**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS
DEPARTAMENTO DE HIDRÁULICA E SANEAMENTO**

RAQUEL ANDRADE DE ROSSI

**Seleção de microalgas dos gêneros *Desmodesmus* e *Scenedesmus* produtoras
de lipídeos: otimização do cultivo e aplicação do efluente doméstico de reator
UASB como substrato alternativo à produção de biodiesel**

São Carlos

2013

RAQUEL ANDRADE DE ROSSI

Seleção de microalgas dos gêneros *Desmodesmus* e *Scenedesmus* produtoras de lipídeos: otimização do cultivo e aplicação do efluente doméstico de reator UASB como substrato alternativo à produção de biodiesel

Tese apresentada à Escola de Engenharia de São Carlos, da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências, Programa de Engenharia Hidráulica e Saneamento

Orientadora: Professora Titular Maria do Carmo Calijuri

VERSÃO CORRIGIDA

São Carlos

2013

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTA TRABALHO,
POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS
DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

R831s Rossi, Raquel Andrade de
Seleção de microalgas dos gêneros Desmodesmus e
Scenedesmus produtoras de lipídeos: otimização do
cultivo e aplicação do efluente doméstico de reator
UASB como substrato alternativo à produção de biodiesel
/ Raquel Andrade de Rossi; orientadora Maria do Carmo
Calijuri. São Carlos, 2013.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação e Área
de Concentração em Hidráulica e Saneamento -- Escola de
Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo,
2013.

1. Desmodesmus. 2. Scenedesmus. 3. otimização do
cultivo. 4. esgoto sanitário. 5. lipídeos. 6.
biodiesel. I. Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidata: Bacharel **RAQUEL ANDRADE DE ROSSI**.

Título da tese: "Seleção de microalgas dos gêneros *Desmodesmus* e *Scenedesmus* produtoras de lipídeos: otimização do cultivo e aplicação do efluente doméstico de reator UASB como substrato alternativo à produção de biodiesel".

Data da defesa: 01/11/2013

Comissão Julgadora:

Resultado:

Prof^a. Titular **Maria do Carmo Calijuri (Orientadora)**
(Escola de Engenharia de São Carlos/EESC)

Aprovada

Prof^a. Associada **Maria Bernadete Amâncio Varesche Silva**
(Escola de Engenharia de São Carlos/EESC)

Aprovada

Prof^a. Dr^a. **Ana Teresa Lombardi**
(Universidade Federal de São Carlos/UFSCar)

Aprovada

Prof. Dr. **Reinaldo Gaspar Bastos**
(Universidade Federal de São Carlos/UFSCar)

APROVADA

Prof^a. Dr^a. **Iracema de Oliveira Moraes**
(Universidade Estadual de Campinas/UNICAMP)

Aprovada

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento:

Profa. Assoc. **Maria Bernadete A. Varesche Silva**

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:
Prof. Titular **Denis Vinicius Coury**

“Quanto mais aprendemos, melhor dimensionamos nossa ignorância, melhor compreendemos nossas limitações perante o infinito poder criativo da Natureza. É comum dizer-se que a ciência é um processo. Eu acrescentaria que a ciência é um processo sem fim, uma procura num território sem fronteiras.”

“Em graus diferentes, todos fazemos parte dessa aventura, todos podemos compartilhar o êxtase que surge a cada nova descoberta; se não por intermédio de nossas próprias atividades de pesquisa, ao menos ao estudarmos as ideias daqueles que expandiram e expandem as fronteiras do conhecimento com sua criatividade e coragem intelectual.”

Marcelo Gleiser

*Dedico esta tese aos meus pais, Rosemeire e Glais,
pelo incentivo e respeito às minhas escolhas. Por
muitas vezes abdicarem de seus sonhos para que os
meus se tornassem realidade.*

AGRADECIMENTOS

O doutorado possibilitou o aprofundamento do conhecimento adquirido na graduação em Biologia, assim como o contato com novas áreas do conhecimento, além da experiência em pesquisa. Muitas pessoas contribuíram para a superação dos desafios, assim como para a realização das atividades do dia a dia. Aproveito o momento para registrar meus sinceros agradecimentos a todos que participaram de forma direta ou indireta desta pesquisa.

À Profª Dra. Maria do Carmo Calijuri, por orientar esta pesquisa e pela oportunidade e confiança em mim depositadas. Pela força e apoio transmitidos e pelo exemplo de integridade.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro (Processo nº 143279/2011-4).

Aos professores Dra. Iracema de Oliveira Moraes (Fundação André Tosello), Dra. Ana Teresa Lombardi (UFSCAR), Dr. Reinaldo G. Bastos (UFSCAR) e Dra. Maria Bernadete A. Varesche Silva (USP), membros da banca examinadora, pelas enriquecedoras contribuições.

Aos meus pais, Glais e Rosemeire, pelo incentivo, por respeitarem e apoiarem as minhas decisões, amor e exemplos de força e determinação. Obrigada por tudo que fizeram por mim.

Ao Klauss, pelo companheirismo, paciência, amor e generosidade. Obrigada por estar ao meu lado nos momentos alegres, difíceis e fazer com que eu me sinta muito feliz.

À minha irmã Barbara, pelo amor que tanto me faz bem.

Às minhas tias queridas, Daniela, Marta e Marli, pelo incentivo e carinho demonstrados.

Aos alunos e funcionários do BIOTACE, Adriana Miwa, Davi Gasparini, Flávia Bottino, Juliana Moccellini, Laís Giraldo, Lorena Secchin, Luci Queiroz, Paulo Vagner dos Santos, Sarah Vargas, Simone Casali e Tácyo Acioli, pelo apoio e bons momentos compartilhados. Agradeço em especial ao Paulo Vagner pela amizade desde a graduação e pela convivência e apoio em todos os momentos desta pesquisa.

À empresa Foz do Brasil (Rio Claro - SP) por permitir e oferecer suporte às coletas, em especial aos funcionários Gustavo van Deursen, André de Oliveira e Carlinhos.

Aos funcionários do Departamento de Hidráulica e Saneamento, Flávia, Fernanda, Sá e Rose.

À Maria Angela Tallarico pela boa vontade em ajudar com as análises cromatográficas.

À Isabel da Biofísica Molecular (IFSC) pelo auxílio no uso da centrífuga.

RESUMO

ROSSI, R. A. (2013). *Seleção de microalgas dos gêneros Desmodesmus e Scenedesmus produtoras de lipídeos: otimização do cultivo e aplicação do efluente doméstico de reator UASB como substrato alternativo à produção de biodiesel*. Tese (Doutorado). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo (EESC-USP), São Carlos. 139p

Microalgas são interessantes fontes de lipídeos para produção de biodiesel. No entanto, seus cultivos para tal finalidade são apenas viáveis do ponto de vista ambiental e econômico se apresentarem elevadas produtividades de biomassa e de lipídeos e estiverem associados ao uso de efluentes. A presente pesquisa estudou as condições de cultivo das microalgas *Desmodesmus* e *Scenedesmus*, considerando o conteúdo lipídico para produção de biodiesel, aliado à análise da eficiência de remoção de nutrientes pelas cepas, além da avaliação do efluente de reator UASB (esgoto sanitário) como meio alternativo ao cultivo. Dentre 22 cepas de microalgas isoladas de ambientes de água doce e lagoas de estabilização, 2 foram selecionadas para otimização de seus cultivos diante das suas capacidades de acumular lipídeos e crescerem em diferentes condições físico-químicas. Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) foi aplicado para otimização das condições de crescimento celular das cepas LE17 (34,5°C, pH 8,2 e 200 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) e ITU07 (34°C, pH 8,2 e 180 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Definidas as condições ótimas, foram realizados os cultivos mixotróficos das cepas em batelada (8 litros) em meio sintético e em efluente de reator UASB (50%). Nos cultivos em efluente de reator UASB as produtividades de biomassa das cepas LE17 e ITU07 foram, respectivamente, 3,4 e 3 vezes maiores do que as obtidas na condição não otimizada (controle) o que demonstrou a viabilidade do esgoto sanitário como meio alternativo ao cultivo de microalgas. Nos cultivos em meio sintético as produtividades de biomassa das cepas LE17 e ITU07 foram, respectivamente, 48,3 e 22,6 vezes maiores do que as observadas na condição não otimizada (controle). Os conteúdos lipídicos das cepas sob condição otimizada (em meio sintético e no efluente do reator) apresentaram aumento (1%-6,1%) em relação aos observados na condição controle. Assim, houve elevação das produtividades de biomassa das cepas e por consequência, aumento da produção de lipídeos. Os principais ácidos graxos identificados nos lipídeos extraídos foram C16:0 e C18:1. O estudo da remoção de nutrientes pelas microalgas verificou que as cepas são eficientes na remoção de nitrogênio e fósforo tanto do meio sintético quanto do efluente do reator UASB.

Palavras-chave: otimização do cultivo, esgoto sanitário, lipídeos e biodiesel

ABSTRACT

ROSSI, R. A. (2013). *Selection of lipid-bearing microalgae of the genus Desmodesmus and Scenedesmus: culture optimization and application of domestic wastewater from UASB reactor as an alternative substrate for the production of biodiesel*. Thesis (Doctoral). School of Engineering in São Carlos, University of São Paulo, São Carlos. 139p.

Microalgae are interesting source of lipids for biodiesel production. However, their cultivation for this purpose is only economic and environmental feasible if high biomass and lipid productivity are achieved under wastewater use as nutrients source. This research aimed to improve the culture conditions of Chlorococcales microalgae (*Desmodesmus* and *Scenedesmus*), considering the lipid content for biodiesel production, the efficiency of nutrient removal by strains, besides the evaluation of wastewater from UASB reactor as an alternative substrate for the cultures. Among 22 strains of microalgae isolated from freshwater environments and stabilization ponds, 2 were selected for culture optimization due to their capacity of accumulating lipids and growing under different physicochemical conditions. Central Composite Design (CCD) was applied to optimization of cell growth conditions of strains LE17 (34,5°C, pH 8,2 e 200 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) and ITU07 (34°C, pH 8,2 e 180 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). The optimal conditions were defined and mixotrophic batch cultivations (8 liters) of strains in synthetic medium and in wastewater from UASB reactor (50%) were performed. The biomass productivities of the strains LE17 and ITU07 in domestic wastewater cultivation were, respectively, 3,4 e 3,0 times higher than those obtained in the non-optimized condition (control). This suggested the feasibility of wastewater use as an alternative substrate for the microalgae cultivation. The biomass productivities of the strains LE17 and ITU07 in synthetic medium cultivation were, respectively, 48,3 e 22,6 times higher than those observed in non-optimized condition (control). The lipid content of strains under optimized conditions (in synthetic medium and domestic wastewater) showed an increase (1% - 6,1%) compared to those observed in the control condition. Thus, there was an increase in biomass productivities of the strains and consequently, increased production of lipids. The major fatty acids identified in the extracted lipids were C16:0 e C18:1. The study of nutrients removal by microalgae found that the strains are efficient in the uptake of nitrogen and phosphorus from both the synthetic medium and wastewater from the UASB reactor.

Key-words: culture optimization, domestic wastewater, lipids and biodiesel

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	23
2. HIPÓTESES	25
3. OBJETIVOS	27
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	29
4.1. Microalgas	29
4.2. Chlorococcales: <i>Desmodesmus</i> e <i>Scenedesmus</i>	29
4.3. Aplicação Biotecnológica das Microalgas	30
4.4. Microalgas: Fonte de Lipídeos para Produção de Biodiesel	33
4.5. Uso de Efluentes para o Cultivo de Microalgas	36
4.6. Otimização do Cultivo	38
5. MATERIAL E MÉTODOS	40
5.1. Etapa 1	41
5.1.1. Coletas	41
5.1.2. Amostragens	42
5.1.3. Isolamento das Microalgas	43
5.2. Etapa 2	44
5.2.1. Seleção das Microalgas	44
5.2.2. Cultivo das Microalgas em Diferentes Condições Físico-Químicas	45
5.2.3. Otimização do Cultivo das Microalgas	47
5.3. Etapa 3	50
5.3.1. Coleta do Efluente de Reator UASB	50
5.3.2. Caracterização do Efluente	52
5.3.3. Cultivo das Microalgas em Diferentes Concentrações do Efluente	53
5.3.4. Cultivo das Microalgas em Batelada	54
5.3.5. Análises Bioquímicas da Biomassa	56
6. RESULTADOS	57
6.1. Microalgas Isoladas	57
6.2. Microalgas Seleccionadas	59
6.3. Cultivo das Microalgas em Diferentes Condições Físico-Químicas	63
6.3.1. Intensidade Luminosa	66
6.3.2. Temperatura	69
6.3.3. pH	71
6.3.4. Relação de Nitrogênio e Fósforo (N:P)	73
6.3.5. Ácido Acético	75
6.3.6. Ácido Butírico	78

6.3.7. Ácido Propiônico.....	79
6.3.8. Frutose	82
6.3.9. Glicose.....	84
6.3.10. Sacarose	87
6.4. Otimização do Cultivo	90
6.4.1. DCCR para Otimização do Crescimento Celular – Cepa LE17.....	91
6.4.2. Primeiro DCCR para Otimização do Crescimento Celular – Cepa ITU07	96
6.4.3. Segundo DCCR para Otimização do Crescimento Celular – Cepa ITU07	100
6.5. Cultivo das Microalgas em Batelada – Escala de Bancada.....	105
6.5.1. Caracterização do Efluente.....	105
6.5.2. Cultivo das Microalgas em Diferentes Concentrações do Efluente.....	109
6.5.3. Cultivos na Condição Otimizada.....	110
7. CONCLUSÕES	125
8. RECOMENDAÇÕES	127
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	128

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Produção de biocombustíveis e bioprodutos combinados com assimilação de nutrientes de efluentes e biomitigação de CO ₂	31
Figura 2 - Produção de energia pela conversão da biomassa microalgal por processos biomíquico, termoquímico, químico e conversão direta.....	32
Figura 3 - Fluxograma das etapas desenvolvidas no trabalho.....	40
Figura 4 - Células das cepas isoladas semeadas em meio de cultura WC líquido (5 mL) em tubos de ensaio (10 mL) e mantidos na sala climatizada do BIOTACE.....	43
Figura 5 – Cultivos das microalgas em tubos acondicionados em incubadoras	47
Figura 6 - Vista aérea da Estação de Tratamento (ETE) Jardim das Flores.....	51
Figura 7 - Fluxograma do processo da ETE Jardim das Flores.....	51
Figura 8 - Imagens do enriquecimento das amostras (a) e esgotamento celular (b) para isolamento das cepas de microalgas.....	58
Figura 9 - Fluorescência do conteúdo lipídico das cepas isoladas, na condição controle (14 mg.L ⁻¹ de N) e sob limitação de nitrogênio (1 mg.L ⁻¹ de N). Destaque para os valores de fluorescência dos lipídeos das cepas: ITU07, LE 17 e UF 21.....	60
Figura 10 - Imagens das microalgas selecionadas LE17 (A), IP07 (B) e UF21(C)	60
Figura 11 - Imagens da cepa LE17 cultivada sob limitação de nitrogênio (1 mg.L ⁻¹); A: microscopia de luz e B: microscopia de fluorescência (células coradas com <i>Nile Red</i>), em vermelho a fluorescência da clorofila e em amarelo a fluorescência do lipídeo.....	62
Figura 12 - Curvas de calibração entre concentração celular e absorbância (683 nm) das cepas LE17, ITU07 e UF21, cultivadas em meio WC (controle) (coluna A) e meio WC acrescido com glicose (coluna B).....	64
Figura 13 - Curvas de crescimento, pela absorbância a 683 nm (X e X ₀), das microalgas LE17, ITU07 e UF21 cultivadas nas condições: fotoautotrófica, heterotrófica (1 g.L ⁻¹ de glicose) e mixotrófica (1 g.L ⁻¹ de glicose).....	66
Figura 14 - Curvas de crescimento, pela absorbância a 683 nm (X e X ₀), das cepas LE 17, ITU 07 e UF 21 em meio WC com variação da intensidade luminosa	68
Figura 15 - Fluorescência dos lipídeos acumulados no 20º dia de cultivo, das cepas de microalgas LE 17, ITU 07 e UF 21 em diferentes intensidades luminosas	68
Figura 16 - Curvas de crescimento, pela absorbância a 683 nm (X e X ₀), das cepas LE 17, ITU 07 e UF 21 em meio WC com variação da temperatura	70
Figura 17 - Fluorescência dos lipídeos acumulados no 20º dia de cultivo, das cepas de microalgas LE 17, ITU 07 e UF 21 sob diferentes temperaturas	70
Figura 18 - Curvas de crescimento, pela absorbância a 683 nm (X e X ₀), das cepas LE 17, ITU 07 e UF 21 em meio WC com variação do pH.....	72

Figura 19 - Fluorescência dos lipídeos acumulados no 20º dia de cultivo, das cepas de microalgas LE 17, ITU 07 e UF 21 em diferentes pH.....	72
Figura 20 - Curvas de crescimento, pela absorbância a 683 nm (X e X_0), das cepas LE 17, ITU 07 e UF 21 em meio WC com variação da relação N:P	74
Figura 21 - Fluorescência dos lipídeos acumulados no 20º dia de cultivo, das cepas de microalgas LE 17, ITU 07 e UF 21 sob variação de N:P.....	74
Figura 22 - Curvas de crescimento, pela absorbância a 683 nm (X_0 e X), das cepas LE 17, ITU 07 e UF 21 em meio WC com variação de ácido acético e na condição controle (sem adição de ácido acético)	76
Figura 23 - Fluorescência dos lipídeos acumulados no 20º dia de cultivo das cepas de microalgas LE 17, ITU 07 e UF 21 cultivadas em diferentes concentrações de ácido acético e na condição controle (sem adição de ácido acético)	77
Figura 24 - Curvas de crescimento, pela absorbância a 683 nm (X e X_0), das cepas LE 17, ITU 07 e UF 21 em meio WC com variação de ácido butírico e na condição controle (sem adição de ácido butírico).....	78
Figura 25 - Fluorescência dos lipídeos acumulados no último dia de cultivo, das cepas de microalgas LE 17, ITU 07 e UF 21 em diferentes concentrações de ácido butírico e na condição controle (sem adição de ácido butírico)	79
Figura 26 - Curvas de crescimento, pela absorbância a 683 nm (X e X_0), das cepas LE 17, ITU 07 e UF 21 em meio WC com variação da concentração de ácido propiônico e na condição controle (sem ácido propiônico).....	81
Figura 27 - Fluorescência dos lipídeos acumulados no último dia de cultivo, das cepas de microalgas LE 17, ITU 07 e UF 21 em diferentes concentrações de ácido propiônico e na condição controle (sem adição do ácido propiônico)	81
Figura 28 - Curvas de crescimento, pela absorbância a 683 nm (X e X_0), das cepas LE 17, ITU 07 e UF 21 em meio WC com variação de frutose e na condição controle (sem adição de frutose)	82
Figura 29 - Fluorescência dos lipídeos acumulados no último dia de cultivo das cepas de microalgas LE 17, ITU 07 e UF 21, em diferentes concentrações de frutose e na condição controle (sem adição de frutose)	83
Figura 30 - Curvas de crescimento, pela absorbância a 683 nm (X e X_0), das cepas LE 17, ITU 07 e UF 21 em meio WC com variação de glicose e na condição controle (sem adição de glicose)	85
Figura 31 - Fluorescência dos lipídeos acumulados no último dia de cultivo, das cepas de microalgas LE 17, ITU 07 e UF 21 em diferentes concentrações de glicose e na condição controle (sem adição de glicose)	86

