–85]. Ao se comparar uma cultura de microalgas com sistemas de cultivos transgênicos plantados, as microalgas possuem a vantagem significativa de que uma amostra manipulada pode se multiplicar rapidamente, se transformando em um cultivo em larga escala em pouco tempo (semanas, em comparação com meses ou anos em vegetais superiores como milho ou tabaco). Uma vez que microalgas são organismos simples, existe uma menor chance da recombinação de proteínas resultar em variações genéticas indesejadas. Além disso, microalgas podem ser cultivadas em sistemas fechados, o que reduz consideravelmente o risco de contaminações da cultura por agentes contaminantes e protege o ambiente da liberação acidental de organismos geneticamente modificados.

Uma outra técnica importante para se melhorar a performance de uma dada cepa de microalgas é a evolução adaptativa de laboratório (EAL) [86–88]. Como ferramenta científica, a EAL é uma técnica importante para a análise de fenômenos evolutivos em condições controladas de laboratório. Durante a EAL de microalgas, o cultivo de uma cultura sob condições bem definidas por longos períodos permite a seleção dos indivíduos mais bem adaptados através de uma seleção natural. Em ambientes artificiais e controlados em laboratórios, o desempenho de uma dada cepa de microalgas pode ser melhorado e sua adaptação guiada a partir de estresse causado por condições adversas de temperatura, luz, pH, incidência de luz ultra violeta, escassez de nutrientes, etc.

2.3 Fotobiorreatores

Um aspecto fundamental de uma dada cepa de microalga é a sua dinâmica de crescimento. Em ambientes naturais (oceanos, rios, lagos e lagoas) a dinâmica de crescimento de uma dada microalga não pode ser medida de forma precisa, uma vez que os parâmetros físicos (luz e temperatura), químicos (moléculas e íons presentes no meio) e biológicos (vírus, bactérias, fungos, predadores) que condicionam o crescimento da cultura podem variar tanto no espaço quanto no tempo. Isso faz com que seja inviável individualizar os efeitos de cada um desses parâmetros na dinâmica de crescimento. É desejável, portanto, a utilização de ambientes artificiais (fotobiorreatores) nos quais os parâmetros de interesse podem ser controlados e suas influências na dinâmica de crescimento da cultura podem ser estudadas individualmente.

Fotobiorreatores são dispositivos utilizados para o cultivo controlado de microalgas. Ainda que vários modelos tenham sido descritos e muito tenha sido aprendido (veja por exemplo [89–91]), o design racional de fotobiorreatores ainda é uma ciência em desenvolvimento. Um fotobiorreator pode ser considerado um sistema com quatro “fases”. As microalgas são a fase sólida, o meio de cultura a fase líquida, moléculas (principalmente N_2 , O_2 e CO_2) a fase gasosa e, finalmente, a luz, que é um campo de radiação no espectro de 400 a 700 nm, que as microalgas são capazes de usar na fotossíntese.

De maneira geral, fotobiorreatores podem ser agrupados em dois grupos distintos de acordo com a sua finalidade. O primeiro é constituído por reatores grandes, cujo objetivo consiste em produzir, de modo eficiente, a maior quantidade possível de biomassa. Para que isso seja alcançado, esses reatores são projetados para manter culturas de microalgas sob condições ótimas durante longos períodos. Para se construir um reator como esses, é necessário o entendimento de como ocorrem as interações entre a cultura e os parâmetros ambientais de controle. Esse tipo de reator requer uma infraestrutura e logística específicas, isso faz com que a sua construção e operação sejam caras. O segundo grupo é constituído por reatores de bancada de laboratório. Eles são pequenos e destinados ao cultivo de uma cultura com volume reduzido, tendo como objetivo o estudo preciso da dinâmica de crescimento e sua resposta aos diferentes parâmetros que condicionam o desenvolvimento da cultura. Esses reatores podem ser utilizados também como dispositivos

onde ocorre EAL.

A Figura 2.1 mostra um esquema que representa a interação entre os diversos fenômenos relevantes em um FBR e que devem ser levados em consideração ao se projetar um fotobiorreator.

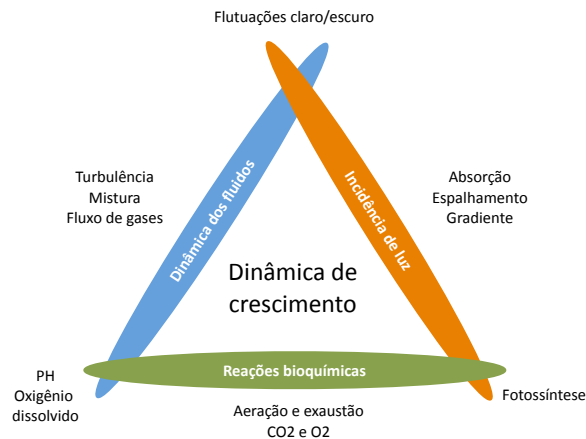


Figura 2.1: Interações entre dinâmica de fluidos, reações bioquímicas e interações com a luz determinam a dinâmica de crescimento da cultura num FBR

2.4 Estado da arte

No que se refere ao estudo das microalgas, o estado da arte consiste na arte de usar as microalgas como fábricas celulares, capazes de gerar produtos, ou seja, comida, medicamentos e combustíveis. Essa arte envolve a busca por cepas candidatas por todo o planeta, o uso de manipulações genéticas, evolução adaptativa em laboratório e fotobiorreatores. A ideia é usar fotobiorreatores de bancada na fenotipagem de cepas naturais e geneticamente modificadas. Esses reatores também podem ser programados para executar EAL de forma automatizada. Os resultados desses procedimentos podem então ser utilizados no design de fotobiorreatores maiores que funcionem como elementos chave de biorrefinarias.

Capítulo 3

Metodologia

As atividades experimentais que guiaram este trabalho podem ser divididas em quatro partes principais. A primeira consistiu na identificação das microalgas utilizadas. A segunda foi referente à manutenção de culturas estáveis de microalgas no laboratório durante todo o período deste trabalho. A terceira, por sua vez, envolveu a construção de um fotobiorreator automatizado e a quarta consistiu na elaboração do software de controle que permite a automatização dos estudos desejados. Este capítulo traz considerações a respeito da dinâmica de crescimento de uma cultura de microalgas e, em seguida, descreve cada uma das atividades experimentais realizadas.

3.1 Dinâmica da cultura

Ao contrário de plantas e animais, que crescem em tamanho e massa ao longo do tempo, o “crescimento” de organismos unicelulares, como microalgas, está associado à multiplicação dos indivíduos como resultado das divisões celulares. Vários fatores podem influenciar direta e indiretamente a taxa de divisão celular. Em geral, ao se inserir uma cultura de microalgas num meio, estas apresentam crescimento que pode ser descrito pelas diferentes etapas que estão ilustradas na figura 3.1 e sintetizadas a seguir.

- **Adaptação:** Durante esta etapa as algas se ajustam às condições do novo meio e não apresentam crescimento, podendo até sofrer um declínio de concentração. A duração da fase de adaptação depende, principalmente, das condições em que se encontrava a cultura previamente e das mudanças sofridas com a transferência para o novo meio.

Se o novo meio possui as mesmas condições de iluminação, temperatura, salinidade e pH, esta fase pode, inclusive, não existir.

- Crescimento exponencial: Esta etapa é atingida quando as células se dividem com uma taxa constante e corresponde ao crescimento máximo da cultura. A taxa de crescimento (μ) durante esta fase depende dos parâmetros do meio onde a cultura se encontra e do histórico ao qual ela foi submetida.
- Desaceleração do crescimento: É atingida quando algum fator passa a limitar o crescimento da cultura. Possíveis fatores limitantes são a escassez de nutrientes, limitação de CO_2 ou até mesmo de luz devido ao sombreamento gerado pelas próprias algas.
- Fase estacionária: É caracterizada por um equilíbrio entre a taxa de crescimento da cultura quando esta atinge uma concentração máxima e a taxa de degradação das microalgas.
- Morte: Representa um período em que a cultura se encontra em condições desfavoráveis e, portanto, a densidade de células vivas no meio cai continuamente.

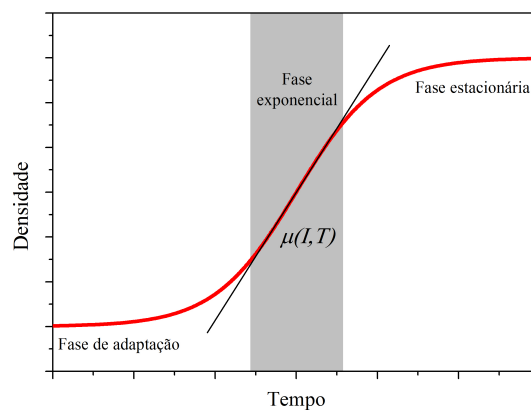


Figura 3.1: Fases de crescimento de uma cultura de microalgas. A taxa de crescimento μ durante a fase exponencial é influenciada por diversos parâmetros externos.

O foco desta pesquisa está na fase de crescimento exponencial. A figura 3.2 identifica as principais variáveis envolvidas no funcionamento de FBRs fechados e que devem ser

levadas em consideração para se desenvolver um modelo de crescimento satisfatório. Nessa figura, x representa a espessura do FBR, P , V , T e C representam a pressão, volume, temperatura e concentração de células na cultura respectivamente, F_{in} e F_{out} representam as vazões de entrada de meio de cultura e saída de algas devido a um possível sistema de diluição e I_{in} e I_{out} são as intensidades luminosas de entrada e saída.

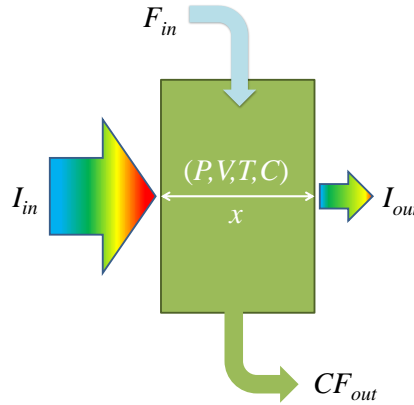


Figura 3.2: Principais variáveis envolvidas no funcionamento de FBRs.

O balanceamento de massa de algas no FBR requer que:

$$\left[\begin{array}{c} \text{variação} \\ \text{na massa} \\ \text{acumulada} \end{array} \right] = \left[\begin{array}{c} \text{fluxo de} \\ \text{entrada} \end{array} \right] - \left[\begin{array}{c} \text{fluxo de} \\ \text{saída} \end{array} \right] + \left[\begin{array}{c} \text{massa} \\ \text{produzida} \end{array} \right] - \left[\begin{array}{c} \text{massa} \\ \text{consumida} \end{array} \right]$$

Assim, a taxa de variação do número de algas na cultura será

$$V \frac{dC}{dt} + C \frac{dV}{dt} = F_{in} C_{in} - F_{out} C + \mu_c V C - \mu_m V C - \gamma V Z C \quad (3.1)$$

onde μ_c e μ_m representam as taxas de crescimento específico e morte da cultura respectivamente, Z representa a concentração de uma possível espécie predadora e γ representa a interação entre as espécies. É possível considerar também múltiplas espécies e interações de outros tipos como competição ou mutualismo. Fazendo $dV/dt = F_{in} - F_{out}$ segue que

$$\frac{dC}{dt} = (\mu_c - \mu_m - \delta) C + \delta C_{in} - \gamma Z C \quad (3.2)$$

onde $\delta = F_{in}/V$ é o fator de diluição utilizado no cultivo. Considerando uma cultura limpa de predadores, sem adição de algas novas e que a taxa de crescimento efetivo da cultura é dada por $\mu = \mu_c - \mu_m$ tem-se que

$$\frac{dC}{dt} = (\mu - \delta)C. \quad (3.3)$$

Em geral, vários fatores influenciam essa taxa de crescimento, dentre eles a temperatura, a incidência de luz, o pH, a concentração de nutrientes, a concentração dos gases de interação, etc. Existem diversos modelos que buscam descrever o comportamento da taxa de crescimento de culturas em termos dos parâmetros de interesse [92,93]. Porém, conforme verificado durante as atividades experimentais realizadas neste trabalho, esse comportamento é complexo e não depende apenas de valores momentâneos de cada parâmetro, e sim de seus históricos ao longo do desenvolvimento da cultura.

3.2 Identificação da cepa de microalgas utilizada

Ao longo deste trabalho, foram utilizadas microalgas do gênero *Nannochloropsis*, obtidas em águas costeiras brasileiras. A identificação de microalgas unicamente a partir de características morfológicas não é um método preciso para se distinguir espécies, principalmente em cepas com grande semelhança morfológica. Contudo, a identificação correta de cepas é crucial uma vez que diferentes espécies de microalgas possuem características de metabolismo significativamente distintas. Para se evitar uma identificação errônea, recorre-se ao uso de ferramentas moleculares que identificam regiões específicas do DNA. A identificação precisa das microalgas utilizadas neste trabalho foi feita pela Embrapa, a partir do isolamento total do DNA presente em 30 mg de biomassa fresca após o rompimento das membranas celulares com o detergente brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) para a liberação do DNA [94]. Em seguida, com uma reação em cadeia de polimerase (PCR) foi amplificada a região *rbcL* do DNA com a utilização dos iniciadores Fw_rbcL_192 (5' - GGT ACT TGG ACA ACW GTW TGG AC - 3') e Rv_rbcL_657 (5' - GAA ACG GTC TCK CCA RCG CAT - 3') [34]. Os produtos da PCR foram então sequenciados com um analisador genético 3130 (produzido pela *Applied Biosystems*) e as sequências direta e inversa obtidas foram alinhadas e editadas com auxílio do software Geneious 9.1.

A análise de similaridade da sequência de *rbcl* encontrada a partir do sistema BOLD (*The Barcode of Life Data System*) resultou numa concordância de 98,69% com a espécie *Nannochloropsis oceanica*, já depositada na base de dados BOLD sob o número de acesso HQ710610.

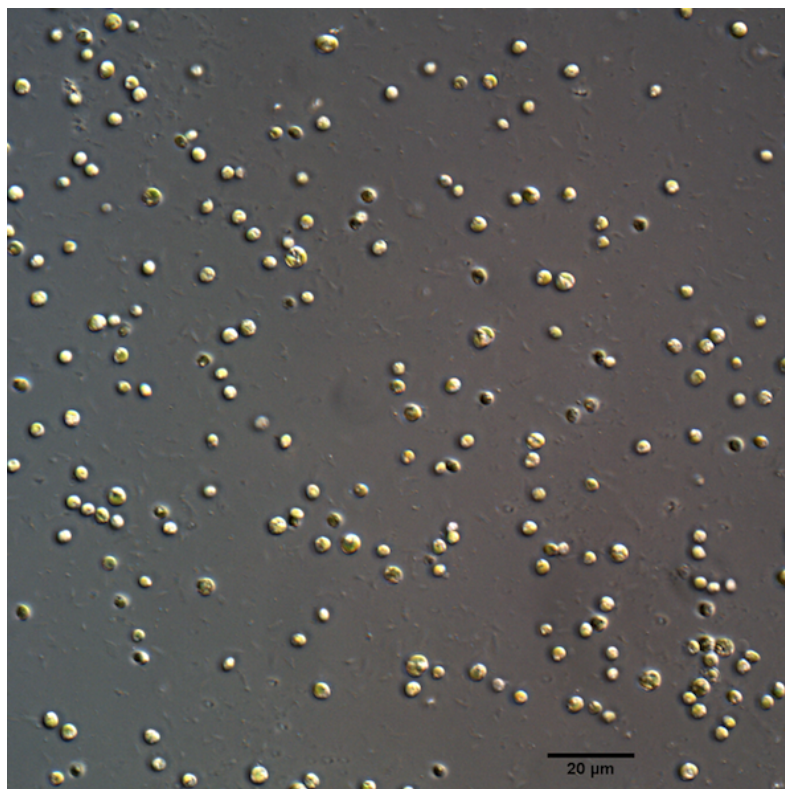


Figura 3.3: *Nannochloropsis oceanica*: Microalgas unicelulares esféricas com poucos microns de diâmetro e sem características morfológicas particulares.

A *Nannochloropsis oceanica* é uma das várias espécies do gênero *Nannochloropsis*. É uma microalga unicelular sem qualquer característica morfológica particular, como pode ser visto na Fig. 3.3. Esta espécie possui um genoma curto e ferramentas biológicas de desenvolvimento rápido por transformações, substituição de genes por recombinações homólogas e edição de DNA por CRISPR/Cas9 [24]. Sua grande produtividade e alto teor lipídico a tornam promissora como fonte de matéria prima para a produção de biocombustíveis e bioprodutos.

3.3 Manutenção da cultura

Para a manutenção das microalgas é utilizado o meio de cultura Guillard F/2 [95,96], diluído em água marinha sintética preparada a partir de água RO (osmose reversa). A cultura de *Nannochloropsis oceanica* é mantida em três fotobiorreatores básicos como os que são mostrados na Fig. 3.4. Eles recebem manutenção semanal, quando os recipientes são limpos e a cultura diluída. Para a circulação de ar são utilizados pequenos compressores de ar e filtros de membranas de teflon ($0.2 \mu m$). A iluminação é fornecida com lâmpadas fluorescentes brancas e um timer elétrico na régua de energia para a definição dos períodos claro/escuro. São mantidas uma cultura com 24 horas de luz, uma cultura com um regime de iluminação 12 horas de claro/12 horas de escuro e uma terceira com apenas 6 horas de luz a cada dia. Além disso, periodicamente são colhidas amostras das algas para serem armazenadas em um refrigerador para reinicialização da cultura caso necessário.

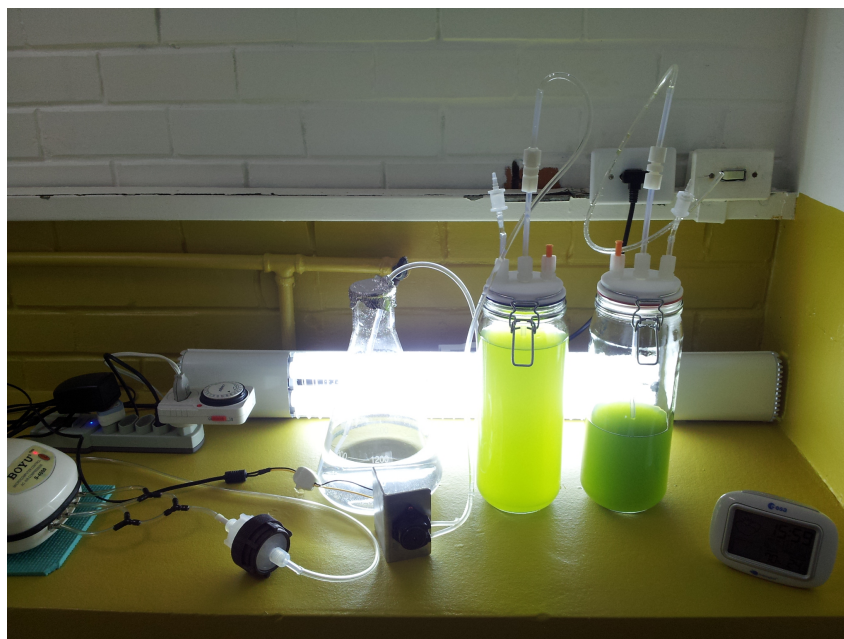


Figura 3.4: Fotobiorreatores básicos utilizados na manutenção da cultura. Os potes cilíndricos contêm microalgas antes (direita) e depois (esquerda) da limpeza e diluição periódica e a diferença de coloração entre eles é devida ao crescimento semanal da cultura. É possível visualizar também o meio de cultura (no Erlenmeyer), o compressor e filtro usados na circulação de ar, a bomba peristáltica utilizada na diluição e o timer que determina os períodos de claro e escuro.

3.4 Fotobiorreator automatizado: Hardware

Ao longo deste trabalho foram desenvolvidos e testados três protótipos de reatores. Esta seção descreve de forma resumida os primeiros modelos e de forma detalhada o terceiro, que se encontra atualmente em uso.

Primeiro protótipo

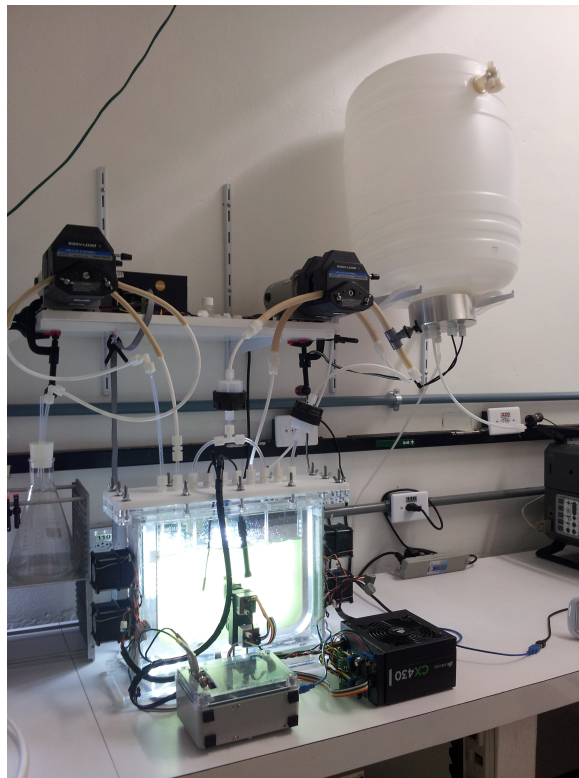


Figura 3.5: Primeiro fotobiorreator: corpo em acrílico com capacidade para um litro de microalgas.

O primeiro fotobiorreator desenvolvido foi construído com corpo em acrílico e capacidade para uma cultura de um litro. As microalgas permaneciam em um aquário com paredes paralelas imerso em um segundo aquário, onde havia um banho térmico para o controle de temperatura do sistema. Placas paralelas proporcionam um bom aproveitamento da luz incidente, porém a geometria adotada não se mostrou eficiente devido à inércia térmica do sistema (que gerava um tempo de resposta muito longo no controle de temperatura) e à dificuldade de limpeza e manutenção do aparato. A Fig. 3.5 ilustra o funcionamento deste protótipo.

Segundo protótipo

O segundo reator (visto na Fig. 3.6) foi construído em Teflon para culturas de meio litro de microalgas. O material escolhido proporciona superfícies fáceis de limpar e o reator como um todo era muito mais compacto e robusto do que o seu antecessor. Apesar de suas vantagens, este protótipo ainda possuía uma manutenção trabalhosa e era uma peça única, construída manualmente e sem unidades de reposição.

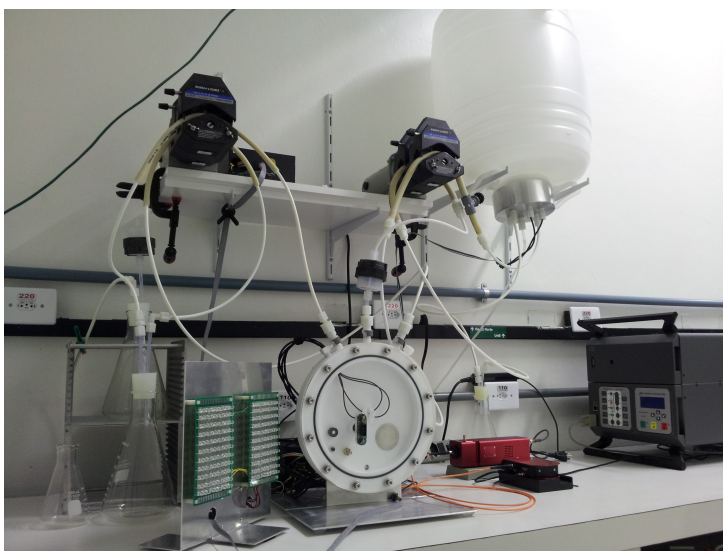


Figura 3.6: Segundo fotobiorreator: corpo em Teflon e capacidade para uma cultura de meio litro.

Terceiro protótipo

Durante a construção do terceiro protótipo foram eliminados diversos problemas observados nas versões anteriores como condensações que influenciavam a leitura de sensores ópticos e ruídos no circuito que causavam interferências em diversas leituras. Além disso, este reator foi construído a partir de um pote de vidro borossilicato disponível no mercado, o que fez com que a montagem do atual protótipo fosse muito mais simples que as anteriores e que unidades de reposição pudessem ser utilizadas. Seu corpo cilíndrico com capacidade para uma cultura de um litro pode ser visto na Fig. 3.7. Os detalhes de cada um dos módulos que compõem o reator são descritos a seguir.

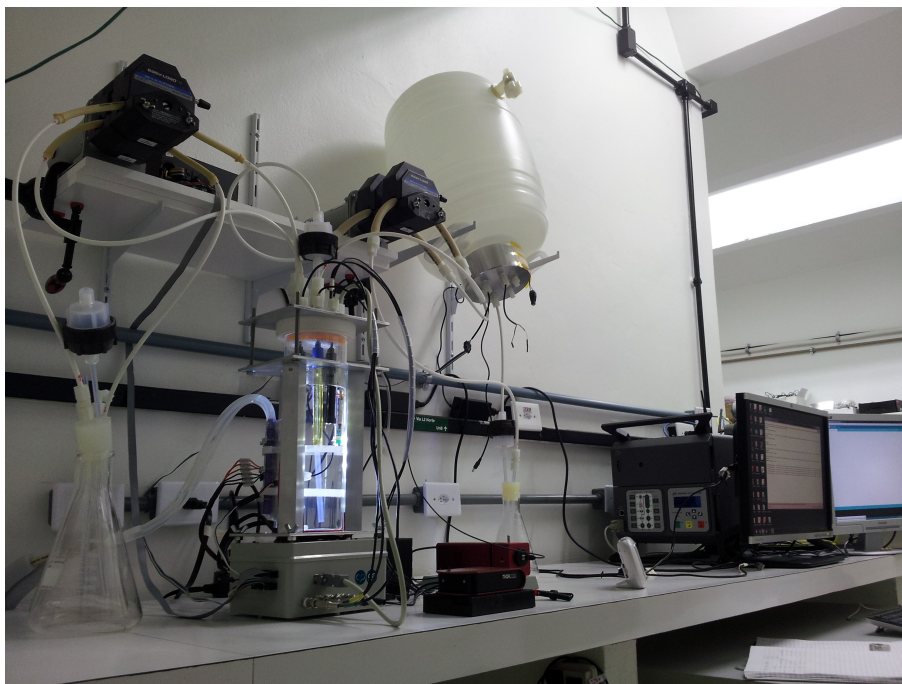


Figura 3.7: Foto do aparato experimental completo. Na prateleira no alto estão as bombas peristálticas de diluição, de circulação de ar e ao lado o reservatório de ar. Em baixo, na bancada, estão o FBR à esquerda, a fonte luminosa para medição dos espectros de absorção e o espectrofotômetro e o espectrômetro de massa, à direita (atrás dos monitores).

3.4.1 Módulo de circulação do ar

A circulação de ar pela cultura é feita com uma bomba peristáltica Masterflex L/S cujo fluxo pode ser controlado via modulação por pulso (PWM). Com ela o sistema pode permanecer aberto (usando o ar natural do ambiente) ou fechado (usando o ar de um reservatório de 50 litros). No último caso, o ar que sai do FBR volta para o reservatório. Além disso, é possível circular através da cultura ar sintético, preparado com diferentes concentrações de gases atmosféricos, ou com outros gases de interesse, e utilizar um Espectrômetro de Massa para estudar como a cultura interage com diferentes moléculas presentes no ar (captura/produção). Em particular é possível acompanhar a respiração e a fotossíntese, monitorando as concentrações de CO_2 e O_2 no reservatório em função dos diversos parâmetros que condicionam o crescimento da cultura.

3.4.2 Módulo de controle da temperatura

Este módulo se baseia em um módulo termoelétrico (3 células Peltier 76W, HT8 da Laird Technologies, bloco de resfriamento por água em alumínio e refrigerador de água) e termômetros digitais (DS18S20, Maxim). O controle via feedback é baseado em um algoritmo PID calibrado no laboratório. O sistema permite manter a cultura com temperaturas entre 10 e 50 graus Celsius com uma precisão de 0.1° independentemente da temperatura externa. Pode ser utilizado para manter a temperatura constante ou alterá-la ao longo do experimento simulando variações entre o dia e a noite, modulações diversas, choques, ou condições extremas. O bloco trocador de calor responsável pelo controle de temperatura das algas pode ser visualizado na Figura 3.8.

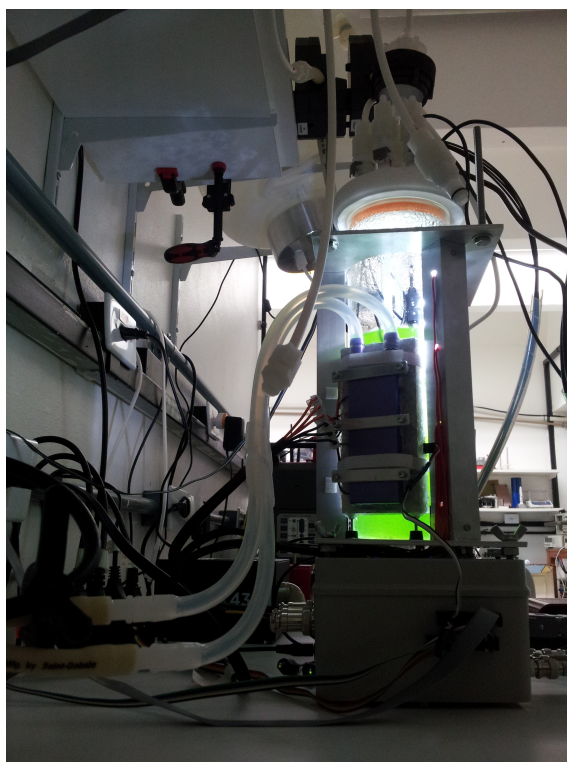


Figura 3.8: Módulo para controle da temperatura. Um trocador de calor é colocado em contato com o vidro que contém as algas e resfriado por células Peltiers. Na imagem, pode-se ver também a saída e entrada de água utilizadas para a manutenção de uma temperatura constante nas faces das células Peltiers opostas à cultura de microalgas.

3.4.3 Módulo de densidade óptica

O módulo de densidade óptica se baseia na atenuação de um feixe de luz para a obtenção da densidade da cultura de microalgas. Este módulo foi construído a partir de dois LEDs (um vermelho de 680 nm e um infra vermelho de 930 nm) alinhados com sensores de luz TSL230R. Foram utilizadas duas cuvetas de quartzo para acondicionar os LEDs e sensores no interior da cultura. A distância entre as cuvetas corresponde ao caminho óptico percorrido pela luz que sai dos LEDs até atingir o sensor oposto e foi mantida fixa por uma peça usinada em alumínio. Para evitar a condensação de umidade durante o funcionamento deste módulo em baixas temperaturas, foram inseridas pequenas porções de sílica em cada uma das cuvetas. Para finalizar, foi posicionado um termômetro digital para monitorar a temperatura das algas e o conjunto foi selado com uma cola vedante. A Fig. 3.9 mostra o módulo durante a sua montagem e após finalizado.

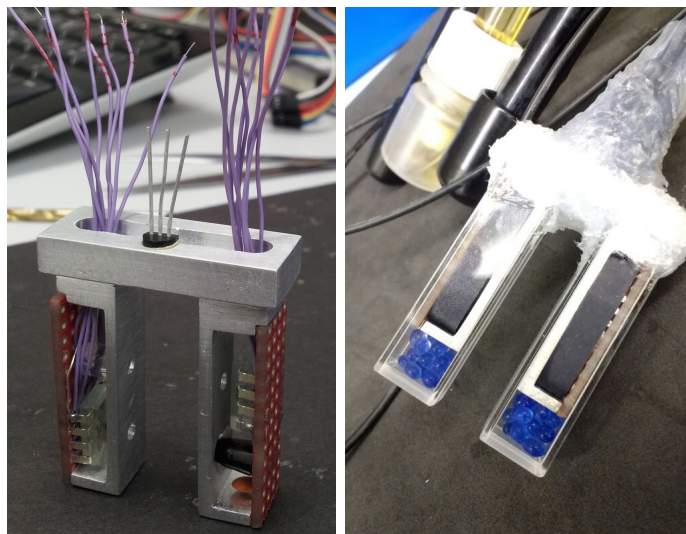


Figura 3.9: Módulo de densidade óptica construído para o monitoramento da densidade da cultura. À esquerda vê-se o termômetro, LEDs, sensores ópticos e a peça em alumínio que fornece rigidez ao conjunto. À direita se encontra o módulo finalizado, com os circuitos e a sílica para controle de umidade posicionados no interior das cuvetas de quartzo.

Uma vez que podem haver flutuações na emissão dos LEDs e nas leituras efetuadas pelos sensores ópticos em diferentes temperaturas, foi feita uma calibração prévia do módulo de densidade óptica apenas com meio de cultura no fotobiorreator. Para diferentes intensidades dos LEDs, foram coletados valores de I_0 (intensidade luminosa que atravessa

o meio de cultura) e de I_{ref} (intensidade luminosa medida com o sensor que se encontra na mesma cuveta do LED, sem que a luz atravessasse o meio de cultura). As leituras de ambas as intensidades obtidas durante a calibração do LED vermelho estão ilustradas na Figura 3.10a. Foi feito um ajuste linear entre tais medidas para diversas temperaturas do meio de cultura. Os coeficientes angulares (β) encontrados para estes ajustes estão representados na Figura 3.10b em função da temperatura do sistema.

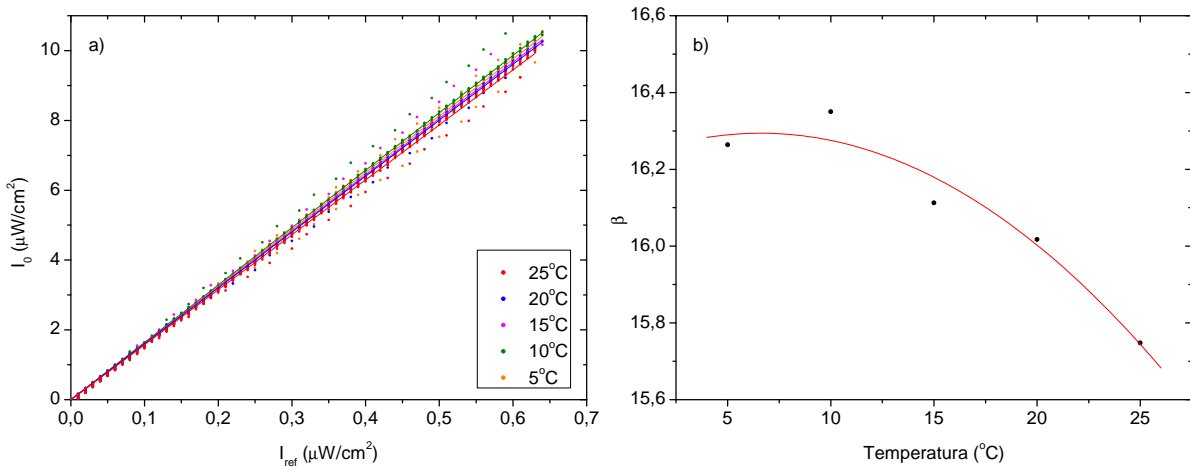


Figura 3.10: Calibração do módulo de densidade óptica do fotobiorreator. Os valores de I_0 (intensidade luminosa que atravessa o meio de cultura) e I_{ref} (intensidade lida pelo sensor posicionado próximo ao LED) foram obtidos pelos sensores para diversas intensidades do LED enquanto o fotobiorreator estava preenchido apenas com meio de cultura. a) Curvas $I_0 = f(I_{ref})$ obtidas para diferentes temperaturas. b) Coeficientes angulares das retas obtidas em (a) em função da temperatura do sistema.

A partir do conhecimento de $I_0 = f(I_{ref}, T)$, a atenuação da luz no comprimento de onda λ ao atravessar a cultura de microalgas por ser calculada por

$$A_\lambda = -\ln \frac{I}{I_0}, \quad (3.4)$$

onde I representa a intensidade luminosa detectada pelo sensor posicionado em frente ao LED (luz que atravessou a cultura) e I_0 representa a luz que atravessaria o meio de cultura caso as microalgas não estivessem presentes. A densidade da cultura pode então ser obtida a partir da lei de Lambert-Beer:

$$A_\lambda = nl\sigma_\lambda, \quad (3.5)$$

onde n corresponde à densidade da cultura (em número de células por unidade de volume), l é o caminho óptico percorrido pela luz (≈ 1 cm) e σ_λ é a seção de choque das microalgas.

3.4.4 Módulo de iluminação

Consiste em três colunas de alumínio posicionadas ao redor do recipiente que contém as algas. Cada coluna contém conjuntos de LEDs brancos, roxos (otimizados para a fotossíntese) e RGBs. Cada cor pode ser modulada (intensidade e período claro/escuro) individualmente. O funcionamento e o espectro de emissão de cada um dos conjuntos de LEDs do módulo de iluminação estão ilustrados nas Figuras 3.11 e 3.12.

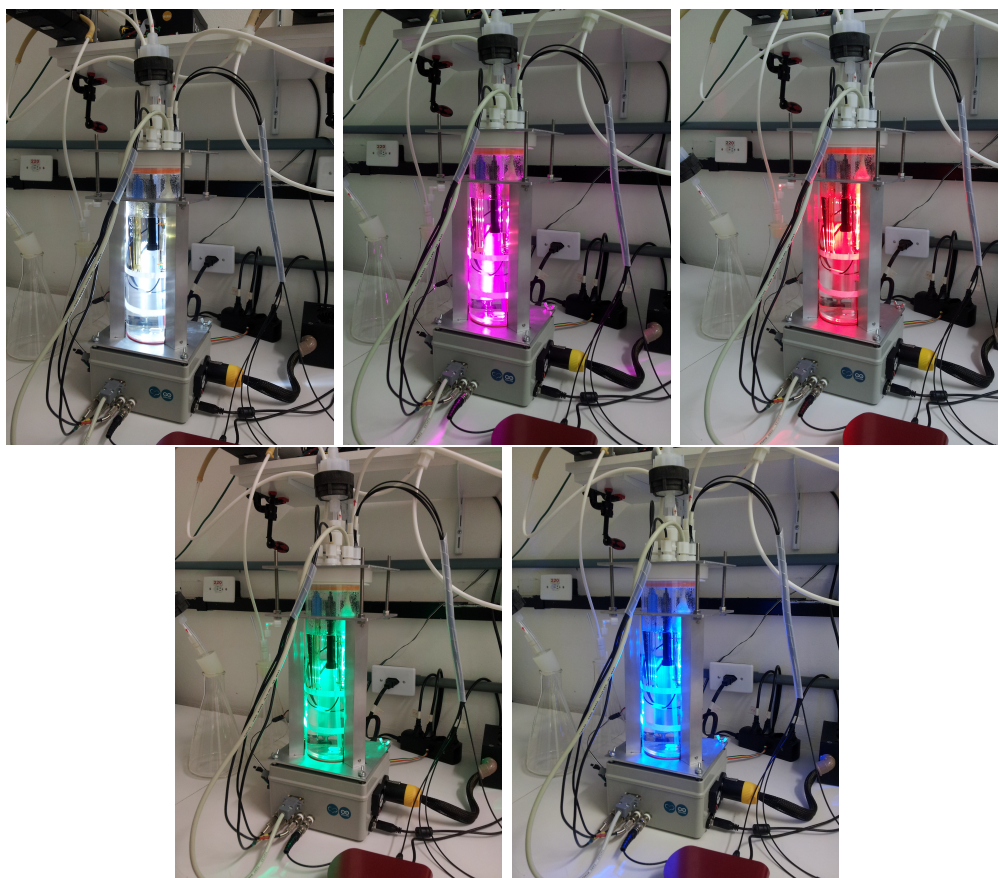


Figura 3.11: Funcionamento das torres de iluminação utilizadas para iluminar as algas com os diversos LEDs disponíveis.

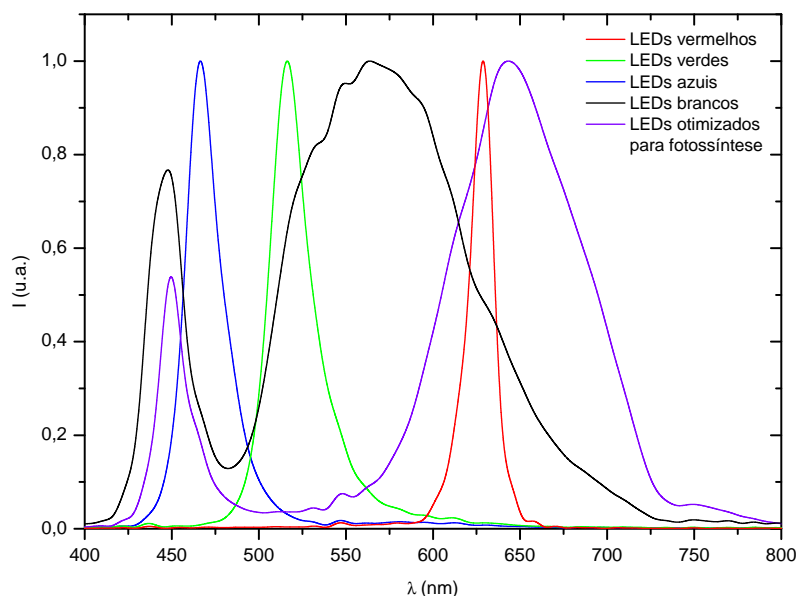


Figura 3.12: Espectro de emissão dos diferentes LEDs utilizados nas torres de iluminação do fotobiorreator automatizado. A intensidade de cada um dos conjuntos de LEDs disponíveis pode ser modulada individualmente.

3.4.5 Sensores

Além da densidade óptica e da temperatura da cultura, vários outros parâmetros são monitorados durante o funcionamento do reator. A fase líquida é monitorada por sondas de pH (com acurácia de 0,01), de oxigênio dissolvido (OD, com acurácia de 0,05 mg/L) e de condutividade elétrica (CE) produzidos pela *Atlas Scientific*. No reservatório de ar se encontram um sensor de temperatura, umidade relativa e pressão (modelo BME280 produzido pela *Adafruit*) e um sensor K-33 ICB de dióxido de carbono da *CO₂Meter*. Há também um sensor TSL 235 para o monitoramento constante da irradiância (emitida pelo módulo de iluminação) que incide sobre a cultura.

3.4.6 Módulo de controle de CO₂

Este módulo é constituído por um cilindro de gás e uma válvula que pode ser acionada a partir das leituras da concentração de CO₂ no reservatório de ar. É possível estabelecer uma concentração desejada e este módulo libera a injeção de CO₂ no sistema à medida que este gás é consumido pelas algas.

3.4.7 Módulo de diluição

A densidade da cultura, obtida a partir de medições de densidade óptica, pode ser utilizada para o acionamento controlado de uma bomba peristáltica Masterflex L/S com duas cabeças capazes de, simultaneamente, remover microalgas e adicionar meio de cultura novo em quantidades iguais ao longo do tempo. Quando este módulo é desligado, é possível acompanhar diretamente o crescimento da cultura através das variações na sua densidade, ou seja, a fase de adaptação, a fase de crescimento exponencial, a diminuição do crescimento devido a limitação de nutrientes, CO_2 ou O_2 , atingindo por fim uma densidade máxima. Com este módulo ligado em modo contínuo, a cultura pode permanecer em “eterno” crescimento exponencial enquanto o sistema se mantém com a densidade e o volume constantes. Nesta situação a taxa de crescimento pode ser obtida a partir da taxa de diluição da cultura, conforme visto na eq. 3.3. É possível também operar o módulo em modo semi-contínuo para se observar o crescimento da cultura entre diluições periódicas.

3.4.8 Sistema de alimentação

Os módulos termoeletrônicos, as bombas peristálticas, o painel de iluminação e os LEDs para medição da densidade óptica são controlados através de controladores (POLOLU) alimentados por duas fontes AXT (450 W da CORSAIR). Todo o conjunto, incluindo o computador de controle e armazenamento de dados, é conectado a um nobreak de 6 kVA, capaz de alimentar o sistema de forma independente por até 3 horas no caso de blackout.

3.4.9 Sistema de integração

Todos os módulos e sensores descritos acima são integrados através de uma placa microcontrolada (Arduino Mega) e um software de controle desenvolvido inteiramente no laboratório. Com ele é possível executar uma grande variedade de experimentos de curta ou longa duração, onde o usuário pode interagir a qualquer momento com o sistema ou deixá-lo funcionando de forma autônoma.

3.4.10 Espectrofotômetro

A espectrofotometria das algas é realizada por meio de um espectrômetro compacto (modelo CCS200 da Thorlabs) que complementa o aparato experimental citado ao longo desta seção. Imersos na cultura e separados por uma distância de um centímetro existem dois cabos de fibra ótica. O primeiro é utilizado para levar a luz de uma fonte estabilizada (modelo SLS201L da Thorlabs) até a amostra, enquanto o segundo leva a luz transmitida através da amostra até o espectrofotômetro. A fonte de luz utilizada consiste numa lâmpada halógena de tungstênio, que possui uma potência constante de 10 mW e uma emissão espectral contínua de 300 a 2600 nm. Ao inserir os cabos de fibra ótica diretamente na cultura, podemos medir continuamente as variações *in vivo* do espectro de absorção da cultura nas condições instantâneas em que ela se encontra sem a necessidade de colher amostras e transportá-las. Desta forma podemos também realizar medidas de fluorescência do sistema.

3.5 Fotobiorreator automatizado: Software

O software de controle do fotobiorreator automatizado e as bibliotecas auxiliares desenvolvidas foram escritos em C++. Inicialmente, o usuário deve definir os modos de funcionamento e parâmetros a serem utilizados no experimento subsequente de acordo com as seguintes opções:

- Modo de controle da temperatura:
 - Constante: requer que o usuário defina a temperatura desejada.
 - Senoidal: requer que o usuário defina as temperaturas máxima e mínima e o período das variações.
 - Step: requer que o usuário defina a temperatura inicial, o incremento de temperatura, o intervalo de tempo entre incrementos sucessivos e os limites superior e inferior de temperaturas a serem utilizadas.
 - Desligado: permite que a temperatura da cultura varie livremente ao longo do experimento.

- Modo de controle da iluminação:
 - Constante: requer que o usuário defina os pwm's a serem utilizados em cada conjunto de LEDs que iluminam a cultura (branco, roxo, azul, vermelho e verde).
 - Senoidal: requer que o usuário defina os pwm's máximo e mínimo de cada cor de LEDs, assim como o período de oscilação da iluminação.
 - Step: requer que o usuário defina valores máximos para o pwm de cada cor, para o período que cada intensidade será mantida e para o número de "steps" que serão utilizados.
 - Amanhecer/anoitecer: o usuário define horários para que os LEDs sejam ligados e desligados e o pwm desejado para cada cor.

- Modo de diluição:
 - Contínuo: a cultura permanece continuamente em uma densidade próxima à pré-estabelecida pelo usuário. Sempre que a densidade de algas supera o valor desejado, o sistema de diluição é acionado e remove algas e insere meio de cultura no fotobiorreator de modo a manter o volume da cultura constante.
 - Semicontínuo: deve ser usado em conjunto com o modo "step" de temperatura ou iluminação. O usuário define uma densidade e, sempre que houver uma alteração na temperatura ou na iluminação, o sistema de diluição é acionado para re-estabelecer a densidade desejada. A cultura poderá, então, crescer livremente até que ocorra a próxima alteração de parâmetros.
 - Desligado: a cultura de microalgas permanece livre para crescer indefinidamente, até que atinja uma densidade crítica ou os nutrientes presentes no meio de cultura se esgotem.

- Modo de circulação de ar:
 - Ligado: o usuário define a intensidade da bomba de ar e esta permanece ligada continuamente, sendo interrompida apenas durante as aferições de dados pelo sensores.

- Desligado: a bomba de ar permanece desligada durante todo o experimento.
- Modo de controle de CO₂:
 - Constante: o usuário define uma concentração de CO₂ a ser mantida constante no reservatório de ar. Sempre que a concentração aferida pelo sensor de CO₂ apresentar um valor aquém do desejado, a válvula de injeção de CO₂ será acionada.
 - Step: o usuário define a concentração inicial de CO₂ e, periodicamente (com período a ser definido), a concentração será elevada em um valor também escolhido pelo usuário.
 - Desligado: a válvula de injeção de CO₂ não é acionada e a concentração deste gás permanece livre para variar sujeita ao consumo pelas algas.
- Modo do agitador magnético:
 - Ligado
 - Desligado

Após a definição do tipo de experimento a ser realizado, o loop principal do programa consiste em:

- Atualização do relógio
- Leitura da temperatura da cultura
- Ajuste da potência do módulo termoeletrico para manter a temperatura da cultura sempre próxima ao valor desejado
- Ajuste da circulação de ar
- Ajuste do módulo de iluminação
- Ajuste do agitador magnético
- A cada minuto:
 - Ler a concentração de CO₂ no reservatório de ar

-
- Inserir CO₂ no sistema se a concentração estiver aquém da desejada
 - A cada 5 minutos:
 - Desligar todos os atuadores
 - Obter a leitura dos sensores
 - Armazenar os dados
 - Diluir a cultura (se necessário)

O usuário pode, a qualquer momento, alterar os parâmetros ou modos de funcionamento do reator por meio de comunicação serial com o Arduino que controla o sistema.

Capítulo 4

Resultados

Neste capítulo estão sintetizados alguns dos resultados obtidos ao longo da realização deste trabalho, que comprovam que o aparato experimental desenvolvido pode ser utilizado no estudo efetivo e preciso da dinâmica de crescimento de microalgas. Inicialmente são apresentados dados referentes à calibração do sistema. Em seguida estão ilustrados os resultados obtidos durante a investigação da temperatura ótima para o crescimento da microalga *Nannochloropsis oceanica*. Após estes, são apresentados resultados do estudo da dinâmica de crescimento das microalgas sob diferentes condições de iluminação e temperatura. Por fim, são mostrados os resultados referentes à utilização do sistema desenvolvido no estudo da variação na concentração de pigmentos no interior das microalgas ao longo de ciclos de claro e escuro.

4.1 Estudos preliminares

Após a montagem do aparato experimental, foram realizadas diversas calibrações a fim de se entender como a temperatura, a concentração de CO₂ e a densidade das algas influenciam na leitura do sensores. A seguir estão descritas as observações feitas durante a calibração do módulo de densidade óptica e durante o estudo do meio de cultura puro submetido a diferentes condições.

4.1.1 Densidade óptica

Um dos objetivos deste trabalho consiste na verificação das taxas de crescimento da cultura de microalgas em função de parâmetros físicos como temperatura e luminosidade. As taxas de crescimento são obtidas a partir das variações na densidade da cultura (microalgas/ml) ao longo do tempo. Ao atravessar a cultura, a atenuação (A_λ) da luz no comprimento λ é obtida pelo módulo de densidade óptica a partir da eq. 3.4. A partir desse valor a densidade da cultura pode então ser calculada com auxílio da eq. 3.5. Porém, inicialmente não se conhecia a seção de choque σ_λ e esta precisou ser encontrada a partir de uma curva de calibração entre a densidade óptica e a concentração de células na cultura. Para isso, o fotobiorreator foi preenchido com microalgas e, ao longo de alguns dias, foram coletadas amostras da cultura para que pudessem ser efetuadas contagens de células em microscópio com uma Câmara de Neubauer com quadrantes de 1,0 mm de lado e 0,1 mm de profundidade. As densidades obtidas para diferentes densidades ópticas estão representadas na Figura 4.1. Os dados utilizados nos ajustes das Figuras 3.10 e 4.1 foram utilizados no software de controle do fotobiorreator de modo que, a partir das leituras dos sensores do módulo de densidade óptica, a densidade da cultura pode ser mantida constante pelo módulo de diluição do sistema, ou acompanhada diretamente nos modos de funcionamento em que a densidade de células permanece livre.

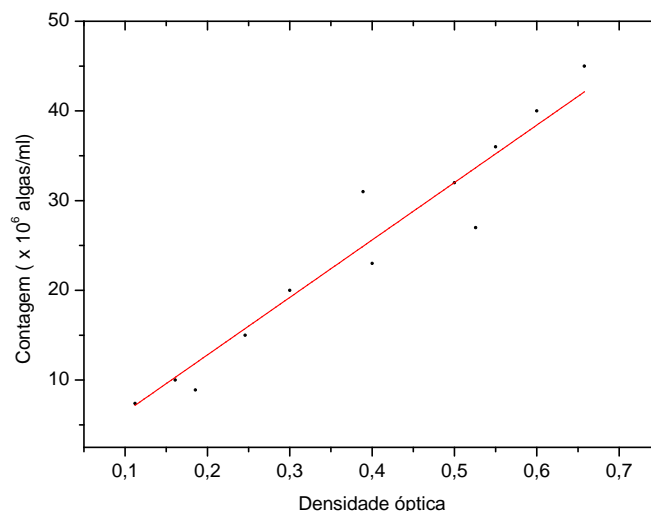


Figura 4.1: Curva de calibração utilizada para a obtenção da densidade da cultura. Foram realizadas sucessivas contagens de células de *Nannochloropsis* em câmara de Neubauer.

4.1.2 Meio de Cultura

A fim de se evitar interpretações errôneas dos dados provenientes da cultura de microalgas em diferentes temperaturas, foi realizado um estudo prévio das propriedades do meio de cultura utilizado no cultivo das algas quando submetido a diferentes temperaturas e diferentes concentrações de CO_2 .

A influência da temperatura na densidade óptica do meio de cultura é dificilmente distinguível dos efeitos que essa tem sobre a emissão do LED e resposta dos sensores ópticos. Desta forma, não se buscou caracterizar o comportamento óptico do meio de cultura em diferentes temperaturas, e sim calibrar o software de controle do FBR para que as leituras referentes à densidade da cultura não fossem influenciadas pela temperatura do sistema. O comportamento considerado para tal calibração foi ilustrado no capítulo anterior.

A concentração de oxigênio dissolvido num meio aquoso é um parâmetro sensível à temperatura e seus valores de equilíbrio variam significativamente dentro da faixa de temperaturas nas quais a cultura de microalgas foi estudada. Conforme ilustrado na Figura 4.2, a concentração de O_2 no meio de cultura na ausência de algas decai exponencialmente à medida que a temperatura do sistema é elevada.

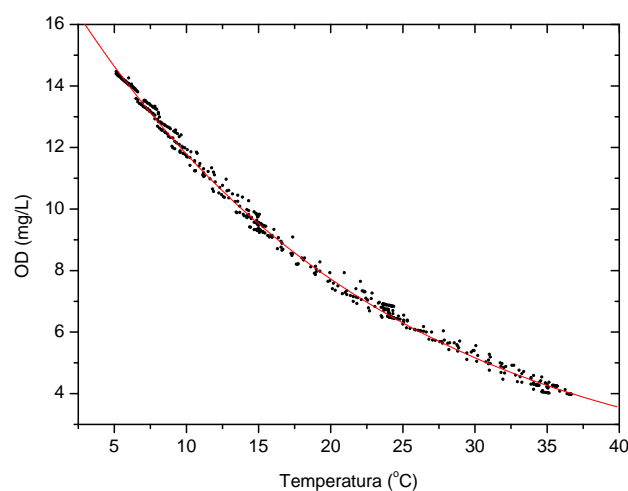


Figura 4.2: Concentração de oxigênio dissolvido encontrada no meio de cultura puro em diferentes temperaturas. O ajuste obtido corresponde a um decaimento exponencial.

Além da concentração de oxigênio dissolvido, a temperatura do meio de cultura influencia também no pH do mesmo. Este, por sua vez, é fortemente influenciado pela concentração de CO_2 contida no reservatório que contém o ar que circula pelo meio. A Figura 4.3 ilustra, para concentrações de CO_2 selecionadas, a influencia da temperatura no pH do meio de cultura na ausência de algas. Podemos ver que, no meio de cultura frio, o pH é muito mais sensível a pequenas variações de temperatura do que em temperaturas mais elevadas. Além disso, a concentração de CO_2 no reservatório de ar influencia fortemente no pH do meio de cultura, uma vez que a presença desse gás é conhecida por acidificar o meio em que se encontra.

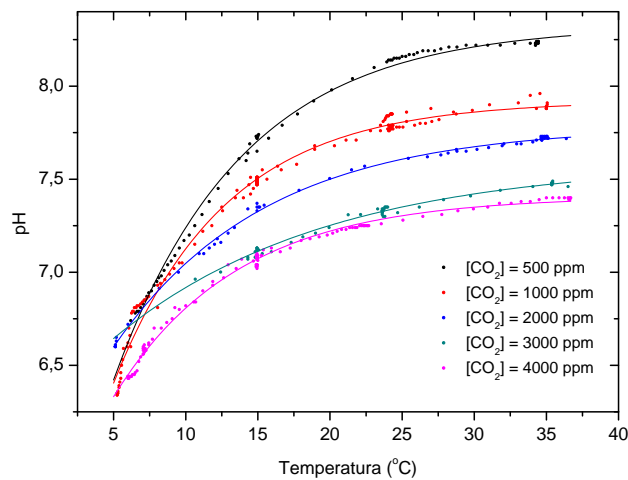


Figura 4.3: Valores de equilíbrio do pH do meio de cultura (na ausência de algas) em função da temperatura para diferentes concentrações de CO_2 .

4.2 Dinâmica de crescimento

A luz e a temperatura estão entre os principais fatores que influenciam a dinâmica de uma cultura de microalgas. Para observar seus efeitos foi feito um estudo do crescimento da cultura quando submetidas a diferentes intensidades luminosas e temperaturas, cujos resultados estão expostos a seguir.

4.2.1 Temperatura ótima

Durante este experimento, as algas foram mantidas à iluminação constante (24 horas de luz) com os LEDs brancos na cor 6000 K e potência total de 5.4 W. Inicialmente a cultura foi resfriada lentamente até atingir uma temperatura de 15°C e, a partir daí, a temperatura foi mantida constante e a densidade da cultura monitorada. Ao final de um período de três horas a temperatura foi elevada em 1°C e a cultura foi diluída até atingir a densidade desejada ($\approx 1,5 \times 10^7$ células/mL) e assim sucessivamente até a temperatura máxima de 40°C.

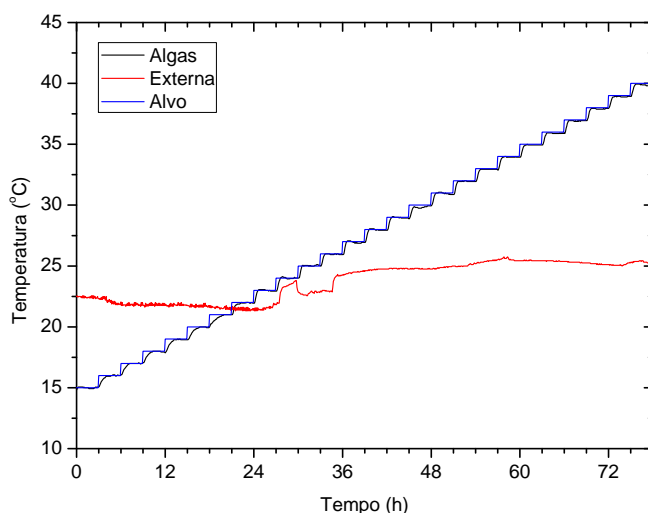


Figura 4.4: Variações de temperatura impostas à cultura em experimento para detecção da influência da temperatura na taxa de crescimento das microalgas.

Como pode ser visto na Fig. 4.4, a temperatura da cultura não é alterada imediatamente quando há uma alteração na temperatura desejada. Por isso, para a obtenção das taxas de crescimento ao longo deste experimento, foi considerada apenas a hora final em que a cultura se encontrava em cada temperatura. A taxa de crescimento para cada temperatura foi medida diretamente a partir da variação na densidade da cultura ao longo dessa última hora. A figura 4.5 mostra que a temperatura ótima para o crescimento das microalgas foi de 25°C e que a partir de 36°C a cultura começa a morrer.

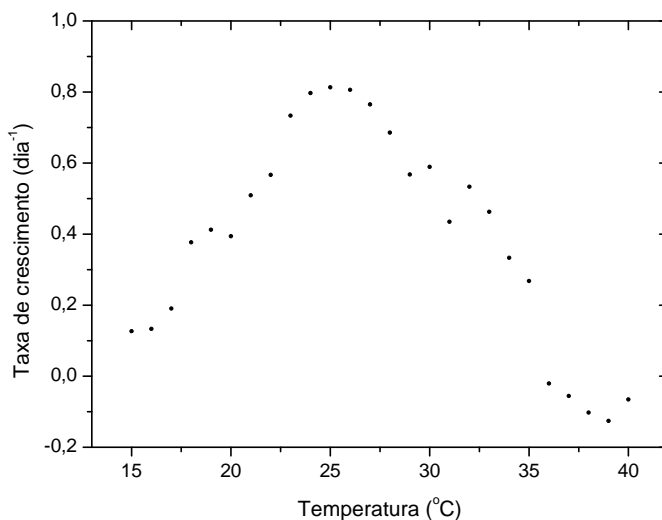


Figura 4.5: Taxa média de crescimento da cultura obtida para as diferentes temperaturas estudadas.

4.2.2 Iluminação

Foi feito um estudo da dinâmica de crescimento da microalga *Nannochloropsis Oceanica* quando submetida a diferentes ciclos de iluminação. Em todos os casos, o sistema de diluição foi programado para manter a densidade da cultura constante em $1,5 \times 10^7$ células/mL e o volume total dentro do reator constante e igual a 1 litro. A concentração de CO_2 no ar que circulava pela cultura foi mantida constante em 1500 ppm e a temperatura permaneceu constante e igual a temperatura ótima, ou seja, igual 25°C . A cada cinco minutos foram coletados os dados da cultura referentes ao pH, à concentração de oxigênio dissolvido, à temperatura e à densidade óptica da cultura. Os resultados observados em três dos ciclos de iluminação selecionados são apresentados nas seções que seguem. Em todos os casos foram utilizados LEDs brancos com temperatura 6000 K.

Dinâmica 12x12

A primeira amostra de algas foi submetida ao mesmo ciclo de iluminação ao qual já havia sido condicionada, ou seja, 12 horas contínuas (das 6:00 hs as 18:00 hs) de claro constante seguidas por 12 horas contínuas (das 18:00 hs as 6:00 hs) de escuro constante, conforme ilustrado pela Fig. 4.6.

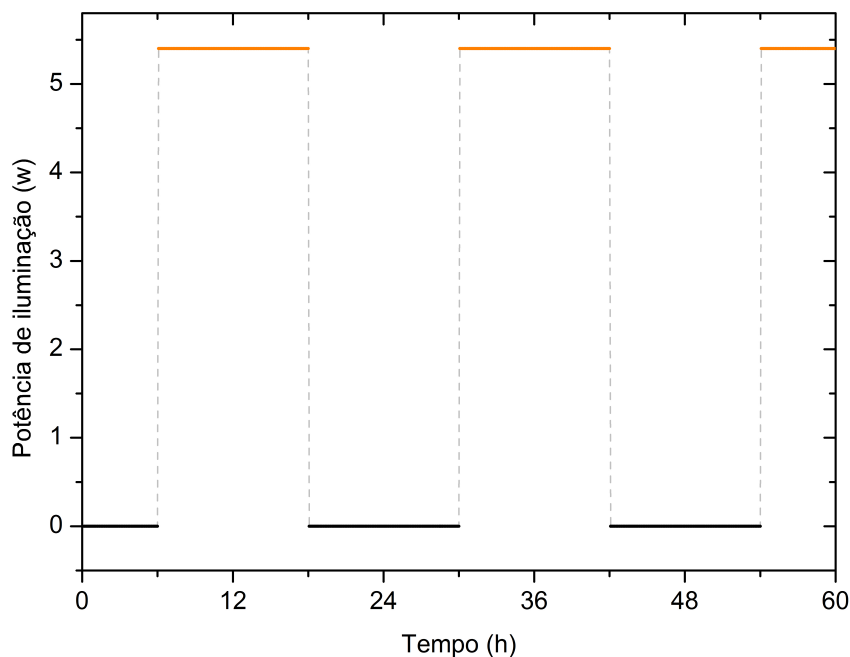


Figura 4.6: Padrão de iluminação durante o regime 12/12. As linhas laranjas mostram os períodos claros e as pretas os períodos escuros.