Figura 32 - Imagens da cepa ITU07 cultivada na condição controle (A) e sob 5 g.L ⁻¹ de glicose (B); Microscopia de fluorescência (células coradas com <i>Nile Red</i>), em vermelho a fluorescência da clorofila e em amarelo a fluorescência do lipídeo	87
Figura 33 - Curvas de crescimento, pela absorbância a 683 nm (X e X ₀), das cepas LE 17, ITU 07 e UF 21 em meio WC com variação de sacarose e na condição controle (sem adição de sacarose).....	88
Figura 34 - Fluorescência dos lipídeos acumulados no último dia de cultivo, das cepas de microalgas LE 17, ITU 07 e UF 21 em diferentes concentrações de sacarose e na condição controle (sem adição de sacarose)	89
Figura 35 - Superfície de resposta (A) e curvas de contorno (B) para $\mu_{\max}$ (dia ⁻¹) em função da Intensidade Luminosa (IL) ($\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) e temperatura (°C), da cepa LE 17.....	94
Figura 36 - Superfície de resposta e curvas de contorno para $\mu_{\max}$ (dia ⁻¹) em função da Intensidade Luminosa (IL) ($\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) e pH (A); pH e temperatura (°C) (B); temperatura (°C) e Intensidade Luminosa ($\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) (C), do primeiro DCCR da cepa ITU07	99
Figura 37 - Superfície de resposta (A) e curvas de contorno (B) para $\mu_{\max}$ (dia ⁻¹) em função da Intensidade Luminosa (IL) ($\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) e temperatura (°C), do segundo DCCR da cepa ITU07.....	103
Figura 38 - Curvas de crescimento, pela absorbância a 683 nm, das cepas LE17 e ITU07 cultivadas em diferentes concentrações do efluente de reator UASB	109
Figura 39 - Velocidades específicas máximas de crescimento ($\mu_{\max}$) das cepas LE17 e ITU07 cultivadas em diferentes concentrações do efluente de reator UASB.....	110
Figura 40 - Aspecto dos cultivos na condição otimizada em meio sintético no 1º dia (A) e no 2º dia (B)	111
Figura 41 - Perfil de crescimento da cepa LE17 e os valores de pH (coluna A); fluorescências dos lipídeos acumulados (coluna B); remoção de nutrientes (N e P) e glicose (meio sintético) (coluna C) nos cultivos na condição otimizada em meio sintético e otimizada em efluente (50%), além dos valores obtidos na condição controle	115
Figura 42 - Perfil de crescimento da cepa ITU07 e os valores de pH (coluna A); fluorescências dos lipídeos acumulados (coluna B); remoção de nutrientes (N e P) e glicose (meio sintético) (coluna C) nos cultivos na condição otimizada em meio sintético e otimizada em efluente (50%), além dos valores obtidos na condição controle	116
Figura 43 - Teor (%) de triacilgliceróis (TAG) da fração lipídica das cepas LE17 e ITU07 no último dia dos cultivos: controle, na condição otimizada em efluente (50%) e otimizada em meio sintético	122

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Produtividades da biomassa e lipídica de microalgas cultivadas em esgoto sanitário.....	37
Tabela 2 - Origem das amostras coletadas, data e local em que foram realizadas.....	41
Tabela 3 - Composição do meio de cultura WC	42
Tabela 4 - Variáveis analisadas no cultivo das cepas selecionadas e as condições em que foram testadas.....	46
Tabela 5 - Fatores do DCCR para otimização do crescimento celular da cepa LE17 e seus níveis (reais e codificados)	48
Tabela 6 - Fatores do primeiro DCCR para otimização do crescimento celular da cepa ITU07 e seus níveis (reais e codificados).....	48
Tabela 7 - Fatores do segundo DCCR para otimização do crescimento celular da cepa ITU07 e seus níveis (reais e codificados)	49
Tabela 8 - Variáveis determinadas para caracterização do efluente de reator UASB e, os métodos, equipamentos e referências empregados	53
Tabela 9 - Condições dos cultivos em batelada (8 L).....	54
Tabela 10 - Variáveis monitoradas durante os cultivos em batelada, além dos métodos e equipamentos utilizados	55
Tabela 11 - Origem das amostras, local em que foram coletadas e código designado, com a respectiva ordem no isolamento, para cada cepa	57
Tabela 12 - Velocidades específicas máximas de crescimento ($\mu\text{máx}$) das cepas LE 17, ITU 07 e UF 21 nos cultivos em meio WC com variação da intensidade luminosa	68
Tabela 13 - Velocidades específicas máximas de crescimento ($\mu\text{máx}$) das cepas LE 17, ITU 07 e UF 21 nos cultivos em meio WC com variação da temperatura.....	70
Tabela 14 - Velocidades específicas máximas de crescimento ($\mu\text{máx}$) das cepas LE 17, ITU 07 e UF 21 nos cultivos em meio WC com variação do pH	72
Tabela 15 - Velocidades específicas máximas de crescimento ($\mu\text{máx}$) das cepas LE 17, ITU 07 e UF 21 nos cultivos em meio WC com variação de N:P	74
Tabela 16 - Velocidades específicas máximas de crescimento ($\mu\text{máx}$) das cepas LE 17, ITU 07 e UF 21 nos cultivos em meio WC com variação da concentração de ácido acético e na condição controle (sem adição de ácido acético)	77
Tabela 17 - Velocidades específicas máximas de crescimento ($\mu\text{máx}$) das cepas LE 17, ITU 07 e UF 21 nos cultivos em meio WC com variação da concentração de ácido butírico e na condição controle (sem adição de ácido butírico)	79

Tabela 18 - Velocidades específicas máximas de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) das cepas LE 17, ITU 07 e UF 21 nos cultivos em meio WC com variação da concentração de ácido propiônico e na condição controle (sem adição de ácido propiônico)	81
Tabela 19 - Velocidades específicas máximas de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) das cepas LE 17, ITU 07 e UF 21 nos cultivos em meio WC, com variação da concentração de frutose e na condição controle (sem adição de frutose)	83
Tabela 20 - Velocidades específicas máximas de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) das cepas LE 17, ITU 07 e UF 21 nos cultivos em meio WC com variação da concentração de glicose e na condição controle (sem adição de glicose)	85
Tabela 21 - Velocidades específicas máximas de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) das cepas LE 17, ITU 07 e UF 21 nos cultivos em meio WC com variação da concentração de sacarose e na condição controle (sem adição de sacarose)	88
Tabela 22 - Concentração de nitrogênio, fósforo e glicose em meio de cultura WC acrescido com 1 g.L ⁻¹ de glicose nos cultivos das microalgas LE17 e ITU07 e, porcentagem de assimilação desses nutrientes.....	90
Tabela 23 - Matriz do DCCR com níveis experimentais e codificados das variáveis, respostas de $\mu_{\text{máx}}$ (dia ⁻¹) experimentais e preditas pelo modelo para a cepa LE17	92
Tabela 24 - Coeficientes de regressão para a resposta da $\mu_{\text{máx}}$ da cepa LE 17	92
Tabela 25 - Análise de variância (ANOVA) do primeiro modelo quadrático para predição da velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) da cepa LE 17	93
Tabela 26 - Respostas experimental e prevista da $\mu_{\text{máx}}$ na condição ótima apontada pelo modelo do DCCR para a cepa LE17	95
Tabela 27 - Matriz do primeiro DCCR com níveis experimentais e codificados das variáveis, respostas de $\mu_{\text{máx}}$ (dia ⁻¹) experimentais e preditas pelo modelo para a cepa ITU07	97
Tabela 28 - Coeficientes de regressão para a resposta da $\mu_{\text{máx}}$ do primeiro DCCR da cepa ITU07	98
Tabela 29 - Análise de variância (ANOVA) do primeiro modelo quadrático para predição da velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) da cepa ITU07	98
Tabela 30 - Matriz do segundo DCCR com níveis experimentais e codificados das variáveis, respostas de $\mu_{\text{máx}}$ (dia ⁻¹) experimentais e preditas pelo modelo para a cepa ITU07	101
Tabela 31 - Coeficientes de regressão para a resposta da μ_{max} do segundo DCCR da cepa ITU07	102
Tabela 32 - Análise de variância (ANOVA) do segundo modelo quadrático para predição da velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) da cepa ITU07	102
Tabela 33 - Respostas experimentais e previstas da $\mu_{\text{máx}}$ na condição ótima apontada pelo modelo do DCCR para a cepa ITU07	104

Tabela 34 - Variáveis determinadas para caracterização do efluente de reator UASB utilizado	106
Tabela 35 - Concentração de ácidos orgânicos, carboidratos e alcoóis analisados no efluente de reator UASB utilizado	107
Tabela 36 - Concentração de íons metálicos analisados no efluente de reator UASB utilizado	108
Tabela 37 - Velocidades específicas máximas de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$), tempos de geração (Tg) e produtividades das biomassas das cepas LE17 e ITU07 nos cultivos: controle, condição otimizada em efluente (50%) e otimizada em meio sintético	118
Tabela 38 - Remoção de nutrientes (N e P) e glicose (meio sintético) das cepas LE 17 e ITU07 nos cultivos: controle, na condição otimizada em efluente (50%) e otimizada em meio sintético	119
Tabela 39 - Composição da biomassa das cepas LE17 e ITU07 cultivadas nas condições: controle, condição otimizada em efluente (50%) e otimizada em meio sintético.....	120
Tabela 40 - Composição em ácidos graxos da fração lipídica da biomassa das cepas LE 17 e ITU 07 no último dia dos cultivos: controle, condição otimizada em efluente (50%) e condição otimizada em meio sintético	124

1. INTRODUÇÃO

A aplicação biotecnológica das microalgas é diversa. Esses micro-organismos são fonte de quantidades relevantes de lipídeos, proteínas e carboidratos que podem ser convertidos em produtos de interesse comercial. A utilização de algas como fonte de energia não é nova, mas tornou-se emergente nesta década devido às preocupações ambientais e ao aumento da demanda energética.

Em certas condições de cultivo, microalgas sintetizam em quantidades relevantes triacilgliceróis, matéria-prima necessária à produção de biodiesel. Apesar das vantagens de produtividade em relação às culturas terrestres tradicionais, a produção de biodiesel de microalgas só é considerada ambientalmente favorável e viável do ponto de vista econômico se o sistema de cultivo estiver acoplado ao uso de água residuária. Nitrogênio e fósforo estão disponíveis nessas fontes sem o custo adicional de obtenção, balanceando favoravelmente o sistema produtivo.

Reatores e lagoas anaeróbias empregados no tratamento de águas residuárias das mais diversas origens geram efluentes ricos em nutrientes tais como: nitrogênio, fósforo e gás metano, o qual é resultante da degradação microbiológica anaeróbia. A utilização de microalgas como estratégia de tratamento de efluentes sanitário e agroindustrial é uma técnica relatada há algumas décadas. Microalgas assimilam radiação solar e gás carbônico e produzem o oxigênio requerido à degradação aeróbia da matéria orgânica. Além disso, atuam na assimilação de nutrientes, principalmente nitrogênio e fósforo, responsáveis pela eutrofização gerando biomassa com valor econômico e oferecendo valiosa alternativa de tratamento de efluentes.

Ambientes de água doce e sistemas de lagoa de estabilização podem ser fonte potencial de cepas que possuam diferencial adaptativo e metabólico para aplicação em tratamento de efluentes. Entre as microalgas de interesse para a biossíntese lipídica estão as Chlorococcales: *Desmodesmus* e *Scenedesmus*, devido às suas capacidades de acumular lipídeos e à possibilidade de seus cultivos em meio eutrofizado.

Nesse contexto, é interessante investigar o uso do esgoto sanitário de duas formas distintas: como fonte, em lagoas de estabilização, para o isolamento de linhagens de *Desmodesmus* e *Scenedesmus*, e a partir de reatores anaeróbios como meio ao crescimento dessas microalgas com propósito de biorremediação e síntese de biomassa algal para produção de biodiesel.

Para viabilizar o cultivo em efluente, é importante o conhecimento dos aspectos físicos, químicos e biológicos que influenciam o crescimento, o que possibilita a otimização do cultivo, uma forma de alcançar elevadas produtividades de biomassa e de lipídeos sem que haja elevação dos custos.

Assim, esta pesquisa tem por proposta explorar o potencial biotecnológico de microalgas de forma sustentável do ponto de vista ambiental e econômico ao agregar tratamento de águas residuárias e produção de um composto (lipídeos) de interesse econômico a partir da biomassa algal.

2. HIPÓTESES

Um dos desafios científico e tecnológico do biodiesel de microalgas é a redução de seu custo de produção. Há diversos fatores que o afetam e, na presente pesquisa, foram considerados: meio de cultivo utilizado, produtividade de biomassa e conteúdo lipídico das culturas. O processo ideal envolve elevada produtividade de biomassa e elevado conteúdo lipídico da microalga. No entanto, o acúmulo ocorre à custa do crescimento celular mais lento devido às condições de estresse. Assim, estratégias que alcancem a melhor combinação entre produção de biomassa e conteúdo lipídico devem ser aplicadas.

Diante do exposto, as seguintes hipóteses foram consideradas:

- i. Pressupõe-se que a otimização do cultivo de microalgas, levando-se em consideração o conteúdo lipídico, possibilite a elevação da produtividade de biomassa e uma maior produção de lipídeos;
- ii. O efluente de reator UASB seja viável como meio ao crescimento de microalgas, por oferecer nutrientes, principalmente nitrogênio e fósforo;
- iii. Espécies e linhagens de microalgas Chlorococcales (*Desmodesmus* e *Scenedesmus*) sejam boas produtoras de lipídeos, cresçam com facilidade em condições de laboratório e apresentem tolerância às condições do efluente de interesse;
- iv. As microalgas Chlorococcales (*Desmodesmus* e *Scenedesmus*) sejam capazes de remover com eficiência nitrogênio e fósforo do efluente de reator UASB.

3. OBJETIVOS

Esta pesquisa teve como objetivo principal o estudo das condições de cultivo das microalgas dos gêneros *Desmodesmus* e/ou *Scenedesmus*, considerando-se o conteúdo lipídico para produção de biodiesel, aliado à análise da eficiência de remoção de nutrientes das cepas, além da avaliação do efluente de reator UASB como meio alternativo ao cultivo.

A pesquisa foi dividida em três etapas. Os objetivos específicos estão relacionados a seguir:

▪ ETAPA 1

- i. Isolar espécies de microalgas dos gêneros *Desmodesmus* e *Scenedesmus* a partir de amostras coletadas de ambientes de água doce e lagoas de estabilização.

▪ ETAPA 2

- i. Selecionar microalgas que apresentam maior acúmulo lipídico sob estresse nutricional (limitação de nitrogênio);
- ii. Estudar o efeito de diferentes condições físico-químicas (intensidade luminosa, temperatura, pH, fonte inorgânica e orgânica de nutrientes) em cultivos das microalgas selecionadas, com a intenção de estabelecer as faixas dessas variáveis em que ocorra elevação do crescimento celular e do acúmulo de lipídeos para aplicação na otimização dos cultivos;
- iii. Estudar a otimização do crescimento celular pela aplicação da técnica de Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) em cultivo das microalgas em meio de cultura (sintético) e em efluente de reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo (reator UASB).

▪ ETAPA 3

- i. Avaliar a otimização do crescimento celular dos cultivos em meio de cultura (sintético) e em efluente de reator UASB pela produtividade de biomassa e verificar o acúmulo lipídico final;
- ii. Analisar a eficiência das microalgas em remover nutrientes (nitrogênio e fósforo) dos meios utilizados nos cultivos: meio de cultura (sintético) e efluente de reator UASB.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1. Microalgas

O termo alga é comumente empregado para designar um grupo polifilético formado por vários táxons de organismos aquáticos e foto-autotróficos. Apesar das algas e plantas produzirem compostos de reserva em comum, utilizarem estratégias de defesa similares contra predadores e parasitas e apresentarem similaridades morfológicas, apenas as algas verdes (*Chlorophyta*) têm relação evolutiva com os vegetais superiores (BARSANTI e GUALTIERI, 2006).

O grupo das algas compreende tanto as macroalgas como as microalgas. Microalgas apresentam dois tipos celulares, eucarioto e procarioto. As células eucarióticas têm organelas (núcleo, plastídios, mitocôndria, complexo de Golgi e flagelo), já as procarióticas não apresentam compartimentalização interna por membranas (como núcleo) exemplo, cianobactérias, as quais são classificadas no Reino *Eubacteria* (LEE, 2008).

Microalgas estão presentes em água doce, marinha e salobra, no entanto podem ser encontradas em diversos ambientes como na neve, em águas termais, nos líquens e até em solos do deserto. Desempenham a função de produtores primários em várias cadeias tróficas pela fixação da energia solar e do CO₂ atmosférico em moléculas orgânicas, além de contribuírem com aproximadamente 40-50% do oxigênio na atmosfera através do metabolismo fotossintético (ANDERSEN e KAWACHI, 2005).

4.2. Chlorococcales: *Desmodesmus* e *Scenedesmus*

Chlorococcales é uma ordem pertencente às clorofíceas que representam um amplo grupo taxonômico do qual muitas microalgas foram identificadas como produtoras de lipídeos. Isto se deve por, naturalmente acumularem mais lipídeos do que outros taxa de microalgas, estarem em diversos ambientes naturais, serem facilmente isoladas e crescerem rapidamente sob condições de laboratório (HU et al., 2008).

Desmodesmus e *Scenedesmus* são considerados gêneros comuns e cosmopolitas dentre as Chlorococcales. Seus exemplares ocorrem em habitats oligotróficos, mesotróficos e principalmente em eutróficos (BICUDO e MENEZES, 2005). As espécies do gênero *Scenedesmus* que possuem espinhos nas células extremas e/ou intermediárias do cenóbio

foram recentemente transferidas para o gênero *Desmodesmus* An, Friedl & Hegewald (HEGEWALD, 2000), com base em estudos morfológicos e genéticos (sequência do DNA ribossômico ITS-2).

4.3. Aplicação Biotecnológica das Microalgas

A aplicação biotecnológica das microalgas é diversa. As rotas metabólicas que realizam como fotossíntese e respiração podem ser exploradas biotecnologicamente para diversas finalidades. Estes micro-organismos são fonte de quantidades relevantes de carboidratos, proteínas e lipídeos que podem ser convertidos a produtos de interesse comercial (CHISTI, 2007; DEMIRBAS, 2011; VANTHOOR-KOOPMANS et al., 2013).

Microalgas são capazes de acumular em certas condições de cultivo acima de 50% de seu peso seco em carboidratos, sendo que a composição e o metabolismo destes compostos podem diferir significativamente de uma espécie para outra (HO et al, 2012). Geralmente, os carboidratos estão presentes na parede celular como celulose, hemicelulose, polissacarídeos e nos plastídeos na forma de amido como composto de reserva (CHEN et al., 2013). A glicose presente na forma de amido e celulose pode ser utilizada para produção de biocombustíveis, principalmente etanol e hidrogênio; já os polissacarídeos representam uma classe de compostos de alto valor agregado com aplicações na produção de alimentos, cosméticos, estabilizadores, emulsificantes, lubrificantes, espessantes e medicamentos (CHOCHOIS et al., 2009; ARAD e LEVY-ONTMAN, 2010; JOHN et al., 2011)

O conteúdo proteico em microalgas pode ser superior a 60% da biomassa seca, como no caso da cianobactéria *Spirulina platensis*; já nas clorofíceas *Scenedesmus obliquus* e *Chlorella vulgaris* representa 50-60% do peso seco. A fração proteica dependerá da espécie e da condição de cultivo. No geral, esses micro-organismos têm proteínas com elevado valor nutricional, pela composição em aminoácidos essenciais e por sua quantidade relevante. Dessa forma, a biomassa proteica pode ser empregada na alimentação animal e humana, além de ser uma interessante fonte de peptídeos bioativos que apresentam potencial terapêutico (BECKER, 2007; KIM e KANG, 2011; IBÁÑEZ e CIFUENTES, 2013).

Os pigmentos presentes nas algas constituem uma fração valiosa da biomassa. As clorofilas podem ser usadas como anti-inflamatórios, os carotenóides reduzem o risco de

câncer e a astaxantina é considerada um eficaz antioxidante com aplicações na indústria alimentícia, de cosméticos e farmacêutica (CHRISTAKI et al., 2011).

Lipídeos são acumulados por microalgas em condições específicas de cultivo, como por exemplo, sob condição de estresse. Os lipídeos presentes nesses micro-organismos são classificados em dois tipos, de acordo com o tamanho de suas cadeias carbônicas, em ácidos graxos de 14-20 carbonos, os quais são apropriados para produção de biodiesel e ácidos graxos poli-insaturados (PUFAS), que contêm acima de 20 carbonos, que podem ser empregados no mercado de suplementos alimentares e em tratamentos profiláticos e terapêuticos (PULZ e GROSS, 2004).

Além da variedade de produtos derivados dos compostos da biomassa, as microalgas assimilam nutrientes como matéria orgânica, NH_4^+ , NO_3^- , PO_4^{3-} e metais pesados do meio em que crescem, o que possibilita seu uso no tratamento de efluentes industriais e domésticos (MARTÍNEZ et al., 2000; TAM e WONG, 2000). Outra aplicação na área ambiental é a remoção de CO_2 por biofixação, reduzindo assim a emissão desse gás de efeito estufa (WANG et al., 2008).

A aplicação biotecnológica das microalgas pode ser economicamente viável e ambientalmente sustentável pela combinação do cultivo com processos de biorremediação (Figura 1) (WANG et al., 2008). No caso da produção de biodiesel, só é ambientalmente favorável, se o sistema de cultivo estiver ligado ao uso de efluentes (CLARENS et al., 2010).

Figura 1 - Produção de biocombustíveis e bioprodutos combinados com assimilação de nutrientes de efluentes e biomitigação de CO_2 . Fonte: Wang et al. (2008)

A conversão da biomassa microalgal em biocombustíveis está centrada em quatro principais processos: bioquímico, termoquímico, químico e combustão direta (Figura 2). Como exemplos pode-se citar os processos que envolvem a conversão bioquímica que incluem a digestão anaeróbia para produção de metano e de fermentação para a produção de etanol (SPOLAORE et al., 2006); o processo de conversão química, envolve a extração de lipídeos acumulados pelas microalgas e a conversão dessa fração da biomassa em biodiesel pela reação de transesterificação (CHISTI, 2007); a conversão termoquímica, que compreende gaseificação para obtenção de gás combustível e, liquefação e pirólises para geração de bio-óleo (TSUKAHARA e SAWAYAMA, 2005; CHIARAMONTI et al., 2007). Estas tecnologias convencionais são comprovadamente eficientes no processo industrial, contudo estão focadas em um composto em detrimento de outras valiosas frações.

Figura 2 - Produção de energia pela conversão da biomassa microalgal por processos biomíquico, termoquímico, químico e conversão direta. Fonte: Tsukahara e Sawayama (2005)

Recentemente o conceito de biorrefinaria propõe a exploração do potencial algal através da integração de processos brandos de separação e conversão da biomassa para obtenção simultânea de diferentes produtos. Desta forma, o foco está no aproveitamento máximo da biomassa e na diminuição do uso de energia, o que leva a valores de mercado maiores do que os custos de produção. As técnicas de biorrefinaria apropriadas para extração dos compostos são relativamente novas e por isso devem ser bem estudadas para que sejam viáveis comercialmente (VANTHOOR-KOOPMANS et al., 2013).

4.4. Microalgas: Fonte de Lipídeos para Produção de Biodiesel

O conceito de microalgas como fonte para produção de combustíveis iniciou-se há 53 anos, no entanto só houve empenho nas pesquisas na década de 70 com a crise do petróleo. O Departamento de Energia dos Estados Unidos, entre 1978 e 1996, fundou o Programa de Espécies Aquáticas (*Aquatic Species Program* – ASP) com o principal objetivo de produzir biodiesel a partir de algas com elevado conteúdo lipídico. No Japão, o governo financiou, de 1990 a 1999, uma ampla pesquisa sobre fixação e aproveitamento biológico de CO₂ por algas. Estes programas apresentaram bons resultados como cepas promissoras para produção de lipídeos, desenvolvimento de sistemas abertos de cultivo de microalgas (lagoas *raceway*) e princípios para projetos de biorreatores (WIJFFELS e BARBOSA, 2010).

Nos últimos anos, o ressurgimento das pesquisas em biocombustíveis foi estimulado por questões críticas como, especialmente, o aumento da demanda energética e as preocupações ambientais. No caso da produção de biodiesel a partir de microalgas, os investimentos recentes são justificáveis pelo potencial que esses micro-organismos oferecem em relação às culturas agrícolas oleaginosas. As vantagens de usar microalgas como fonte de biodiesel são as seguintes (HU et al., 2008; UM e KIM, 2009):

- i. Apresentam rápido crescimento (por exemplo, 1-3 duplicações por dia);
- ii. O conteúdo lipídico pode representar acima de 50% da biomassa seca;
- iii. O rendimento lipídico é maior do que nos vegetais oleaginosos;
- iv. Por serem micro-organismos aquáticos, não competem com as culturas agrícolas por terra arável;
- v. Podem ser cultivadas em reatores ao longo do ano, excedendo a produtividade de plantas terrestres em aproximadamente 10 vezes;
- vi. Podem crescer em água marinha ou salobra;
- vii. Para o crescimento utilizam nutrientes (nitrogênio e fósforo) de uma variedade de efluentes (como industriais e domésticos), proporcionando a biorremediação desses resíduos;
- viii. Sequestram CO₂, o que reduz a emissão do principal gás de efeito estufa;
- ix. Produzem combustíveis que não contêm enxofre e são altamente biodegradáveis.

Em condições ambientais desfavoráveis ou sob estresse, muitas microalgas modificam a biossíntese de seus lipídeos de membrana, na sua maioria como glicosilglicerídeos, para formação e acúmulo de lipídeos neutros, principalmente na forma de triacilglicerol (TAG), o qual é formado pela combinação de três moléculas de ácidos graxos com uma molécula de glicerol. Os triacilgliceróis (usualmente chamados de triglicerídeos) servem como uma forma de armazenamento de carbono e energia para a célula, além de estarem envolvidos em processos de adaptação às condições ambientais extremas, por atuarem na reparação do aparato fotossintético e evitarem danos foto-oxidativos (SOLOVCHENKO, 2012). São encontrados como corpos lipídicos no citoplasma celular das algas e em determinadas clorófitas ocorrem entre os tilacóides do cloroplasto (HU et al., 2008).

Mandal e Mallick (2009) constataram que o conteúdo lipídico de *Scenedesmus obliquus* aumentou 5 vezes apenas pela manipulação da condição nutricional (nitrogênio e fósforo), o que representou 58,3% da biomassa seca. Liu et al. (2012) mostraram que altas intensidades luminosas aliadas ao cultivo sob limitação de nitrogênio estimularam o crescimento celular e acúmulo lipídico de *Scenedesmus* sp. Chia et al. (2013) observaram que o acúmulo de TAG por *Chlorella vulgaris* foi maior sob estresse de nitrogênio, enquanto a presença e o aumento de cádmio causou a redução dos níveis de TAG.

Em condição de estresse, os principais estímulos físicos para o acúmulo de lipídeos em microalgas são temperatura e intensidade luminosa, enquanto os químicos são pH, salinidade, sais minerais e fonte de carbono. Dentre estes estímulos, limitação de nitrogênio é uma estratégia amplamente empregada. Nessa condição, a concentração de nitrogênio restante é direcionada para síntese de enzimas e estruturas celulares essenciais, enquanto as moléculas de CO₂ subsequentemente fixadas são convertidas a carboidratos ou lipídeos (SOLOVCHENKO, 2012).

A limitação de nitrogênio nos cultivos de microalgas pode causar a redução da biomassa final (WANG, 2008). Para superar este problema, geralmente aplica-se a limitação de duas formas: a primeira envolve duas etapas de cultivo, em que as células crescem em meio suficiente de nitrogênio para estimular o crescimento durante determinado tempo e depois são transferidas para uma condição escassa em nitrogênio, o que promove o acúmulo lipídico; a segunda envolve o cultivo em apenas uma etapa, na qual ajusta-se a concentração de nitrogênio inicial de acordo com o tempo desejado para que o crescimento celular esgote este nutriente e o cultivo se prolongue sob estresse nutricional (YEN et al., 2013).

Para se alcançar uma produção de lipídeos eficiente é necessário avaliar: o conteúdo lipídico (% de lipídeos da biomassa seca) e a produtividade lipídica (quantidade de lipídeos produzidos por litro em um dia), já que o acúmulo ocorre à custa do crescimento celular mais lento devido às condições de estresse (CHEN et al., 2011a).

Dependendo da espécie ou linhagem, microalgas sintetizam diferentes tipos de ácidos graxos que são influenciados por variáveis físico-químicas e pela constituição genética (MENG et al., 2009). Xin et al. (2011) observaram que o cultivo de *Scenedesmus* sp. à baixa temperatura induziu o acúmulo lipídico e que o conteúdo de ácidos graxos poli-insaturados diminuiu com o aumento da temperatura. Algas verdes, na sua maioria, produzem ácidos graxos com tamanho de cadeias entre C16 e C18 considerados adequados à produção de biodiesel, que podem ser saturados ou insaturados (PETKOV e GARCIA, 2007). No caso dos insaturados, podem variar de acordo com o número e posição das duplas ligações na cadeia carbônica (HU et al., 2008). A condição metabólica também pode influenciar a produção de ácidos graxos em microalgas. De acordo com Hodaifa et al. (2009), o conteúdo de ácidos graxos saturados de *Scenedesmus obliquus* foi maior no crescimento heterotrófico do que no mixotrófico.

Outro fator que influencia o conteúdo lipídico e a composição de ácidos graxos em microalgas é a fase do crescimento celular. Em muitas espécies observou-se o aumento de triacilgliceróis (TAG) durante a fase estacionária do crescimento. Como exemplos, a clorofícea *Parietochloris incise* aumentou de 43% de TAG na fase logarítmica para 77% na fase estacionária (BIGOGNO et al., 2002) e *S. obliquus* alcançou o máximo de lipídeos acumulados na fase estacionária (MANDAL e MALLICK, 2009). No caso da microalga marinha *Gymnodinium* sp., seus ácidos graxos saturados (C16:0) e monoinsaturados (C18:1) aumentaram em relação aos lipídeos totais na transição da fase exponencial para a fase estacionária (MANSOUR et al., 2003).

O perfil de ácidos graxos dos lipídeos influenciam propriedades importantes do biodiesel, como viscosidade, estabilidade oxidativa e emissão de NO_x após sua queima (DURRET et al., 2008). Cadeias de ácidos graxos de C16 a C18 e com baixo grau de insaturação são desejáveis para um biodiesel de boa qualidade (HU et al., 2008). Ho et al. (2010) consideraram a possibilidade de produção lipídica por *S. obliquus* viável. Observou-se alta produtividade e perfil lipídico apropriado quando se cultivou essa microalga sob deficiência nutricional e concentração de 10% de CO₂.

Neste contexto, é importante o conhecimento das variáveis que influenciam o acúmulo lipídico e o perfil de ácidos graxos sintetizados pelas microalgas, uma vez que os lipídeos podem variar tanto quantitativamente quanto qualitativamente.

4.5. Uso de Efluentes para o Cultivo de Microalgas

Hoje as pesquisas buscam o desenvolvimento de métodos de cultivo de microalgas eficientes que diminuam os custos de produção. A utilização de águas residuárias como meio alternativo pode ser uma forma de diminuir os custos desta biotecnologia, o que agregaria o conceito de reuso da água e produção de biomassa com valor de mercado aos sistemas de tratamento de efluentes (PITTMAN et al., 2011).

Há vários meios alternativos para cultivo de microalgas já testados em laboratório, como: resíduos líquidos da indústria de suco de laranja (BELTRÃO, 1992), vinhaça de cana-de-açúcar (OLIVEIRA, 1988), efluente sintético de suíno (BERTOLIN et al., 2005), meio à base de esterco de suíno (FIORESI, 2007), meio enriquecido com substâncias inorgânicas (SEBASTIEN e KLEIN, 2006), esgoto sanitário (ÓRPEZ et al., 2009), entre outros.

A tolerância das microalgas às condições dos efluentes pode variar. A concentração de nutrientes, principalmente N e P, a presença de compostos tóxicos, de micro-organismos patogênicos e de competidores, além de predação por zooplâncton diferem dependendo da origem do efluente e do tratamento ao qual foi submetido. A densidade inicial de microalgas também é um fator crítico para o crescimento da população. Dentre as microalgas, as clorofíceas, particularmente, demonstraram ser tolerantes às condições presentes em diferentes efluentes (ASLAN e KAPDAN, 2006; RUIZ-MARIN et al., 2010).

Munoz e Guieysse (2006) descreveram que microalgas têm capacidade de remover nutrientes, contaminantes orgânicos, metais pesados e patógenos de efluentes domésticos. As espécies dos gêneros *Desmodesmus* e *Scenedesmus* despertam interesse para aplicação na biorremediação de águas residuárias. Cepas de *Desmodesmus pleiomorphus* foram consideradas viáveis na remoção de cádmio de águas residuais por adsorção nas suas superfícies celular (MONTEIRO et al., 2010). Lombardi et al. (2005) verificaram que ligantes de cobre liberados pela microalga *Scenedesmus acuminatus* podem reduzir a atividade desse íon metálico no ambiente e/ou carregá-lo em uma forma solúvel.

O duplo uso do cultivo de microalgas para o tratamento de efluentes acoplado à geração de biodiesel é uma opção atrativa em termos de redução dos custos energéticos, emissão de gases de efeito estufa, nutrientes e de água doce. Estudos realizados em escala laboratorial com cultivos de microalgas em batelada relataram acúmulo considerável de lipídeos por esses micro-organismos quando cultivados em esgoto sanitário, variando de baixo (<10% peso seco) a moderado (17-31% peso seco) conteúdo lipídico e, em alguns desses casos, traduzidos como altas produtividades quando consideradas as elevadas produções de biomassa (Tabela 1). A produtividade elevada da biomassa de microalgas a partir de águas residuárias sugere que este método de cultivo é viável para geração de biocombustível, avaliado como uma das muitas abordagens utilizadas para produção de energia sustentável e renovável (PITTMAN et al., 2011).

Tabela 1 - Produtividades da biomassa e lipídica de microalgas cultivadas em esgoto sanitário

Efluente	Microalgas	Produtividade da Biomassa (mg.L ⁻¹ .dia ⁻¹)	Conteúdo Lipídico (% peso seco)	Produtividade Lipídica (mg.L ⁻¹ .dia ⁻¹)	Referência
Municipal (bruto)	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	2000	25,25	505	Kong et al. (2010)
Municipal (tratamento secundário)	<i>Scenedesmus obliquus</i>	26	31,4	8	Martínez et al. (2000)
Municipal (tratamento secundário)	<i>Botryococcus braunii</i>	345,6	17,85	62	Órpez et al. (2009)
Municipal (tratamento secundário)	Mix de <i>Chlorella sp.</i> , <i>Micractinium sp.</i> , <i>Actinastrum sp.</i>	270,7	9	24,4	Woertz et al. (2009)

Fonte: Pittman et al. (2011)

O tratamento de esgoto sanitário em países tropicais baseia-se em métodos biológicos como as lagoas aeradas, os reatores anaeróbios e as lagoas de estabilização, devido à eficiência e relativa simplicidade desses sistemas (MENDONÇA, 2000). O reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo (reator UASB) exhibe a vantagem de remover grande parte da matéria orgânica do esgoto, cerca de 55 a 75% com custos de implantação e operação consideravelmente baixos, no entanto não é eficiente na remoção de nutrientes (nitrogênio e fósforo) e patógenos, além da matéria orgânica presente no seu efluente. Assim, é importante que se realize um pós-tratamento no efluente do reator UASB com a

finalidade de completar a remoção desses materiais remanescentes, sendo as lagoas de estabilização uma das alternativas de pós-tratamento (CHERNICHARO et al., 2001).

O fitoplâncton desempenha papel fundamental nas lagoas de estabilização, pela produção de oxigênio necessário à degradação aeróbia bacteriana da matéria orgânica (WEATHERELL et al., 2003), além de removerem compostos carbonatados, fosforados e nitrogenados. Nessas lagoas, microalgas pertencentes ao grupo das clorofíceas são comumente encontradas, principalmente as dos gêneros: *Scenedesmus*, *Chlorella*, e *Chlamydomonas* (PEARSON, 1996; GRANADO, 2004; CASALI, 2008). Algas isoladas de estações de tratamento de águas residuárias ou de corpos d'água adaptam-se melhor às condições práticas de cultivo e demonstram maior eficiência na remoção de nutrientes inorgânicos (PÉREZ et al., 2004).