Após a introdução das microalgas no fotobiorreator, o controle de temperatura e o ciclo de iluminação desejado foram acionados para que a cultura se aclimatasse ao novo ambiente, à nova temperatura, à nova iluminação e ao novo ar. Os dados mostrados a seguir foram coletados após o período de adaptação.

Foi observado que o pH da cultura possui valores estáveis durante o período escuro e que este se estabiliza em novos valores elevados poucos minutos após o início do período claro, conforme ilustrado na Fig. 4.7. Nos períodos escuros as microalgas respiram e um dos produtos da respiração são as moléculas de CO_2 que acabam sendo liberadas no meio fazendo com que ele fique ligeiramente mais ácido (≈ 7.6) do que o meio de cultura puro (≈ 7.7). Nos períodos claros, além de respirar, as microalgas também fazem fotossíntese, o que reduz a concentração de CO_2 do meio devido à fixação de carbono pela matéria orgânica. À medida que as moléculas de CO_2 são removidas do meio nos períodos claros, esse se torna mais alcalino com relação aos períodos escuros (≈ 7.9). Este valor é ligeiramente maior do que o valor medido no meio puro. Isso indica que a irradiância correspondente aos períodos claros mostradas na Fig. 4.6 faz com que a taxa da fotossíntese seja maior do que a taxa da respiração nas condições deste experimento. Dentro do reator, os únicos processos químicos relevantes associados com a variação das

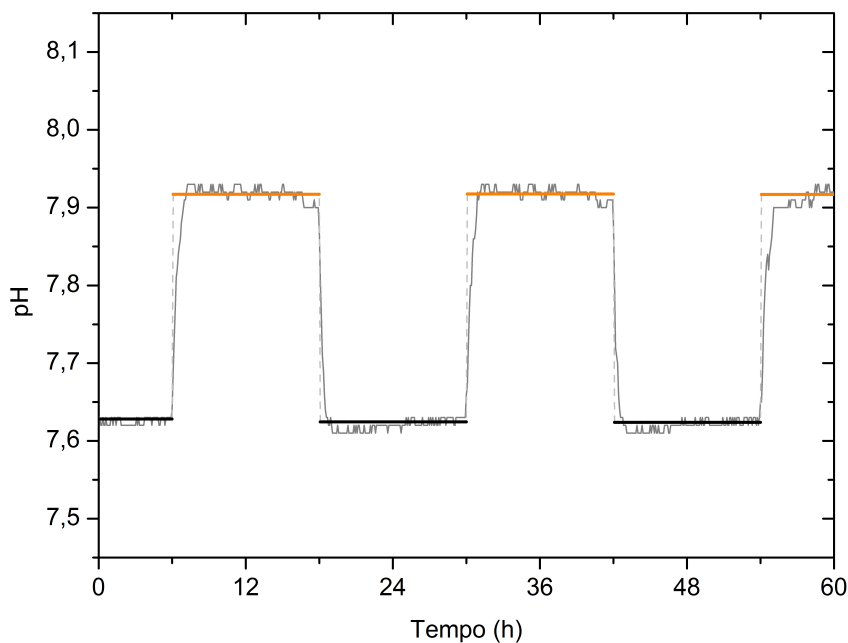


Figura 4.7: Dados experimentais (cinza) e ajustes dos valores de equilíbrio (laranja/preto) referentes ao pH da cultura no ciclo 12/12 (claro/escuro). A fotossíntese nos períodos claros (laranja) faz com que o CO_2 presente no meio seja consumido, elevando assim o pH do sistema. Nos períodos escuros (preto), o CO_2 fornecido pelo ar e liberado pela respiração das microalgas não é mais consumido, acidificando portanto o meio e reduzindo o pH da cultura.

moléculas de CO_2 são a fotossíntese e a respiração. Dessa forma é possível considerar que, neste sistema, o pH é uma medida indireta da concentração de CO_2 dissolvido no meio.

Além da remover as moléculas de CO_2 , a fotossíntese libera O_2 no meio, o que foi confirmado pelas medidas diretas da concentração de oxigênio dissolvido (OD) ilustradas na Fig. 4.8. Assim, a concentração de OD apresenta patamares distintos nos períodos claros e escuros, sendo máxima no período claro e mínima no período escuro. As concentrações de equilíbrio do OD são alcançadas quase instantaneamente após a iluminação ser ligada ou desligada.

As figuras 4.7 e 4.8 mostram que a modulação da luz, através da respiração e da fotossíntese realizada pelas microalgas, alteram o equilíbrio químico do meio. A Fig. 4.9 ilustra claramente a existência de dois estados distintos e bem definidos: pH e OD baixos nos períodos escuros e pH e OD elevados nos períodos claros.

As alterações nas concentrações gasosas em decorrência da fotossíntese nos períodos claros ocorrem em conjunto com a multiplicação das células. A Figura 4.10 mostra que durante os períodos escuros a quantidade de microalgas no fotobiorreator permanece cons-

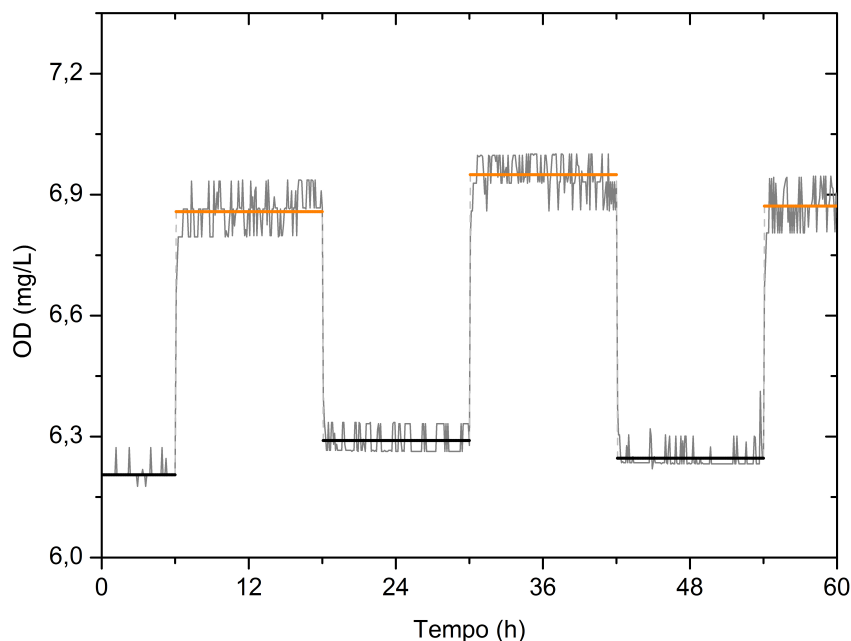


Figura 4.8: Dados experimentais (em cinza) e ajustes (laranja/preto) referentes à concentração de oxigênio dissolvido (OD) na cultura submetida ao ciclo 12/12 (claro/escuro). Parte do oxigênio produzido pela fotossíntese nos períodos claros permanece dissolvida no meio líquido.

tante sem que seja necessária nenhuma diluição da cultura, enquanto que nos períodos claros o sistema de diluição é acionado constantemente, o que indica uma constante multiplicação das células.

Com o auxílio da calibração feita entre as taxas de diluição da cultura e as alterações causadas na densidade de algas é possível, a partir dos dados ilustrados na Fig. 4.10, obter as taxas de crescimento da cultura nos períodos claros, conforme ilustrado na Fig. 4.11. Como o volume e a densidade de microalgas dentro do reator são constantes, tem-se que a taxa de diluição é igual a taxa de crescimento.

Ao longo dos dias e noites em que este experimento foi mantido, a cultura permaneceu em agitação devido à turbulência gerada pela circulação do ar, no qual a concentração de CO_2 foi mantida sempre constante em 1500 ppm. Para que isso fosse possível, era necessário adicionar CO_2 ao reservatório de ar para compensar o CO_2 fixado pelas microalgas que era indiretamente removido do sistema através da diluição. É possível ver na Fig. 4.12 a contagem cumulativa das adições efetuadas pela válvula de injeção de CO_2 ao longo do tempo. Note que o acionamento da válvula ocorre frequentemente durante os períodos claros, pois nesta situação o CO_2 é consumido como reagente na fotossíntese, o que não

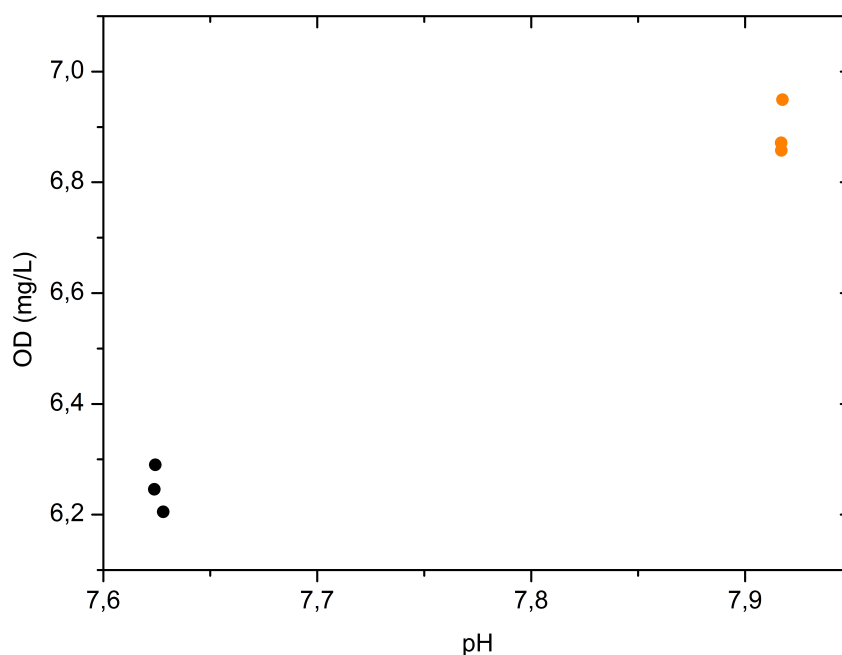


Figura 4.9: A mudança no equilíbrio químico do meio causada pela modulação 12/12 da luz pode ser vista claramente no espaço OD×pH. Durante o dia (laranja) a ocorrência da fotossíntese eleva a concentração de O_2 e diminui a concentração de CO_2 (observada pelo aumento no pH) na cultura. Durante os períodos noturnos (preto) a respiração das algas consome o oxigênio dissolvido no meio líquido e libera CO_2 (detectado pela diminuição do pH).

ocorre nos períodos escuros, quando ao contrário, CO_2 é produzido pela respiração.

A taxa com que as microalgas consomem moléculas de CO_2 enquanto realizam fotossíntese pode ser calculada a partir da derivada da curva obtida para a adição do CO_2 em cada período representado na Fig. 4.12. Também neste caso, tem-se que a taxa de adição de CO_2 no reservatório é igual a taxa de consumo de CO_2 pela cultura. Para isso, foi efetuada uma calibração que relaciona a taxa de acionamento da válvula de CO_2 com a respectiva alteração causada na concentração deste ar no reservatório que alimenta o sistema. Ao se dividir a taxa de consumo de CO_2 pelo número de células presentes no reator é obtido o número de moléculas que são capturadas por cada célula a cada segundo. Este consumo está representado na Fig. 4.13 e as taxas obtidas apontam que a cada dia ocorre um consumo da ordem de 10^{21} moléculas de CO_2 pela cultura presente no fotobiorreator.

Assim como foi verificada uma nítida correlação entre o pH e o DO na cultura, nota-se também, na Fig. 4.14, a dependência entre o consumo de CO_2 e a taxa de crescimento da cultura. Esse gráfico evidencia de forma clara que a dinâmica de crescimento da cultura

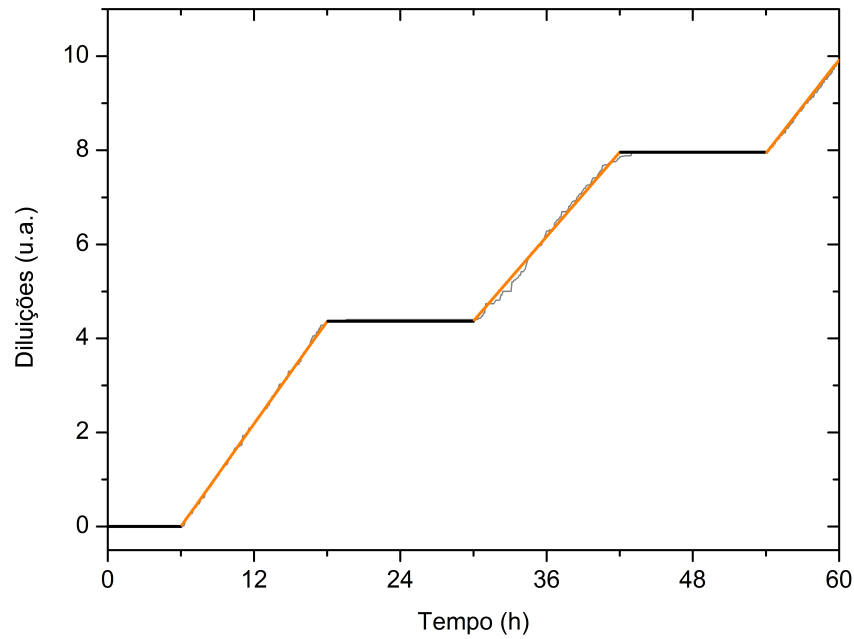


Figura 4.10: Dados experimentais (cinza) e ajustes (laranja/preto) referentes à contagem cumulativa do tempo de acionamento do sistema de diluição ao longo de experimento em regime 12/12 (claro/escuro). O acionamento da diluição, sempre que a densidade de células supera o valor preestabelecido ($1,5 \times 10^7$ células/mL), permite que a densidade da cultura seja mantida constante ao longo do tempo.

influencia o ambiente externo, nesse caso, o ar do reservatório.

A Figura 4.15 traz o quadro resumo com os diversos parâmetros que caracterizam a dinâmica da cultura submetida ao ciclo 12/12 de claro/escuro.

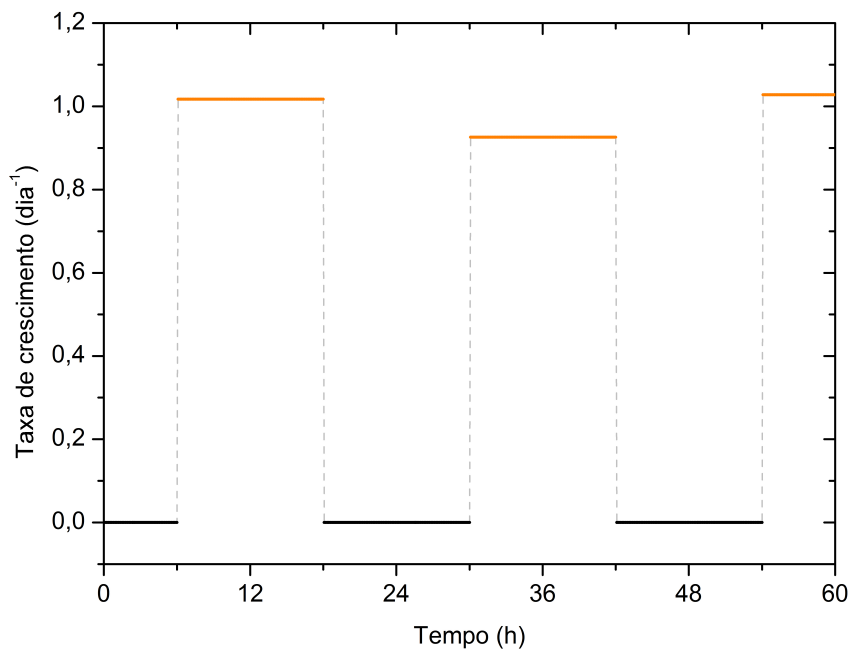


Figura 4.11: Taxas de crescimento das algas quando submetidas ao regime 12/12 (claro/escuro) obtidas a partir das derivadas de cada período representado na Figura 4.10. Note a ausência de crescimento durante os períodos escuros (preto) em contraste com o crescimento com taxas bem definidas (laranja) durante os períodos claros.

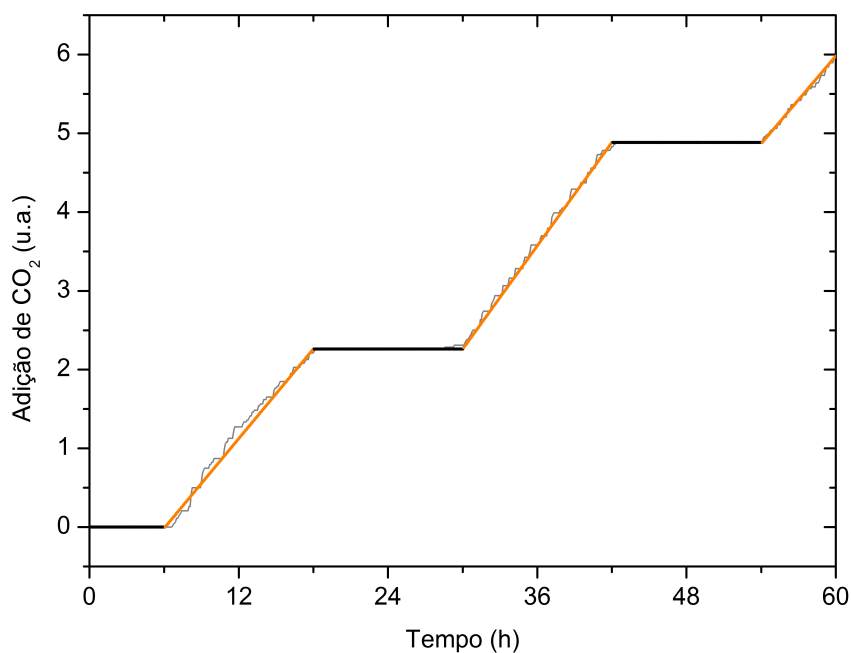


Figura 4.12: Dados experimentais (cinza) e ajustes (laranja/preto) referentes ao acionamento da válvula de adição de CO₂ ao longo do experimento 12/12 (claro/escuro). Para manter a concentração de CO₂ no ar que circular pela cultura constante em 1500 ppm é necessário que este seja adicionado ao sistema durante os períodos claros (laranja) uma vez que esse gás é fixado pelas microalgas e removido do sistema pela diluição.

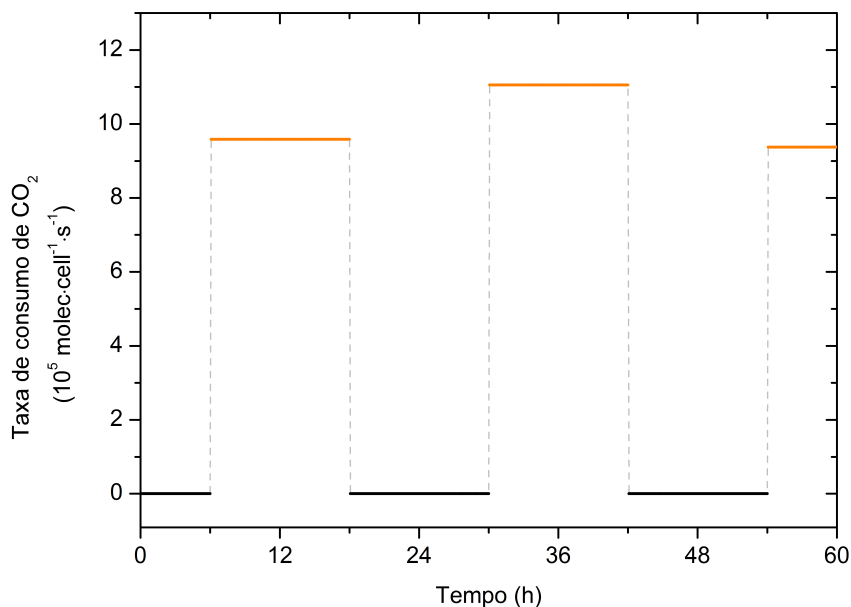


Figura 4.13: Taxa de consumo de CO₂ pela cultura durante o experimento 12/12 de claro/escuro. É possível notar que existe consumo de CO₂ apenas nos períodos claros (laranja).

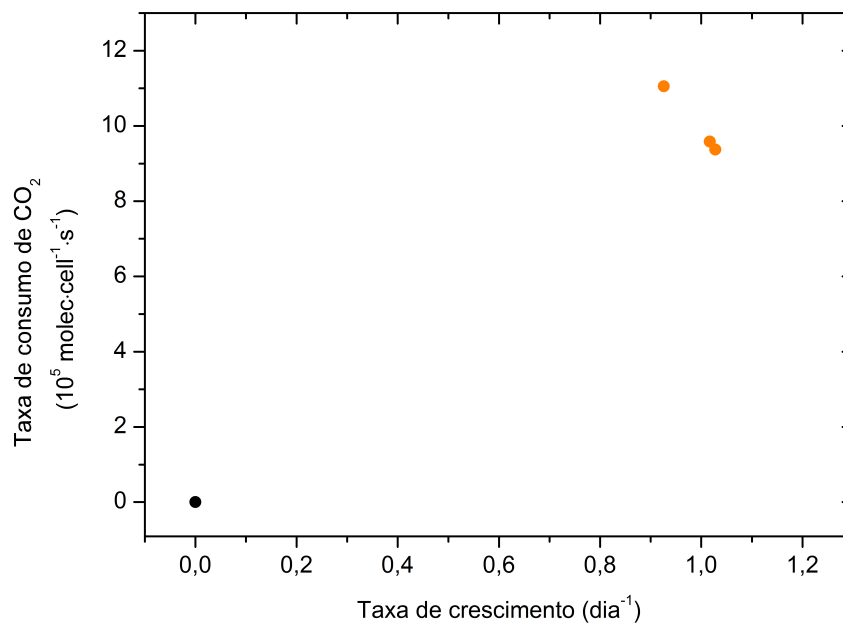


Figura 4.14: Relação entre a taxa de consumo de CO₂ e a taxa de crescimento da cultura durante os períodos claros (laranja) e escuros (preto) no regime 12/12 de claro/escuro. Conforme esperado, durante os períodos claros a ocorrência da fotossíntese implica na divisão das microalgas e na captura das moléculas de CO₂, enquanto nos períodos escuros a densidade da cultura permanece constante e não há consumo de CO₂.

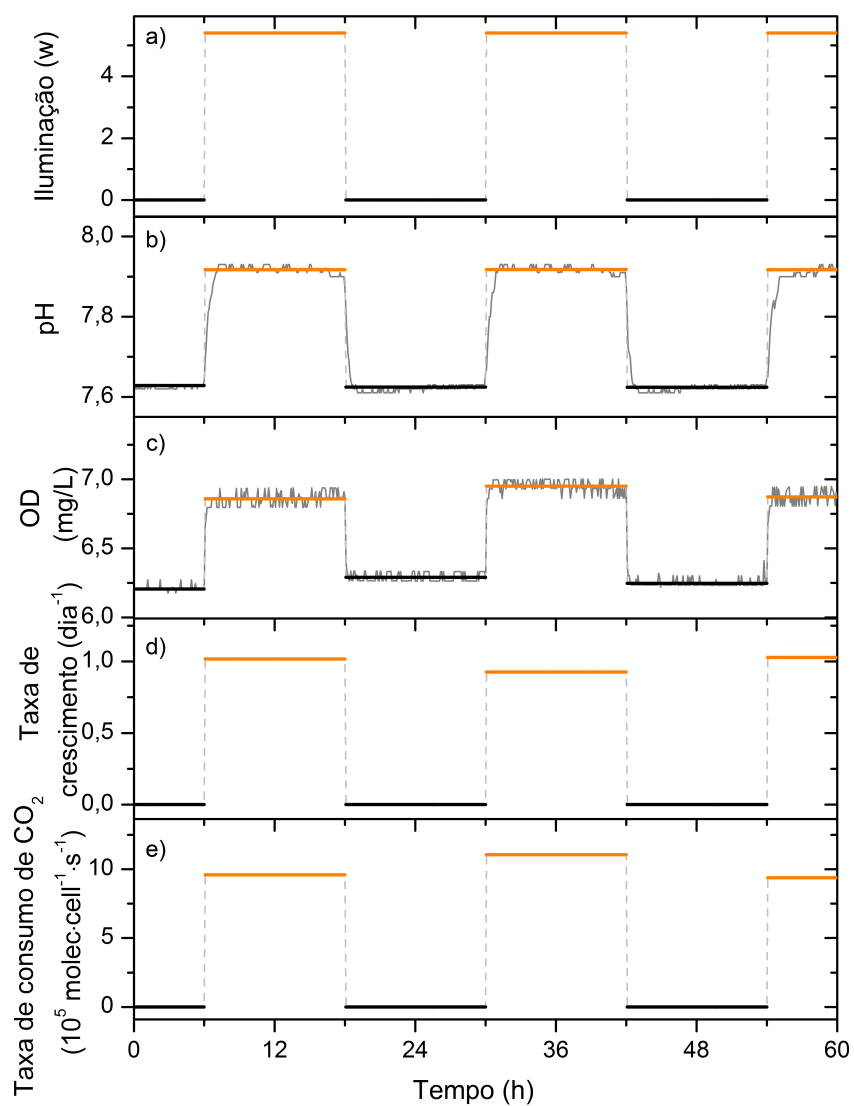


Figura 4.15: Quadro resumo com os principais parâmetros observados durante o regime 12/12 de claro/escuro. a) Potência dos LEDs de iluminação da cultura. b) pH da cultura. c) Concentração de oxigênio dissolvido na cultura. d) Crescimento específico das células. e) Taxa de consumo de CO₂.

Dinâmica Step

O segundo ciclo de iluminação utilizado no estudo das microalgas foi o produzido pelo modo *step* do fotobiorreator. Neste, as algas foram submetidas a um ciclo de 24 horas no qual, nas 12 horas iniciais, a potência dos LEDs era aumentada a cada duas horas com incrementos constantes e, nas 12 horas restantes, a potência era reduzida periodicamente aos mesmos valores utilizados anteriormente, como mostra a Fig. 4.16.

Assim como o que foi observado na dinâmica 12/12, neste novo modo de iluminação, o pH da cultura continuou apresentando valores estáveis para cada potência dos LEDs às quais a cultura foi submetida. A cada aumento na intensidade da luz incidente sobre as algas foi observada uma elevação no valor do pH de equilíbrio da cultura, conforme ilustrado na Fig. 4.17. Os valores intermediários encontrados entre os períodos escuros e os períodos mais claros indicam que a concentração de CO_2 no meio também se estabiliza em valores que dependem diretamente da iluminação que incide sobre a cultura ao longo do dia, alcalinizando o meio em cada aumento na intensidade dos LEDs e acidificando-o a cada diminuição em tal intensidade.

As variações na concentração de CO_2 ao longo do dia são acompanhadas por variações na concentração do oxigênio dissolvido na cultura. Assim como o pH, a concentração de

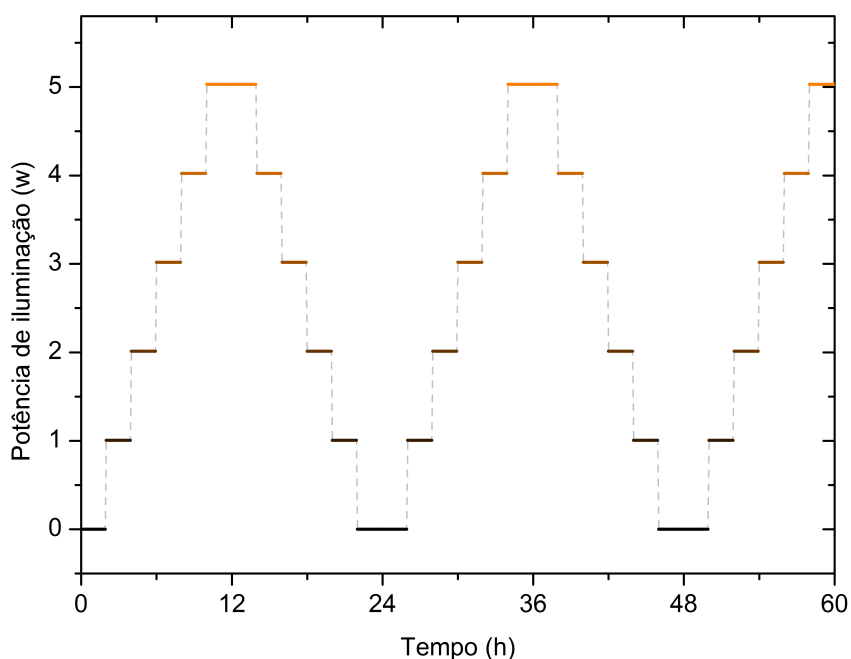


Figura 4.16: Padrão de iluminação imposto à cultura durante o modo *step*.

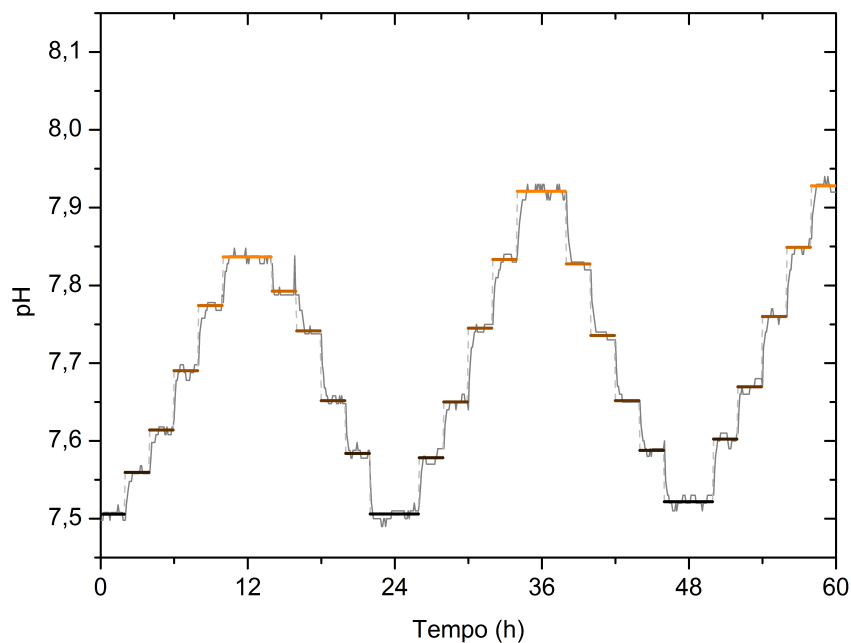


Figura 4.17: Dados experimentais (cinza) e ajustes dos valores de equilíbrio do pH da cultura quando submetida ao modo *step*. A realização da fotossíntese pelas microalgas se intensifica à medida que ocorre o aumento da luz incidente sobre a cultura. Os períodos mais claros (laranja) correspondem aos valores máximos de pH. Durante os períodos escuros (preto) o pH da cultura é mínimo.

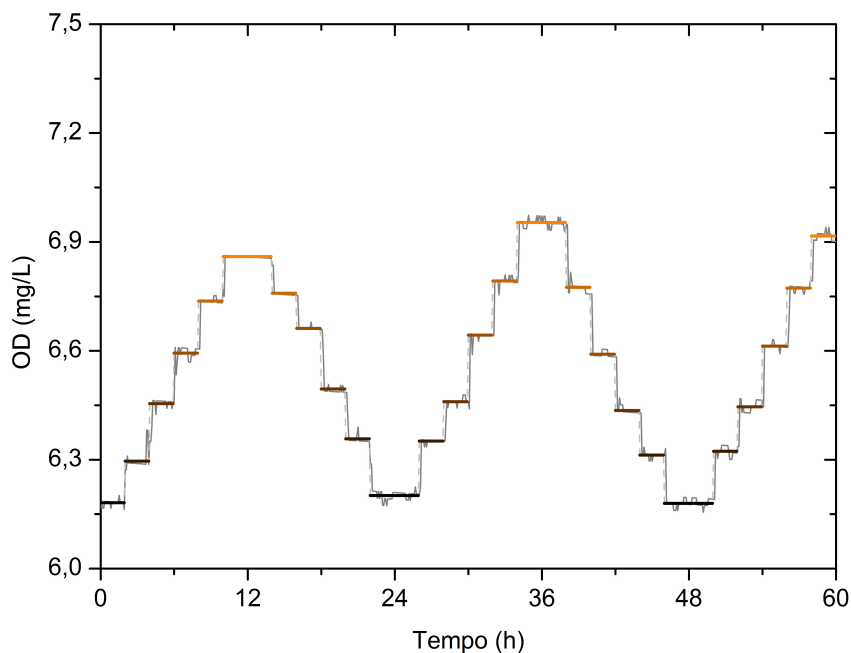


Figura 4.18: Dados experimentais (cinza) e ajustes da concentração de oxigênio dissolvido na cultura submetida ao modo *step*. Quanto maior a intensidade da luz incidente sobre a cultura, maior a concentração de O_2 dissolvido no meio líquido.

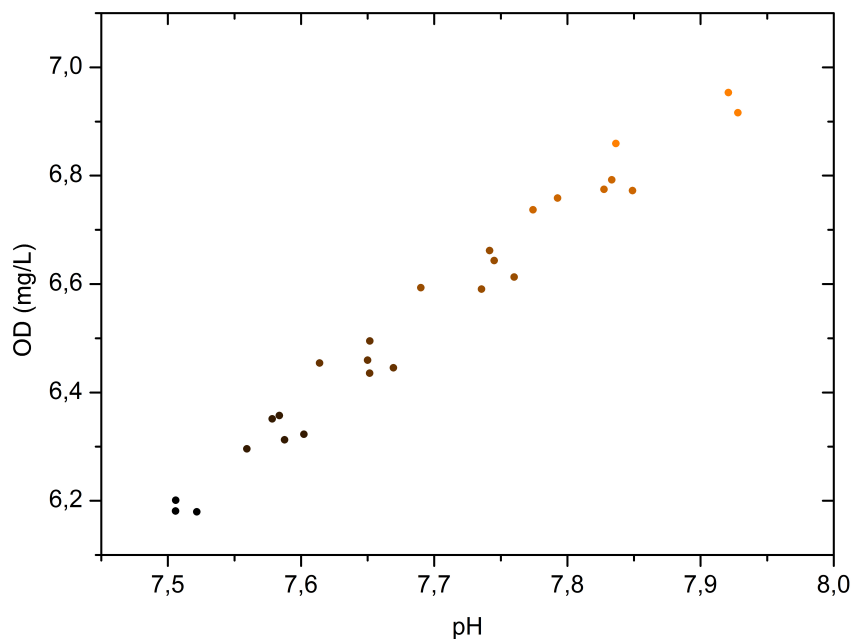


Figura 4.19: Correlação entre o pH e a concentração de oxigênio dissolvido na cultura durante o modo *step*. O equilíbrio químico do meio é definido pela potência dos LEDs.

O₂ também se estabiliza em um valor distinto a cada vez que a intensidade dos LEDs é alterada, como pode ser visto na Fig. 4.18. A dependência entre os valores de equilíbrio do pH e da concentração de oxigênio dissolvido ao longo dos ciclos com diferentes intensidades luminosas pode ser verificada a partir da Fig. 4.19.

As alterações nas concentrações gasosas em decorrência da fotossíntese em cada período luminoso ocorrem em conjunto com a multiplicação das células. A Fig. 4.20 mostra que quanto mais intensa a luz incidente sobre a cultura, mais frequentemente o sistema de diluição é acionado para que a densidade de algas permaneça constante no valor escolhido ($1,5 \times 10^7$ células/mL).

De maneira análoga ao que foi feito para o modo 12/12, podemos, a partir dos acionamentos da diluição, obter as taxas de crescimento da cultura no modo *step*. Tais taxas estão representadas na Fig. 4.21.

Para que aconteça o crescimento da cultura é necessário que ocorra a fixação de CO₂ pelas microalgas. Visto que a concentração deste gás no ar que circula pela cultura é mantida constante, é necessário que haja adição de CO₂ sempre que a cultura apresenta uma taxa de crescimento não nula. Este fato pode ser verificado a partir da contagem de acionamentos da válvula de controle de CO₂, mostrada na Fig. 4.22. Podemos ver que a

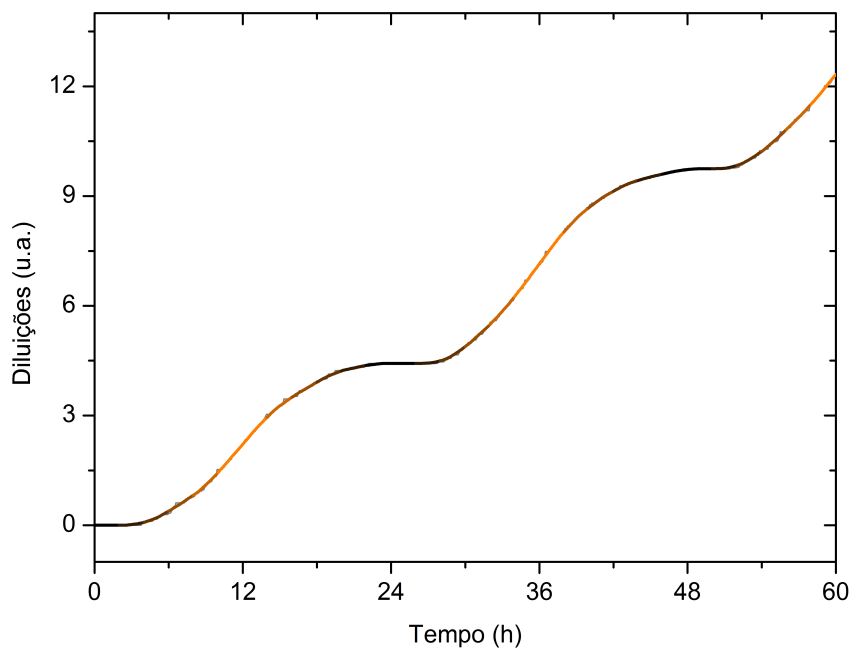


Figura 4.20: Dados experimentais (cinza) e ajustes (tons de laranja) referentes à contagem cumulativa do tempo de acionamento do sistema de diluição ao longo do experimento no modo *step*. O acionamento da diluição sempre que a densidade de células supera o valor preestabelecido ($1,5 \times 10^7$ células/mL) permite que a densidade da cultura seja mantida constante ao longo do tempo. A taxa de acionamento é proporcional a potência dos LEDs.

frequência de acionamento de tal válvula aumenta à medida que se aumenta a intensidade dos LEDs que iluminam a cultura.

As taxas com as quais o CO_2 é fixado pelas algas podem ser obtidas de maneira análoga à adotada no modo 12/12. O consumo específico de CO_2 pelas células está representado na Fig. 4.23 e sua relação com o crescimento da cultura pode ser verificada na Fig. 4.24.

A Figura 4.25 traz o quadro resumo com os principais parâmetros observados durante a dinâmica *step*.

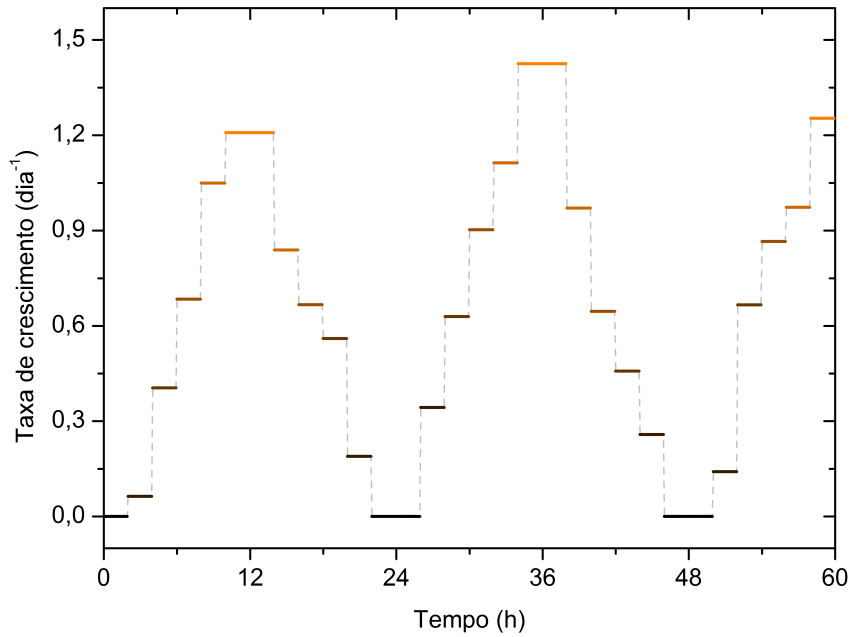


Figura 4.21: Taxa de crescimento da cultura quando submetida ao modo de iluminação *step*. Para cada potência de iluminação, as taxas de crescimento foram obtidas a partir da inclinação da reta que melhor se ajusta à contagem de diluição durante o respectivo intervalo de tempo. Nota-se que a taxa de crescimento máxima ocorre quando a luz incidente sobre a cultura é mais intensa (laranja) e nula nos períodos escuros (preto).

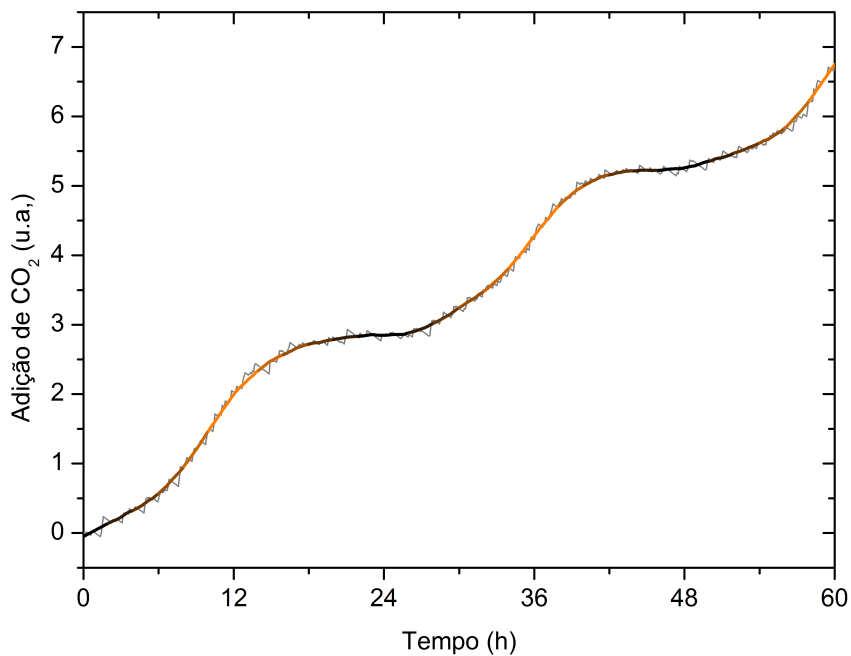


Figura 4.22: Dados experimentais (cinza) e ajustes (tons de laranja) referentes ao acionamento da válvula de adição de CO_2 ao sistema ao longo de experimento no modo *step*. Vê-se que a frequência de acionamento da válvula é proporcional a potência dos LEDs.

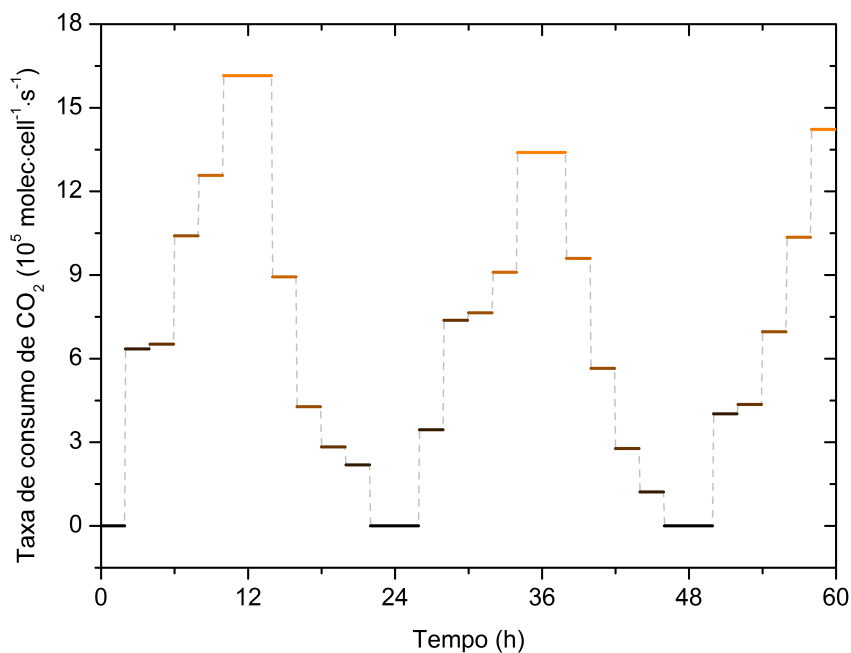


Figura 4.23: Consumo de CO₂ pela cultura durante o experimento em modo *step*. Percebe-se que a taxa de consumo é máxima durante os períodos mais claros (laranja) e nula durante os períodos escuros (preto).

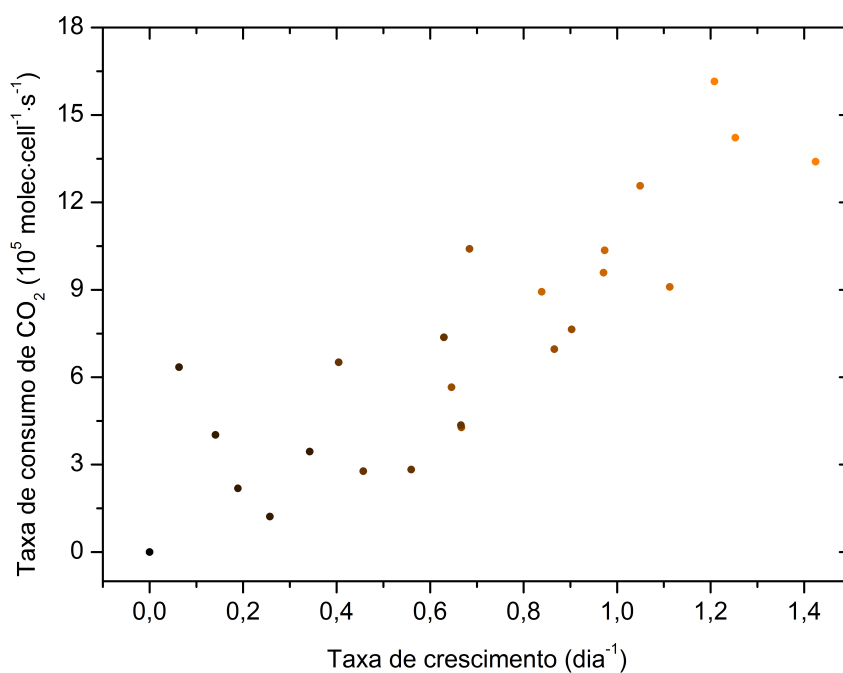


Figura 4.24: Correlação entre o consumo de CO₂ e a taxa de crescimento da cultura durante experimento em modo *step* do fotobiorreator. Conforme esperado, nos períodos mais luminosos a ocorrência da fotossíntese implica na divisão mais frequente das células e na captura das moléculas de CO₂ presentes na cultura com taxas mais elevadas. Nos períodos sem iluminação a densidade da cultura permanece constante e não há consumo de CO₂.

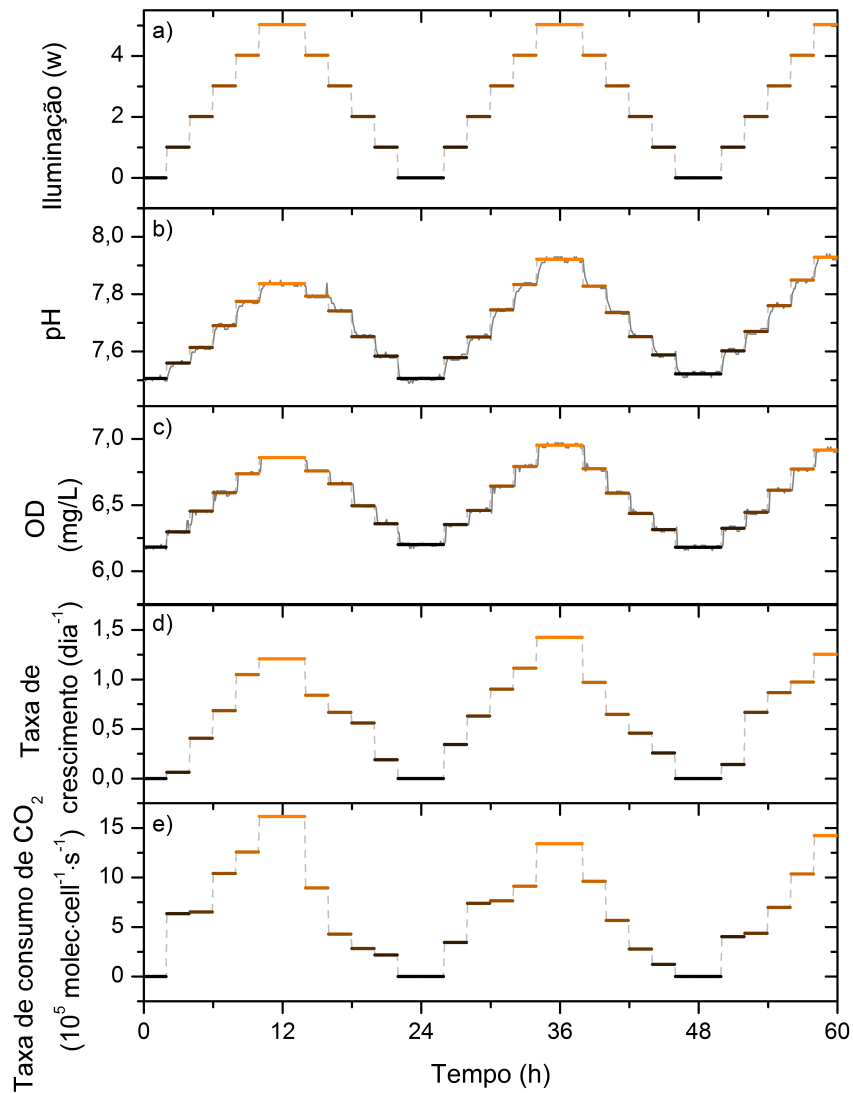


Figura 4.25: Quadro resumo com os principais parâmetros observados durante o modo *step* de funcionamento do fotobiorreator. a) Potência dos LEDs de iluminação da cultura. b) pH da cultura. c) Concentração de oxigênio dissolvido na cultura. d) Crescimento específico das células. e) Taxa de consumo de CO₂.

Dinâmica Senoidal

O último padrão de iluminação do fotobiorreator utilizado no estudo da dinâmica de crescimento das microalgas foi o modo senoidal, que impôs o ciclo de iluminação mostrado na Fig. 4.26. Diferente dos outros modos, este apresenta alterações suaves e contínuas na intensidade dos LEDs que iluminam a cultura, obedecendo uma padrão senoidal de período 24 horas.

O padrão senoidal produzido pelos LEDs foi observado também no pH da cultura, conforme pode ser verificado na Fig. 4.27. Mais uma vez, observa-se picos de pH nos instantes em que a iluminação é mais intensa, devido à menor concentração de CO_2 dissolvido na cultura.

Uma vez que a absorção de CO_2 pelas algas esta associada à liberação de O_2 no meio, é natural que o padrão observado no pH se repita nas concentrações de oxigênio dissolvido, o que pode ser confirmado a partir da Fig. 4.28. A relação entre os valores obtidos a partir dos ajustes do pH e do OD está representada na Fig. 4.29.

Visto que o CO_2 absorvido do meio é utilizado para a multiplicação das células que compõem a cultura, é esperado que a taxa de crescimento das microalgas também apre-

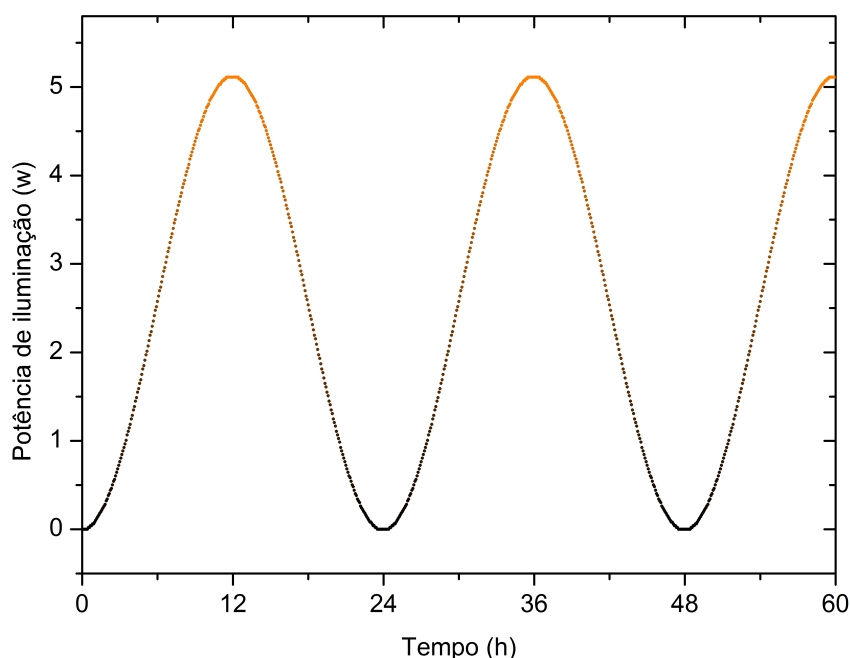


Figura 4.26: Padrão da iluminação à qual a cultura foi submetida durante o modo senoidal do fotobiorreator. Foram utilizados LEDs cujas intensidades variaram suavemente com um período de 24 horas.

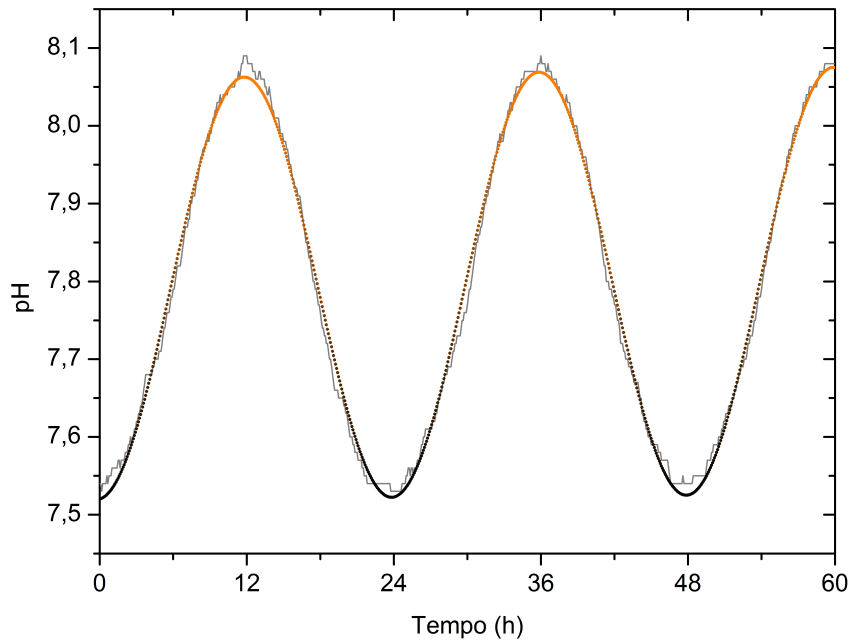


Figura 4.27: Dados experimentais (cinza) e ajuste (tons de laranja) referentes ao pH da cultura submetida ao modo de iluminação senoidal.

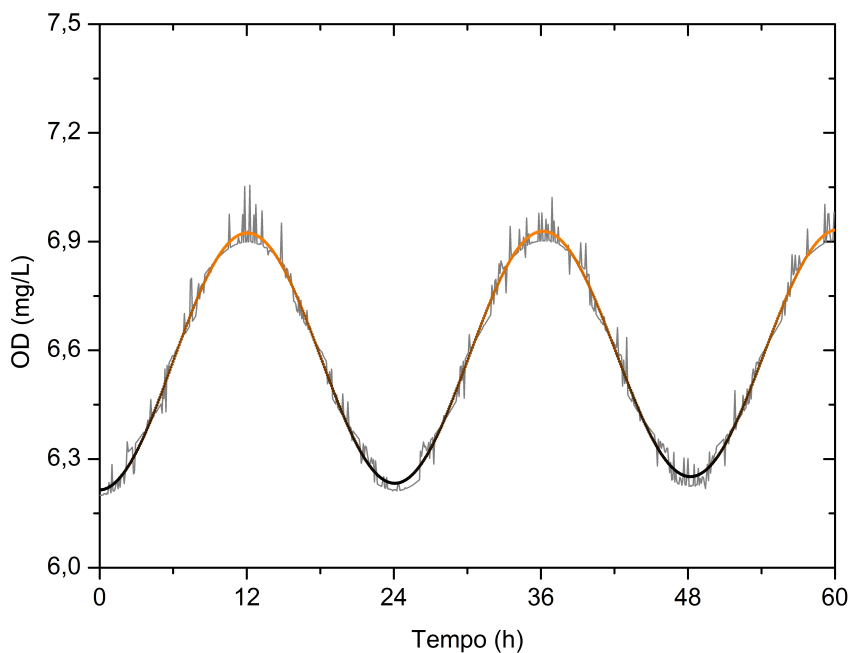


Figura 4.28: Dados experimentais (cinza) e ajuste (tons de laranja) da concentração de oxigênio dissolvido na cultura submetida ao modo de iluminação senoidal.

sente um padrão senoidal quando calculada a partir dos acionamentos do módulo de diluição do sistema (Fig. 4.30), o que pode ser verificado ao se observar a Fig. 4.31. Ao contrário do que foi observado para os demais modos de iluminação, no modo senoidal a

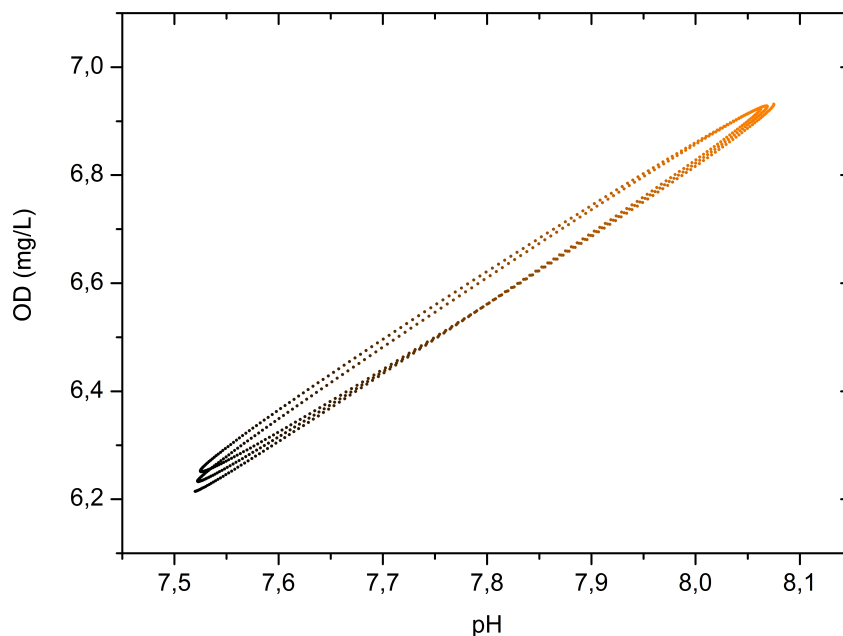


Figura 4.29: Correlação entre o pH e a concentração de oxigênio dissolvido na cultura submetida ao modo de iluminação senoidal. Pode-se ver neste caso que o equilíbrio químico do meio varia continuamente entre os extremos.

taxa de crescimento da cultura não possui valores nulos nos períodos escuros, o que pode ser entendido como um efeito do curto tempo em que as algas permanecem na ausência de luz.

Em conjunto com o crescimento das algas, ocorre o consumo de CO_2 pela cultura com uma taxa que pode ser obtida a partir da frequência de acionamento da válvula de controle de CO_2 (Fig. 4.32) e está ilustrada na Fig. 4.33. Assim como a taxa de crescimento, a taxa de consumo de CO_2 também não apresenta valores nulos neste modo de iluminação, devido ao tempo reduzido em que a cultura permanece no escuro. A dependência entre ambas estas taxas pode ser verificada na Fig. 4.33.

É mostrado, na Fig. 4.35, o quadro resumo com os principais parâmetros encontrados na dinâmica senoidal.

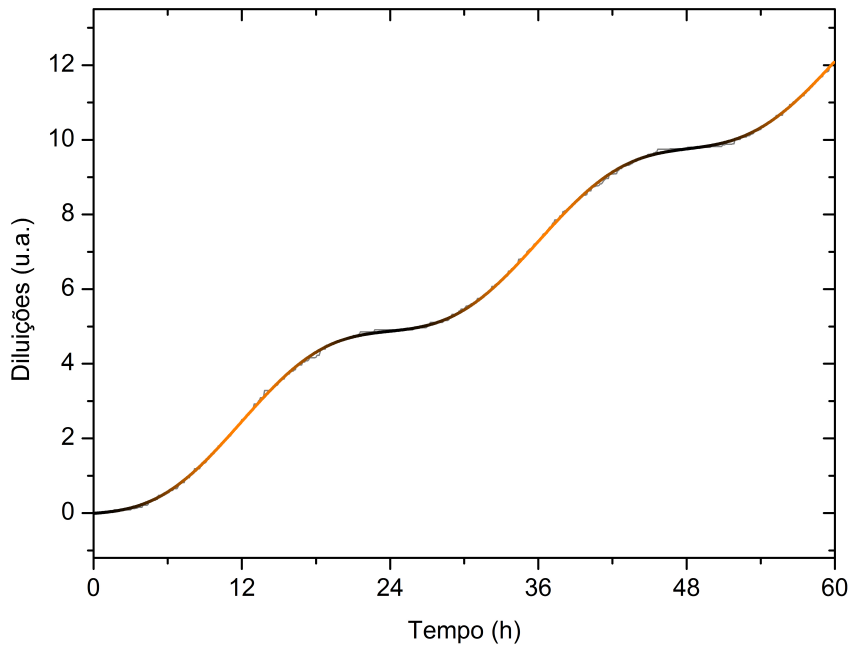


Figura 4.30: Dados experimentais (cinza) e ajuste (tons de laranja) referentes à contagem cumulativa do tempo de acionamento do sistema de diluição ao longo do experimento modo de iluminação senoidal. O acionamento da diluição sempre que a densidade de células supera o valor preestabelecido ($1,5 \times 10^7$ células/mL) permite que a densidade da cultura seja mantida constante indefinidamente. A taxa de acionamento é proporcional à potência dos LEDs

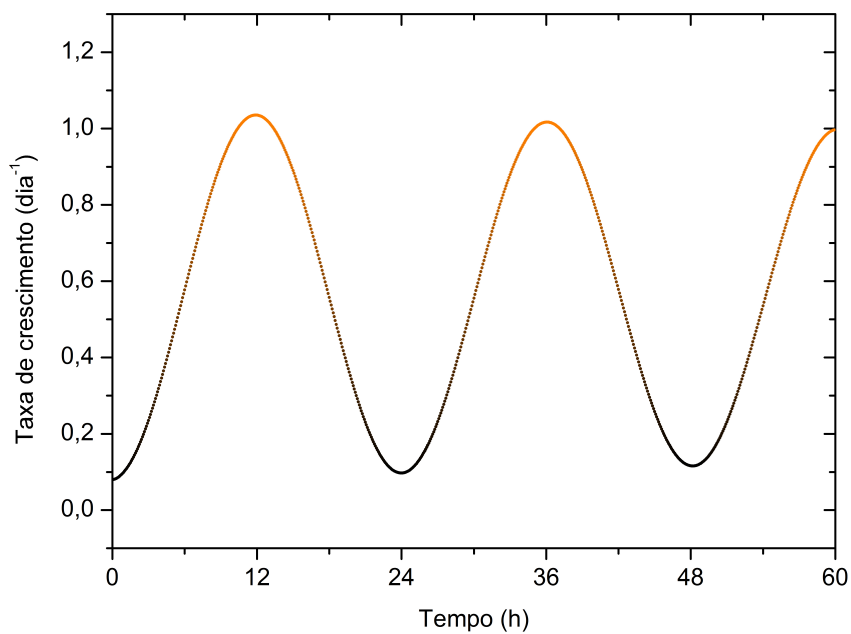


Figura 4.31: Taxa de crescimento da cultura quando submetida ao modo de iluminação senoidal, obtida a partir da derivada da curva mostrada na Fig. 4.30.