As características de *Desmodesmus* e *Scenedesmus* são interessantes para cultivo em esgoto sanitário com vista à produção de biodiesel por: adaptarem-se em ambientes eutrofizados; possuírem versatilidade metabólica, como crescimento em condições autotrófica, heterotrófica e mixotrófica (HODAIFA et al., 2009) e conseguirem acumular lipídeos em quantidade relevante (MATA et al., 2010; ABOU-SHANAB et al., 2011).

4.6. Otimização do Cultivo

Microalgas que apresentam capacidade de acumular lipídeos em quantidade relevante e rápido crescimento são desejáveis como fonte para produção de biodiesel, no entanto essas qualidades são inversamente relacionadas (ABOMOHR et al., 2013). Rápido crescimento celular promove alta produtividade de biomassa, mas deve-se considerar o conteúdo lipídico para elevar a produtividade lipídica. Esse aumento da biomassa pode ser alcançado através de cultivos otimizados (ROSENBERG et al., 2008).

A otimização é considerada um método para implementar a performance de processos e aumentar os rendimentos sem que haja elevação dos custos. Para otimização de um processo por meio de planejamento experimental estatístico, a aplicação da metodologia de superfície de resposta (Response Surface Methodology - RSM) é uma das técnicas mais utilizadas que permite avaliar os efeitos das variáveis definidas de forma individual ou de suas interações sobre o processo, além de possibilitar a geração de um modelo matemático que o descreve. A perspectiva gráfica da técnica recebe o nome de superfície de resposta (BAS e BOYACI, 2007).

O planejamento experimental a ser empregado depende do número de variáveis independentes a serem estudadas. No caso de 2 ou 3 variáveis independentes ou fatores definidos, recomenda-se um delineamento composto central rotacional (DCCR), também conhecido como metodologia de superfície de resposta (RODRIGUES e IEMMA, 2005).

A aplicação de planejamento experimental estatístico em processos com microalgas foi relatado na literatura. Xie et al. (2012) utilizaram a metodologia de superfície de resposta (DCCR) para otimizar o cultivo heterotrófico de *Chlorella* sp com o objetivo de aumentar a produtividade lipídica. Os valores obtidos de produtividade lipídica foram bem próximos dos previstos pelo modelo estatístico, o que demonstrou a efetividade metodológica. Cheng et al. (2009) através da metodologia de superfície de resposta alcançaram os melhores parâmetros para redução dos custos na produção de lipídeos por *Chlorella protothecoides*. Martínez et al. (2010) concluíram que a combinação do DCCR com a análise de superfície de resposta foram ferramentas eficientes em determinar os efeitos de diferentes condições de cultivo da cianobactéria *Synechocystis* sp. na biofixação de CO₂.

Diante do exposto, ao considerar o uso do planejamento experimental estatístico como uma ferramenta eficaz no desenvolvimento de processos, a otimização do cultivo de microalgas surge como uma importante estratégia para alcançar elevada produtividade lipídica para geração de biodiesel.

5. MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo estão descritos os procedimentos utilizados no desenvolvimento da pesquisa. A Figura 3 apresenta o fluxograma das etapas realizadas.

Figura 3 - Fluxograma das etapas desenvolvidas na pesquisa

5.1. Etapa 1

Esta etapa do trabalho teve como objetivo isolar microalgas dos gêneros *Desmodesmus* e *Scenedesmus*.

5.1.1. Coletas

Foram coletadas amostras a partir de lagos, reservatório e lagoas de estabilização, entre dezembro de 2009 a dezembro de 2010. Esses sistemas localizados em cidades dos estados de São Paulo e de Minas Gerais foram escolhidos pela facilidade de acesso e conhecimento prévio das áreas (Tabela 2).

O isolamento das algas dos gêneros *Desmodesmus* e *Scenedesmus* a partir de lagoas de estabilização correlaciona-se à aclimação de espécies e linhagens resistentes às condições de cultivo de interesse, no caso, o efluente de reator UASB. Já o isolamento a partir de lagos e do reservatório está relacionado ao fato destas microalgas serem frequentemente encontradas em ambientes de água doce (BOROWITZKA; BOROWITZKA, 1998).

Tabela 2 - Origens das amostras coletadas, datas e locais em que foram realizadas

Origem	Data	Local
Lago	dez/2009	UFSCAR/São Carlos - SP
Reservatório de Itupararanga	abr/2010	Votorantim - SP
Lagoas de Estabilização	jun/2010	ETE - Ajapi/Rio Claro - SP
Lago	jul/2010	Fazenda - Ilícinea - MG
Lago	dez/2010	Parque Zeca Malavazzi/Paulínia - SP

As lagoas de estabilização compõem a Estação de Tratamento de Esgoto (ETE), localizada no distrito de Ajapi, em Rio Claro – SP, a qual é administrada pela empresa Foz do Brasil.

As amostras coletadas foram levadas até o Laboratório BIOTACE (Biotoxicologia de Águas Continentais e Efluentes) da Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de

São Paulo (EESC-USP) e acondicionadas, em sala climatizada, sob as seguintes condições: 24°C, fotoperíodo de 12 horas e intensidade luminosa de 60 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

5.1.2. Amostragens

Em laboratório, alíquotas das amostras a fresco foram enriquecidas em meio de cultura WC (Tabela 3), em frascos de Duran de 500 mL, nas proporções: 25% e 75% da amostra.

Tabela 3- Composição do meio de cultura WC

Componente	Unidade	Concentração
<i>Macronutrientes</i>		
NaNO ₃	mg.L ⁻¹	85,01
CaCl ₂ .2H ₂ O	mg.L ⁻¹	36,76
MgSO ₄ .7H ₂ O	mg.L ⁻¹	36,97
Na ₂ SiO ₃ .9H ₂ O	mg.L ⁻¹	21,20
NaHCO ₃	mg.L ⁻¹	12,60
K ₂ HPO ₄	mg.L ⁻¹	8,71
<i>Micronutrientes</i>		
FeCl ₃ .6H ₂ O	mg.L ⁻¹	3,15
H ₃ BO ₃	mg.L ⁻¹	1,00
MnCl ₂ .4H ₂ O	mg.L ⁻¹	0,18
ZnSO ₄ .7H ₂ O	mg.L ⁻¹	0,02
CoCl ₂ .6H ₂ O	mg.L ⁻¹	0,01
CuSO ₄ .5H ₂ O	mg.L ⁻¹	0,01
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	$\mu\text{g.L}^{-1}$	6,00
<i>Solução de Vitaminas</i>		
Tiamina.HCl (B ₁)	mg.L ⁻¹	0,10
Cianocobalamina (B ₁₂)	$\mu\text{g.L}^{-1}$	0,05
Biotina (H)	$\mu\text{g.L}^{-1}$	0,05
<i>Solução Tampão</i>		
TRIS	mg.L ⁻¹	500,00

Fonte: Guillard e Lorenzen (1972)

5.1.3. Isolamento das Microalgas

O plaqueamento em superfície foi empregado para o isolamento das células de microalgas. A partir de cada amostra, 100 µL foram distribuídos com auxílio de alça de Drigalsky sobre o meio de cultura WC sólido em placas de Petri (HOSHAW; ROSOWISKI, 1973). As amostras a fresco foram plaqueadas 24 horas após as coletas e as amostras enriquecidas após 15 dias de incubação.

Para obtenção de culturas puras, as microalgas foram semeadas com o auxílio de alça de platina estéril por esgotamento em meio WC sólido em placas de Petri. Essas placas foram incubadas por aproximadamente 20 dias na sala climatizada do BIOTACE. Esse procedimento foi realizado repetidamente até obtenção de apenas um tipo celular, não axênico. Para conservação das microalgas isoladas, células de cada cepa foram semeadas em tubo de ensaio de 10 mL com 5 mL de meio WC líquido e mantido na sala climatizada do laboratório BIOTACE (Figura 4).

Nos procedimentos citados, as células de microalgas foram manipuladas em capela de fluxo laminar e o meio WC foi autoclavado a 121°C por 20 minutos e utilizado após 24 horas do preparo.

Os micro-organismos foram observados por meio de microscópio ótico Olympus BX51® e microscópio ótico invertido Olympus CK2®. Os gêneros *Desmodesmus* e *Scenedesmus* foram identificados pelo uso de chaves de identificação disponíveis na literatura (BICUDO e MENEZES, 2005; KOMÁREK & FOTT, 1983; PARRA et al., 1983).

Figura 4 - Células das cepas isoladas semeadas em meio de cultura WC líquido (5 mL) em tubos de ensaio (10 mL) mantidos na sala climatizada do BIOTACE

5.2. Etapa 2

Nesta etapa do trabalho, as microalgas isoladas foram selecionadas pela capacidade em acumular lipídeos. As cepas selecionadas foram submetidas a cultivos em pequena escala (tubos de ensaio), em meio sintético (meio de cultura WC), para avaliar as melhores condições físicas e químicas de crescimento celular, levando-se em consideração o acúmulo lipídico.

5.2.1. Seleção das Microalgas

A seleção das microalgas foi realizada pela análise da capacidade das cepas em acumular lipídeos sob condição de limitação de nitrogênio. As três cepas que apresentaram maior acúmulo lipídico foram selecionadas para as etapas seguintes.

Para a seleção, as cepas de *Desmodesmus* e *Scenedesmus* foram cultivadas em meio WC líquido com concentração de nitrogênio modificada de 14 mg.L⁻¹ para 1 mg.L⁻¹. O cultivo considerado como referência (controle) foi feito em meio WC líquido (14 mg.L⁻¹ de N).

Os cultivos sob limitação de nitrogênio e o controle foram realizados em triplicatas, em tubos de ensaio de 50 mL com 20 mL de meio WC autoclavado (121°C por 20 minutos) e o inóculo representou 5% (v/v). Os inóculos foram obtidos a partir do cultivo das cepas em meio WC, acondicionados na sala climatizada, os quais foram transferidos na fase exponencial de crescimento celular. Durante 18 dias os cultivos foram mantidos em incubadora (Nova Ética B.O.D 411D) nas seguintes condições: 24°C, intensidade luminosa de 60 µE.m⁻²s⁻¹, fotoperíodo de 12 horas e pH 7,2.

Após o período de cultivo, o conteúdo lipídico das microalgas foi determinado pelo método proposto por Chen et al. (2011b) adaptado, em que houve aplicação de técnica histológica de coloração *in vivo* específica para lipídeos, pelo uso do corante *Nile red* (HARRISON, 1988) e técnica de fluorescência.

Nesse método a concentração celular de cada cultivo foi diluída para 0,1 de absorbância a 683 nm (HIRATA et al., 1996), quantificada por espectrofotômetro Hach® 4.000V. Para diluição, utilizou-se água deionizada e o volume final foi de 18 mL de cultivo em tubo de 50 mL. A cada tubo foram adicionados 1,8 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) e agitou-se o conteúdo que foi levado ao micro-ondas por 90 segundos à 60% da potência de 1400 W. Em seguida, foram adicionados 200 µL da solução do corante *Nile Red* (100 µg.mL⁻¹ em acetato) ao tubo, que foi novamente agitado e submetido ao micro-ondas

pelo mesmo tempo e potência anteriores. Passados 40 minutos, a fluorescência das células coradas foi determinada em fluorímetro (Turner Designs® Modelo 10-AU) com filtro de excitação de 490 nm e filtro de emissão de 580 nm. Para cada cepa avaliada, tréplicas foram realizadas.

5.2.2. Cultivo das Microalgas em Diferentes Condições Físico-Químicas

Para o cultivo das microalgas selecionadas em diferentes condições físico-químicas e nas etapas seguintes, as culturas foram axenizadas pelo método descrito em Vieira (1983) modificado. As células de microalgas foram previamente lavadas, quatro vezes, por centrifugação (3000 rpm) em 5 mL de meio de cultura WC e em seguida, transferidas para tubos com 5 mL do meio e 0,5 mL de solução de Dakin (hipoclorito de sódio a 1%). A solução de Dakin ficou em contato com as células durante 1 minuto e na sequência, alíquotas foram retiradas, pelo uso de pipeta Pasteur estéril e foram inoculadas em tubos teste com 5 mL de solução de peptona (1%) e glicose (0,1%) em meio WC, para verificação do crescimento de fungos e bactéria. Os tubos foram incubados a 24°C, sob 60 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ por 5 dias e então as células foram examinadas em microscópio ótico.

O estudo dos cultivos em diferentes condições físico-químicas analisou a velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) das cepas de microalgas e o acúmulo lipídico em resposta à variação de fatores físicos, como intensidade de radiação luminosa e temperatura; de fatores químicos, como pH, fonte de nutrientes inorgânicos (nitrogênio e fósforo) e de fonte de carbono orgânico (ácidos orgânicos e açúcares) (Tabela 4). As velocidades específicas máximas de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) (item A) foram calculadas em triplicatas conforme modelo de Gompertz (item B), pelo *software* OriginPro 8.

$$\mu_{\text{máx}} = (a.b).exp(-1) \quad (\text{A})$$

$$y=a.e(-e(-b(x-x_c))) \quad (\text{B})$$

Os cultivos foram realizados em condição físico-química semelhante ao de referência (controle), com estudo apenas de uma variável de interesse por experimento. A condição controle foi estabelecida em meio de cultura WC à 24°C, intensidade luminosa de 60 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 12 horas e pH 7,2.

Para cada variável estudada, tréplicas foram realizadas em tubos de 50 mL com 20 mL de meio sintético e inóculo de 5% (v/v) na fase exponencial de crescimento. O crescimento dos cultivos foi monitorado pela medida da absorbância a 683 nm (HIRATA et al., 1996) em espectrofotômetro Hach® 4.000V. Em incubadora, os tubos foram acondicionados (Figura 5) até o alcance da fase estacionária de crescimento celular e, após este período, o conteúdo lipídico das cepas foi determinado por fluorescência (CHEN et al., 2011b).

Tabela 4 - Variáveis analisadas no cultivo das cepas selecionadas e as condições em que foram testadas

Variável	Unidade	Condições
<i>Físico</i>		
Intensidade Luminosa	$\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	60/ 150/ 300/ 500
Temperatura	°C	20/ 24/ 30/ 35
<i>Químico</i>		
pH	-	6,2/ 7,2/ 8,2/ 9,2/ 10,2/ 11,2
Fonte Inorgânica		
N:P (N-NO ₃ ⁻ :P-PO ₄ ⁻³)	-	2:1/ 5:1/ 10:1/ 15:1/ 20:1
Fonte Orgânica		
Ácidos Orgânicos		
Acético	g.L ⁻¹	0,02/ 0,1/ 1,0/ 5,0/ 10,0
Butírico	g.L ⁻¹	0,02/ 0,1/ 1,0/ 5,0/ 10,0
Propiônico	g.L ⁻¹	0,02/ 0,1/ 1,0/ 5,0/ 10,0
Açúcares		
Frutose	g.L ⁻¹	0,02/ 0,1/ 1,0/ 5,0/ 10,0/ 15,0/ 30,0
Glicose	g.L ⁻¹	0,02/ 0,1/ 1,0/ 5,0/ 10,0/ 15,0/ 30,0
Sacarose	g.L ⁻¹	0,02/ 0,1/ 1,0/ 5,0/ 10,0/ 15,0/ 30,0

Figura 5 – Cultivos das microalgas em tubos acondicionados em incubadoras

As condições das variáveis físicas e químicas em que as cepas apresentaram aumento da velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$), sem que houvesse decréscimo do conteúdo lipídico foram consideradas para o planejamento da otimização do crescimento celular.

5.2.3. Otimização do Cultivo das Microalgas

Com a intenção de definir a concentração de nitrogênio, fósforo e glicose no meio de cultura nos experimentos de otimização, as microalgas LE17 e ITU07 foram cultivadas em meio de cultura WC acrescido de 1 g.L^{-1} de glicose e a assimilação desses nutrientes pelas cepas foi verificada durante 15 dias.

Para otimização do crescimento celular foi aplicado planejamento experimental para o cultivo das microalgas em meio sintético sob condições de temperatura e intensidade luminosa controladas e pH inicial fixo. Utilizou-se o DCCR (Delineamento Composto Central Rotacional), fatorial completo 2^3 (3 = número de fatores), com 6 pontos axiais e 3 repetições no ponto central, totalizando 17 experimentos (em triplicatas) para cada cepa selecionada.

As faixas estudadas para luz, pH e temperatura foram definidas em função dos resultados obtidos na fase anterior (item 5.2.2). A partir dessas faixas, o planejamento definiu os níveis aplicados para a cepa LE17 (Tabela 5) e para a cepa ITU07 (Tabela 6).

Tabela 5 - Fatores do DCCR para otimização do crescimento celular da cepa LE17 e seus níveis (reais e codificados)

Fatores	Símbolo	Níveis				
		-1,68179	-1	0	+1	+1,68179
Temperatura (°C)	X ₁	25,0	27,4	31,0	34,6	37,0
Intensidade Luminosa ($\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)	X ₂	100	200	350	500	600
pH	X ₃	8,2	8,4	8,7	9,0	9,2

Tabela 6 - Fatores do primeiro DCCR para otimização do crescimento celular da cepa ITU07 e seus níveis (reais e codificados)

Fatores	Símbolo	Níveis				
		-1,68179	-1	0	+1	+1,68179
Temperatura (°C)	X ₁	25,0	27,4	31,0	34,6	37,0
Intensidade Luminosa ($\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)	X ₂	100	200	350	500	600
pH	X ₃	9,2	9,4	9,7	10,0	10,2

A fim de definir a região ótima para o crescimento da cepa ITU07, realizou-se um segundo planejamento; DCCR (Delineamento Composto Central Rotacional), fatorial 2², totalizando 17 experimentos (em triplicatas). As variáveis estudadas foram temperatura e intensidade luminosa, sendo os níveis reais e codificados apresentados na Tabela 7. As variáveis e seus respectivos níveis foram determinados em função dos resultados encontrados no primeiro DCCR.

Tabela 7 - Fatores do segundo DCCR para otimização do crescimento celular da cepa ITU07 e seus níveis (reais e codificados)

Fatores	Símbolo	Níveis				
		$-1,41421$	-1	0	$+1$	$+1,41421$
Temperatura (°C)	X_1	30,0°C	31,0	33,5	36,0	37,0°C
Intensidade Luminosa ($\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)	X_2	50	87	175	263	300

Todos os experimentos foram conduzidos em tubos de ensaio de 50 mL com 20 mL de meio sintético e 5% de inóculo (v/v) na fase exponencial de crescimento. O meio de cultura foi definido como o meio WC modificado para o triplo da concentração dos micronutrientes e macronutrientes e, com adição de 5 g.L^{-1} de glicose, sendo que os demais componentes não foram alterados. Essas concentrações foram determinadas previamente conforme os resultados obtidos na fase de cultivo das microalgas em diferentes condições químicas (item 5.2.2).