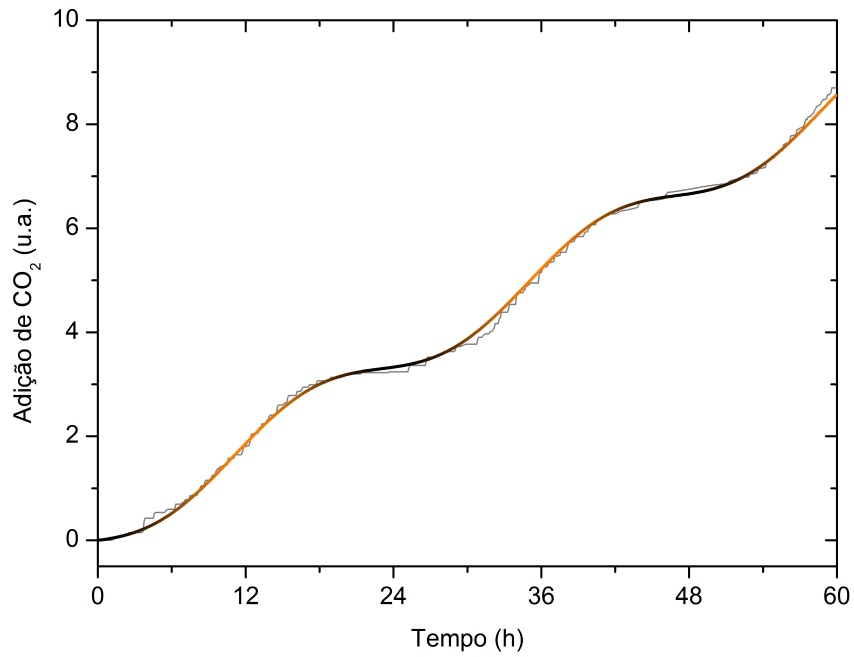


Figura 4.32: Dados experimentais (cinza) e ajustes (tons de laranja) referentes ao acionamento da válvula de adição de CO₂ ao sistema ao longo de experimento no modo de iluminação senoidal.

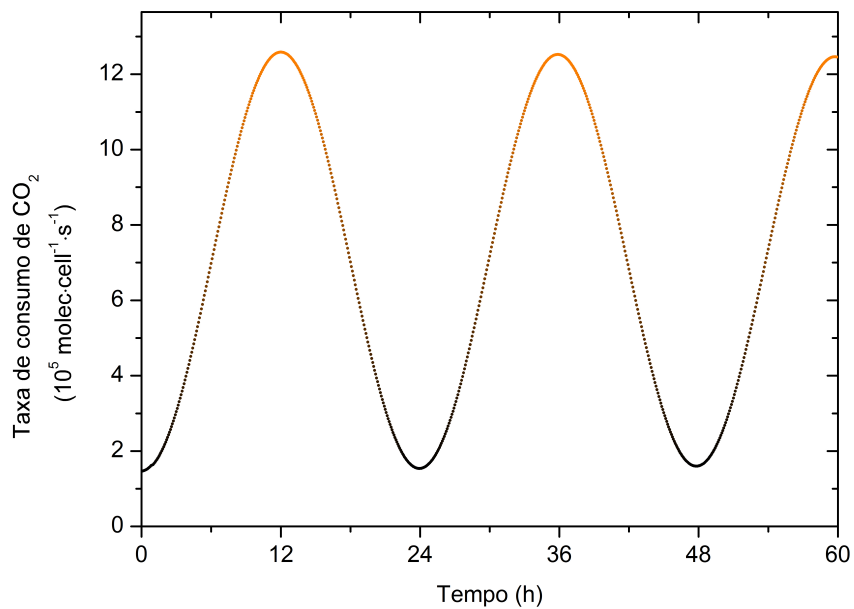


Figura 4.33: Consumo de CO₂ da cultura obtido a partir dos ajustes referentes ao acionamento da válvula de injeção de CO₂ (Fig. 4.32) durante o experimento no modo de iluminação senoidal.

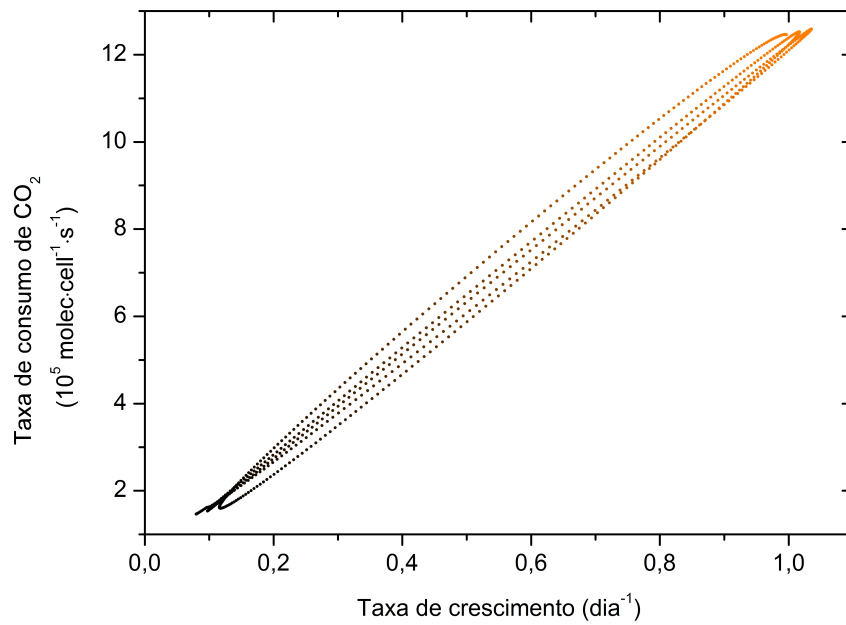


Figura 4.34: Correlação entre o consumo de CO₂ e a taxa de crescimento da cultura no modo de iluminação senoidal.

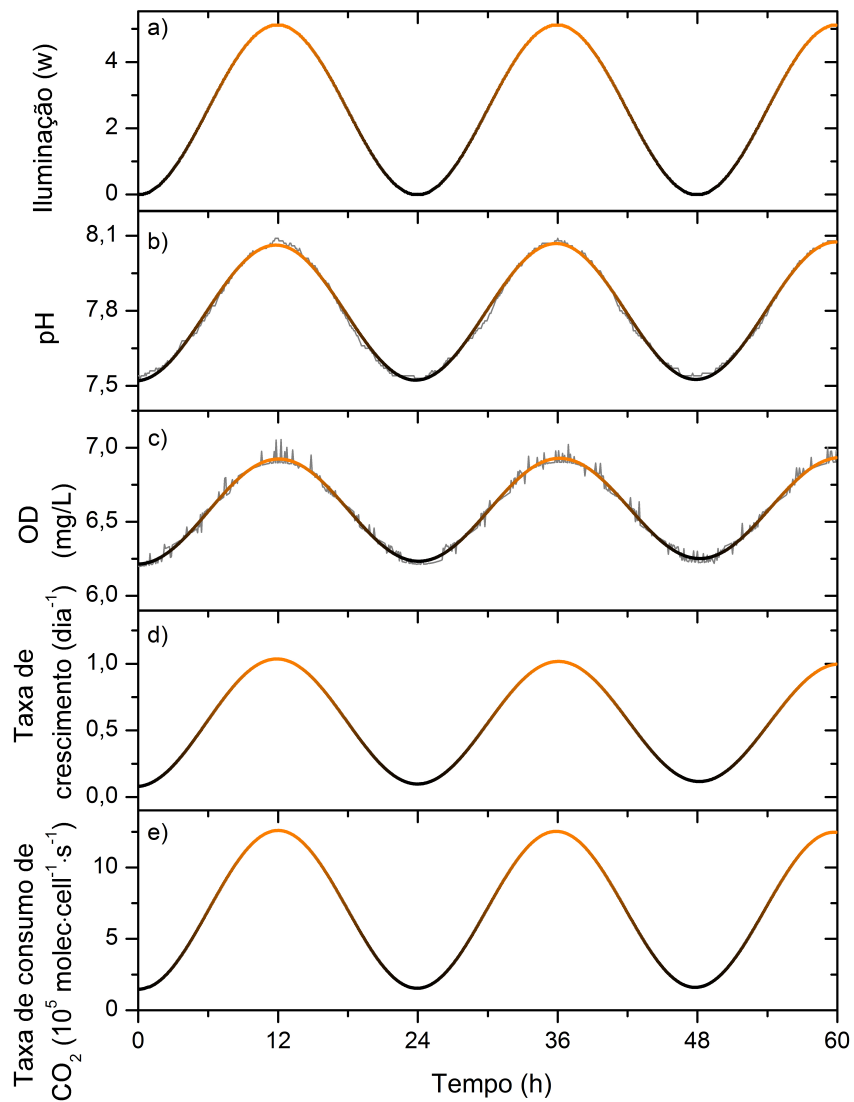


Figura 4.35: Quadro resumo com os principais parâmetros observados durante o modo de iluminação senoidal. a) Potência dos LEDs de iluminação da cultura. b) pH da cultura. c) Concentração de oxigênio dissolvido na cultura. d) Crescimento específico das células. e) Taxa de consumo de CO₂.

4.2.3 Efeitos conjuntos da temperatura e da luz

Para buscar um melhor entendimento do crescimento da cultura em um regime com iluminação periódica em diferentes temperaturas, foi realizado um experimento em que as variações impostas aos LEDs que iluminam as microalgas foram associadas às variações de temperatura. Tal experimento foi conduzido no modo senoidal de iluminação e com alterações de temperatura que eram realizadas a cada dois dias. Com o objetivo de se observar possíveis efeitos de foto-inibição, além dos LEDs brancos que já haviam sido utilizados nos experimentos anteriores, foi introduzido também o conjunto de LEDs otimizados para a fotossíntese, cujos picos de emissão correspondem às regiões do espectro com maior absorção pela clorofila.

Inicialmente as microalgas foram aclimatadas no fotobiorreator a 25°C e, ao longo do experimento, a temperatura do sistema foi reduzida até 5°C e então elevada novamente até a temperatura inicial. Tanto durante o resfriamento como durante o aquecimento das microalgas, as variações de temperatura foram sempre de 5°C. Foi possível observar que, com a adição dos novos LEDs otimizados para a fotossíntese, o pico de crescimento apresentou, em vários dos dias, valores superiores aos apresentados no experimento anterior com o modo senoidal de iluminação. Além disso, o instante no qual ocorreu o crescimento máximo da cultura foi sempre anterior ao pico de iluminação, o que indica que a foto-inibição foi atingida. Após atingir o crescimento máximo, a cultura não repete o seu comportamento na segunda metade do dia, quando as potências de iluminação se repetem. Isto sugere que as microalgas demoram a se recuperar após a foto-inibição.

Ao se comparar as taxas de crescimento da cultura a uma mesma temperatura durante o resfriamento e posteriormente durante o aquecimento do sistema, essas não se mostraram equivalentes. Tal resultado sugere a existência de uma memória no sistema, ou seja, o que determina o comportamento da cultura em um dado estado não é apenas o conjunto de variáveis que caracterizam tal estado, mas sim o histórico dessas variáveis ao longo do tempo. A Figura 4.36 ilustra a taxa de crescimento ao longo de um dia para as diferentes temperaturas estudadas.

Na Figura 4.37 pode-se observar o comportamento da taxa de crescimento das microalgas em função da potência luminosa aplicada. Esta figura evidencia a histerese observada na cultura devido à ocorrência de foto-inibição no sistema.

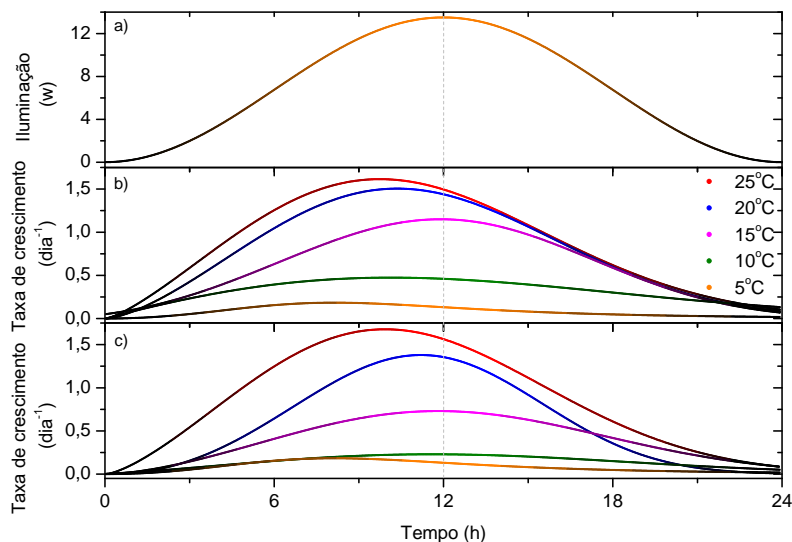


Figura 4.36: a) Padrão de iluminação imposto às algas a cada dia. b) Taxas de crescimento obtidas durante os primeiros dias do experimento, enquanto a cultura era resfriada. c) Taxas de crescimento obtidas durante os dias em que a temperatura da cultura foi elevada.

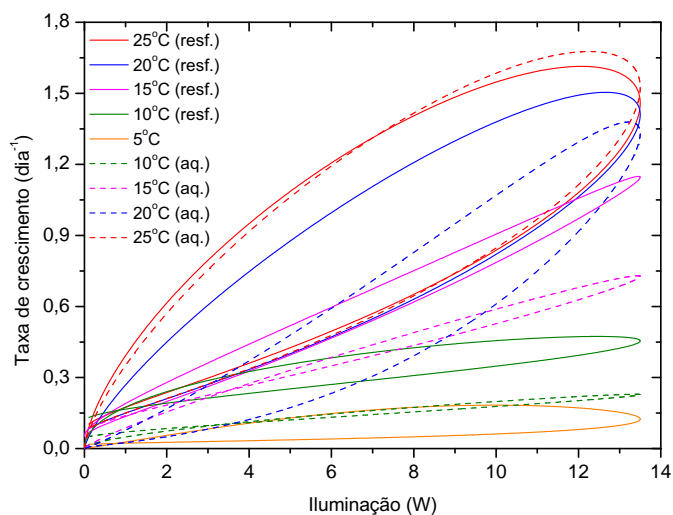


Figura 4.37: Taxa de crescimento da cultura em função da potência luminosa em diferentes temperaturas estudadas. Percebe-se, em cada curva, que o comportamento das microalgas foi diferente durante os períodos de “amanhecer” e “anoitecer” do dia.

4.3 Variações no espectro de absorção

O espectro de absorção de uma cultura de microalgas num dado instante pode ser representado como a soma das contribuições dos diferentes pigmentos opticamente ativos presentes no interior das células:

$$A(\lambda, t) = C_{\text{chl}}(t)A_{\text{chl}}(\lambda) + C_{\text{car}}(t)A_{\text{car}}(\lambda) + C_0(t)A_0(\lambda), \quad (4.1)$$

onde A_{chl} e A_{car} representam o espectro de absorção da clorofila-a e dos carotenoides, respectivamente, e A_0 representa as demais contribuições para o espectro. Cada uma destas contribuições pode ser descrita como um pacote composto por uma combinação linear de Gaussianas

$$A_\alpha(\lambda) = \sum_i a_{\alpha i} e^{-\frac{1}{2} \left(\frac{\lambda - \lambda_{\alpha i}}{w_{\alpha i}} \right)^2}, \quad (4.2)$$

onde α corresponde a *chl*, *car* ou *0*. Os valores de $a_{\alpha i}$, $\lambda_{\alpha i}$ e $w_{\alpha i}$ encontrados para descrever o espectro de absorção da *Nannochloropsis Oceanica* estão representados na Tabela 4.1. Os coeficientes $C_\alpha(t)$ podem apresentar variações ao longo do tempo e fornecem, para cada instante, a contribuição de cada componente α .

Durante diversos dias, uma cultura de um litro de *Nannochloropsis Oceanica* foi submetida a um regime de iluminação de 12 horas de claro e 12 horas de escuro enquanto parâmetros como temperatura, densidade e salinidade foram mantidos constantes

Tabela 4.1: Parâmetros do espectro de absorção da *Nannochloropsis* de acordo com as equações 4.1 e 4.2.

	a	λ (nm)	w (nm)
chl	0.731	431.4	23.5
	0.324	443.1	12.4
	0.092	584.8	12.6
	0.209	626.1	16.9
	0.682	675.5	11.8
	0.309	685.7	7.2
	0.045	699.7	5.8
car	0.432	464.5	9.4
	0.946	485.1	13.9
0	0.442	505.5	12.4
	0.569	512.3	32.3

($10^7 \pm 10^5$ cels/mL, $25,0 \pm 0,1$ °C e 30 ± 1 ppt, respectivamente). A cada cinco minutos, além dos parâmetros já tratados nas seções anteriores, foi obtido também o espectro de absorção da cultura. Para que este fosse encontrado, foram utilizadas a transmitância de luz em comprimentos de onda de 400 a 700 nm (com resolução de 0,5 nm) e a lei de Lambert-Beer (eq. 3.5). O espectro médio obtido ao longo dos três últimos dias do experimento pode ser observado na Figura 4.38 e corresponde à combinação linear de pacotes descritos pela Eq. 4.2.

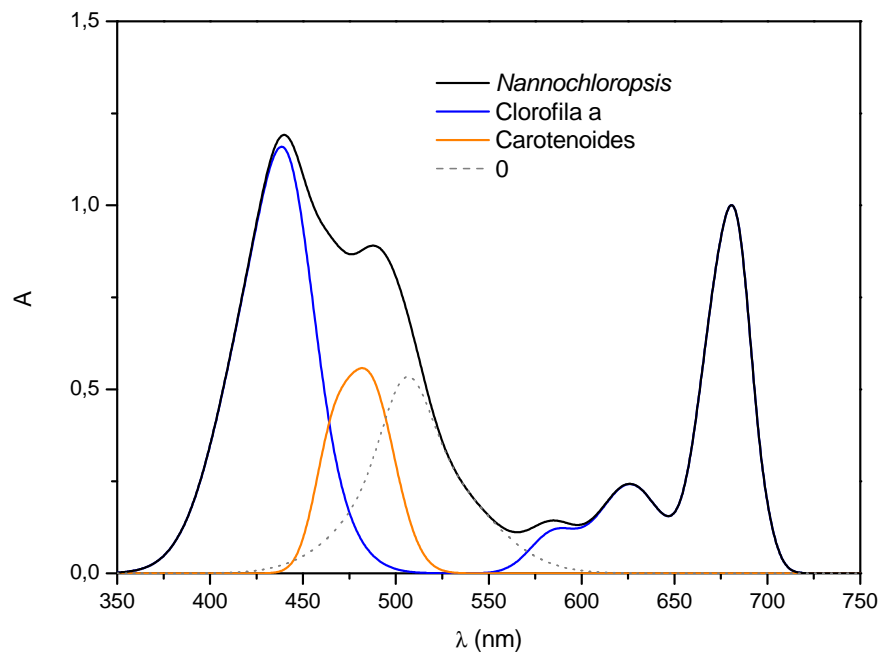


Figura 4.38: Espectro de absorção médio obtido para algas *Nannochloropsis* ao longo dos três últimos dias submetidas ao regime claro/escuro de 12 horas. Além do espectro total de absorção, estão representadas também as contribuições específicas de cada componente.

Com o auxílio de um algoritmo de ajuste, os coeficientes $C_{chl}(t)$, $C_{car}(t)$ e $C_0(t)$ contidos na Eq. 4.1 foram encontrados para descrever o espectro de absorção da cultura (obtido pela Equação 3.5) em cada instante. A Figura 4.39a compara uma das curvas ajustadas e seus respectivos dados experimentais e mostra um bom acordo entre ambos. Na Figura 4.39b estão sobrepostos todos os espectros obtidos durante as últimas 72 horas do experimento. É possível observar que a região em torno do pico de absorção dos carotenoides foi a única a exibir variações significativas ao longo do tempo.

Enquanto C_{chl} , e C_0 permaneceram constantes com os valores iguais a 1,16 e 0,53 respectivamente, C_{car} apresentou um padrão oscilatório centrado em 0,55. A Figura 4.38 ilustra este modelo aplicado ao espectro de absorção da *Nannochloropsis Oceanica* e aos seus componentes. Esta representação se mostra muito semelhante a outras utilizadas na literatura para representar a absorção de *Nannochloropsis sp.* [25] e *Nannochloropsis Salina* [26].

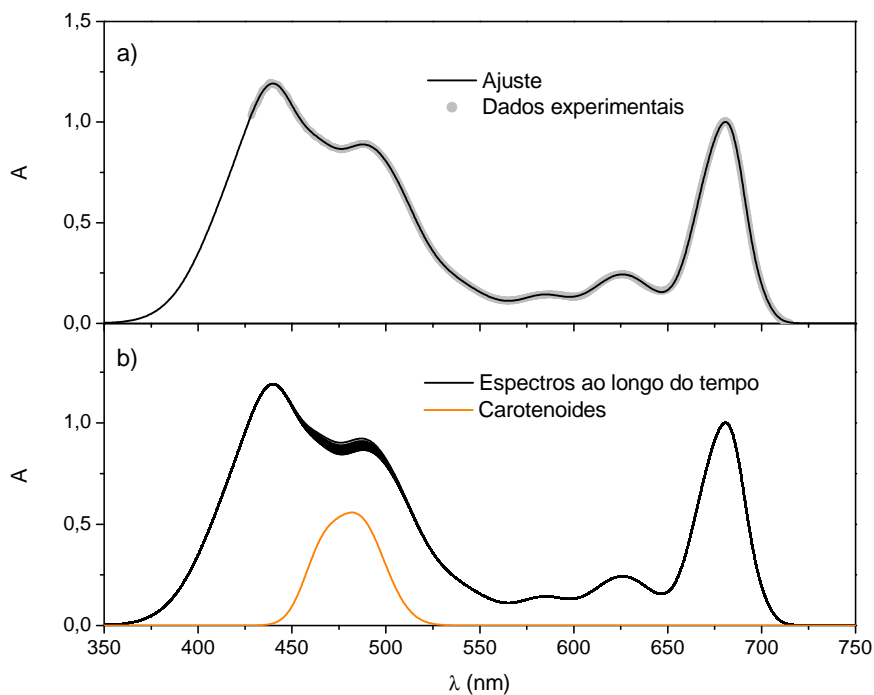


Figura 4.39: a) Exemplo de espectro de absorção obtido com a Eq. 3.4 e sua respectiva representação analítica (Eq. 4.1). A exemplo do espectro ilustrado, para os demais também foram encontradas boas representações analíticas, com forte concordância entre ajustes e dados experimentais. b) Sobreposição de todos os espectros obtidos ao longo das 72 horas finais do experimento (em preto). É possível observar que a única região com alterações significativas se encontra no pico de absorção dos carotenoides (em laranja).

As alterações observadas na atividade óptica dos carotenoides em relação à clorofila-a podem ser melhor entendidas a partir da análise dos valores dos coeficientes $C_{chl}(t)$, $C_{car}(t)$ e $C_0(t)$. Enquanto C_{chl} e C_0 permaneceram constantes ao longo do tempo, C_{car} apresentou um padrão oscilatório. Na Figura 4.40 é possível ver que tal padrão segue a dinâmica de crescimento da cultura associada aos ciclos 12/12 de claro/escuro. Nesta, o

painel superior evidencia que a ocorrência da fotossíntese e da respiração das microalgas leva o pH e o oxigênio dissolvido na cultura a terem valores de equilíbrio distintos durante os períodos claros e escuros. O painel central, por sua vez, ilustra a manutenção da densidade constante da cultura a partir de acionamentos da diluição do sistema, que ocorria frequentemente durante os períodos claros e praticamente não ocorria enquanto a cultura era mantida no escuro. Finalmente, o painel inferior ilustra um comportamento circadiano na atividade óptica dos carotenoides. O padrão obtido possui uma fase de aproximadamente duas horas em relação aos ciclos claro/escuro.

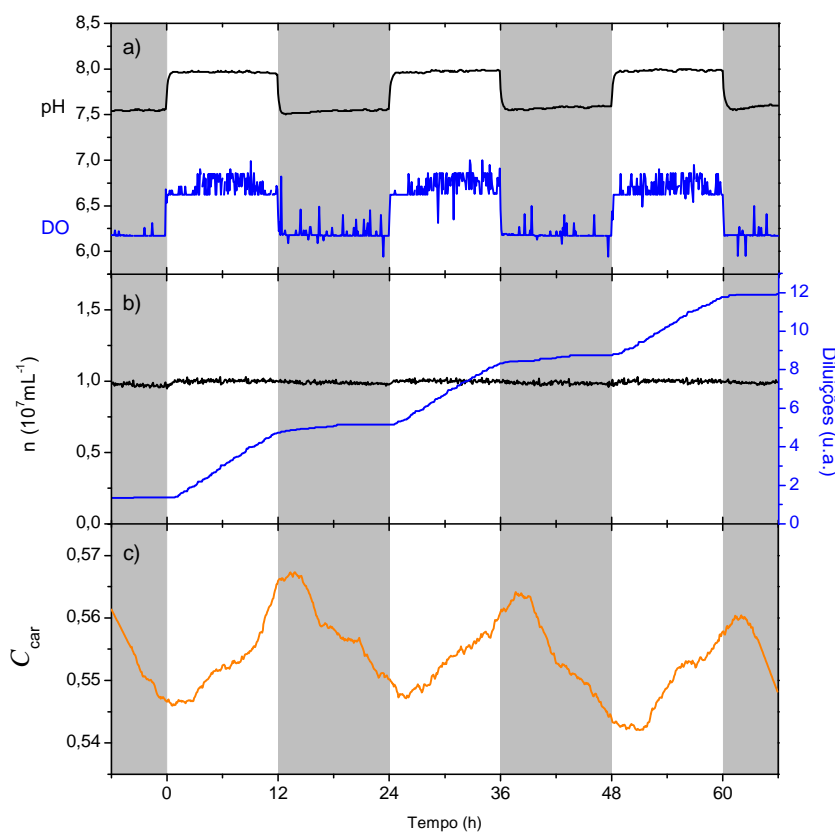


Figura 4.40: Padrões circadianos associados ao ciclo 12/12 de claro/escuro. a) Valores do pH e da concentração de oxigênio dissolvido na cultura. b) Densidade das algas mantida constante por acionamentos do módulo de diluição do fotobiorreator. c) Comportamento circadiano da atividade óptica dos carotenoides.

O exato mecanismo causador deste padrão ainda merece investigações mais detalhadas mas, ainda assim, algumas considerações podem ser feitas a partir dos resultados obtidos.

Caso fossem observadas variações no comportamento dos carotenoides de maneira absoluta, mas não em respeito à clorofila-a, o padrão oscilatório poderia sugerir alterações no tamanho das células devido à divisão celular ou no índice de refração do meio intracelular. Porém o fato de que a contribuição da clorofila-a para os espectros foi mantida constante garante que as alterações observadas provém não de alterações gerais das células, mas das concentrações relativas entre estes pigmentos fotossintetizantes.

Capítulo 5

Discussões e Perspectivas Futuras

Ao longo deste trabalho foram planejados, construídos e testados três protótipos distintos de fotobiorreatores automatizados. A cada nova versão se buscou mais robustez, facilidade de manutenção e precisão no controle dos parâmetros que condicionam o desenvolvimento das microalgas. Com isso, se alcançou um aparato experimental robusto, que opera de maneira facilmente configurável e que permite a obtenção de dados precisos e reproduzíveis.

O aparato foi utilizado no estudo da dinâmica de crescimento da microalga *Nannochloropsis oceanica*. Este dispositivo, junto com a metodologia desenvolvida, permitiu o estudo qualitativo e quantitativo da dinâmica de crescimento da cultura através de várias medidas distintas, todas correlacionadas entre si e de acordo com o esperado. Especificamente, o aparato permitiu que a dinâmica de crescimento da cultura fosse registrada através 1) da variação na densidade de microalgas na cultura, 2) da variação no equilíbrio químico (pH e OD) no meio de cultura e 3) da taxa de consumo de CO₂ presente no ar que circula pela cultura. Ficou claro que essas variações são definidas pela modulação da luz incidente na cultura e dependem da temperatura.

Foi detectada uma histerese nas taxas de crescimento medidas em função da intensidade da luz incidente. Isso ocorre apenas quando a luz incidente atinge um certo valor elevado, capaz de causar a foto-inibição nas microalgas. Este comportamento sugere que a dinâmica de crescimento da cultura é complexa e não depende apenas dos parâmetros instantâneos que caracterizam o estado em que as algas se encontram, e sim de como esses parâmetros evoluíram ao longo do tempo. Desta forma, modelos que descrevem o cres-

cimento da cultura apenas em função da luz e da temperatura instantânea no ambiente são limitados.

Além de proporcionar o estudo da dinâmica de crescimento da cultura, o aparato desenvolvido foi capaz de evidenciar a existência de uma dinâmica interna nas microalgas. Essa dinâmica ficou clara a partir das variações no espectro de absorção das microalgas associada com a modulação da luz. A partir da decomposição do espectro nas suas componentes associadas aos pigmentos ativos, foi possível medir que a concentração de carotenoides varia de acordo com a modulação da luz incidente. A capacidade de medir *in vivo* esse tipo de fenômeno constitui uma valiosa ferramenta de monitoramento não destrutivo da conversão energética realizada pela fotossíntese nas microalgas.

O entendimento completo da dinâmica de crescimento de microalgas é um problema complexo e envolve um grande número de parâmetros, com muitos fatores que ainda merecem ser investigados, dentre eles:

- Estudo do crescimento da cultura em função do espectro de iluminação.
- Análise do crescimento em função de diferentes concentrações moleculares no ar que circula na amostra.
- Desenvolvimento de teorias físicas capazes de explicar o funcionamento de organismos fotossintetizantes.
- Investigação de possíveis efeitos associados a memória fotoquímica na microalgas.
- Consequências cibernéticas na interação entre fotobiorreator (hardware+software) e cultura de microalgas.
- Uso de fotobiorreatores como ferramentas capazes de realizar evolução adaptativa de laboratório de forma automatizada.

Atualmente estes estudos estão em fase de planejamento e devem ser iniciados em breve. Eles serão realizados em versões melhoradas do aparato experimental. Especificamente, nessas novas versões haverá um painel de iluminação cujo espectro emitido será controlável a partir de 20 fontes individuais com comprimentos de onda entre 400 e 700 nm. Além disso, um espectrômetro de massa será acoplado ao reservatório de ar.

Com ele será possível preparar um ar com diferentes concentrações moleculares e verificar como isso afeta a dinâmica de crescimento da cultura e as trocas gasosas realizadas pelas microalgas.

O Fotobiorreator desenvolvido neste trabalho permite o estudo quantitativo da dinâmica de crescimento de microalgas. Essa dinâmica está intrinsecamente associada a conservação de energia e matéria no sistema e essas leis de conservação são a base de qualquer teoria física, em particular a termodinâmica. Dessa forma, os experimentos que podem ser realizados com esse aparato fornecem a base experimental para qualquer teoria física sobre o funcionamento de organismos fotossintetizantes, em particular, as microalgas.

Durante o desenvolvimento desta tese, entre teste e experimentos que deram errado e experimentos que deram certo, foram acumuladas algumas milhares de horas de funcionamento de fotobiorreatores em diversas circunstâncias. Em alguns casos específicos, os resultados da dinâmica de crescimento evidenciou a existência de uma memória fotoquímica no sistema. Isso acontece, por exemplo, quando o padrão de iluminação da cultura muda de forma repentina. Nesses casos é possível identificar que resquícios do padrão antigo continuam presentes na nova dinâmica de crescimento. Mais especificamente, é possível notar que se a hora do “pôr do sol” é propositalmente atrasada, a taxa de crescimento medida durante o atraso é menor do que a taxa de crescimento medida ao longo do dia original. Além disso, foi visto que o padrão de oscilação encontrado no espectro de absorção da cultura permanece ativo mesmo após a modulação 12/12 na iluminação ser alterado. Isso indica que, as microalgas após serem sincronizadas em um dado padrão de iluminação, desenvolvem uma memória fotoquímica, associada com aquele ciclo circadiano. Atualmente estão sendo preparados experimentos para que esse fenômeno seja confirmado de forma clara e definitiva.

Os fotobiorreatores desenvolvidos neste trabalho são dispositivos mecatrônicos, ou seja, reatores robóticos com um software de controle programável que estabelece relações entre sensores e atuadores. Atualmente esses sistemas vêm sendo utilizados como uma plataforma de controle gerida por um usuário (local ou remoto) ou programada para ser autônoma, de acordo com regras pré-definidas. O próximo passo será equipar o aparato com uma heurística de inteligência artificial que dê ao reator a habilidade de perceber, aprender, buscar, planejar e otimizar. Nesse contexto, o reator poderia não apenas guiar a

evolução da cultura, mas evoluir junto com ela. Esse tipo de sistema poderia em princípio evoluir como um sistema dinâmico com o objetivo de obter o maior potencial energético proveniente das microalgas.

Referências Bibliográficas

- [1] E. Rabinowitch and Govindjee, *Photosynthesis*. Wiley, 1969.
- [2] N. Nelson and A. Ben-Shem, “The complex architecture of oxygenic photosynthesis,” *Nature Reviews*, vol. 5, 2004.
- [3] N. Nelson, “Photosystems and global effects of oxygenic photosynthesis,” *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1807, p. 856, 2013.
- [4] N. Nelson, “Evolution of photosystem I and the control of global enthalpy in an oxidizing world,” *Photosynth. Res.*, vol. 116, p. 145, 2013.
- [5] S. A. Crowe, L. N. Døssing, N. J. Beukes, M. Bau, S. J. Kruger, R. Frei, and D. E. Canfield, “Atmospheric oxygenation three billion years ago,” *Nature*, vol. 501, p. 535, 2013.
- [6] L. Barsanti and P. Gualtieri, *Algae: Anatomy, Biochemistry and Biotechnology*. CRC Press, 2006.
- [7] D. G. Boyce, M. R. Lewis, and B. Worm, “Global phytoplankton over the past century,” *Nature*, vol. 466, p. 591, 2010.
- [8] E. E. M. Luiten, I. Akkerman, A. Koulman, P. Kamermans, H. Reith, M. J. Barbosa, D. Sipkema, and R. H. Wijffels, “Realizing the promises of marine biotechnology,” *Biomol. Eng.*, vol. 20, p. 429, 2003.
- [9] “National alliance for advanced biofuels and bioproducts ,” tech. rep., U.S. Department of Energy, 2014.
- [10] K. H. C. et at., “Metabolites from algae with economical impact,” *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.*, vol. 146, p. 60, 2007.

- [11] R. Kandilian, E. Lee, and L. Pilon, "Radiation and optical properties of *Nannochloropsis oculata* grown under different irradiances and spectra," *Bioresour. Technol.*, vol. 137, p. 63, 2013.
- [12] A. Solovchenko, I. Khozin-Goldberg, L. Recht, and S. Boussiba, "Stress-induced changes in optical properties, pigment and fatty acid content of *Nannochloropsis* sp.: Implications for non-destructive assay of total fatty acids," *Mar. Biotechnol.*, vol. 13, p. 527, 2011.
- [13] O. Kilian, C. S. E. Benemann, K. K. Niyogi, and B. Vick, "High-efficiency homologous recombination in the oil-producing alga *Nannochloropsis* sp.," *PNAS*, vol. 108, p. 21265, 2011.
- [14] R. Radakovits, R. E. Jinkerson, S. I. Fuerstenberg, H. Tae, R. E. Settlage, J. L. Boore, and M. C. Posewitz, "Draft genome sequence and genetic transformation of the oleaginous alga *Nannochloropsis gaditana*," *Nat. Commun.*, vol. 3, p. 686, 2012.
- [15] G. C. Zittelli, F. Lavista, A. Bastianini, L. R. L, M. Vincenzini, and M. R. Tredici, "Production of eicosapentaenoic acid by *Nannochloropsis* sp. cultures in outdoor tubular photobioreactors," *J. Biotechnol.*, vol. 70, p. 299, 1999.
- [16] L. Rodolfi, G. C. Zittelli, N. Bassi, G. Padovani, N. Biondi, G. Bonini, and M. R. Tredici, "Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 102, p. 100, 2009.
- [17] L. Gouveia and A. C. Oliveira, "Microalgae as a raw material for biofuels production," *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 26, p. 269, 2009.
- [18] R. Huerlimann, R. Nys, and K. Heimann, "Growth, lipid content, productivity, and fatty acid composition of tropical microalgae for scale-up production," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 107, p. 245, 2010.
- [19] T. M. Mata, A. A. Martins, and N. S. Caetano, "Microalgae for biodiesel production and other applications: A review," *Renew. Sust. Energ. Rev.*, vol. 14, p. 217, 2010.

- [20] M. Koberg, M. Cohen, A. Ben-Amotz, and A. Gedanken, “Bio-diesel production directly from the microalgae biomass of *Nannochloropsis* by microwave and ultrasound radiation,” *Bioresource Technology*, vol. 102, p. 4265, 2011.
- [21] E. Kazamia, D. C. Aldridge, and A. G. Smith, “Synthetic ecology - a way forward for sustainable algal biofuel production?,” vol. 162, p. 163, 2012.
- [22] K. P. Fawley and M. W. Fawley, “Observations on the diversity and ecology of freshwater *Nannochloropsis* (Eustigmatophyceae), with descriptions of new taxa,” *Protist*, vol. 158, p. 325, 2007.
- [23] D. Wang *et al.*, “*Nannochloropsis* genomes reveal evolution of microalgal oleaginous traits,” *PLoS Genetics*, vol. 10, p. 1, 2014.
- [24] A. Vieler *et al.*, “Genome, functional gene annotation, and nuclear transformation of the heterokont oleaginous alga *Nannochloropsis oceanica* CCMP1779,” *PLoS Genetics*, vol. 8, p. 11, 2014.
- [25] A. A. Gitelson, Y. A. Grits, D. Etzion, Z. Ning, and A. Richmond, “Optical properties of *Nannochloropsis* sp and their application to remote estimation of cell mass,” *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 69, p. 516, 2000.
- [26] T. A. Reichardt, A. M. Collins, O. F. Garcia, A. M. Ruffing, H. D. T. Jones, and J. A. Timlin, “Spectroradiometric monitoring of *Nannochloropsis salina* growth,” *Algal Res.*, vol. 1, p. 22, 2012.
- [27] D. Pal, I. Khozin-Goldberg, Z. Cohen, and S. Boussiba, “The effect of light, salinity, and nitrogen availability on lipid production by *Nannochloropsis* sp.,” vol. 90, p. 1424, 2011.
- [28] S. Basso, D. Simionato, C. Gerotto, A. Segalla, G. M. Giacometti, and T. Morosinotto, “Characterization of the photosynthetic apparatus of the Eustigmatophycean *Nannochloropsis gaditana*: Evidence of convergent evolution in the supramolecular organization of photosystem I,” *Biochim Biophys Acta*, vol. 1837, p. 306, 2014.

- [29] E. Forjan, I. Garbayo, M. Henriques, J. Rocha, J. M. Vega, and C. Vilchez, “UV-A mediated modulation of photosynthetic efficiency, xanthophyll cycle and fatty acid production of *Nannochloropsis*,” *Mar Biotechnol*, vol. 13, p. 366, 2011.
- [30] L. M. Lubian, O. Montero, I. Moreno-Garrido, I. E. Huertas, C. Sobrino, M. G. del Valle, and G. Pares, “*Nannochloropsis* (Eustigmatophyceae) as source of commercially valuable pigments,” *J. Appl. Phycol.*, vol. 12, p. 249, 2000.
- [31] J. S. Brown, “Functional organization of chlorophyll a and carotenoids in the alga, *Nannochloropsis salina*,” *Plant Physiol.*, vol. 83, p. 434, 1987.
- [32] R. C. Forzza *et al.*, “New Brazilian floristic list highlights conservation challenges,” *Bioscience*, vol. 62, p. 39, 2012.
- [33] S. O. Lourenço and A. A. H. Vieira, “Culture collections of microalgae in Brazil: progress and constraints,” *Nova Hedwigia*, vol. 79, p. 149, 2004.
- [34] S. I. I. A. Hadi, H. Santana, P. P. M. Brunale, T. G. Gomes, M. D. Oliveira, A. Matthiensen, M. E. C. Oliveira, F. C. P. Silva, and B. S. A. F. Brasil, “DNA barcoding green microalgae isolated from neotropical inland waters,” *PLoS ONE*, vol. 11, p. 2, 2016.
- [35] B. S. A. F. Brasil, F. C. P. Silva, and F. G. Siqueira, “Microalgae biorefineries: The Brazilian scenario in perspective,” *N. Biotechnol*, vol. 39, p. 90, 2017.
- [36] I. A. N. *et al.*, “Screening microalgae strains for biodiesel production: lipid productivity and estimation of fuel quality based on fatty-acids profiles as selective criteria,” *Bioenergy Res.*, vol. 6, p. 1, 2013.
- [37] W. W. Parson and V. Nagarajan, “Optical spectroscopy in photosynthetic antennas,” *Advances in photosynthesis and respiration*, vol. 13, p. 83, 2003.
- [38] “Chlorophyll a fluorescence: A signature of photosynthesis,” in *Advances in photosynthesis and respiration 19* (H. G. Govindjee, J. T. Beatty and J. F. Allen, eds.), Springer, 2004.

- [39] G. C. Possa, H. Santana, B. S. A. F. Brasil, and L. F. Roncaratti, “Diel oscillation in the optical activity of carotenoids in the absorption spectrum of *Nannochloropsis*,” *J. Mol. Model.*, vol. 23, p. 95, 2017.
- [40] “Non-photochemical quenching and energy dissipation in plants, algae and cyanobacteria,” in *Advances in photosynthesis and respiration 40* (W. W. A. I. B. Demmig-Adams, G. Garab and Govindjee, eds.), Springer, 2014.
- [41] “Photosynthesis in silico: Understanding complexity from molecules to ecosystems,” in *Advances in photosynthesis and respiration 29* (L. N. A. Laisk and Govindjee, eds.), Springer, 2009.
- [42] “Functional genomics and evolution of photosynthetic systems,” in *Advances in photosynthesis and respiration 33* (R. Burnap and W. Vermaas, eds.), Springer, 2012.
- [43] E. Collini, C. Y. Wong, K. E. Wilk, P. M. G. Curmi, P. Brumer, and G. D. Scholes, “Coherently wired light-harvesting in photosynthetic marine algae at ambient temperature,” *Nature*, vol. 463, p. 644, 2010.
- [44] G. D. Scholes, “Quantum-coherent electronic energy transfer: Did nature think of it first?,” *J. Phys. Chem. Lett.*, vol. 1, p. 2, 2012.
- [45] J. C. Dean, T. Mirkovic, Z. S. Toa, D. G. Oblinsky, and G. D. Scholes, “Vibronic enhancement of algae light harvesting,” *Chem*, vol. 1, p. 858, 2016.
- [46] G. S. Engel, T. R. Calhoun, E. L. Read, T. K. Ahn, T. Manca, Y. C. Cheng, R. E. Blankenship, and G. R., “Evidence for wavelike energy transfer through quantum coherence in photosynthetic systems,” *Nature*, vol. 446, p. 782, 2007.
- [47] G. Panitchayangkoon, D. Hayes, K. A. Fransted, J. R. Caram, E. Harel, J. Z. Wen, R. E. Blankenship, and G. S. Engel, “Longlived quantum coherence in photosynthetic complexes at physiological temperature,” *PNAS*, vol. 107, p. 12766, 2010.
- [48] S. Styring, “Artificial photosynthesis for solar fuels,” *Faraday Discuss.*, vol. 155, p. 357, 2012.

- [49] C. Liu, B. C. Colon, M. Ziesack, P. A. Silver, and D. Nocera, “Water splitting-biosynthetic system with CO₂ reduction efficiencies exceeding photosynthesis,” *Science*, vol. 352, p. 1210, 2016.
- [50] N. Armaroli and V. Balzani, “The future of energy supply: Challenges and opportunities,” *Angew. Chem.*, vol. 46, p. 52, 2006.
- [51] K. Kalyanasundaram and M. Graetzel, “Artificial photosynthesis: biomimetic approaches to solar energy conversion and storage,” *Curr. Opin. Biotech.*, vol. 21, p. 298, 2010.
- [52] Govindjee, “Bioenergetics of photosynthesis,” Academic Press, 1975.
- [53] “On the requirement of minimum number of four versus eight quanta of light for the evolution of one molecule of oxygen in photosynthesis: A historical note,” *Photosynth. Res.*, vol. 59, p. 249, 1999.
- [54] E. Schrödinger, *What is Life?* Cambridge University Press, 1944.
- [55] I. Prigogine, *Introduction to thermodynamics of irreversible processes*. Wiley, 1968.
- [56] J. S. Wicken, “A thermodynamic theory of evolution,” *J. Theo. Biol.*, vol. 87, p. 9, 1980.
- [57] E. D. Schneider and J. J. Kay, “Complexity and thermodynamics: Towards a new ecology,” *Futures*, vol. 26, p. 626, 1994.
- [58] E. D. Schneider and J. J. Kay, “Life as a manifestation of the second law of thermodynamics,” *Mathl. Comput. Modelling*, vol. 19, p. 25, 1994.
- [59] O. Toussaint and E. D. Schneider, “The thermodynamics and evolution of complexity in biological systems,” *Comp Biochem Physiol Part A*, vol. 120, p. 3, 1998.
- [60] L. Demetrius, “Thermodynamics and evolution,” *J. theor. Biol.*, vol. 206, p. 1, 2000.
- [61] C. D. Andriessse and M. J. Hollestelle, “Minimum entropy production in photosynthesis,” *Biophys. Chem.*, vol. 90, p. 249, 2001.

- [62] Y. Demirel and S. I. Sandler, “Thermodynamics and bioenergetics,” *Biophys. Chem.*, vol. 97, p. 87, 2002.
- [63] A. Pross, “The driving force for life’s emergence: Kinetic and thermodynamic considerations,” *J. Theor. Biol.*, vol. 220, p. 393, 2003.
- [64] D. Juretic and P. Zupanovic, “Photosynthetic models with maximum entropy production in irreversible charge transfer steps,” *Comp. Biol. Chem.*, vol. 27, p. 541, 2003.
- [65] R. C. Jennings, E. Engelmann, F. Garlaschi, A. P. Casazza, and G. Zucchelli, “Photosynthesis and negative entropy production,” *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1709, p. 254, 2005.
- [66] R. S. Knox and W. W. Parson, “Entropy production and the second law in photosynthesis,” *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1767, p. 1189, 2007.
- [67] E. Albarrán-Zavala and F. Angulo-Brown, “A simple thermodynamic analysis of photosynthesis,” *Entropy*, vol. 9, p. 152, 2007.
- [68] P. C. Davies, E. Rieper, and J. A. Tuszynski, “Self-organization and entropy reduction in a living cell,” *BioSystems*, vol. 111, p. 1, 2013.
- [69] J. L. England, “Statistical physics of self-replication,” *J. Chem. Phys.*, vol. 139, p. 121923, 2013.
- [70] J. L. England, “Dissipative adaptation in driven self-assembly,” *Nat. Nanotech.*, vol. 10, p. 919, 2015.
- [71] N. Perunov, R. A. Marsland, and J. L. England, “Statistical physics of adaptation,” *Phys. Rev. X*, vol. 6, p. 021036, 2016.
- [72] T. Kachman, J. A. Owen, and J. L. England, “Self-organized resonance during search of a diverse chemical space,” *Phys. Rev. Lett.*, vol. 119, p. 038001, 2017.
- [73] J. M. Horowitz and J. L. England, “Spontaneous fine-tuning to environment in many-species chemical reaction networks,” *PNAS*, vol. 114, p. 7565, 2017.

- [74] L. E. Graham, J. M. Graham, and L. W. Wilcos, *Algae*. Benjamin Cummings, 2008.
- [75] M. D. Guiry, “How many species of algae are there?,” *J. Phycol.*, vol. 48, p. 1057, 2012.
- [76] M. D. Guiry and G. M. Guiry, “Algaebase. world-wide electronic publication.”
- [77] R. A. Andersen, *Algal Culture Techniques*. Elsevier, 2005.
- [78] O. Pulz and W. Gross, “Valuable products from biotechnology of microalgae,” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 65, p. 635, 2004.
- [79] H. C. Greenwell, L. M. L. Laurens, R. J. Shields, R. W. Lovitt, and K. J. Flynn, “Placing microalgae on the biofuels priority list: a review of the technological challenges,” *J. R. Soc. Interface*, vol. 7, p. 703, 2010.
- [80] S. A. Scott, M. P. Davey, J. S. Dennis, I. Horst, C. J. Howe, D. J. Lea-Smith, and A. G. Smith, “Biodiesel from algae: challenges and prospects,” *Curr. Opin. Biotech.*, vol. 21, p. 277, 2010.
- [81] S. S. Oncel, “Microalgae for a macroenergy world,” *Renew. Sustainable Energy Rev.*, vol. 26, p. 241, 2013.
- [82] A. Hallmann, “Algal transgenics and biotechnology,” *Transgenic Plant Journal*, vol. 1, p. 81, 2007.
- [83] S. E. Franklin and S. P. Mayfield, “Prospects for molecular farming in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*,” *Curr. Opin. Plant. Biol.*, vol. 7, p. 159, 2004.
- [84] E. Specht, S. Miyake-Stoner, and S. Mayfield, “Microalgae come of age as a platform for recombinant protein production,” *Biotechnol. Lett.*, vol. 32, p. 1373, 2010.
- [85] M. Hlavova, Z. Turoczy, and K. Bisova, “Improving microalgae for biotechnology - from genetics to synthetic biology,” *Biotechnol. Adv.*, vol. 33, p. 1194, 2015.
- [86] T. M. Conrad, N. E. Lewis, and B. O. Palsson, “Microbial laboratory evolution in the era of genome - scale science,” *Mol. Syst. Biol.*, vol. 7, p. 509, 2011.

- [87] M. Dragosits and D. Mattanovich, “Adaptive laboratory evolution - principles and applications for biotechnology,” *Microb. Cell Fact.*, vol. 12, p. 64, 2013.
- [88] R. A. LaCroix, B. O. Palsson, and A. M. Feist, “A model for designing adaptive laboratory evolution experiments,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 16, p. 03115, 2017.
- [89] O. Pulz and K. Scheibenbogen, “Design and performance with respect to light energy input,” *Adv. Biochem. Eng. Biotech.*, vol. 59, p. 123, 1998.
- [90] O. Pulz, “Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms,” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 57, p. 287, 2001.
- [91] C. Posten, “Design principles of photo-bioreactors for cultivation of microalgae,” *Eng. Life Sci.*, vol. 9, p. 165, 2009.
- [92] E. M. Grima, F. A. Fernández, F. G. Camacho, and Y. Chisti, “Photobioreactors: light regime, mass transfer, and scaleup,” *Journal of Biotechnology*, vol. 70, p. 231, 1999.
- [93] T. V. Arragon, “Development of an effective process model for algae growth in photobioreactors,” Master’s thesis, Delft University of Technology, 2014.
- [94] A. L. V. Bonato, C. B. do Valle, L. Jank, R. M. S. Resende, and G. O. C. Leguizamón, “Extração de DNA genômico de *Brachiaria* e *Panicum Maximum*,” tech. rep., Embrapa Gado de Corte, 2002.
- [95] R. R. L. Guillard, “Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates,” in *Culture of Marine Invertebrate Animals* (W. L. Smith and M. H. Chanley, eds.), New York: Plenum Press, 1975.
- [96] R. R. L. Guillard and J. H. Ryther, “Studies of marine planktonic diatoms: I. *Cyclotella nana* Husted, and *Detonula confervacea* (Grav.) Grun.,” *Can. J. Microbiol.*, vol. 8, p. 222, 1962.

Apêndice A: Artigo 1



Diel oscillation in the optical activity of carotenoids in the absorption spectrum of *Nannochloropsis*

Gabriela C. Possa^{1,2} · Hugo Santana³ · Bruno S. A. F. Brasil³ · Luiz F. Roncaratti¹

Received: 20 November 2016 / Accepted: 30 January 2017 / Published online: 28 February 2017
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2017

Abstract In this paper we show that the absorption spectrum of the microalgae *Nannochloropsis oceanica* exhibits changes in response to the modulation of incident light. A model was used to analyze the contribution of different active pigments to the total absorption in the photosynthetically active radiation region and suggested consistent diel oscillations in the optical activity of carotenoids.

Keywords *Nannochloropsis* · Absorption spectrum · Carotenoids · Diel oscillations

Introduction

Photosynthesis is the main process of energy transformation on our planet and its importance for life as we know is enormous [1–4]. Photosynthetic organisms are at the very base of almost all food chains and over the last 3 billion years they have provided most of the molecular oxygen found in the atmosphere [5]. Among many other photosynthetic

organisms, microalgae stand out due to their relative simplicity and variety [6]. They are ubiquitous in nature [7] and their biodiversity represents a valuable resource for the humankind [8, 9]. Over the last decades, thousands of novel compounds have been harvested from microalgae biomass, most of them unique products like carotenoids, fatty acids, antioxidants, toxins, enzymes, polymers, peptides, and sterols [10].

Among several species of microalgae described in the literature, the ones belonging to the *Nannochloropsis* genus have been attracting increasing interest due to their promising biotechnology applications [11, 12] and to their high lipid content and productivity. At the moment, their uses range from an energy-rich food source to biofuel production [13–19]. All the *Nannochloropsis* species consist of non-motile cells with diameters of 2–5 micrometers and few structural elements which do not present any distinct morphological feature, being characterized mostly by genome sequence analysis [20, 21]. They all have chlorophyll *a*, lack of chlorophyll *b* and *c*, and are able to accumulate high levels of carotenoids [22–25], which the presence of can be detected by analysis of their absorption spectrum [26–28]. Notably, *Nannochloropsis* [29, 30] and other algae as well [31, 32], have been observed to exhibit significant changes in the optical activity of carotenoids with respect to chlorophyll *a*. These changes have been associated to a response to nitrogen availability and fatty acid content.

In this paper we show that *Nannochloropsis oceanica* exhibits changes in the optical activity of carotenoids with respect to chlorophyll *a* also in response to modulation of the incident light associated with the light/dark periods. In the next sections, we present, describe, and model this phenomenon, finally we discuss and conclude our analysis.

This paper belongs to Topical Collection VI Symposium on Electronic Structure and Molecular Dynamics – VI SeedMol

✉ Luiz F. Roncaratti
roncaratti@fis.unb.br

¹ Instituto de Física, Universidade de Brasília, 70910-900 Brasília, Brazil

² Faculdade Gama, Universidade de Brasília, 72444-240 Gama, Brazil

³ Embrapa Agroenergia, 70770-901 Brasília, Brazil

Methods

Identification of the microalgae strain

A *Nannochloropsis* wild-type strain obtained from coastal waters of Brazil was used in this study. For identification of this microalgae, the total genomic DNA of the strain was isolated from 30 mg of fresh algal biomass using the cetyl trimethylammonium bromide (CTAB) DNA extraction protocol [33]. It was followed by PCR (polymerase chain reaction) amplification of the *rbcL* DNA region using the primers Fw_*rbcL*_192 (5' - GGT ACT TGG ACA ACW GTW TGG AC - 3') and Rv_*rbcL*_657 (5' - GAA ACG GTC TCK CCA RCG CAT - 3') [34]. The PCR products were sequenced using a 3130 genetic analyzer (Applied Biosystems) and the forward and reverse sequences obtained were aligned and edited using Geneious 9.1 software (Biomatters).

The identification of microalgae using only morphologic data is not a precise method for distinguish species, especially for the strains that have high morphologic similarity. However, the correct identification of a microalgae strain has a crucial role in metabolic studies, since it is a diverse group of microorganisms that have significant metabolic differences among its species. To avoid misidentification and to increase the speed of the process, the use of molecular tools to identify species is an alternative to fulfill these requirements. These tools identify regions in the organism's DNA that show very low variation rates in samples of the same species. However, this region varies enough to identify if it is a different microorganism strain or species. For microalgae, the marker *rbcL* shows these characteristics and can be used with this purpose. The similarity analysis of the consensus *rbcL* sequence using the BOLD systems resulted in a top hit of 98.69 % for a *Nannochloropsis oceanica* strain deposited in the BOLD database (Accession number: HQ710610).

Experimental setup

We used a laboratory-scale automatized photobioreactor to maintain 1-l culture of *Nannochloropsis oceanica* in a constant density, temperature, and salinity ($10^7 \pm 10^5$ cells/ml, 25 ± 0.1 °C and 30 ppt, respectively) environment for several days. The density was controlled by a dilution system that works via feedback between an optical density module that measures the culture absorbance at 640 nm and a peristaltic pump with two heads that simultaneously add/remove the same amount of medium/algae on the reactor whenever the absorbance increases beyond a set point. The correspondence between absorbance at 640 nm and the algae density was found to be linear by a previous calibration using a Neubauer chamber. The temperature

was controlled via feedback between a digital thermometer immersed in the culture and thermoelectric modules attached to the reactor vessel. Such a vessel consists of a cylinder with a 4.5-cm radius made out of transparent borosilicate glass. The culture was fed with Guillard's *f/2* growth medium [35] and aerated with CO₂-enriched atmospheric air (2000 ppm). The microalgae were kept under 12/12 light/dark cycles of cool white LEDs (6000 K and ≈ 500 lumens at the glass wall). The culture growth dynamics was monitored using pH and dissolved oxygen (DO) probes, as well as the instantaneous growth rate (given by the dilution rate). The absorption spectrum on the region of the photosynthetically active radiation (400–700 nm) was measured by a fiber-based CCD spectrometer together with a stabilized tungsten-halogen light source (360–2600 nm). The ends of the optical fibers attached to the light source and to the spectrometer are held together facing each other by a Teflon ring, which is submerged in the culture and defines an optical path of 5 mm in which the microalgae can continuously flow through. The culture is kept homogeneous by the airlift generated by the aeration and by a magnetic stirrer located at the bottom of the vessel.

Absorption spectrum

The absorption spectrum is represented as the sum of the optically active pigment contributions over the time

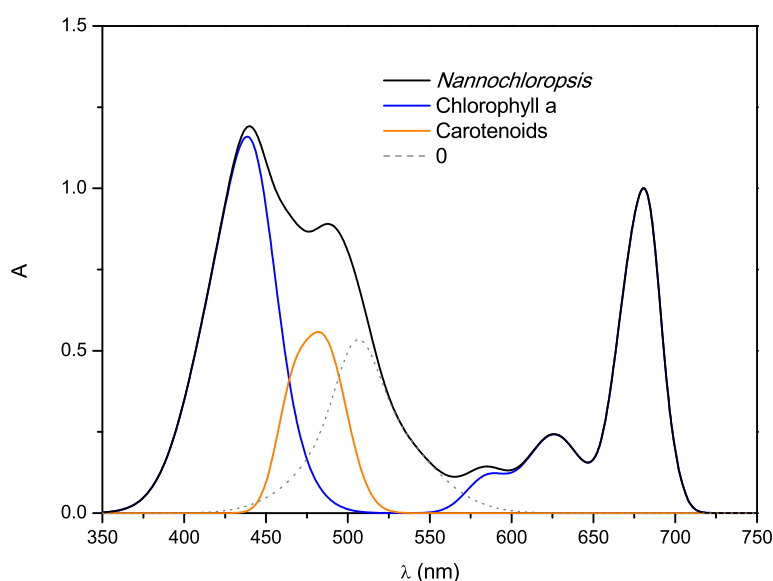
$$A(\lambda, t) = C_{\text{chl}}(t)A_{\text{chl}}(\lambda) + C_{\text{car}}(t)A_{\text{car}}(\lambda) + C_0(t)A_0(\lambda), \quad (1)$$

where A_{chl} and A_{car} represent the absorption spectra of chlorophyll *a* and carotenoids, respectively. A_0 represents

Table 1 Parameters for the *Nannochloropsis* absorption spectrum according with Eqs. 1 and 2

	<i>a</i>	λ (nm)	<i>w</i> (nm)
chl	0.731	431.4	23.5
	0.324	443.1	12.4
	0.092	584.8	12.6
	0.209	626.1	16.9
	0.682	675.5	11.8
	0.309	685.7	7.2
car	0.045	699.7	5.8
	0.432	464.5	9.4
0	0.946	485.1	13.9
	0.442	505.5	12.4
	0.569	512.3	32.3

Fig. 1 The *Nannochloropsis* absorption spectrum and its components according to Eqs. 1, 2 and Table 1. In this figure, the contribution of each component is shown using typical values of the C coefficients found in our experiment

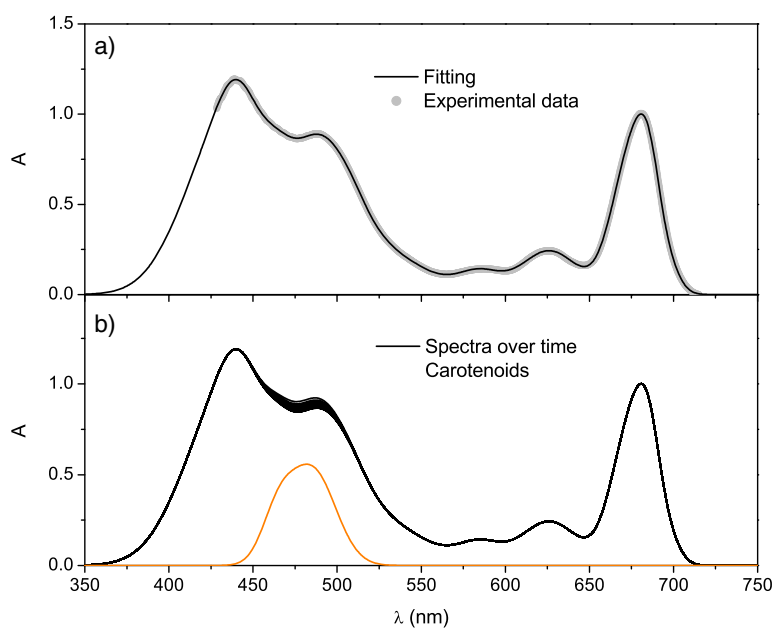


all the remaining features of the spectrum. They are all represented as packages of Gaussian functions

$$A_{\alpha}(\lambda) = \sum_i a_{\alpha i} e^{-\frac{1}{2} \left(\frac{\lambda - \lambda_{\alpha i}}{w_{\alpha i}} \right)^2}, \quad (2)$$

where α stands for chl, car, and 0. The coefficients $C_{\alpha}(t)$ give the contributions of α over time. The values of $a_{\alpha i}$, $\lambda_{\alpha i}$ and $w_{\alpha i}$ are given in Table 1. Figure 1 illustrates our model for the *Nannochloropsis oceanica* absorption spectrum and its components. This representation is very close to those used to represent the absorption spectra of *Nannochloropsis* sp. [26] and *Nannochloropsis salina* [27].