Os tubos foram acondicionados em incubadora, durante tempo diferenciado para cada experimento, pois os mesmos foram conduzidos até o alcance da fase estacionária de crescimento celular. Os cultivos foram realizados em triplicatas, em condição axênica, assim os meios foram autoclavados (121°C por 20 minutos) e as células de microalgas manipuladas em capela de fluxo laminar. O crescimento celular foi monitorado pela medida da absorbância a 683 nm (HIRATA et al., 1996) em espectrofotômetro Hach® 4.000V.

As velocidades específicas máximas de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) foram calculadas em triplicatas conforme modelo de Gompertz, pelo *software* OriginPro 8. Os resultados foram tratados com o auxílio do *software* STATISTICA 7.0 e a adequação dos modelos foi avaliada através da análise de variância (ANOVA).

Os resultados sugeridos pelos modelos foram validados pelo cultivo das cepas nas condições pertencentes à região ótima para o crescimento celular.

5.3. Etapa 3

Nesta etapa do trabalho, foram realizados os cultivos em batelada, em média escala (garrações) na condição otimizada. Os meios utilizados foram o meio sintético e o efluente de reator UASB. A eficiência das cepas na remoção de nutrientes (N e P), dos meios durante o crescimento celular foi avaliada. A biomassa gerada foi analisada quanto a sua composição bioquímica (proteínas, carboidratos e lipídeos) e o perfil lipídico em ácidos graxos foi determinado.

5.3.1. Coleta do Efluente de Reator UASB

O efluente do reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo - UASB foi obtido na Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) Jardim das Flores, situada na cidade de Rio Claro – SP (Figura 6). Foi realizada uma coleta em agosto de 2011 com autorização da empresa Foz do Brasil, que é responsável pela administração da ETE.

A ETE é constituída pelos seguintes sistemas: tratamento preliminar, formado por gradeamento grosseiro, gradeamento fino, peneira e caixa retentora de areia e gorduras; reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo – UASB, formados por quatro módulos operando em paralelo; sistema de lodo ativado, composto por um tanque de aeração contendo três aeradores superficiais e dois decantadores secundários. Nesse processo de tratamento, uma parte do lodo retido nos decantadores secundários retorna ao tanque de aeração, sendo que o excesso de lodo produzido no sistema aeróbio é conduzido aos reatores anaeróbios para digestão (Figura 7).

O efluente do reator UASB coletado foi transportado até o Laboratório BIOTACE (Biotoxicologia de Águas Continentais e Efluentes), da Escola de Engenharia de São Carlos.

Foto cedida pela empresa Foz do Brasil

Figura 6 - Vista aérea da Estação de Tratamento (ETE) Jardim das Flores

Figura 7 - Fluxograma do processo da ETE Jardim das Flores

5.3.2. Caracterização do Efluente

No laboratório, aproximadamente 2 horas após a coleta, o efluente foi caracterizado pela determinação das seguintes variáveis: pH, condutividade, oxigênio dissolvido e demanda química de oxigênio (DQO) de acordo com APHA (2005). Amostras do efluente para nutrientes totais, como carbono total, nitrogênio total Kjeldahl e fósforo total, foram acondicionadas em frascos de plástico e congeladas para posterior determinação, de acordo com os métodos propostos em APHA (2005). Amostras para nutrientes dissolvidos (nitrato, nitrogênio amoniacal, nitrogênio total Kjeldahl, fósforo total e ortofosfato) foram filtradas em membranas GF/C de 0,45 µm de poro, acondicionadas em frascos de plástico e congeladas para posteriores análises. Para estimativa da cor, foi medida a turbidez a 450 nm do efluente filtrado (membranas GF/C de 0,45 µm).

A composição em ácidos, carboidratos e alcoóis do efluente foi determinada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), método proposto por Penteado et al. (2012) realizado no Laboratório de Processos Biológicos, Departamento de Hidráulica e Saneamento – EESC/USP. Para as análises, foi usado o sistema SHIMADZU®, com dois detectores ligados em série: detector de ultravioleta (UV) com arranjo de diodos SPD-M10 AVP e detector por índice de refração RID-10^a. Coluna AMINEX® HPX-87H (300 mm x 7.8 mm, BioRad) e *software* Class-VP (SHIMADZU®). Para preparo das amostras, 1 mL do efluente filtrado em membrana de acetato de celulose 0,22 µm foi adicionado a 80 µL de solução de ácido sulfúrico 2M, sendo que o volume injetado desta mistura foi de 100 µL. O eluente usado foi solução de ácido sulfúrico 0,005M e aplicado com fluxo de 0,5 mL.min⁻¹. A temperatura do forno da coluna foi de 43°C.

Na tabela 8 estão descritas as variáveis pelas quais o efluente de reator UASB foi caracterizado, assim como as metodologias e os aparelhos empregados. Todas as análises foram realizadas em duas réplicas.

Tabela 8 - Variáveis determinadas para caracterização do efluente de reator UASB e, os métodos, equipamentos e referências empregados

Variável	Unidade	Método/Equipamento	Referência
pH	-	Potenciométrico	-
Condutividade	$\mu\text{S.cm}^{-1}$	Potenciométrico/Condutivímetro	-
Oxigênio Dissolvido	mg.L^{-1}	Polarográfico	-
Demanda Química de Oxigênio	mg.L^{-1}	Espectrofotométrico 5220-D/ Espectrofotômetro Hach® 4.000V	APHA (2005)
Cor	Pt-Co	Espectrofotométrico	APHA (2005)
Turbidez	NTU	Nefelometria/Turbidímetro de bancada Marconi®	-
Nitrogênio Total Kjeldahl	mg.L^{-1}	Digestão, Destilação e Titulação 4500-N _{org} - C/ Büchi®I	APHA (2005)
Nitrato	mg.L^{-1}	Espectrofotométrico 4500-NO ₃ ⁻ . B/ Espectrofotômetro Hach® 4.000V	APHA (2005)
Nitrogênio amoniacal	mg.L^{-1}	Destilação e Titulação 4500-NH ₃ . C/ Büchi®I	APHA (2005)
Fósforo Total	mg.L^{-1}	Digestão e Espectrofotométrico 4500-P .E/ Espectrofotômetro Hach® 4.000V	APHA (2005)
Ortofosfato	mg.L^{-1}	Espectrofotométrico 4500-P. E/ Espectrofotômetro Hach® 4.000V	APHA (2005)
Íons Metálicos	mg.L^{-1}	Digestão/Espectrofotométrico	APHA (2005)
Carbono Total (orgânico e inorgânico)	mg.L^{-1}	Combustão/ TOC Shimadzu®	APHA (2005)
Alcoóis, Ácidos Orgânicos e Carboidratos	mg.L^{-1}	Cromatográfico - CLAE/ Cromatógrafo SHIMADZU®	Penteado et al. (2012)

5.3.3. Cultivo das Microalgas em Diferentes Concentrações do Efluente

Com a intenção de analisar tolerância das microalgas à composição do efluente, foram realizados cultivos das cepas em diferentes concentrações deste meio. O efluente foi diluído em água deionizada nas seguintes proporções: 25%, 50% e 75%. As cepas foram cultivadas no efluente (100%) e nas suas diluições, em tubos de 50 mL com 20 mL de conteúdo e inóculo de 5% v/v na fase exponencial de crescimento. Durante 16 dias, os cultivos foram acondicionados em incubadora nas seguintes condições: 24°C, intensidade

luminosa de $60 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$, com fotoperíodo de 12 horas e pH 7,2. As cepas cresceram em condição axênica através da filtração do efluente e da água deionizada em membrana de acetato de celulose $0,22 \mu\text{m}$, do tratamento térmico dos tubos de ensaio em autoclave (121°C por 21 minutos) e da manipulação das células em capela de fluxo laminar.

O crescimento celular foi monitorado pela absorbância a 683 nm em espectrofotômetro, as velocidades específicas máximas de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) foram calculadas em triplicatas conforme modelo de Gompertz, pelo *software* OriginPro 8 e o peso seco da biomassa no 16º dia de cultivo foi determinado.

5.3.4. Cultivo das Microalgas em Batelada

Os cultivos unialgais foram realizados em batelada simples na condição determinada pelo planejamento da otimização (item 5.2.3) e na condição de referência (controle). Na condição otimizada, as cepas foram cultivadas em meio sintético (WC modificado) e em efluente de reator UASB (50% em água deionizada) à 34°C , intensidade luminosa de $180 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e pH 8,2. Já na condição de referência (controle), os cultivos foram feitos à 24°C , intensidade luminosa de $60 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e pH 7,2 (Tabela 9). Garrafões de vidro com capacidade de 9 litros com 8 litros do meio e 5% (v/v) de inóculo na fase exponencial de crescimento foram usados para os cultivos das microalgas. Os garrafões foram aerados por borbulhamento de ar filtrado (filtro de $0,22 \mu\text{m}$) com vazão de $4,5 \text{ L.min}^{-1}$ e acondicionados em incubadora até a fase estacionária de crescimento celular.

Tabela 9 - Condições dos cultivos em batelada (8 L) das cepas LE17 e ITU07

Cultivo	Meio	Temperatura ($^\circ\text{C}$)		Intensidade Luminosa ($\mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$)		pH	
		LE17	ITU07	LE17	ITU07	LE17	ITU07
Referência (Controle)	Meio WC	24	24	60	60	7,2	
Otimizado	Meio Sintético (WC modificado)	34,5	34	200	180	8,2	
Otimizado	Efluente (50%)	34,5	34	200	180	8,2	

Amostras periódicas para análise de nutrientes, como: ortofosfato, nitrato, nitrogênio amoniacal e sólidos totais (orgânicos e inorgânicos) (APHA, 2005) foram retiradas em

condição axênica. Na Tabela 10 estão descritas as variáveis analisadas durante os cultivos, assim como seus respectivos métodos e equipamentos usados.

Tabela 10 - Variáveis monitoradas durante os cultivos em batelada, além dos métodos e equipamentos utilizados

Variável	Unidade	Método	Equipamento/Referência
Ortofosfato	mg.L ⁻¹	Espectrometria 4500-P. E	Espectrofotômetro Hach® 4.000V/APHA (2005)
Nitrato	mg.L ⁻¹	Espectrofotometria 4500-NO ₃ ⁻ . B	Espectrofotômetro Hach® 4.000V/APHA (2005)
Nitrogênio amoniacal	mg.L ⁻¹	Destilação e Titulação 4500-NH ₃ . C	Büchi®I/APHA (2005)
Sólidos Totais	mg.L ⁻¹	Gravimetria	APHA (2005)

O efluente diluído foi filtrado em membrana 0,22 µm, o meio sintético (WC modificado) foi autoclavado à 121°C, durante 50 minutos. As células, axênicas, foram inoculadas em capela de fluxo laminar.

O crescimento celular foi monitorado pelo peso seco da biomassa filtrada em membrana GF/C 1,2 µm. As velocidades (µmáx) foram calculadas em triplicatas conforme modelo de Gompertz, através do *software* OriginPro 8.0.

5.3.5. Análises Bioquímicas da Biomassa

A biomassa final seca de cada cultivo foi analisada quanto à composição (%) em: proteínas, carboidratos e lipídeos, respectivamente, pelo método de digestão e titulação (APHA, 2005), método do fenol (DUBOIS et al. 1956) e método de Folch et al. (1956), adaptado. Os lipídeos totais foram extraídos com uma mistura de clorofórmio-metanol (2:1, v/v) *overnight*, em seguida foi adicionado 24% de solução salina (NaCl 0,05 N) e separados em duas fases por 10 minutos de centrifugação a 3000 rpm. A fase metanol e solução salina foi descartada e a fase clorofórmio e lipídeos foi seca em estufa por 2 horas à 40°C para evaporação do clorofórmio e obtenção dos lipídeos.

A composição em ácidos graxos da fração lipídica foi determinada por cromatografia gasosa, realizada no Laboratório de Cromatografia do Departamento de Química - Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Para preparo das amostras, aproximadamente 30 mg do óleo extraído foi diluído em 100 µL da solução de hidróxido de potássio 1M em 95% de etanol. A solução foi hidrolisada em forno micro-ondas, à potência de 80 W (Potencia 2), durante 5 minutos. Após resfriamento, adicionou-se 400 µL de água e 800 µL de acetato de etila para remoção do material não saponificável. A camada orgânica foi desprezada e então, foram adicionados 100 µL de ácido clorídrico concentrado, 20 mg de NaCl e 600 µL de acetato de etila. Após agitação em vórtex por 10 segundos e repouso por 2 minutos, uma alíquota de 400 µL da camada orgânica foi retirada, colocada em tubo de microcentrífuga e seca por evaporação, obtendo-se assim os ácidos graxos livres (adaptado de CHRISTIE, 1989).

Os ácidos graxos livres foram metilados com 100 µL da solução de trifluoreto de boro em 14% de metano e aquecidos durante 10 minutos em banho-maria a 60°C. Em seguida, foram diluídos com metanol de modo que todas as amostras ficaram com a mesma concentração. O tridecanoato de metila (C13:0) foi utilizado como padrão interno.

As análises foram realizadas em Cromatógrafo a Gás HP7820A, equipado com detector por ionização de chamas. Utilizou-se uma coluna INNOWAX (HP) 15m x 0,25mm x 0,20 µm com gradiente de temperatura: 100°C, 0min, 7°C/min até 240°C; injetor (split de 1/50) a 250°C e detector a 260°C. Hidrogênio como gás de arraste (2 ml.min⁻¹) e volume de injeção de 2 µL. A identificação dos picos foi feita por comparação com padrões de ácidos graxos metilados SUPELCO37 e cálculo de equivalente de tamanho de cadeia (CHRISTIE, 1988).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Microalgas Isoladas

Foram isoladas 22 cepas, que compreendem os gêneros *Desmodesmus* e *Scenedesmus*, a partir das coletas realizadas em lagos (UFSCAR, fazenda e parque), reservatório (Itupararanga) e lagoas de estabilização (ETE - Ajapi). As cepas isoladas de lagos foram codificadas em relação ao local da coleta, como: fazenda (FA), parque (PA) e universidade federal/UFSCAR (UF); já as cepas isoladas a partir das lagoas de estabilização e do reservatório foram codificadas de acordo com a origem das amostras, lagoas de estabilização (LE) e reservatório de Itupararanga (ITU) (Tabela 11).

Tabela 11 - Origem das amostras, local em que foram coletadas e código designado, com a respectiva ordem no isolamento, para cada cepa

Origem da Amostra	Local da Coleta	Código	Ordem	Código Final
Lago	Fazenda - MG	FA	08	FA08
			09	FA09
			10	FA10
			11	FA11
Reservatório de Itupararanga	Votorantim - SP	ITU	03	ITU03
			04	ITU04
			07	ITU07
Lagoas de Estabilização	ETE Ajapi Rio Claro - SP	LE	01	LE01
			02	LE02
			03	LE03
			04	LE04
			06	LE06
			08	LE08
			12	LE12
Lago	Parque Municipal Paulínia - SP	PA	17	LE17
			01	PA01
			02	PA02
Lago	UFSCAR São Carlos - SP	UF	05	PA05
			02	UF02
			05	UF05
			09	UF09
			21	UF21

O enriquecimento das amostras em meio de cultura WC (padrão) favoreceu o crescimento das microalgas Chlorococcales, facilitando o isolamento das células de *Desmodesmus* e *Scenedesmus*. A purificação das cepas desses gêneros das amostras de lagoas de estabilização foi dificultada pela quantidade elevada de bactérias. Desta forma, com auxílio de antibiótico no meio sólido WC e repetidos esgotamentos da biomassa, foi possível purificar as células de microalgas. Contudo, nesta etapa não foi verificado se as cepas isoladas estavam axênicas. Na Figura 8 estão as imagens das amostras enriquecidas e o esgotamento celular para isolamento das cepas.

(a)

(b)

(b)

Figura 8 - Imagens do enriquecimento das amostras (a) e esgotamento celular (b) para isolamento das cepas de microalgas

A seleção de cepas de microalgas com elevado conteúdo energético e rápido crescimento é fundamental para o sucesso desses micro-organismos na aplicação comercial, em particular para geração de produtos de baixo valor agregado, como os biocombustíveis (GRIFFITHS e HARRISON, 2009). Assim, a varredura de microalgas dos gêneros *Desmodesmus* e *Scenedesmus* é importante para obtenção das cepas de interesse.

Vários trabalhos relataram o isolamento de microalgas a partir de amostras ambientais e efluentes, as quais na sua maioria foram selecionadas como fontes promissoras para geração de biocombustíveis (HO et al., 2010; SYDNEY et al., 2011; BHATNAGAR et al., 2011; PAN et al., 2011; ABOU-SHANAB et al., 2011).

6.2. Microalgas Selecionadas

O conteúdo lipídico é um indicador importante para avaliar se uma espécie de microalga apresenta potencial como fonte para produção de biodiesel. Limitação de nitrogênio estimula o acúmulo de triacilgliceróis (TAG) em muitas espécies de microalgas; assim, sua aplicação serve como estratégia na seleção de cepas capazes de acumular, em quantidades relevantes, lipídeos neutros (SOLOVCHENKO, 2012).

As 22 cepas cultivadas sob limitação de nitrogênio (1 mg.L^{-1} de N) apresentaram aumento do conteúdo lipídico em relação à condição controle (14 mg.L^{-1} de N) como observado na Figura 9. As cepas ITU07, LE17 e UF21 destacaram-se pelas maiores fluorescências lipídicas, as quais foram selecionadas para as etapas seguintes.

Figura 9 - Fluorescência do conteúdo lipídico das cepas isoladas, na condição controle (14 mg.L⁻¹ de N) e sob limitação de nitrogênio (1 mg.L⁻¹ de N). Destaque para os valores de fluorescência dos lipídeos das cepas: ITU07, LE 17 e UF 21

Na Figura 10 estão as imagens das microalgas selecionadas, nas quais se pode observar espinhos nas células extremas (A, B e C) e intermediárias (C) dos cenóbios, características de espécies do gênero *Desmodesmus* (BICUDO e MENEZES, 2005).

Figura 10 - Imagens das microalgas selecionadas LE17 (A), ITU07 (B) e UF21(C). As escalas, em micrômetros, são mostradas na foto de cada microalga

Breuer et al. (2012) a partir de 96 espécies de microalgas, considerou 21 como promissoras para produção de triacilgliceróis (TAG) por apresentarem elevado conteúdo lipídico, aumento considerável do mesmo conteúdo sob limitação de nitrogênio, elevada produtividade lipídica e ampla fração de TAG dos lipídeos totais. Pan et al. (2011) determinaram o conteúdo lipídico de quatro cepas de *Desmodesmus*. Quando cultivadas em condição suficiente em nitrogênio, apresentaram 16% de lipídeos em relação à biomassa seca e sob limitação de nitrogênio, após 3 e 7 dias de cultivo, a fração lipídica representou acima de 40% e 50%, respectivamente. Esses resultados foram considerados para escolha das microalgas produtoras de lipídeos, visando geração de biodiesel.