Fig. 2 **a** Experimental absorption spectrum (3) and its analytical representation (1). Strong agreements as the one shown for this single case were found for all the obtained spectra over time. **b** Absorption spectra during 72 h (in black). It can be seen that the only region where significant changes occur lies around the absorption peak of the carotenoids (in orange)



Results

Every five minutes pH, DO, density and the absorption spectrum of the culture were obtained. The last one was calculated through the transmittance of light from $\lambda=425$ to 725 nm, with resolution of 0.5 nm, and the Beer-Lambert law

$$A(\lambda, t) = -\ln \frac{I(\lambda, t)}{I_m(\lambda)}, \quad (3)$$

where $I(\lambda, t)$ is the radiant flux transmitted through the algae culture at wave length λ at time t , and $I_m(\lambda)$ is the

radiant flux transmitted at wave length λ through the pure growth medium. A curve fitting algorithm was used to find the values for $C_{chl}(t)$, $C_{car}(t)$ and $C_0(t)$, in Eq. 1, that best adjust each one of the spectra obtained with Eq. 3 over the time. Figure 2a compares one of the fitted curves to its respective experimental data and shows a strong agreement between both. Figure 2b presents all the spectra obtained along the last 72 hours of the experiment. It can be easily seen from this figure that the region around the absorption peak of the carotenoids is the only one that presented significant changes over time.

The observed changes in the optical activity of carotenoids with respect to chlorophyll *a* can be better understood in terms of the $C_{chl}(t)$, $C_{car}(t)$ and $C_0(t)$ coefficient values. While C_{chl} and C_0 remained constant and equal to 1.16 and 0.53, respectively, C_{car} presented an oscillatory pattern around 0.55. In Fig. 3 it is easy to see that such a pattern follows the culture growth dynamics associated with the 12/12 light/dark cycles.

Discussion

Consistent diel oscillations in the optical activity of carotenoids were observed in the absorption spectrum of *Nannochloropsis oceanica*. The exact mechanism behind this pattern is yet to be understood. However, some assumptions about the phenomenon can be made. In particular, it is known that pigments display a different absorption cross section once they are packaged inside a cell. This can be due to the non-linear dependence of absorption on pigment concentrations, cell refractive index, cell size, or pigment location within the cell [28]. Regarding these possibilities, the question that rises is how the light modulation could affect the biophysical mechanisms behind these features. Particularly, changes in cell size due to growth and division can also lead to variations in attenuation cross section [36]. However, such variations would be detected equally regarding absorption due to carotenoids and chlorophyll *a* in a way that their ratio should remain constant.

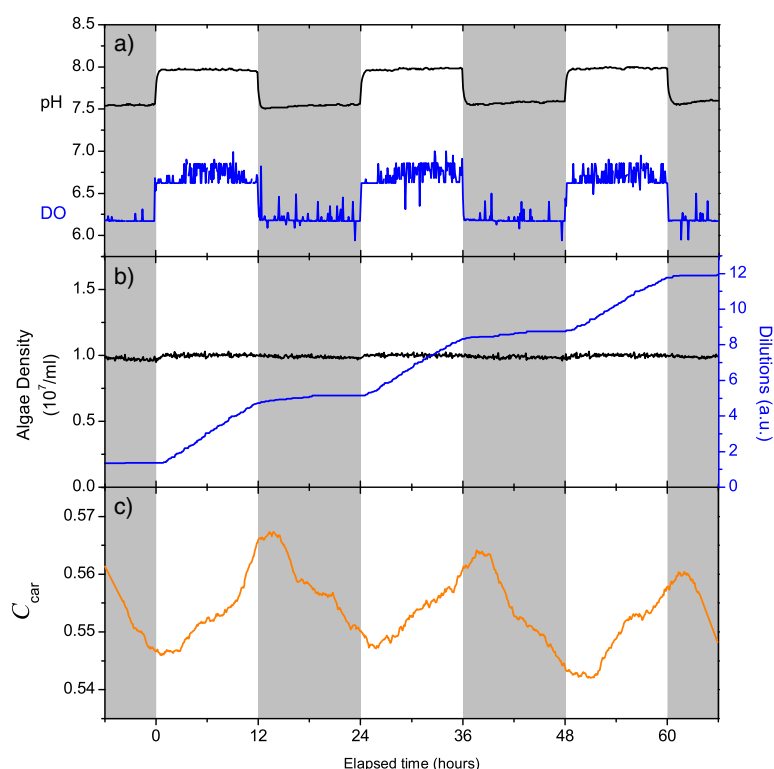


Fig. 3 Diel patterns associated with the 12/12 light/dark cycles. **a** Photosynthesis and respiration lead pH and dissolved oxygen (DO) to have different equilibrium values during light and dark periods. **b** Algae density was kept constant during the entire experiment due to the dilution system that simultaneously add and remove the same amount of medium and algae on the reactor whenever the density increased beyond the set point (10^7 cells/ml). As expected, the presence of light increases the amount of oxygen, decreases the CO_2 concentration

(increasing the pH), and allows the algae to grow, as seen by the dilution rate (derivative of the dilution curve). During the dark periods, the oxygen is no longer produced and the CO_2 is no longer consumed (decreasing the pH), the dilution rate then equals zero. **c** A consistent diel pattern is observed for the optical activity of carotenoids. This oscillatory pattern is slightly out of phase (approx. 2 h) with respect to the light/dark cycles

A possible cause for changes in the carotenoid absorption could be nitrogen starvation [29, 30]. This condition would increase the carotenoids-to-chlorophyll absorption ratio, similarly to what was observed during the light periods but, since the culture was grown in a continuous mode, the insertion of medium would prevent such starvation. Besides that, there is no nitrogen compensation during the dark periods that could be responsible for the decreases of C_{car} values while there is no dilution of the culture. This leads us to think that even if nitrogen could affect the values of C_{car} , that would not happen with an oscillatory pattern as the one observed.

A more interesting cause for the observed oscillations of carotenoids optical activity could be the non-photochemical quenching (NPQ) processes that occur in almost all photosynthetic Eukaryotes. Reference [37] is a very good paper on this subject. According to present understanding, these processes help to regulate and protect the photosynthetic apparatus from damage caused by reactive oxygen species (ROS). NPQ involves conformational changes within the PSII (Photosystem II) antenna and the activation of the xanthophyll (oxygenated carotenoids) cycle triggered by the decrease in lumen pH in excessive light. During the light periods, the observed increase in C_{car} can be associated to the increase in the quantity of specific xanthophyll species (antheraxanthin and zeaxanthin) inside a cell due to a decrease in lumen pH. On the other hand, during the dark periods, the process is reversed, decreasing C_{car} .

Conclusions

A consistent diel pattern in the carotenoid optical activity was observed in a *Nannochloropsis oceanica* culture cultivated in a controlled lab-scale photobioreactor. This phenomenon seems to be related to NPQ processes. The ability to measure in vivo such a pattern and its interpretation could provide a valuable non-destructive monitoring tool of how photosynthetic energy conversion works.

Acknowledgments This work was supported by CNPq and FAP-DF.

References

- Rabinowitch E (1969) Govindjee photosynthesis. Wiley, New York
- Nelson N, Ben-Shem A (2004) Nat Rev Mol Cell Biol 5:971–982
- Nelson N (2011) Biochim Biophys Acta 1807:856–863
- Nelson N (2013) Photosynth Res 116:145–151
- Crowe SA, Døssing LN, Beukes NJ, Bau M, Kruger SJ, Frei R, Canfield DE (2013) Nature 501:535–538
- Barsanti L, Gualtieri P (2006) Algae: anatomy, biochemistry and biotechnology. CRC Press, Boca Raton
- Boyce DG, Lewis MR, Worm B (2010) Nature 466:591–596
- Luiten EEM, Akkerman I, Koulman A, Kamermans P, Reith H, Barbosa MJ, Sipkema D, Wijffels RH (2003) Biomol Eng 20:429–439
- US Department of Energy (2014) National alliance for advanced biofuels and bioproducts (final report). Retrieved from <https://energy.gov/eere/bioenergy/downloads/national-alliance-advanced-biofuels-and-bioproducts-synopsis-naabb-final>
- Cardozo KH, Guaratini T, Barros MP, Falco VR, Tonon AP, Lopes AP, Campos S, Torres MA, Souza AO, Colepicolo P, Pinto E (2007) Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol 146:60–78
- Kilian O, Benemann CSE, Niyogi KK, Vick B (2011) PNAS 108:21265–21269
- Radakovits R, Jinkerson RE, Fuerstenberg SI, Tae H, Settlage RE, Boore JL, Posewitz MC (2012) Nat Commun 3:686
- Zittelli GC, Lavista F, Bastianini A, Rodolfi L, Vincenzini M, Tredici MR (1999) J Biotechnol 70:299–312
- Rodolfi L, Zittelli GC, Bassi N, Padovani G, Biondi N, Bonini G, Tredici MR (2009) Biotechnol Bioeng 102:100–112
- Gouveia L, Oliveira AC (2009) J Ind Microbiol Biotechnol 36:69–274
- Huerlimann R, de Nys R, Heimann K (2010) Biotechnol Bioeng 107:245–257
- Mata TM, Martins AA, Caetano NS (2010) Renew Sust Energ Rev 14:217–232
- Koberg M, Cohen M, Ben-Amotz A, Gedanken A (2011) Bioreour Technol 102:4265–4269
- Kazamia E, Aldridge DC, Smith AG (2012) J Biotechnol 162:163–169
- Fawley KP, Fawley MW (2007) Protist 158:325–336
- Wang D, Ning K, Li J, Hu J, Han D, Wang H, Zeng X, Jing X, Zhou Q, Su X, Chang X, Wang A, Wang W, Jia J, Wei L, Xin Y, Qiao Y, Huang R, Chen J, Han B, Yoon K, Hill RT, Zohar Y, Chen F, Hu Q, Xu J (2014) PloS Genetics 10:1–13
- Brown JS (1987) Plant Physiol 83:434–437
- Lubián LM, Montero O, Moreno-Garrido I, Huertas IE, Sobrino C, del Valle MG, Parés G (2000) J Appl Phycol 12:249–255
- Forján E, Garbayo I, Henriques M, Rocha J, Vega JM, Vilchez C (2011) Mar Biotechnol 13:366–375
- Basso S, Simionato D, Gerotto C, Segalla A, Giacometti GM, Morosinotto T (2014) Biochim Biophys Acta 1837:306–314
- Gitelson AA, Grits YA, Etzion D, Ning Z, Richmond A (2000) Biotechnol Bioeng 69:516–525
- Reichardt TA, Collins AM, Garcia OF, Ruffing AM, Jones HDT, Timlin JA (2012) Algal Res 1:22–31
- Kandilian R, Lee E, Pilon L (2013) Bioreour Technol 137:63–73
- Solovchenko A, Khozin-Goldberg I, Recht L, Boussiba S (2011) Mar Biotechnol 13:527–535
- Pal D, Khozin-Goldberg I, Cohen Z, Boussiba S (2011) Appl Microbiol Biotechnol 90:1429–1441
- Reynolds RA, Stramski D, Kiefer DA (1997) Limnol Oceanogr 42:881–892
- Solovchenko AE, Khozin-Goldberg I, Cohen Z, Merzlyak MN (2009) J Appl Phycol 21:361–366
- Bonato ALV, do Valle CB, Jank L, Resende RMS, Leguizamón GOC (2002) Extração de DNA genômico de *Brachiaria* e *Panicum Maximum*, Embrapa Gado de Corte Comunicado técnico
- Hadi SIA, Santana H, Brunale PPM, Gomes TG, Oliveira MD, Matthiensen A, Oliveira MEC, Silva FCP, Brasil BSAF (2016) PLOS ONE 11(2):E0149284
- Guillard RRL, Ryther JH (1969) Can J Microbiol 8:229–239
- DuRand MD, Olson RJ (1998) Limnol Oceanogr 43:1107–1118
- Müller P, Li XP, Niyogi KK (2001) Plant Physiol 125:1558–1566

Apêndice B: Artigo 2

Stability Diagrams for Paul Ion Traps Driven by Two-Frequencies

Gabriela C. Possa^{†,‡} and Luiz F. Roncaratti^{*,†}

[†]Instituto de Física, Universidade de Brasília, 70910 Brasília, Brazil

[‡]Faculdade Gama, Universidade de Brasília, 72444, Gama, Brazil

ABSTRACT: In this paper, we present and discuss stability diagrams for Paul traps driven by two ac voltages. In contrast to a typical Paul trap, here we suggest a secondary ac voltage whose frequency is twice the frequency of the primary one. The ratio between their amplitudes can be used to expand the region of stability and to access different states of motion of trapped ions. This provides a further mechanism to trap, cool, and manipulate single ions and also to improve the experimental framework where ion clouds and crystals can be prepared and controlled. Such approach opens the possibility of designing more sophisticated trapping architectures, leading to a wide variety of applications on ion trap research and mass analysis techniques.



1. INTRODUCTION

Paul traps¹ have been widely used to confine and isolate ions from external perturbations. Among several applications stand out the detection of molecules, from simple to complex ones, by quadrupole mass spectrometry^{2,3} and several experiments with single trapped ions and quantum optics (see ref 4 and references therein). Even ordered structures can be created inside Paul traps giving access to highly controllable systems where a wide variety of statistical, quantum, computational, and interrelated phenomena can be tested.^{5–29} Together with developments in the generation of cold ions, this technique allows an impressive progress on the studies of Coulomb crystals^{30–40} and the understanding of the behavior of molecules and chemical reactions at ultralow energies.^{41–45}

The main feature of Paul traps is the use of periodic quadrupole electric fields in order to keep charged particles in a well-characterized state of motion. In this way, it is possible to overcome the Earnshaw's theorem and dynamically confine charged particles in space. Typical Paul traps use a dc voltage superposed to a single frequency ac voltage applied to specific arrangements of electrodes, usually with linear or cylindrically symmetric geometries.⁴ Recently, great attention has been devoted to microfabricated surface-electrode traps and their uses in quantum information processing.⁴⁶

In this paper, the theory of Paul traps driven by two ac voltages is presented and discussed. In contrast to a typical Paul trap, here we consider a secondary ac voltage whose frequency is twice the frequency of the primary one. This particular case is of interest because the problem takes the form of the Whittaker-Hill equation whose analytical solution method is well known.^{47–49} We show that by changing the ratio between their amplitudes it is possible to expand the stability region, providing new operating modes for Paul traps and allowing new ways to perform mass analysis and coupling motional and electronic states of trapped ions, opening the possibility to design more sophisticated trapping architectures.

For instance, a specific secondary frequency can be used to simultaneously confine ions with widely different charge-to-mass ratios.⁵⁰ In such arrangement, two almost independent

traps with coincident centers can be formed, allowing an efficient sympathetic cooling of the heavy ions by laser-cooled lighter ions. In order to do this, one had to consider a secondary frequency much higher than the primary one. On the other hand, our work presents a deeper mathematical analysis for the case where the secondary frequency is twice the primary one, and its focus lies on the stability diagrams. Moreover, the formation of ordered structures depends critically on the trapping potential and then the presence of the secondary frequency also expands the experimental framework where ion clouds and crystals can be prepared and manipulated. In particular, the secondary frequency can be useful to study defect formation, structural transitions, and energy exchanges between modes on Coulomb crystals^{19,21,22,34,35} and improve the ongoing efforts to process information using quantum-mechanical principles.²⁰

In the next two sections, we present the mathematical background of our analysis and the study of how the secondary frequency affects the operation of Paul traps. Then we treat the dynamics of a single ion and, finally, we discuss and conclude our analysis.

2. THEORETICAL METHODS

We start by considering periodic voltage

$$\Phi_0(t) = V_0 + V_1 \cos \omega_{rf}t + V_2 \cos 2\omega_{rf}t \quad (1)$$

where ω_{rf} is the primary radio frequency and V_1 and V_2 are the primary and secondary amplitudes to specific arrangements of electrodes such that the resulting electric potential at the center of the trap is given by a parabolic shape

Special Issue: Piergiorgio Casavecchia and Antonio Lagana Festschrift

Received: December 22, 2015

Revised: February 5, 2016

Published: February 16, 2016

$$\Phi(x, y, z, t) = \frac{\Phi_0(t)}{2r_0^2}(\delta_x x^2 + \delta_y y^2 + \delta_z z^2) \quad (2)$$

where r_0 is the distance from the center of the trap to the electrodes and the δ values are geometric factors that fulfill the Laplace condition $\Delta\Phi = 0$. For the linear trap, we have $\delta_x = -\delta_y = 1$ and $\delta_z = 0$, while $\delta_x = \delta_y = 1$ and $\delta_z = -2$ for the cylindrically symmetric three-dimensional (3D) trap.

2.1. Whittaker-Hill Equation. To simplify the calculation, we shall consider a single ion with charge-to-mass ratio e/m and whose motion lies along the x direction. The motion along the other directions could be treated in a similar way. The classical equation of motion is given by

$$m \frac{d^2x}{dt^2} = -\frac{d}{dx}U(x, t) \quad (3)$$

where

$$U(x, t) = \frac{e\Phi_0(t)}{2r_0^2}\delta_x x^2 \quad (4)$$

is a time-dependent scalar potential. Equation 3 can be rewritten as

$$\frac{d^2x}{dt^2} + [a_x + q_x(\cos 2\tau + p \cos 4\tau)]x = 0 \quad (5)$$

where $\tau = \omega_{\text{tr}}t/2$, $p = V_2/V$, $V = V_1$, $a_x = a\delta_x$, $q_x = q\delta_x$ with

$$a = \frac{4eV_0}{m\omega_{\text{tr}}^2 r_0^2} \quad (6)$$

and

$$q = \frac{2eV}{m\omega_{\text{tr}}^2 r_0^2} \quad (7)$$

being dimensionless parameters.

Equation 5 is often called Whittaker-Hill equation.^{47,48} From the mathematical point of view, it is similar to Mathieu's equation ($p = 0$) but two main differences occur. First, for certain values of a_x , q_x and p , two basically periodic solutions can coexist. Second, if we attempt to solve the Whittaker-Hill equation using trigonometric series, a five-term recurrence relation between the coefficients emerges. The use of the standard techniques for three-term recurrence relations can be used by transforming the Whittaker-Hill equation into Ince's equation. A remarkable feature of Ince's equation is that for certain values of a_x , q_x and p , it has finite solutions or the so-called Ince polynomials.^{47,49}

According to Floquet's theorem, a formal solution of eq 5 can be written as

$$x(\tau) = e^{\mu_x \tau} \sum_{n=-\infty}^{\infty} C_{2n} e^{2ni\tau} \quad (8)$$

where μ_x is the characteristic exponent. Substituting into eq 5, we obtain the recurrence relation

$$C_{2n} + \gamma_{2n}[(C_{2n-2} + C_{2n+2}) + p(C_{2n-4} + C_{2n+4})] = 0 \quad (9)$$

where $\gamma_{2n} = \frac{q_x}{a_x - (2n - i\mu_x)^2}$.

For given values of the parameters (a_x, q_x, p), the exponent μ_x is determined by the roots of the characteristic polynomial

$$\Delta(i\mu_x) \equiv \begin{vmatrix} \ddots & & & & & & \\ & 1 & \gamma_0 & p\gamma_0 & 0 & & \\ & \gamma_2 & 1 & \gamma_2 & p\gamma_2 & & \\ & p\gamma_4 & \gamma_4 & 1 & \gamma_4 & & \\ & 0 & p\gamma_6 & \gamma_6 & 1 & & \\ & & & & & \ddots & \end{vmatrix} = 0 \quad (10)$$

This relation can be reduced to the compact form⁴⁷

$$\sin^2\left(i\mu_x \frac{\pi}{2}\right) = \Delta(0) \sin^2\left(a_x^{1/2} \frac{\pi}{2}\right) \quad (11)$$

The stability of the solution (eq 8) is defined by the characteristic exponent $\mu_x = \alpha_x + i\beta_x$ and is an intrinsic property of the time-dependent scalar potential (eq 4). When $\alpha_x \neq 0$, the solution is unbounded and called unstable. When $\alpha_x = 0$ and β_x is not an integer, two subcases of stable solutions may be distinguished: if β_x is a rational fraction, the solution is bounded and periodic; if β_x is irrational, the solution is bounded, but not periodic. If $\alpha_x = 0$ and β_x is an integer, we have the exceptional case of basically periodic solutions, that is, solution of period π or 2π : when $\beta_x = 2l$, with $l = 0, 1, 2, \dots$, $\Delta(0) \sin^2\left(a_x^{1/2} \frac{\pi}{2}\right) = 0$ gives the family of characteristic curves $a_x = a_{2l}(q, p)\delta_x$ and $a_x = b_{2l+2}(q, p)$, for even and odd solutions of period π , respectively.

When $\beta_x = 2l+1$, $\Delta(0) \sin^2\left(a_x^{1/2} \frac{\pi}{2}\right) = 1$ gives the family of characteristic curves $a_x = a_{2l+1}(q, p)\delta_x$ and $a_x = b_{2l+1}(q, p)\delta_x$ for even and odd solutions of period 2π , respectively. For q and $p \geq 0$, these curves can be ordered such that $a_0 < b_1 < a_1 < b_2 < a_2 < b_3$ and so on.^{47,48}

2.2. Stability Diagrams. The first region of stability is bounded by the values (a_u, q_u, p) that yield either $\beta_u = 0$ or $\beta_u = 1$ for all $u \in x, y, z$. For q and $p \geq 0$, these values are defined by the even solutions with period π and 2π . These basically periodic solutions are the particular cases where eq 8 can be written as

$$x_{2l}(\tau, q, p) = \sum_{n=0}^{\infty} A_{2n}^{2l} \cos 2n\tau \quad (12)$$

$$x_{2l+1}(\tau, q, p) = \sum_{n=0}^{\infty} A_{2n+1}^{2l+1} \cos(2n+1)\tau \quad (13)$$

Substituting eq 12 into eq 5 gives an eigenvalue equation $M_{2l}A = \lambda A$, with $A = [A_0^{2l}, A_2^{2l}, A_4^{2l}, \dots]^T$ and

$$M_{2l} = \begin{bmatrix} 0 & 2q & 2pq & 0 & 0 \\ 2q & 2pq - 4 & q & pq & 0 \\ 2pq & q & -16 & q & \ddots \\ 0 & pq & q & -36 & \ddots \\ 0 & 0 & \ddots & \ddots & \ddots \end{bmatrix} \quad (14)$$

For eq 13 we have $M_{2l+1}A = \lambda A$, $A = [A_1^{2l+1}, A_3^{2l+1}, A_5^{2l+1}, \dots]^T$ and

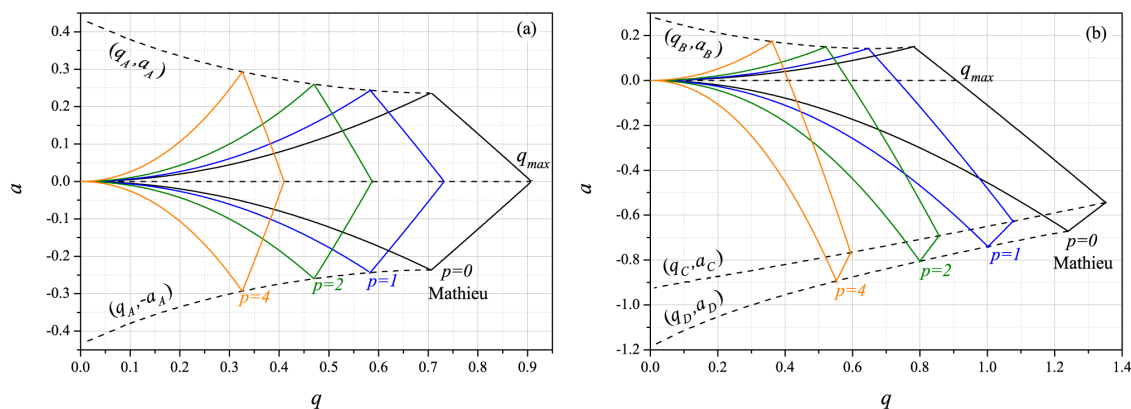


Figure 1. Lowest stability regions for some values of p for linear traps (a) and for cylindrically symmetric 3D traps (b). The dashed curves (q_S, a_S) , with $S = A, B, C$ and D , connect the corners of regions with different values of p . In both cases, the stability region has an edge at q_{max} for $a = 0$. The presence of the secondary frequency expands the typical $p = 0$ region, making all values between the curves (q_A, a_A) and $(q_{A'}, -a_A)$, as well as the region between the curves (q_B, a_B) and $(q_{B'}, -a_B)$, useful to confine ions inside linear and cylindrically symmetric traps, respectively.

$$M_{2l+1} = \begin{bmatrix} -1 - pq & q - qp & pq & 0 & 0 \\ q - qp & -9 & q & pq & 0 \\ pq & q & -25 & q & \ddots \\ 0 & pq & q & -49 & \ddots \\ 0 & 0 & \ddots & \ddots & \ddots \end{bmatrix} \quad (15)$$

The eigenvalues of eq 14 provide the family of curves $\lambda = -a_{2l}(q, p)\delta_x$, while the eigenvalues of eq 15 provide the family $\lambda = -a_{2l+1}(q, p)\delta_x$. The boundaries of the first region of stability are defined by the curves $a_0(q, p)\delta_u$ and $a_1(q, p)\delta_u$ for all $u \in x, y, z$. For the linear trap, the boundary curves are $a_0(q, p)$, $-a_0(q, p)$, $a_1(q, p)$ and $-a_1(q, p)$, while for the cylindrically symmetric 3D trap, the boundary curves are $a_0(q, p)$, $-2a_0(q, p)$, $a_1(q, p)$ and $-2a_1(q, p)$.

Figure 1 shows the lowest stability regions in the (q, a) for the linear quadrupole and the cylindrically symmetric 3D trap. Each curve in this figure has been calculated by numerical diagonalization of eqs 14 and 15 for several values of q and p . For $p = 0$, eq 5 becomes Mathieu equation and the result is the well-known stability diagram for a typical Paul trap. As p increases, the stability region changes, flattening toward $q = 0$. The stability region of the linear trap has two symmetrical tips at $[q_A, a_A]$ and $[q_{A'}, -a_A]$. For the 3D trap, the stability boundaries are defined by three corners at $[q_B, a_B]$, $[q_C, a_C]$, and $[q_D, a_D]$. In both cases, the stability region has edge at q_{max} for $a = 0$. One can see that the presence of the secondary frequency expands the typical $p = 0$ region making all values between the curves (q_A, a_A) and $(q_{A'}, -a_A)$ and between the curves (q_B, a_B) and $(q_{B'}, -a_B)$ useful to confine ions inside linear and cylindrically symmetric traps, respectively.

After calculating the lowest stability regions for several values of p , we found the curves q_{max} , $q_S(p)$ and $a_S(p)$ (with $S = A, B, C, D$) that are plotted in Figure 2. Then, we have adjusted exponential functions

$$g = c_0 + c_1 e^{-p/d_1} + c_2 e^{-p/d_2} \quad (16)$$

to fit the found values of q_S and a_S as functions of p . Table 1 presents the fitting parameters. These functions permit a simple, yet accurate, analytical description on how the lowest

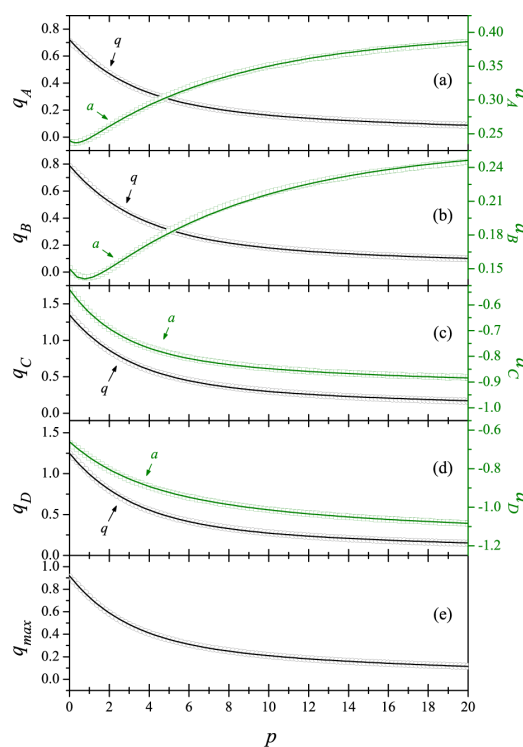


Figure 2. Values of a (squares) and q (circles) of the corners of the lowest stability region as a function of p (see Figure 1). Panel (a) shows the coordinates of the tip of the linear trap. Panels (b–d) show the corners of the lowest stability region for the cylindrically symmetric 3D trap. Panel (e) shows the values of q_{max} . In all panels, solid lines represent the fitting functions (see text and Table 1).

stability regions continuously change with p , opening the possibility to design more general trapping architectures.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Operation Modes. The linear quadrupole, originally developed for mass spectrometry by Paul and co-workers,⁵¹ is

Table 1. Fitting Parameters Used in Equation 16^a

	c_0	c_1	d_1	c_2	d_2
q_A	0	0.49	3.15	0.23	20.51
a_A	0.40	0.02	0.42	-0.18	7.79
q_B	0	0.57	3.43	0.22	25.29
a_B	0.26	0.03	0.64	-0.14	8.60
q_C	0	0.94	3.05	0.41	22.80
a_C	-0.91	0.24	2.48	0.13	12.42
q_D	0	0.88	3.14	0.37	22.46
a_D	-1.14	0.24	3.19	0.24	13.77
q_{max}	0	0.60	2.90	0.32	19.25

^aFor details see Figures 1 and 2.

widely used in many areas as mass filter, ion guide,^{1,3} and as linear ion trap.^{52–55} Its operation is based on the stability diagram for $p = 0$ illustrated in Figure 3a. For fixed values r_0 ,

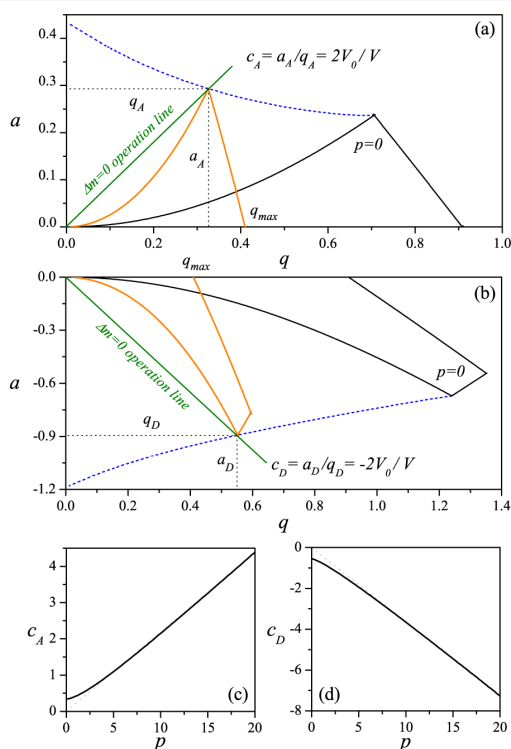


Figure 3. Coordinates of the tip of the stability region for the linear (a) and for the cylindrically symmetric 3D trap (b). The slopes of the $\Delta m = 0$ operation lines as a function of p are plotted in panels (c) and (d).