A metodologia empregada, na presente pesquisa, para obtenção da fluorescência dos lipídeos neutros está de acordo com a utilizada por Chen et al. (2011b), que avaliaram o acúmulo lipídico das microalgas *Pseudochlorococcum* sp., *Scenedesmus dimorphus* e *Chlorella zofingiensis* pela fluorescência das células coradas (*Nile Red*) e pelo método convencional gravimétrico durante 14 dias de cultivo. Os resultados obtidos pelas duas metodologias foram semelhantes e indicaram que a fluorescência é aplicável para seleção de cepas produtoras de lipídeos, além de ser mais rápida, de fácil manipulação e de utilizar quantidades menores de amostras para detecção e quantificação de lipídeos neutros.

Na Figura 11 estão as imagens da cepa LE17 no 20º dia de cultivo sob limitação de nitrogênio. Na imagem A, estão as células coradas com *Nile Red* sob microscopia de luz e na imagem B, as células coradas sob microscopia de fluorescência, em que se pode observar as fluorescências dos corpos lipídicos (amarelo) e da clorofila (vermelho).

A

B

Figura 11 - Imagens da cepa LE17 cultivada sob limitação de nitrogênio (1 mg.L^{-1}); A: microscopia de luz e B: microscopia de fluorescência (células coradas com *Nile Red*), em vermelho a fluorescência da clorofila e em amarelo a fluorescência do lipídeo

6.3. Cultivo das Microalgas em Diferentes Condições Físico-Químicas

O cultivo das microalgas em diferentes condições físico-químicas teve como intenção investigar quais as faixas das variáveis testadas influenciam no aumento da velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) e no acúmulo lipídico das cepas selecionadas, em relação à condição de referência (controle) que foi usada para a propagação das cepas isoladas. O acompanhamento do crescimento celular foi monitorado através da absorbância (683 nm) das células devido à escala dos cultivos (tubos de ensaio).

Para verificar a linearidade da relação entre turbidez do meio e a concentração celular, retas de calibração foram realizadas a partir de cultivos das cepas LE17, IP07 e UF 21 em meio WC (controle) e meio WC acrescido de 1 g.L^{-1} de glicose. As retas estão apresentadas na Figura 12 e confirmam a linearidade entre absorbância (683 nm) e concentração celular (mg.L^{-1}) pelos valores de R^2 adequados (próximos de 1). Contudo, nota-se que a linearidade dos dados fica mais fraca conforme o aumento da concentração celular, como nos casos dos cultivos com glicose das cepas LE17 e ITU07 quando comparados aos seus respectivos controles. Desta forma, para o monitoramento do crescimento das microalgas, as amostras dos cultivos que apresentaram absorbância acima de 1,0 foram diluídas de acordo com o proposto em Abou-Shanab et al. (2011).

Figura 12 - Curvas de calibração entre concentração celular e absorbância (683 nm) das cepas LE17, ITU07 e UF21, cultivadas em meio WC (controle) (coluna A) e meio WC acrescido com glicose (coluna B)

Para a realização dos cultivos com adição de fonte de carbono orgânico (ácidos orgânicos e açúcares), previamente realizou-se o estudo da melhor condição metabólica para o crescimento das cepas selecionadas.

Algumas linhagens de microalgas podem realizar os metabolismos autotrófico, heterotrófico, mixotrófico e fotoheterotrófico, além de serem capazes de alterar a via metabólica conforme as mudanças ambientais. Condições fotoheterotróficas são raramente mencionadas na literatura e geralmente são confundidas com as mixotróficas. No cultivo fotoheterotrófico, a microalga necessita de luz como fonte de energia enquanto utiliza matéria orgânica como única fonte de carbono. No crescimento mixotrófico, tanto o carbono orgânico quanto o CO₂ são fontes essenciais de carbono quando uma fonte de luz também é fornecida (MATA et al., 2010). Embora a condição fotoautotrófica seja utilizada com frequência nos cultivos de microalgas, pode-se obter maiores produtividades de biomassa e lipídeos sob condições heterotrófica e mixotrófica (LIANG et al., 2009; PEREZ-GARCIA et al., 2011).

O crescimento das microalgas LE17, ITU07 e UF 21 sob as condições autotrófica, heterotrófica e mixotrófica estão mostradas na Figura 13. Nesse estudo, 1 g.L⁻¹ de glicose foi usada como fonte de carbono nos cultivos mixotrófico e heterotrófico. As três cepas cresceram na condição heterotrófica e apresentaram concentração celular superior à condição fotoautotrófica. Além disso, o crescimento das cepas foi melhor na condição mixotrófica, conforme as maiores concentrações de células observadas na Figura 13. Esse resultado está de acordo com os descritos por Cheirsilp e Torpee (2012) os quais, ao analisarem o efeito da condição mixotrófica sobre o crescimento de quatro diferentes microalgas, concluíram que os cultivos realizados sob essa condição produziram rendimentos maiores da biomassa em relação aos heterotróficos e fotoautotróficos. É possível que, na condição mixotrófica, a presença de um substrato orgânico indique que o crescimento celular não está restrito à fotossíntese e, portanto, a luz deixa de ser um fator indispensável. Estudos na literatura reportaram ao fato do crescimento heterotrófico e a fotossíntese ocorrerem simultaneamente e de forma independente, contudo a fonte de carbono orgânico pode alterar ambos os metabolismos (VILLAREJO et al., 1995; CHOJNACKA e NOWORYTA, 2004).

Segundo os resultados descritos no presente estudo, a condição mixotrófica foi definida para os cultivos com fonte de carbono orgânico.

Figura 13 - Curvas de crescimento, pela absorbância a 683 nm (X e X_0), das microalgas LE17, ITU07 e UF21 cultivadas nas condições: fotoautotrófica, heterotrófica (1 g.L^{-1} de glicose) e mixotrófica (1 g.L^{-1} de glicose)

6.3.1. Intensidade Luminosa

Microalgas cultivadas em diferentes intensidades luminosas apresentam mudanças nas suas composições químicas, nos pigmentos e na atividade fotossintética (HU et al., 2008). Nesse estudo, analisou-se a relação entre a velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) e a intensidade luminosa das microalgas LE17, ITU07 e UF21. Como demonstrado pelas curvas de crescimento (Figura 14), as concentrações celulares finais não apresentaram diferenças significativas sob as diferentes intensidades luminosas, no entanto

sob $60 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (controle) os crescimentos foram mais lentos nos primeiros 4 dias de cultivo.

Pela análise da Tabela 12, os maiores valores de $\mu_{\text{máx}}$ foram observados sob 150 e $300 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, respectivamente, nos cultivos das cepas LE17/ITU07 e UF21. Observa-se que nos cultivos das três cepas a $\mu_{\text{máx}}$ aumentou com a elevação da intensidade luminosa, atingiu seu valor máximo e decresceu com intensidades maiores. No estudo do efeito da luz sobre o desenvolvimento de *Scenedesmus* sp., foi verificado aumento da velocidade específica de crescimento conforme elevação da intensidade luminosa, quando cultivada sob 50 a $400 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (LIU et al., 2012). Nos cultivos de *Dunaliella viridis*, a velocidade de crescimento decresceu sob intensidades acima de $700 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (GORDILLO et al., 1998).

Na Figura 15, estão apresentadas as fluorescências dos lipídeos acumulados no 20º dia de cultivo das cepas. Os resultados mostram o efeito positivo da intensidade luminosa no acúmulo lipídico das cepas LE17 e ITU07. As fluorescências aumentaram com a elevação de $60 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ para $150 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e, acima dessa intensidade as diferenças não foram significativas ($p < 0,05$). No caso da cepa UF21, o aumento da intensidade luminosa não influenciou no acúmulo lipídico, visto que as fluorescências não apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as condições testadas.

No estudo realizado por Liu et al. (2012), o conteúdo lipídico e o rendimento da biomassa de *Scenedesmus obliquus* foram promovidos pelo aumento da intensidade luminosa de 50 para $250\text{-}400 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Já na pesquisa realizada por Ho et al. (2012), o conteúdo lipídico de *S. obliquus* não apresentou alteração significativa em relação à variação da intensidade luminosa entre 60 a $540 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. O mesmo resultado foi descrito por Chrismadha e Borowitzka (1994), os quais concluíram que a relação entre a intensidade luminosa e o conteúdo lipídico, de modo geral, está ligada à espécie.

Figura 14 - Curvas de crescimento, pela absorbância a 683 nm (X e X_0), das cepas LE 17, ITU 07 e UF 21 em meio WC com variação da intensidade luminosa

Tabela 12 - Velocidades específicas máximas de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) das cepas LE 17, ITU 07 e UF 21 nos cultivos em meio WC com variação da intensidade luminosa

Intensidade Luminosa ($\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)		$\mu_{\text{máx}}$ (dia^{-1})		
		LE 17	ITU 07	UF 21
Controle	60	$0,41 \pm 0,01^a$	$0,44 \pm 0,01^a$	$0,37 \pm 0,02^a$
	150	$0,56 \pm 0,09^b$	$0,62 \pm 0,20^b$	$0,35 \pm 0,03^a$
	300	$0,47 \pm 0,02^a$	$0,48 \pm 0,03^a$	$0,46 \pm 0,04^b$
	500	$0,42 \pm 0,05^a$	$0,46 \pm 0,02^a$	$0,40 \pm 0,02^a$

*Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$)

Figura 15 - Fluorescência dos lipídeos acumulados no 20º dia de cultivo, das cepas de microalgas LE 17, ITU 07 e UF 21 em diferentes intensidades luminosas

6.3.2. Temperatura

As curvas de crescimento das cepas LE17, ITU07 e UF21 cultivadas sob diferentes temperaturas são mostradas na Figura 16. Observa-se que as cepas ITU07 e UF21 apresentaram uma fase de adaptação nos primeiros 3 dias de cultivo em 20°C e 20/24°C, respectivamente. A variação da temperatura não alterou a concentração final de células da cepa ITU07, entretanto nota-se uma tendência de aumento da concentração celular com a elevação da temperatura nos cultivos das cepas LE17 e UF21.

Os valores de $\mu_{\text{máx}}$ obtidos sob as diferentes temperaturas de cultivo das cepas analisadas não apresentaram diferenças significativas em relação aos seus respectivos controles (24°C), de acordo com o demonstrado pela Tabela 13. Nos estudos de Westerhoff et al. (2010), as velocidades específicas de crescimento de *Scenedesmus* sp. e *Chlorella* sp. não foram alteradas entre 27°C e 39°C, no entanto a 42°C as microalgas não se desenvolveram. Esses resultados diferem dos apresentados por Xin et al. (2011), que ao cultivarem *Scenedesmus* sp. sob 10°C a 25°C observaram uma relação positiva entre velocidade específica de crescimento e temperatura.

Na Figura 17, estão apresentadas as fluorescências dos lipídeos das cepas no 20º dia de cultivo sob variação da temperatura. Os cultivos a 20°C, com as microalgas LE17 e UF21, demonstraram os maiores acúmulos lipídicos com diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação às demais temperaturas. No caso da cepa ITU07, a temperatura influenciou o conteúdo lipídico de forma significativa ($p < 0,05$) quando a microalga foi cultivada em temperaturas acima de 24°C. Observa-se que todas as cepas da presente pesquisa demonstraram uma relação negativa entre acúmulo lipídico e temperatura.

Xin et al. (2011) ao modificarem a temperatura de 25°C do cultivo de *Scenedesmus* sp. LX1 para 10°C e 20°C, verificaram que o conteúdo lipídico de 25% em relação à biomassa seca passou para 31% e 35%, respectivamente. Segundo destacado em Renaud et al. (2002), a resposta da fração lipídica em microalgas às altas e baixas temperaturas depende da espécie.

Figura 16 - Curvas de crescimento, pela absorbância a 683 nm (X e X_0), das cepas LE 17, ITU 07 e UF 21 em meio WC com variação da temperatura

Tabela 13 - Velocidades específicas máximas de crescimento ($\mu_{\max}$) das cepas LE 17, ITU 07 e UF 21 nos cultivos em meio WC com variação da temperatura

Temperatura (°C)		$\mu_{\max}$ (dia ⁻¹)		
		LE 17	ITU 07	UF 21
Controle	20	0,43 ± 0,08 ^a	0,45 ± 0,02 ^a	0,42 ± 0,06 ^a
	24	0,46 ± 0,02 ^a	0,39 ± 0,04 ^a	0,42 ± 0,01 ^a
	30	0,56 ± 0,07 ^a	0,43 ± 0,04 ^a	0,52 ± 0,06 ^a
	35	0,48 ± 0,09 ^a	0,43 ± 0,03 ^a	0,47 ± 0,06 ^a

* Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença estatística, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$)

Figura 17 - Fluorescência dos lipídeos acumulados no 20º dia de cultivo, das cepas de microalgas LE 17, ITU 07 e UF 21 sob diferentes temperaturas

6.3.3. pH

As curvas de crescimento das microalgas cultivadas com variação do pH (Figura 18) demonstram que as maiores concentrações de células foram obtidas entre pH 9,2 e 11,2. Já as menores concentrações foram observadas no pH 6,2. Nota-se que na faixa de pH 7,2-8,2, as concentrações celulares finais foram próximas nos cultivos das três cepas. Em relação a $\mu_{\text{máx}}$, os maiores valores obtidos foram encontrados: no pH 9,2 e 11,2, para a cepa LE17; no pH 9,2 e 10,2, para a cepa ITU07; no pH 9,2, 10,2 e 11,2, para a cepa UF21 (Tabela 14). Presume-se que um ambiente alcalino é mais apropriado para o crescimento das cepas avaliadas na presente pesquisa.

Xin et al. (2011) descreveram que, ao cultivarem *Scenedesmus* sp. em diferentes concentrações de pH (3,9 - 10,3), o crescimento da microalga foi inibido pela condição ácida (pH<6,0). Zheng et al. (2013) relataram que a variação de pH 6,0 a 8,0 foi favorável ao cultivo de *Chlorella sorokiniana* e seu pH ótimo foi 7,0. Houve inibição do crescimento em pH 5,0 e decréscimo da velocidade de crescimento em pH 9,0. Esse efeito pode ser observado no cultivo da cepa ITU07 em pH 11,2, no qual a $\mu_{\text{máx}}$ foi menor do que as observadas em pH 9,2 e 10,2 (Tabela 14).

As fluorescências dos lipídeos acumulados no 20º dia de cultivo das cepas sob variação do pH são mostradas na Figura 19. Observa-se uma relação positiva entre pH e conteúdo lipídico nos cultivos com destaque da cepa LE17 sob pH 10,2 e 11,2.

Gardner et al. (2011), ao estudarem o efeito do pH sobre o crescimento e acúmulo de TAG em duas clorofíceas, notaram que há um melhor desenvolvimento para *Coelastrella* sp. (cepa WC-1) e *Scenedesmus* sp. (cepa PC-3) em pH 7,4 e 10,3, respectivamente. Ambas as microalgas exibiram evidências da influência do pH alcalino no acúmulo de TAG. Santos et al. (2012), ao analisarem a influência da condição alcalina sobre o conteúdo de ácidos graxos em *Neochloris oleoabundans*, concluíram que houve um aumento da fração lipídica com a elevação do pH.

Figura 18 - Curvas de crescimento, pela absorbância a 683 nm (X e X_0), das cepas LE 17, ITU 07 e UF 21 em meio WC com variação do pH

Tabela 14 - Velocidades específicas máximas de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) das cepas LE 17, ITU 07 e UF 21 nos cultivos em meio WC com variação do pH

pH inicial		$\mu_{\text{máx}}$ (dia^{-1})		
		LE 17	ITU 07	UF 21
Controle	6,2	$0,35 \pm 0,03^a$	$0,35 \pm 0,05^a$	$0,21 \pm 0,05^a$
	7,2	$0,45 \pm 0,05^b$	$0,32 \pm 0,03^a$	$0,27 \pm 0,03^{a,b}$
	8,2	$0,31 \pm 0,03^a$	$0,27 \pm 0,03^a$	$0,26 \pm 0,03^{a,b}$
	9,2	$0,59 \pm 0,03^c$	$0,40 \pm 0,03^{a,b}$	$0,34 \pm 0,01^{b,c}$
	10,2	$0,31 \pm 0,03^a$	$0,50 \pm 0,06^b$	$0,41 \pm 0,01^c$
	11,2	$0,53 \pm 0,02^{b,c}$	$0,38 \pm 0,07^a$	$0,36 \pm 0,05^c$

*Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$)

Figura 19 - Fluorescência dos lipídeos acumulados no 20º dia de cultivo, das cepas de microalgas LE 17, ITU 07 e UF 21 em diferentes pH

6.3.4. Relação de Nitrogênio e Fósforo (N:P)

As curvas de crescimento das microalgas cultivadas sob diferentes relações de N:P estão mostradas na Figura 20. Todas as condições foram adequadas para o crescimento das cepas, uma vez que as concentrações de células no 20º dia de cultivo não mostraram diferenças significativas ($p < 0,05$), contudo o crescimento da microalga ITU07 foi mais lento nos primeiros 8 dias na relação 10:1 (N:P). Em comparação ao controle (20:1), apenas a cepa LE17 demonstrou aumento considerável da $\mu_{\text{máx}}$ quando cultivada sob a relação 5:1. No caso da cepa UF21, os valores de $\mu_{\text{máx}}$ não apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as relações de N:P testadas (Tabela 15).

Arbib et al. (2013) avaliaram *S. obliquus* em efluente urbano em 7 diferentes relações de N:P e inferiram que a variação da relação N:P de 9:1 a 13:1 foi adequada para um ótimo crescimento da microalga.

A concentração de nitrogênio e fósforo no cultivo de microalgas é considerada um fator fundamental e tem influência direta na cinética de crescimento. A composição celular desses micro-organismos proposta pela relação de Redfield ($\text{C}_{106}\text{H}_{181}\text{O}_{45}\text{N}_{16}\text{P}$) sugere um meio de cultura com relação N:P de 16:1 (molar). Essa fórmula serve como parâmetro para quantificar uma possível limitação nutricional do meio, no entanto a composição média das células de microalgas depende da cepa e das condições de cultivo (ROLEDA et al., 2013). Assim, é interessante o estudo das melhores relações N:P para o crescimento das microalgas selecionadas na presente pesquisa

As fluorescências dos lipídeos acumulados no 20º dia de cultivo das três cepas sob variação da relação de N:P estão representadas pelo gráfico da Figura 21. Houve diminuição do conteúdo lipídico das cepas nas menores relações de N:P (2:1-5:1). Este resultado está em conformidade com o obtido por Xin et al. (2010) que, ao cultivarem *Scenedesmus* sp. em meio de cultura com diferentes concentrações de nitrogênio e fósforo, constataram redução do conteúdo lipídico com a variação N:P de 100:1 para 5:1. Nota-se que os conteúdos lipídicos das cepas LE17, ITU07 e UF21 não apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) nos cultivos com relações N:P de 20:1, 15:1 e 10:1

Figura 20 - Curvas de crescimento, pela absorbância a 683 nm (X e x_0), das cepas LE 17, ITU 07 e UF 21 em meio WC com variação da relação N:P

Tabela 15 - Velocidades específicas máximas de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) das cepas LE 17, ITU 07 e UF 21 nos cultivos em meio WC com variação de N:P

N:P		$\mu_{\text{máx}} \text{ (dia}^{-1}\text{)}$		
		LE 17	ITU 07	UF 21
Controle	20:1	$0,37 \pm 0,04^a$	$0,34 \pm 0,01^{a,c}$	$0,27 \pm 0,03^a$
	15:1	$0,38 \pm 0,02^a$	$0,31 \pm 0,03^a$	$0,33 \pm 0,04^a$
	10:1	$0,33 \pm 0,02^{a,c}$	$0,20 \pm 0,01^b$	$0,29 \pm 0,05^a$
	5:1	$0,44 \pm 0,02^b$	$0,39 \pm 0,05^c$	$0,32 \pm 0,01^a$
	2:1	$0,27 \pm 0,02^c$	$0,40 \pm 0,04^c$	$0,29 \pm 0,04^a$

*Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$)

Figura 21 - Fluorescência dos lipídeos acumulados no 20º dia de cultivo, das cepas de microalgas LE 17, ITU 07 e UF 21 sob variação de N:P

6.3.5. Ácido Acético

As cepas LE17, ITU07 e UF21 foram cultivadas sob diferentes concentrações de acetato. As curvas de crescimento são mostradas nos gráficos da Figura 22. É notável que 5,0 g.L⁻¹ e 10,0 g.L⁻¹ de ácido acético inibiram o crescimento das três cepas, posto que as velocidades específicas máximas de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) (Tabela 16) foram menores do que as observadas sem adição da fonte orgânica (controle).

Para as cepas LE17 e ITU07, as concentrações 0,02 a 1,0 g.L⁻¹ de ácido acético influenciaram no aumento do crescimento em relação à condição fotoautotrófica (controle) e os maiores valores de $\mu_{\text{máx}}$ foram observados em 1,0 g.L⁻¹. Nota-se que o ácido acético não promoveu o crescimento da cepa UF21 em relação à condição fotoautotrófica, de acordo com os valores de $\mu_{\text{máx}}$ (Tabela 16), os quais não mostraram aumentos significativos ($p < 0,05$).

Ácido acético (ou acetato) é uma das fontes de carbono mais comuns para muitas espécies de micro-organismos, inclusive as microalgas. *Cryptothecodinium cohnii* cresceu em cultivo heterotrófico com concentrações de acetato em torno de 1g.L⁻¹ (VAZHAPPILLY e CHEN, 1998). *Chlorella vulgaris* teve significativo crescimento heterotrófico em esgoto sanitário quando 10 g.L⁻¹ de acetato de sódio foram adicionados (PEREZ-GARCIA et al., 2011). Como evidenciado por Perez-Garcia et al. (2011), muitas microalgas são capazes de utilizar o acetato como fonte de carbono desde que seja em baixas concentrações. O seu uso no cultivo desses micro-organismos é interessante, pois não impõe severas restrições no processo, além de derivar de muitas aplicações industriais, prontamente disponíveis e de baixo custo.

Figura 22 - Curvas de crescimento, pela absorbância a 683 nm (X_0 e X), das cepas LE 17, ITU 07 e UF 21 em meio WC com variação de ácido acético e na condição controle (sem adição de ácido acético)

As fluorescências dos lipídeos acumulados nos cultivos das cepas sob diferentes quantidades de acetato estão mostradas na Figura 23. Observa-se uma tendência nos cultivos das três cepas, aumento do conteúdo lipídico com a elevação da concentração de acetato, com valores de fluorescência significativos ($p < 0,05$) na concentração de 1,0 g.L⁻¹ em relação à condição fotoautotrófica (controle). As fluorescências dos lipídeos em 5,0 e 10,0 g.L⁻¹ não foram determinadas, pois as concentrações celulares obtidas no 20º dia de cultivo não alcançaram a mínima exigida pela metodologia aplicada. Os resultados observados na presente pesquisa estão em conformidade com os disponíveis na literatura, como no cultivo de *C. vulgaris* ESP-31 em que a adição de ácido acético para controle do pH (7,0) contribuiu para o aumento do conteúdo lipídico (YEH et al., 2012) e o crescimento

de *Chlorococcum* sp. em diferentes concentrações de acetato, demonstrou elevação da fração lipídica em comparação a da condição fotoautotrófica (HARWATI et al., 2012).

Tabela 16 - Velocidades específicas máximas de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) das cepas LE 17, ITU 07 e UF 21 nos cultivos em meio WC com variação da concentração de ácido acético e na condição controle (sem adição de ácido acético)

Ácido Acético (g.L ⁻¹)	$\mu_{\text{máx}}$ (dia ⁻¹)		
	LE 17	ITU 07	UF 21
0,00	0,48 ± 0,01 ^a	0,49 ± 0,05 ^a	0,40 ± 0,02 ^a
0,02	0,59 ± 0,00 ^b	0,55 ± 0,03 ^b	0,43 ± 0,02 ^a
0,10	0,57 ± 0,01 ^b	0,55 ± 0,03 ^b	0,43 ± 0,04 ^a
1,00	0,52 ± 0,00 ^c	0,37 ± 0,02 ^c	0,43 ± 0,02 ^a
5,00	0,26 ± 0,00 ^d	0,16 ± 0,03 ^d	0,14 ± 0,01 ^b
10,00	0,12 ± 0,00 ^e	0,12 ± 0,00 ^d	0,14 ± 0,02 ^b

*Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística, de acordo com o teste de Tukey (p<0,05)

Figura 23 - Fluorescência dos lipídeos acumulados no 20º dia de cultivo das cepas de microalgas LE 17, ITU 07 e UF 21 cultivadas em diferentes concentrações de ácido acético e na condição controle (sem adição de ácido acético)

6.3.6. Ácido Butírico

As curvas de crescimento das cepas cultivadas sob diferentes concentrações de butirato (ácido butírico) estão apresentadas nos gráficos da Figura 24. As concentrações de 0,02 a 1,0 g.L⁻¹ estimularam o crescimento das microalgas em relação à condição fotoautotrófica (controle); as maiores concentrações celulares finais foram observadas sob 1,0 g.L⁻¹ de butirato. Já nos cultivos sob 5,0 g.L⁻¹ de butirato, as cepas cresceram de forma mais lenta e os menores valores de μ_{max} foram observados, como mostrado na Tabela 17. A concentração de 10 g.L⁻¹ de ácido butírico foi testada para o cultivo das três cepas e nessa condição as microalgas não se desenvolveram.

Quanto à fração lipídica, as três cepas apresentaram a tendência de aumentar o conteúdo lipídico com a elevação da concentração de ácido butírico (butirato), conforme as fluorescências dos lipídeos apresentadas na Figura 25. Os mecanismos metabólicos do butirato em microalgas devem ser investigados, visto que apenas alguns estudos na literatura comprovaram sua viabilidade no crescimento desses micro-organismos (COOK¹, 1968 apud PEREZ-GARCIA et al., 2011; HU et al., 2012).

Figura 24 - Curvas de crescimento, pela absorbância a 683 nm (X/X_0), das cepas LE 17, ITU 07 e UF 21 em meio WC com variação de ácido butírico e na condição controle (sem adição de ácido butírico)

¹ COOK, J. R. (1968). The cultivation and growth of *Euglena*. In: Buetow, D. E. (Ed.) **The Biology of *Euglena***, v. 1. Academic Press, New York, USA, p. 243-314.

Tabela 17 - Velocidades específicas máximas de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) das cepas LE 17, ITU 07 e UF 21 nos cultivos em meio WC com variação da concentração de ácido butírico e na condição controle (sem adição de ácido butírico)

Ácido Butírico (g.L ⁻¹)	$\mu_{\text{máx}}$ (dia ⁻¹)		
	LE 17	ITU 07	UF 21
0,00	0,49 ± 0,01 ^a	0,49 ± 0,05 ^a	0,42 ± 0,01 ^a
0,02	0,60 ± 0,01 ^b	0,58 ± 0,07 ^b	0,42 ± 0,00 ^a
0,10	0,79 ± 0,03 ^c	0,47 ± 0,01 ^a	0,42 ± 0,01 ^a
1,00	0,69 ± 0,02 ^d	0,58 ± 0,00 ^b	0,40 ± 0,01 ^a
5,00	0,22 ± 0,01 ^e	0,21 ± 0,01 ^c	0,22 ± 0,01 ^c

*Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$)

Figura 25 - Fluorescência dos lipídeos acumulados no último dia de cultivo, das cepas de microalgas LE 17, ITU 07 e UF 21 em diferentes concentrações de ácido butírico e na condição controle (sem adição de ácido butírico)

6.3.7. Ácido Propiônico

As curvas de crescimento das cepas LE17, ITU07 e UF21 cultivadas sob diferentes concentrações de propionato (ácido propiônico) estão demonstradas na Figura 26. Percebe-se que as concentrações de 0,02 a 1,0 g.L⁻¹ foram adequadas para o crescimento das cepas LE17 e ITU07, no entanto em 5 g.L⁻¹ houve efeito de inibição do crescimento, de acordo com as concentrações celulares finais e as velocidades específicas máximas de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) menores do que as observadas na condição fotoautotrófica (controle) (Tabela 18). Para a cepa UF21, houve inibição do crescimento nas concentrações de 1,0 e 5,0 g.L⁻¹ de propionato conforme as concentrações celulares finais e os valores de $\mu_{\text{máx}}$ menores do que os resultados do controle (Tabela 18); as concentrações de 0,02 e

0,10 g.L⁻¹ não favoreceram o crescimento, segundo as concentrações celulares finais semelhantes a observada na condição fotoautotrófica (controle) (Figura 26).

Experimentos foram preparados com 10 g.L⁻¹ do ácido propiônico, contudo nessa concentração não houve desenvolvimento das três cepas. Nota-se que os cultivos com 1,0 g.L⁻¹ de ácido propiônico duraram 15 dias, visto que nessa concentração as cepas alcançaram a fase estacionária antes das demais (20 dias).

As fluorescências dos lipídeos acumulados no último dia dos cultivos com variação da concentração de ácido propiônico estão representadas no gráfico da Figura 27. A cepa LE17 apresentou aumento do conteúdo lipídico com a elevação da concentração de propionato. A cepa ITU07 aumentou de forma significativa ($p < 0,05$) a fração lipídica na concentração de 1,0 g.L⁻¹ e a cepa UF 21 não mostrou alteração do conteúdo lipídico sob as diferentes concentrações da fonte orgânica. A fluorescência dos lipídeos da cepa ITU07 sob 5 g.L⁻¹ de propionato não foi determinada, pois a concentração de células final não alcançou a mínima exigida pela metodologia.

No estudo do crescimento de *Chlorella* sp. em esterco suíno líquido fermentado, a adição de ácido propiônico ao meio estimulou o crescimento da microalga, melhorou a eficiência na remoção de nutrientes e elevou a produtividade lipídica durante sete dias de cultivo em batelada (HU et al., 2012).

O metabolismo do propionato varia entre as espécies de microalgas. Muitas cepas não são capazes de degradar esse composto, como a de *Chlorella sorokiniana*, contudo algumas espécies como *Arthrospira platensis* e *Rhodobacter sphaeroides* podem remover o propionato do meio de cultura, porém não apresentam um crescimento robusto (LODI et al., 2005).

O crescimento das cepas LE17 e ITU07 foi favorecido pelo ácido propiônico (0,02-1,0 g.L⁻¹), conforme os valores de $\mu_{\text{máx}}$ (Tabela 18). Houve inibição do crescimento das três cepas em 5 g.L⁻¹, de acordo com os valores de $\mu_{\text{máx}}$ bem menores do que os observados no controle (Tabela 18). O acúmulo lipídico das cepas LE17 e ITU07 foi promovido nas concentrações mais elevadas de propionato (Figura 27). No entanto, esse composto não favoreceu o crescimento e o acúmulo lipídico da cepa UF21, em relação à condição fotoautotrófica, de acordo com os valores de $\mu_{\text{máx}}$ e as fluorescências dos lipídeos (Tabela 18, Figura 27).

Figura 26 - Curvas de crescimento, pela absorbância a 683 nm (X e X_0), das cepas LE 17, ITU 07 e UF 21 em meio WC com variação da concentração de ácido propiônico e na condição controle (sem ácido propiônico)

Tabela 18 - Velocidades específicas máximas de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) das cepas LE 17, ITU 07 e UF 21 nos cultivos em meio WC com variação da concentração de ácido propiônico e na condição controle (sem adição de ácido propiônico)

Ácido Propiônico (g.L ⁻¹)	$\mu_{\text{máx}}$ (dia ⁻¹)		
	LE 17	ITU 07	UF 21
0,00	0,38 ± 0,01 ^a	0,33 ± 0,02 ^a	0,35 ± 0,03 ^a
0,02	0,58 ± 0,04 ^b	0,45 ± 0,04 ^{b,c}	0,34 ± 0,01 ^a
0,10	0,64 ± 0,00 ^c	0,46 ± 0,03 ^b	0,28 ± 0,04 ^b
1,00	0,56 ± 0,02 ^b	0,39 ± 0,01 ^c	0,26 ± 0,02 ^b
5,00	0,20 ± 0,00 ^d	0,20 ± 0,04 ^d	0,19 ± 0,01 ^c

*Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$)

Figura 27 - Fluorescência dos lipídeos acumulados no último dia de cultivo, das cepas de microalgas LE 17, ITU 07 e UF 21 em diferentes concentrações de ácido propiônico e na condição controle (sem adição do ácido propiônico)

6.3.8. Frutose

As curvas de crescimento das cepas LE17, ITU07 e UF21 em diferentes concentrações de frutose e na condição controle (sem adição de frutose) estão apresentadas na Figura 28. As três cepas assimilaram a frutose, uma vez que houve aumento das concentrações celulares finais em relação ao cultivo fotoautotrófico (controle). As velocidades específicas máximas de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) apresentaram aumento nos cultivos com 5 a 30 g.L⁻¹ de frutose, em relação ao cultivo fotoautotrófico (Tabela 19).

Gim et al. (2013), ao estudarem o efeito de várias fontes de carbono sobre a produção de biomassa da clorófitica *Scenedesmus obliquus* R8, constataram o crescimento da microalga sob cultivo heterotrófico com 1,8 g.L⁻¹ de frutose, o que sustenta os resultados observados na presente pesquisa. Já Morales-Sánchez et al. (2013) verificaram que *Neochloris oleoabundans* não é capaz de crescer em cultivo heterotrófico com 10 g.L⁻¹ de frutose como fonte de carbono. Os autores concluíram que *N. oleoabundans* não está adaptada à elevada osmolaridade, diferente do que foi observado na presente pesquisa no crescimento das cepas LE17, ITU07 e UF21, as quais foram capazes de se desenvolver em elevadas concentrações de frutose.

Figura 28 - Curvas de crescimento, pela absorvância a 683 nm (X e X_0), das cepas LE 17, ITU 07 e UF 21 em meio WC com variação de frutose e na condição controle (sem adição de frutose)

Tabela 19 - Velocidades específicas máximas de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) das cepas LE 17, ITU 07 e UF 21 nos cultivos em meio WC, com variação da concentração de frutose e na condição controle (sem adição de frutose)

Frutose (g.L ⁻¹)	$\mu_{\text{máx}}$ (dia ⁻¹)		
	LE 17	ITU 07	UF 21
0,00	0,37 $\pm$ 0,05 ^{a,c}	0,32 $\pm$ 0,01 ^a	0,27 $\pm$ 0,02 ^a
0,02	0,36 $\pm$ 0,02 ^{a,c}	0,41 $\pm$ 0,06 ^a	0,31 $\pm$ 0,02 ^{a,c}
0,10	0,37 $\pm$ 0,02 ^{a,c}	0,42 $\pm$ 0,02 ^a	0,29 $\pm$ 0,01 ^a
1,00	0,32 $\pm$ 0,02 ^a	0,32 $\pm$ 0,02 ^a	0,30 $\pm$ 0,02 ^a
5,00	0,53 $\pm$ 0,01 ^b	0,70 $\pm$ 0,17 ^b	0,41 $\pm$ 0,00 ^{b,c}
10,00	0,50 $\pm$ 0,00 ^b	0,56 $\pm$ 0,06 ^{a,b}	0,44 $\pm$ 0,02 ^b
15,00	0,40 $\pm$ 0,05 ^c	0,42 $\pm$ 0,03 ^{a,b}	0,39 $\pm$ 0,04 ^{b,c}
30,00	0,55 $\pm$ 0,00 ^b	0,51 $\pm$ 0,02 ^{a,b}	0,36 $\pm$ 0,02 ^c

*Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$)

As fluorescências dos lipídeos acumulados das três cepas cultivadas sob diferentes concentrações de frutose, estão apresentadas na Figura 29. Observa-se uma relação positiva entre o acúmulo lipídico e a concentração de frutose. Houve aumento significativo ($p < 0,05$) dos lipídeos a partir de 1,0 e 5,0 g.L⁻¹ de frutose nos cultivos das cepas UF21 e LE17/ITU07, respectivamente. As maiores frações lipídicas foram observadas com 30,0 g.L⁻¹ de frutose.

Yeh et al. (2012), ao analisarem o cultivo fotoheterotrófico de *Chlorella vulgaris* ESP-31, reportaram que o controle do pH em 8,5 e frutose elevaram a produção de biomassa e o conteúdo lipídico a níveis semelhantes aos obtidos com o uso da glicose.

Figura 29 - Fluorescência dos lipídeos acumulados no último dia de cultivo das cepas de microalgas LE 17, ITU 07 e UF 21, em diferentes concentrações de frutose e na condição controle (sem adição de frutose)

6.3.9. Glicose

As curvas de crescimento das cepas cultivadas em diferentes concentrações de glicose estão apresentadas na Figura 30. O período de cultivo nas diferentes concentrações de glicose variou de acordo com o tempo necessário para as cepas alcançarem a fase estacionária do crescimento. Observa-se a tendência de aumento da concentração celular com a elevação da concentração de glicose. As maiores concentrações celulares finais foram obtidas com 5 g.L⁻¹ de glicose nos cultivos das cepas LE17 e ITU07 e, com 15 e 30 g.L⁻¹ de glicose nos cultivos da cepa UF21. Esses resultados estão de acordo com os descritos por Mandal e Malick (2009) que, ao analisarem o efeito da glicose (2 - 22,5 g.L⁻¹) no crescimento de *Scenedesmus obliquus*, notaram aumento da biomassa conforme a elevação da concentração dessa fonte de carbono. A maior produção de biomassa foi obtida no cultivo com 15 g.L⁻¹ de glicose por 10 dias. Gim et al. (2013) destacaram a tolerância de *S. obliquus* R8 à elevada concentração de glicose (20 g.L⁻¹) e a influência positiva desse composto no crescimento heterotrófico da microalga.