ω_{rf} , V_0 , V , p , all ions with the same charge-to-mass ratio e/m have the same operating point in the diagram. In the q axis ($a = 0$), one has stability from $0 < q < q_{max}(p)$ where according to eq 16 and Table 1

$$q_{max}(p) = 0.60e^{-p/2.90} + 0.32e^{-p/19.25} \quad (17)$$

Therefore, all masses within the range $\infty > m > m_{min}(p)$, where

$$m_{min}(p) = \frac{2eV}{q_{max}(p)r_0^2\omega_{rf}^2} \quad (18)$$

have stable orbits and the quadrupole field works as a high-pass mass filter where the minimum mass can be adjusted with p . As in the typical $p = 0$ case, the mass range Δm becomes narrower with increasing V_0 and approaches $\Delta m = 0$ if the operation line goes through the tip of the stability region. As shown in Figure 3a,c, the location of the tip depends on p and the slope of the operating line passing through it is given by $c_A(p) = a_A(p)/q_A(p) = 2V/V_0$. For a given value of p , if one changes V_0 and V in such a way that $V = c_A(p)V_0$, one brings the ions of the various masses successively into the stability region while scanning through the mass spectrum. In contrast to the typical $p = 0$ case, defined by the constant slope $c_A(0) \approx 0.3357$, the presence of the secondary frequency allows the slope of the $\Delta m = 0$ operation line to be set within the interval $c_A(0) \leq c_A(p) < \infty$.

The cylindrically symmetric 3D trap can be used as an ion store in which ions can be confined in or ejected from.^{1,2} Its operation is illustrated in Figure 3b,d. As for the linear case, the mass range of the confined ions can be chosen by the slope of the operation line. For $a = 0$, the concentration of a given mass can be determined by detecting the ejections at $q_{max}(p)$. The quadrupole ion trap works as a mass spectrometer when operated in such manner. Setting the operation line on the tip of the stable region, that is, $c_D(p) = a_D(p)/q_D(p) = -2V/V_0$, one can trap ions of a specific mass number.

The key point of this new approach is the use of the amplitude modulation of the periodic voltage (1) to tune the confinement dynamics inside Paul traps. The advantage is that one can change the shape of the stability area through p while keeping the driving frequency ω_{rf} , the dc voltage V_0 and the primary ac voltage V constant. Moreover, this alternative way to trap ions and perform mass analysis can be implemented in any quadrupole hardware by simply changing the output of the wave generator to a more general form given by eq 1. In the limit case $p = 0$, we recover the behavior of typical Paul traps. Note also that in this approach a given point (q, a) in the stability diagram that defines an unstable motion in the case $p = 0$ can now define a stable motion for a specific value of $p > 0$. This means that for given values ω_{rf} , V_0 , and V , one can design a trap with different size r_0 as defined by eqs 6 and 7.

3.2. The Effective Potential. Inside the first region of stability, where $0 < \beta_u < 1$ for all $u \in x, y, z$, the motion of a trapped ion is a combination of a secular motion with frequency $\beta_u\omega_{rf}/2$, and a micromotion with frequency ω_{rf} . For small values of β_ω we have a slow secular motion with respect to the micromotion. In this case, the effective force on the particle can be assumed as a time average force and the ion motion can be determined approximately by an effective potential.⁵⁶

The equation of motion (3) can be written as

$$m\ddot{x} = F(x) + f(x, t) \quad (19)$$

where

$$F(x) = -\frac{m\omega_{rf}^2}{4}a_x x \quad (20)$$

$$f(x, t) = -\frac{m\omega_{rf}^2}{2}q_x(\cos\omega_{rf}t + p\cos 2\omega_{rf}t)x \quad (21)$$

On time scales longer than the driving period $2\pi/\omega_{rf}$ the particle will move in a smooth path $X(t)$, that is, the secular motion. The force $f(x, t)$ makes the ion oscillate around $X(t)$

with micromotion $\xi(X, t)$. The resulting trajectory can be written as

$$x(t) = X(t) + \xi(X, t) \quad (22)$$

where the mean value of the micromotion over the driving period is $\bar{\xi} = 0$ and consequently $\dot{x} = \dot{X}(t)$. Substituting eq 22 into eq 19 and expanding in powers of ξ up to the first-order terms, we obtain

$$m\ddot{X} + m\ddot{\xi} = F(X) + f(X, t) + \xi \left[\frac{dF(X)}{dX} + \frac{df(X, t)}{dx} \right]_{x=X} \quad (23)$$

Then, assuming $m\ddot{\xi} = f(X, t)$, one finds that

$$\xi(X, t) = \frac{q_x}{2} [\cos \omega_{rf} t + \left(\frac{p}{4}\right) \cos 2\omega_{rf} t] X \quad (24)$$

Substituting on eq 23 and averaging over one period we obtain the equation for the secular motion

$$m\ddot{X} = -\frac{d}{dX} U_e(X) \quad (25)$$

where

$$U_e(X) = \frac{m[\nu(p)]^2}{2} X^2 \quad (26)$$

is the effective harmonic potential and

$$\nu(p) = \frac{\omega_{rf}}{2} \left[a_x + \frac{q_x^2}{2} \left(1 + \frac{p^2}{4} \right) \right]^{1/2} \quad (27)$$

is the p -dependent effective frequency. For $p = 0$, we retrieve the pseudopotential approximation for typical Paul traps.⁵⁷ Figure 4 illustrates the shape of $U_e(X)$ for $a = 0$ and some

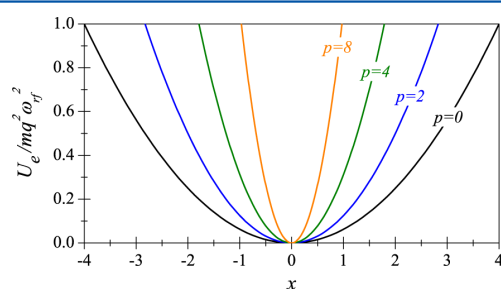


Figure 4. Examples of the effective harmonic potential as a function the reduced distance x (see eq 5 for details). For given values of a , q , and ω_{rf} , the increasing of p causes the narrowing of the confinement region.

values of p . For given values of ω_{rf} and q , p can be used for an effective control of the potential well depth. Therefore, the presence of the secondary frequency provides a further mechanism to change the region of confinement and also the amount of kinetic energy transferred to an ion by changing.

3.3. Classical Motion. Figures 5 and 6 present the results of numerical simulations of the confinement inside linear and 3D traps, respectively. They were obtained using the typical fourth order Runge–Kutta method to integrate the equations of motion. For the sake of illustration, we have chosen some representative values for the parameters q , a , and p .

The top panels of Figure 5 present the trajectory inside the linear trap and the corresponding phase portraits for $p = 0$ (Mathieu's case). Similarly, for the middle panels we set $p = 2$ and for the bottom panels $p = 5$. In all cases, we have used the same initial conditions, $x = z = 0$ and $dx/d\tau = dz/d\tau = 1$, and $q = 0.25$, $a = 0.01$. These are typical parameter used to confine single ions or ion clouds in linear traps.^{4,31,33} The trajectories inside a 3D trap are shown in Figure 6. The top panels present the trajectories and the corresponding phase portraits for $q = 1.23$, $a = -0.63$, and $p = 0$. For the middle panels, we set $q = 0.80$, $a = -0.76$, and $p = 2$, and for the bottom ones we set $q = 0.47$, $a = -0.88$, and $p = 5$. In all cases, we have used the same initial conditions, $z = r = (x^2 + y^2)^{1/2} = 0$ and $dz/d\tau = dr/d\tau = 1$. These parameters are located close to the tip ($q_{D,aD}$) (see Figure 3).

The simulations of Figures 4 and 5 illustrate the effect of p over the motion of a trapped ion, for example, by increasing or decreasing its spacial confinement and velocity. More specifically, one can see that it can be used to access different oscillatory motions, that is, different secular/micromotion couplings inside the trap. Note, however, that eq 5 is linear and, therefore, no matter how complicated the time dependence of the voltages applied to the trap is a single ion cannot be driven into typical nonlinear chaos. Nevertheless, the interaction between two stored ions or the damp caused by the interaction with a laser are sufficient to induce chaotic motion inside typical Paul traps.^{6,11,58,59}

It is known that deviations from the ideal quadrupole potentials (such as misalignments, nonideal shape, or truncation of the electrodes) may lead to resonances at certain operating points that make the ion orbits unstable.^{60,61} It is also known that the application of an axial DC potential in the linear trap gives rise to a harmonic defocusing radial potential.⁵⁴ The manifestation of all these phenomena in the presence of the secondary ac voltage still deserves further investigations.

3.4. Quantum Dynamics. In general, if a , q , and p are such that $\beta_x \ll 1$, the quantum dynamics of a trapped ion can be treated through the effective harmonic potential (eq 26) with number states $|n\rangle$ and energy values $E_n(p) = (n + 1/2)\hbar\nu(p)$ (see Figure 7). The interaction with laser light can be described by considering only two internal energy levels of the trapped ion, labeled $|g\rangle$ and $|e\rangle$, split by $\hbar\omega$. This effective two-level system can be driven at resonance by laser light with wave vector \mathbf{k} and frequency $\omega - \delta$. Depending on the detuning δ , it is possible to couple the ion's electronic and motional states.⁶² The Lamb-Dicke regime represents the situation where the extension of the motional wave function of the ion is much smaller than the wavelength of the incident light field. In this regime, transitions changing the motional state number by more than one can be neglected. The interaction of the laser field with the two levels of the trapped ion can be described by the Hamiltonian⁴

$$\hat{H} = \frac{\hbar\Omega_0}{2} \sigma_+ \{ 1 + i\eta(p) [\hat{a}e^{-i\nu(p)t} + \hat{a}^\dagger e^{i\nu(p)t}] \} e^{-i\delta t} \quad (28)$$

where

$$\eta(p) = k \left[\frac{\hbar}{2m\nu(p)} \right]^{1/2} \quad (29)$$

is the Lamb-Dicke parameter, now depending on p . The laser's intensity and its coupling strength to the ion are included in the Rabi frequency Ω_0 and, \hat{a} and \hat{a}^\dagger are the creation and

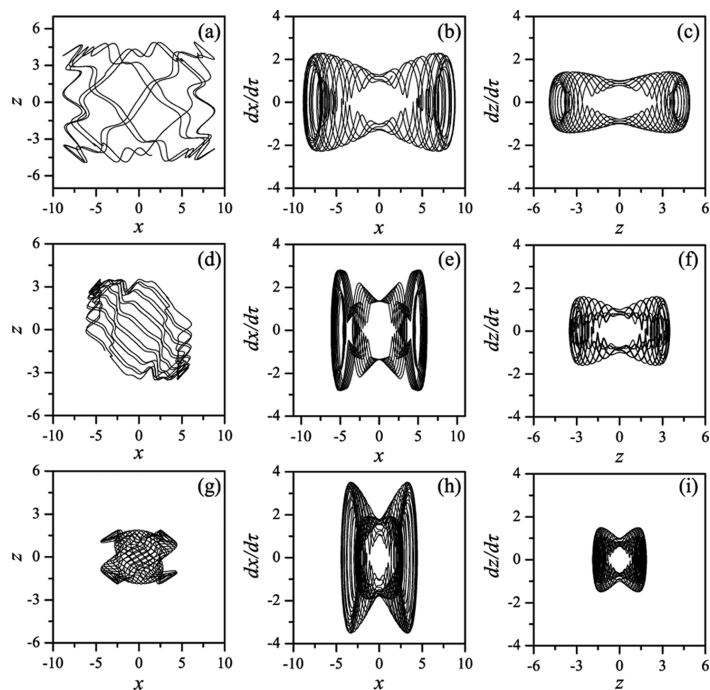


Figure 5. Trajectories and phase portraits of particles confined inside a linear trap using selected values of p . Panels in the top, middle, and bottom rows refer to $p = 0$, $p = 2$, and $p = 5$, respectively. For all cases $a = 0.01$ and $q = 0.25$.

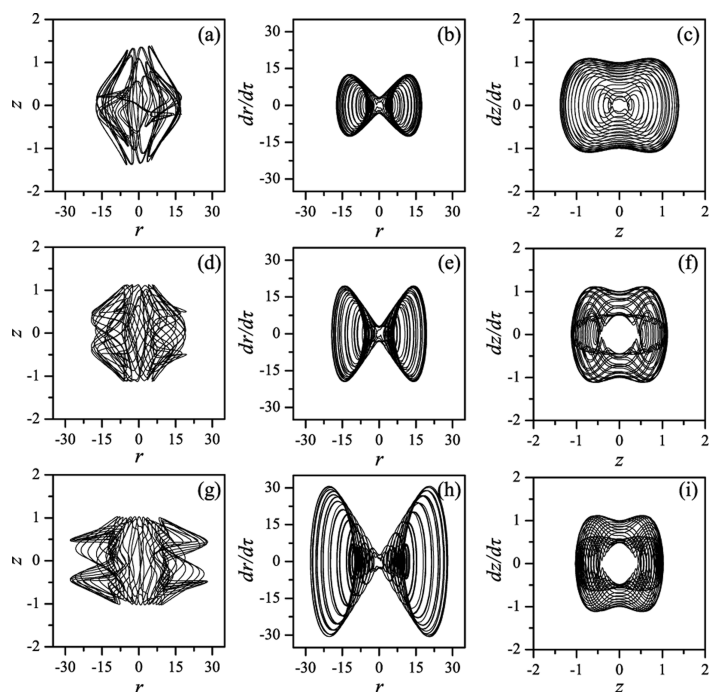


Figure 6. Trajectories and phase portraits of particles confined inside a cylindrically symmetric 3D trap using selected values of p , a and q . In the top panels, we have $p = 0$, $a = -0.63$, and $q = 1.23$. For the middle panels, we have $p = 2$, $a = -0.76$ and $q = 0.8$, and for the bottom ones we have $p = 5$, $a = -0.88$ and $q = 0.47$.

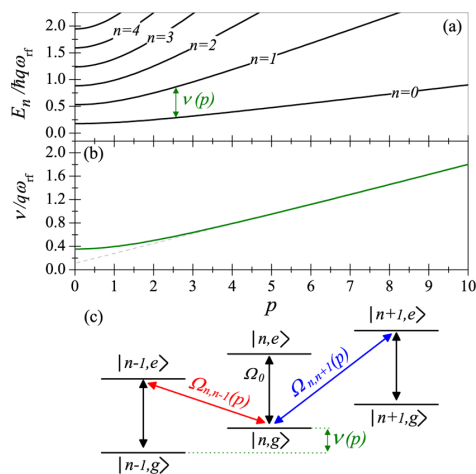


Figure 7. Depicted, in panels (a) and (b) are the equally spaced energy levels of the effective harmonic potential and the corresponding effective frequency as a function of the parameter p , respectively. Panel (c) illustrates the level structure of the coupled electronic and motional states of a two-level ion in a two frequency harmonic trap. The first-order sideband frequencies (red and blue) depend on p .

annihilation operators. This Hamiltonian will give rise to three types of transitions. When $\delta = 0$, we have carrier transitions $|n,g\rangle \leftrightarrow |n,e\rangle$ with frequency Ω_0 . These transitions will not affect the motional state. Electronic and motional degrees of freedom can be coupled by tuning the laser to one of the p -dependent sideband frequencies $\omega \pm \nu(p)$ that drive transitions $|n,g\rangle \leftrightarrow |n \pm 1,e\rangle$ with frequencies

$$\Omega_{n,n+1}(p) = \Omega_0(n+1)^{1/2}\eta(p) \quad (30)$$

$$\Omega_{n,n-1}(p) = \Omega_0 n^{1/2}\eta(p) \quad (31)$$

This dependence on p can be used to tune the sideband frequencies and also to analyze the states of motion, improving our ability to cool and manipulate trapped ions.^{62–64}

4. CONCLUSIONS

In summary, the diagrams for the lowest stability region of Paul traps driven by two frequencies were presented and analyzed. In contrast to typical Paul traps, here we have a secondary frequency that is double the primary one. The ratio between their amplitudes defines the new control parameter p that can be used to continuously change the shape of the stability region, providing different operation modes of Paul traps as mass filters, ion guides, ion sources, or ion traps. Because the position of the tip of the stability region (see Figure 3) can be moved with p , operating lines with different V/V_0 ratios can be used. Moreover, for fixed values of ω_{tr} , a , and q , the parameter p can be used to adjust the potential well depth, and therefore the energy difference between motional levels (see Figure 7), providing a further mechanism to trap, cool, and manipulate ions.

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: roncaratti@fis.unb.br. Phone: +55 61 31077700.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by CNPq. We thank the group of Computing, Theory, and Experiments of Dynamics and Kinetics Studies of Chemical Process from the University of Perugia. In particular, we thank Enzo Aquilanti for the many stimulating discussions on a wide range of topics.

■ REFERENCES

- (1) Paul, W. Electromagnetic Traps for Charged and Neutral Particles. *Rev. Mod. Phys.* **1990**, *62*, 531–540.
- (2) March, R. E. Quadrupole Ion Trap Mass Spectrometry: A View at the Turn of the Century. *Int. J. Mass Spectrom.* **2000**, *200*, 285–312.
- (3) Douglas, D. J. Linear Quadrupoles in Mass Spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* **2009**, *28*, 937–960.
- (4) Leibfried, D.; Blatt, R.; Monroe, C.; Wineland, D. Quantum Dynamics of Single Trapped Ions. *Rev. Mod. Phys.* **2003**, *75*, 281–324.
- (5) Itano, W. M.; Bergquist, J. C.; Wineland, D. J. Laser Spectroscopy of Trapped Atomic Ions. *Science* **1987**, *237*, 612–617.
- (6) Blümel, R.; Kappler, C.; Quint, W.; Walther, H. Chaos and Order of Laser-Cooled Ions in a Paul Trap. *Phys. Rev. A: At, Mol, Opt. Phys.* **1989**, *40*, 808–823.
- (7) Brown, L. S. Quantum Motion in Paul Trap. *Phys. Rev. Lett.* **1991**, *66*, 527–529.
- (8) Prestage, J. D.; Williams, A.; Maleki, L.; Djomehri, M. J.; Harabetian, E. Dynamics of Charged Particles in a Paul Radio-Frequency Quadrupole Trap. *Phys. Rev. Lett.* **1991**, *66*, 2964–2967.
- (9) Li, F. Quantum Motion of a Charged Particle in a Paul Trap. *Phys. Rev. A: At, Mol, Opt. Phys.* **1993**, *47*, 4975–4981.
- (10) Schiffer, J. P. Phase Transition in Anisotropically Confined Ionic Crystals. *Phys. Rev. Lett.* **1993**, *70*, 818–821.
- (11) Farrelly, D.; Howard, J. E. Double-Well Dynamics of Two Ions in the Paul and Penning Traps. *Phys. Rev. A: At, Mol, Opt. Phys.* **1994**, *49*, 1494–1497.
- (12) Izmailov, A. F.; Arnold, S.; Holler, S.; Myerson, A. S. Microparticle Driven by Parametric and Random Forces: Theory and Experiment. *Phys. Rev. E: Stat. Phys., Plasmas, Fluids, Relat. Interdiscip. Top.* **1995**, *52*, 1325–1332.
- (13) Cirac, J. I.; Zoller, P. Quantum Computation With Cold Trapped Ions. *Phys. Rev. Lett.* **1995**, *74*, 4091–4094.
- (14) El Ghafar, M.; Törmä, P.; Savichev, V.; Mayr, E.; Zeiler, A.; Schleich, W. P. Dynamical Localization in the Paul Trap. *Phys. Rev. Lett.* **1997**, *78*, 4181–4184.
- (15) Steane, A. The Ion Trap Quantum Information Processor. *Appl. Phys. B: Lasers Opt.* **1997**, *64*, 623–642.
- (16) Solano, E.; de Matos Filho, R. L.; Zagury, N. Deterministic Bell States and Measurement of the Motional State of Two Trapped Ions. *Phys. Rev. A: At, Mol, Opt. Phys.* **1999**, *59*, R2539–R2543.
- (17) Sørensen, A.; Mølmer, K. Entanglement and Quantum Computation with Ions in Thermal Motion. *Phys. Rev. A: At, Mol, Opt. Phys.* **2000**, *62*, 022311-1–022311-11.
- (18) Huber, G.; Schmidt-Kaler, F.; Deffner, S.; Lutz, E. Employing Trapped Cold Ions to Verify the Quantum Jarzynski Equality. *Phys. Rev. Lett.* **2008**, *101*, 070403-1–070403-4.
- (19) Retzker, A.; Thompson, R. C.; Segal, D. M.; Plenio, M. B. Double Well Potentials and Quantum Phase Transitions in Ion Traps. *Phys. Rev. Lett.* **2008**, *101*, 260504-1–260504-4.
- (20) Blatt, R.; Wineland, D. J. Entangled States of Trapped Atomic Ions. *Nature* **2008**, *453*, 1008–1015.
- (21) Landa, H.; Marcovitch, S.; Retzker, A.; Plenio, M. B.; Reznik, B. Quantum Coherence of Discrete Kink Solitons in Ion Traps. *Phys. Rev. Lett.* **2010**, *104*, 043004-1–043004-4.
- (22) Kaufmann, H.; Ulm, S.; Jacob, G.; Poschinger, U.; Landa, H.; Retzker, A.; Plenio, M. B.; Schmidt-Kaler, F. Precise Experimental Investigation of Eigenmodes in a Planar Ion Crystal. *Phys. Rev. Lett.* **2012**, *109*, 263003-1–263003-5.
- (23) Bowler, R.; Gaebler, J.; Lin, Y.; Tan, T. R.; Hanneke, D.; Jost, J. D.; Home, J. P.; Leibfried, D.; Wineland, D. J. Coherent Diabatic Ion

Transport and Separation in a Multizone Trap Array. *Phys. Rev. Lett.* **2012**, *109*, 080502-1–080502-4.

(24) Abah, O.; Roßnagel, J.; Jacob, G.; Deffner, S.; Schmidt-Kaler, F.; Singer, K.; Lutz, E. Single-Ion Heat Engine at Maximum Power. *Phys. Rev. Lett.* **2012**, *109*, 203006-1–203006-6.

(25) Chen, K.; Sullivan, S. T.; Rellergert, W. G.; Hudson, E. R. Measurement of the Coulomb Logarithm in a Radio-Frequency Paul Trap. *Phys. Rev. Lett.* **2013**, *110*, 173003-1–173003-5.

(26) Genway, S.; Li, W.; Ates, C.; Lanyon, B. P.; Lesanovsky, I. Generalized Dicke Nonequilibrium Dynamics in Trapped Ions. *Phys. Rev. Lett.* **2014**, *112*, 023603-1–023603-5.

(27) Shen, C.; Zhang, Z.; Duan, L.-M. Scalable Implementation of Boson Sampling with Trapped Ions. *Phys. Rev. Lett.* **2014**, *112*, 050504-1–050504-5.

(28) Roßnagel, J.; Abah, O.; Schmidt-Kaler, F.; Singer, K.; Lutz, E. Nanoscale Heat Engine Beyond the Carnot Limit. *Phys. Rev. Lett.* **2014**, *112*, 030602-1–030602-5.

(29) Meir, Z.; Schwartz, O.; Shahmoon, E.; Oron, D.; Ozeri, R. Cooperative Lamb Shift in a Mesoscopic Atomic Array. *Phys. Rev. Lett.* **2014**, *113*, 193002-1–193002-5.

(30) Drewsen, M.; Brodersen, C.; Hornekaer, L.; Hangst, J. S.; Schiffer, J. P. Large Ion Crystals in a Linear Paul Trap. *Phys. Rev. Lett.* **1998**, *81*, 2878–2881.

(31) Bowe, P.; Hornekaer, L.; Brodersen, C.; Drewsen, M.; Hangst, J. S.; Schiffer, J. P. Sympathetic Crystallization of Trapped Ions. *Phys. Rev. Lett.* **1999**, *82*, 2071–2074.

(32) Hornekaer, L.; Kjergaard, N.; Thommesen, A. M.; Drewsen, M. Structural Properties of Two-Component Coulomb Crystals in Linear Paul Traps. *Phys. Rev. Lett.* **2001**, *86*, 1994–1997.

(33) Hornekaer, L.; Drewsen, M. Formation Process of Large Ion Coulomb Crystals in Linear Paul Traps. *Phys. Rev. A: At, Mol, Opt. Phys.* **2002**, *66*, 013412-1–013412-12.

(34) Kjergaard, N.; Drewsen, M. Observation of a Structural Transition for Coulomb Crystals in a Linear Paul Trap. *Phys. Rev. Lett.* **2003**, *91*, 095002-1–095002-4.

(35) Mortensen, A.; Nielsen, E.; Matthey, T.; Drewsen, M. Observation of Three-Dimensional Long-Range Order in Small Ion Coulomb Crystals in an RF Trap. *Phys. Rev. Lett.* **2006**, *96*, 103001-1–103001-4.

(36) Okada, K.; Wada, M.; Takayanagi, T.; Ohtani, S.; Schuessler, H. A. Characterization of Ion Coulomb Crystals in a Linear Paul Trap. *Phys. Rev. A: At, Mol, Opt. Phys.* **2010**, *81*, 013420-1–013420-10.

(37) Willitsch, S. Coulomb-Crystallized Molecular Ions in Traps: Methods, Applications, Prospects. *Int. Rev. Phys. Chem.* **2012**, *31*, 175–199.

(38) Versolato, O. O.; Schwarz, M.; Hansen, A. K.; Gingell, A. D.; Windberger, A.; Klosowski, L.; Ullrich, J.; Jensen, F.; CrespoLopez-Urrutia, J. R.; Drewsen, M. Decay Rate Measurement of the First Vibrationally Excited State of MgH⁺ in a Cryogenic Paul Trap. *Phys. Rev. Lett.* **2013**, *111*, 053002-1–053002-5.

(39) Germann, M.; Tong, X.; Willitsch, S. Observation of Electric-Dipole-Forbidden Infrared Transitions in Cold Molecular Ions. *Nat. Phys.* **2014**, *10*, 820–824.

(40) Lemmer, A.; Cormick, C.; Schmiegelow, C. T.; Schmidt-Kaler, F.; Plenio, M. B. Two-Dimensional Spectroscopy for the Study of Ion Coulomb Crystals. *Phys. Rev. Lett.* **2015**, *114*, 073001-1–073001-5.

(41) Mølhave, K.; Drewsen, M. Formation of Translationally Cold MgH⁺ and MgD⁺ Molecules in an Ion Trap. *Phys. Rev. A: At, Mol, Opt. Phys.* **2000**, *62*, 011401-1–011401-4.

(42) Willitsch, S.; Bell, M. T.; Gingell, A. D.; Procter, S. R.; Softley, T. P. Cold Reactive Collisions between Laser-Cooled Ions and Velocity-Selected Neutral Molecules. *Phys. Rev. Lett.* **2008**, *100*, 043203-1–043203-4.

(43) Hall, F. H. J.; Aymar, M.; Raoult, M.; Dulieu, O.; Willitsch, S. Light-Assisted Cold Chemical Reactions of Barium Ions with Rubidium Atoms. *Mol. Phys.* **2013**, *111*, 1683–1690.

(44) Härter, A.; Krüchow, A.; Deiß, M.; Drews, B.; Tiemann, E.; Denschlag, J. H. Population Distribution of Product States Following

Three-Body Recombination in an Ultracold Atomic Gas. *Nat. Phys.* **2013**, *9*, 512–517.

(45) Rösch, D.; Willitsch, S.; Chang, Y.-P.; Küpper, J. Chemical Reactions of Conformationally Selected 3-Aminophenol Molecules in a Beam with Coulomb-Crystallized Ca⁺ Ions. *J. Chem. Phys.* **2014**, *140*, 124202.

(46) Seidelin, S.; Chiaverini, J.; Reichle, R.; Bollinger, J. J.; Leibfried, D.; Britton, J.; Wesenberg, J. H.; Blakestad, R. B.; Epstein, R. J.; Hume, D. B.; et al. Microfabricated Surface-Electrode Ion Trap for Scalable Quantum Information Processing. *Phys. Rev. Lett.* **2006**, *96*, 253003-1–253003-4.

(47) Arscott, F. M. *Periodic Differential Equations*; Macmillan: New York, 1964.

(48) Magnus, W.; Winkler, S. *Hill's Equation*; Wiley: New York, 1966.

(49) Roncaratti, L. F.; Aquilanti, V. Whittaker-Hill Equation, Ince Polynomials, and Molecular Torsional Modes. *Int. J. Quantum Chem.* **2010**, *110*, 716–730.

(50) Trypogeorgos, D.; Foot, C. J. A Two-Frequency Ion Trap Confining Ions with Widely Different Charge-to-Mass Ratios. 2014; <http://arxiv.org/abs/1310.6294> (accessed Oct. 22, 2015).

(51) Paul, W.; Reinhard, H. P.; von Zahn, U. Das Elektrische Massenfilter als Massenspektrometer und Isotopentrenner. *Z. Phys.* **1958**, *152*, 143–182.

(52) Raizen, M. G.; Gilligan, J. M.; Bergquist, J. C.; Itano, W. M.; Wineland, D. J. Ionic Crystals in a Linear Paul Trap. *Phys. Rev. A: At, Mol, Opt. Phys.* **1992**, *45*, 6493–6501.

(53) Raizen, M. G.; Gilligan, J. M.; Bergquist, J. C.; Itano, W. M.; Wineland, D. J. Linear Trap for High-Accuracy Spectroscopy of Stored Ion. *J. Mod. Opt.* **1992**, *39*, 233–242.

(54) Drewsen, M.; Brøner, A. Harmonic Linear Paul trap: Stability Diagram and Effective Potentials. *Phys. Rev. A* **2000**, *62*, 045401-1–045401-4.

(55) Berkeland, D. J. Linear Paul Trap for Strontium Ions. *Rev. Sci. Instrum.* **2002**, *73*, 2856–2860.

(56) Landau, L. D.; Lifshitz, E. M. *Mechanics*; Pergamon Press: Oxford, 1969.

(57) Dehmelt, H. G. Radiofrequency Spectroscopy of Stored Ions I: Storage. *Adv. At. Mol. Phys.* **1968**, *3*, 53–72.

(58) Blümel, R.; Chen, J. M.; Peik, E.; Quint, W.; Schleich, W.; Shen, Y. R.; Walther, H. Phase Transitions of Stored Laser-Cooled Ions. *Nature* **1988**, *334*, 309–313.

(59) Moore, M.; Blümel, R. Quantum Manifestations of Order and Chaos in the Paul Trap. *Phys. Rev. A: At, Mol, Opt. Phys.* **1993**, *48*, 3082–3091.

(60) Alheit, R.; Gudjons, T.; Kleinedam, S.; Wed, G. Some Observations on Higher-Order Non-Linear Resonances in a Paul Trap. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1996**, *10*, 583–590.

(61) Drakoudis, A.; Söllner, M.; Werth, G. Instabilities of Ion Motion in a Linear Paul Trap. *Int. J. Mass Spectrom.* **2006**, *252*, 61–68.

(62) Leibfried, D.; Meekhof, D. M.; Monroe, C.; King, B. E.; Itano, W. M.; Wineland, D. J. Experimental Preparation and Measurement of Quantum States of Motion of a Trapped Ion. *J. Mod. Opt.* **1997**, *44*, 2485–2505.

(63) Wineland, D. J.; Itano, W. M. Laser Cooling of Atoms. *Phys. Rev. A: At, Mol, Opt. Phys.* **1979**, *20*, 1521–1540.

(64) Diedrich, F.; Bergquist, J. C.; Itano, W. M.; Wineland, D. J. Laser Cooling to the Zero-Point Energy of Motion. *Phys. Rev. Lett.* **1989**, *62*, 403–406.