As velocidades específicas máximas de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) foram maiores do que a da condição fotoautotrófica a partir de 0,02, 0,1 e 0,02 g.L⁻¹ de glicose nos cultivos das cepas LE17, ITU07 e UF21, respectivamente (Tabela 20).

Dentre as várias fontes de carbono orgânico, glicose é de modo geral a mais usada nos cultivos de microalgas, assim como para outras espécies de micro-organismos. As maiores taxas de crescimento e respiração são obtidas com esse açúcar (GRIFFITHS², 1960 apud PEREZ-GARCIA et al., 2011). Isso pode ocorrer devido ao seu elevado valor energético por mol em comparação com os demais compostos orgânicos. Como exemplo, tem-se a glicose que produz em torno de 2,8 kJ/mol de energia, enquanto cerca de 0,8 kJ/mol é gerado pelo acetato (BOYLE e MORGAN, 2009). Essa energia fornecida pela glicose ao crescimento e à produção lipídica das microalgas é gerada por rotas metabólicas mais simples do que as realizadas por outros substratos (GIM et al., 2013). As vias metabólicas reportadas para o catabolismo da glicose em microalgas são: a Embden-Meyerhof, principal processo glicolítico das células sob fonte de luz e a Pentose Fosfato, fundamental na condição de ausência de luz (NEILSON e LEWIN, 1974; YANG et al., 2000).

² GRIFFITHS, D. J.; THRESHER, C. L.; STREET, H. E. (1960). The heterotrophic nutrition of *Chlorella vulgaris*. *Ann. Bot.* v. 24, p. 1-11.

A concentração necessária de glicose para um ótimo crescimento metabólico pode estar relacionada à combinação de fatores, com a espécie de microalga e as condições de cultivo como fatores importantes. Por consequência, cada combinação determinará o nível de consumo do substrato (PEREZ-GARCIA et al., 2011).

Figura 30 - Curvas de crescimento, pela absorbância a 683 nm (X e X_0), das cepas LE 17, ITU 07 e UF 21 em meio WC com variação de glicose e na condição controle (sem adição de glicose)

Tabela 20 - Velocidades específicas máximas de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) das cepas LE 17, ITU 07 e UF 21 nos cultivos em meio WC com variação da concentração de glicose e na condição controle (sem adição de glicose)

Glicose (g.L ⁻¹)	$\mu_{\text{máx}}$ (dia ⁻¹)		
	LE 17	ITU 07	UF 21
0,00	0,52 ± 0,01 ^a	0,56 ± 0,01 ^a	0,39 ± 0,04 ^a
0,02	0,76 ± 0,09 ^b	0,69 ± 0,04 ^a	0,63 ± 0,02 ^{b,e}
0,10	1,28 ± 0,08 ^c	1,34 ± 0,13 ^b	0,77 ± 0,05 ^c
1,00	1,22 ± 0,04 ^{c,d}	1,19 ± 0,06 ^b	0,55 ± 0,02 ^{b,d}
5,00	1,19 ± 0,08 ^{c,d}	1,20 ± 0,02 ^b	0,55 ± 0,06 ^{b,d}
10,00	1,12 ± 0,08 ^d	1,12 ± 0,02 ^b	0,52 ± 0,0 ^d
15,00	1,28 ± 0,03 ^c	1,20 ± 0,03 ^b	0,69 ± 0,00 ^{e,c}
30,00	1,12 ± 0,04 ^d	1,10 ± 0,04 ^b	0,63 ± 0,02 ^{b,e}

*Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$)

O conteúdo lipídico das três cepas aumentou de forma considerável nos cultivos com concentração de glicose a partir de 1,0 a 30,0 g.L⁻¹, em comparação à condição controle, de acordo com as fluorescências dos lipídeos demonstradas na Figura 31. Nota-se uma relação positiva entre concentração de glicose e acúmulo lipídico nos cultivos das cepas. Essa observação também foi reportada por Zhao et al. (2012) que, ao analisarem o efeito de diferentes rotas metabólicas na composição da biomassa de *Scenedesmus quadricauda*, concluíram que a glicose estimulou o acúmulo lipídico e a maior fração foi obtida sob condição mixotrófica com 3 g.L⁻¹ de glicose.

Gim et al. (2013) relataram que o cultivo mixotrófico com 10 g.L⁻¹ de glicose estimulou o acúmulo lipídico das microalgas *Chlorella* sp., *Chlorella vulgaris*, *Botryococcus braunii* e *Scenedesmus obliquus*, quando comparado com o cultivo autotrófico.

Na Figura 32 estão mostradas as imagens da cepa ITU07 na condição controle (sem adição de glicose) e sob 5 g.L⁻¹ de glicose. Nas condições heterotróficas e mixotróficas o acúmulo de lipídeos pode ser atribuído ao consumo de carbono orgânico a uma taxa maior do que a de geração de células, a qual promove conversão do excesso do carbono em triacilgliceróis. Esse processo é realizado em duas fases: divisão celular exponencial até o decréscimo do crescimento pela limitação de nutrientes e acúmulo lipídico (RATLEDGE, 2002).

Figura 31 - Fluorescência dos lipídeos acumulados no último dia de cultivo, das cepas de microalgas LE 17, ITU 07 e UF 21 em diferentes concentrações de glicose e na condição controle (sem adição de glicose)

Figura 32 - Imagens da cepa ITU07 cultivada na condição controle (A) e sob 5 g.L⁻¹ de glicose (B); Microscopia de fluorescência (células coradas com *Nile Red*), em vermelho a fluorescência da clorofila e em amarelo a fluorescência do lipídeo

6.3.10. Sacarose

Nos cultivos das cepas selecionadas sob diferentes concentrações de sacarose, apenas a microalga LE17 mostrou crescimento significativo ($p < 0,05$) em condição mixotrófica com 5 e 10 g.L⁻¹ em relação ao cultivo fotoautotrófico (controle) (Figura 33 e Tabela 21). A cepa ITU07 apresentou velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) em 5,0 g.L⁻¹ de sacarose maior do que a do controle, contudo as concentrações celulares finais nas duas condições foram semelhantes (Figura 33 e Tabela 21). Experimentos foram preparados com 30 g.L⁻¹ de sacarose, contudo nessa concentração não houve desenvolvimento das três cepas.

Yeh et al. (2012) reportaram que os cultivos fotoheterotróficos de *Chlorella vulgaris* ESP-31 com frutose e acetato de sódio foram promovidos em comparação à condição fotoautotrófica, porém o crescimento da microalga não aumentou com sacarose. Assim, esses autores concluíram que a sacarose não é uma fonte de carbono efetiva para *C. vulgaris* ESP-31. Parece que a maioria das microalgas não tem invertase para assimilar a sacarose (PEREZ-GARCIA et al., 2011). No entanto, Bhatnagar et al. (2011) relataram que *Chlorella globosa*, *C. minutissima* e *Scenedesmus bijuga* assimilaram a sacarose e entre os compostos orgânicos (acetato, glicerol, metanol) testados foi o mais adequado para o crescimento das microalgas. O nível de utilização de diferentes fontes de carbono como

glicose, acetato, etanol, glicerol e frutose por heterotrofia ou mixotrofia é conhecido por ser característico da espécie. Normalmente a glicose é a fonte de carbono preferida pelos micro-organismos, entretanto tem custo elevado e seu uso pode causar efeito adverso na produção de alimentos. Dessa maneira, é interessante a busca por meios alternativos (LIU et al., 2010; BHATNAGAR et al., 2011).

Figura 33 - Curvas de crescimento, pela absorbância a 683 nm (X e X_0), das cepas LE 17, ITU 07 e UF 21 em meio WC com variação de sacarose e na condição controle (sem adição de sacarose)

Tabela 21 - Velocidades específicas máximas de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) das cepas LE 17, ITU 07 e UF 21 nos cultivos em meio WC com variação da concentração de sacarose e na condição controle (sem adição de sacarose)

Sacarose (g.L ⁻¹)	$\mu_{\text{máx}}$ (dia ⁻¹)		
	LE 17	ITU 07	UF 21
0,00	0,48 ± 0,04 ^{a,c}	0,41 ± 0,02 ^a	0,38 ± 0,03 ^a
0,02	0,45 ± 0,01 ^{a,b}	0,37 ± 0,02 ^a	0,40 ± 0,02 ^a
0,10	0,40 ± 0,04 ^b	0,43 ± 0,02 ^a	0,36 ± 0,01 ^a
1,00	0,45 ± 0,01 ^{a,b}	0,37 ± 0,02 ^a	0,40 ± 0,02 ^a
5,00	0,53 ± 0,01 ^{c,d}	0,53 ± 0,01 ^b	0,37 ± 0,03 ^a
10,00	0,59 ± 0,00 ^{d,e}	0,40 ± 0,04 ^a	0,39 ± 0,04 ^a
15,00	0,57 ± 0,03 ^d	0,39 ± 0,02 ^a	0,36 ± 0,03 ^a

* Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$)

Os conteúdos lipídicos das cepas LE17 e ITU07 aumentaram com a elevação da concentração de sacarose no meio de cultura (Figura 34). É significativa ($p<0,05$) essa diferença a partir de 1 e 5 g.L^{-1} de glicose nos cultivos, respectivamente, das cepas LE17 e ITU07. No caso da cepa UF21, a sacarose não estimulou o acúmulo lipídico, visto que não houve diferenças significativas ($p<0,05$) entre as frações lipídicas sob as concentrações testadas. O mesmo efeito foi reportado por DAS et al. (2011) que, ao cultivarem *Nannochloropsis* sp. com vários substratos orgânicos, constataram que o conteúdo lipídico da microalga na presença de sacarose foi similar ao quantificado no cultivo fotoautotrófico.

Figura 34 - Fluorescência dos lipídeos acumulados no último dia de cultivo, das cepas de microalgas LE 17, ITU 07 e UF 21 em diferentes concentrações de sacarose e na condição controle (sem adição de sacarose)

6.4. Otimização do Cultivo

As cepas LE17 e ITU07 foram selecionadas para a realização da otimização de seus cultivos, visto que apresentaram as maiores velocidades específicas máximas de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) nos experimentos com variação das condições físico-químicas. Além de serem capazes de assimilar todos os açúcares e ácidos orgânicos testados, diferente do que foi observado com a cepa UF21 que não utilizou a sacarose e o ácido propiônico (propionato) para o crescimento, conforme mostrado anteriormente (item 6.3). Diante do exposto, as microalgas LE17 e ITU07 são promissoras para geração de biomassa e há possibilidade de cultivá-las em efluentes onde os compostos orgânicos avaliados estejam presentes.

Entre os compostos orgânicos testados, a glicose demonstrou ser mais adequada ao crescimento das microalgas, de acordo com os maiores valores de $\mu_{\text{máx}}$ e da concentração final de células constatadas nos cultivos (item 6.3.9). Portanto, para otimização do crescimento das cepas em condição mixotrófica, a glicose foi escolhida como a fonte de carbono orgânico.

As microalgas LE17 e ITU07 foram cultivadas em meio WC acrescido de 1 g.L^{-1} de glicose e a assimilação desses nutrientes pelas cepas foi verificada durante 15 dias para definir a concentração de nitrogênio, fósforo e glicose no meio de cultura nos experimentos de otimização. Pela análise da Tabela 22, as cepas LE17 e ITU07 assimilaram de forma acentuada os nutrientes (N e P) disponíveis no meio de cultura WC, respectivamente, 95% e 93% de nitrogênio e, 99% e 98% de fósforo. A glicose foi assimilada pelas cepas de 75% a 78% da sua concentração inicial.

Tabela 22 - Concentração de nitrogênio, fósforo e glicose em meio de cultura WC acrescido com 1 g.L^{-1} de glicose nos cultivos das microalgas LE17 e ITU07 e, porcentagem de assimilação desses nutrientes

Dia	N-Nitrato (mg.L^{-1})				P-Fosfato ($\mu\text{g.L}^{-1}$)				Glicose (mg.L^{-1})			
	LE17	%*	ITU07	%*	LE17	%*	ITU07	%*	LE17	%*	ITU07	%*
0	14,0	0	14,0	0	1550,0	0	1550,0	0	1000,0	0	1000	0
5	0,7	95	1,8	88	24,5	98	61,3	96	740,6	26	312	69
10	0,7	95	1,3	91	10,0	99	44,0	97	391,6	61	222,1	78
15	0,7	95	1,0	93	10,0	99	30,0	98	245,1	75	217,7	78

* Porcentagem (%) de assimilação

De acordo com as elevadas porcentagens de assimilação dos nutrientes (N e P) e glicose e, com o objetivo de proporcionar condição nutricional para aumento do crescimento celular, determinou-se como meio para os cultivos de otimização das condições de crescimento celular o meio de cultura WC modificado para o triplo da concentração dos micro e macronutrientes e adição de 5 g.L^{-1} de glicose. Na literatura, foi sugerido que esta concentração não exerceu efeito na atividade fotossintética de *Chlorella* em cultivo mixotrófico (OGAWA e AIBA³, 1981 apud YANG et al., 2000). A relação N:P do meio de cultura foi mantida em 20:1 (controle). Apesar da relação N:P de 5:1 ter favorecido as velocidades específicas máximas de crescimento das cepas LE17 e ITU07, houve diminuição dos conteúdos lipídicos nessa condição, o que inviabilizou a sua aplicação.

6.4.1. DCCR para Otimização do Crescimento Celular – Cepa LE17

Em função dos resultados observados nos cultivos da cepa LE17 em diferentes condições físico-químicas (item 6.3), foram determinadas as faixas de temperatura (25,0°C a 37,0°C), luz (100 a 600 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) e pH (8,2 a 9,2) para otimização do crescimento celular.

A matriz dos ensaios com os valores experimentais e codificados das variáveis estudadas, assim como as respostas das velocidades específicas máximas de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) estão apresentadas na Tabela 23. Observa-se que os pontos centrais (ensaios 8-10) indicaram uma pequena variação (desvio padrão igual a $\pm 0,13$), o que demonstra boa repetibilidade experimental. Os valores de $\mu_{\text{máx}}$ variaram de 1,47 a 3,02 dia^{-1} (ensaios 4 e 14) e foram superiores aos obtidos na condição controle (60 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 24°C, pH 7,2) com diferentes concentrações de glicose (item 6.3.9, Tabela 20).

Pelos resultados do planejamento, os coeficientes de regressão foram determinados como mostrados na Tabela 24. As variáveis temperatura e luz apresentaram efeito significativo, de acordo com seus valores de significância (p-valor) menores do que 0,05. O pH não exibiu efeito significativo, de modo que qualquer valor na faixa de 8,2 - 9,2 conduziu a resultados semelhantes de $\mu_{\text{máx}}$. Conforme os parâmetros obtidos, a Equação 6.1 foi estabelecida, a qual representa o modelo quadrático da $\mu_{\text{máx}}$ em função das variáveis estudadas para a cepa LE17.

³ OGAWA, T.; AIBA, S. (1981). Bioenergetic analysis of mixotrophic growth in *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus acutus*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 23, p. 1121-1132.

Tabela 23 - Matriz do DCCR com níveis experimentais e codificados das variáveis, respostas de $\mu_{\max}$ (dia^{-1}) experimentais e previstas pelo modelo para a cepa LE17

Ensaio	Variáveis Experimentais			Variáveis Codificadas			Resultados		
	T ^a	IL ^b	pH	X ₁ ^c	X ₂ ^d	X ₃ ^e	Experimental ^f $\mu_{\max}$ (d^{-1})	Predito ^g $\mu_{\max}$ (d^{-1})	Desvio Relativo ^h %
1	25	350	8,7	-1,68179	0	0	1,61 ± 0,06	1,01	37,3
2	27,4	201	8,4	-1	-1	-1	1,85 ± 0,07	1,59	14,1
3	27,4	201	9,0	-1	-1	+1	2,06 ± 0,06	1,79	13,1
4	27,4	499	8,4	-1	+1	-1	1,47 ± 0,07	0,82	44,2
5	27,4	499	9,0	-1	+1	+1	2,04 ± 0,01	1,10	46,1
6	31,0	100	8,7	0	-1,68179	0	1,78 ± 0,11	2,15	-20,8
7	31,0	350	8,2	0	0	-1,68179	2,59 ± 0,41	1,97	23,9
8	31,0	350	8,7	0	0	0	2,44 ± 0,17	2,10	13,9
9	31,0	350	8,7	0	0	0	2,68 ± 0,29	2,10	21,6
10	31,0	350	8,7	0	0	0	2,64 ± 0,12	2,10	20,5
11	31,0	350	9,2	0	0	+1,68179	2,41 ± 0,11	2,16	10,4
12	31,0	600	8,7	0	+1,68179	0	2,57 ± 0,05	0,81	68,5
13	34,6	201	8,4	+1	-1	-1	2,77 ± 0,06	2,53	8,7
14	34,6	201	9,0	+1	-1	+1	3,02 ± 0,16	2,49	17,5
15	34,6	499	8,4	+1	+1	-1	2,54 ± 0,14	1,63	35,8
16	34,6	499	9,0	+1	+1	+1	2,59 ± 0,20	1,67	35,5
17	37,0	350	8,7	+1,68179	0	0	2,56 ± 0,21	2,27	11,3

^a T – Temperatura (°C); ^b IL – Intensidade luminosa ($\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$); d – dia.

^c temperatura; ^d intensidade luminosa; ^e pH;

^f Resultados experimentais e desvios padrão calculados a partir de triplicatas; ^g Valores de $\mu_{\max}$ preditos pelo modelo; ^h Desvio Relativo = $((Y - \hat{Y})/Y) \cdot 100$; onde Y = resposta experimental e $\hat{Y}$ = resposta prevista pelo modelo

Tabela 24 - Coeficientes de regressão para a resposta da $\mu_{\max}$ da cepa LE 17

Fator	Coeficiente de Regressão	Erro Padrão	p-valor
Média	-41,8470	27,19444	0,132596
X ₁ ^a (L)	1,4046	0,31453	0,000076*
X ₁ (Q)	-0,0128	0,00229	0,000002*
X ₂ ^b (L)	0,0021	0,00711	0,769109
X ₂ (Q)	-0,00001	0,00000	0,000069*
X ₃ ^c (L)	4,5589	5,82065	0,438618
X ₃ (Q)	-0,1616	0,32917	0,626522
X ₁ X ₂	-0,0001	0,00006	0,355637
X ₁ X ₃	-0,0556	0,03216	0,092642
X ₂ X ₃	0,0005	0,00078	0,552370

*p<0,05; ^a Temperatura; ^b Luz; ^c pH; L – termos lineares; Q – termos quadráticos.

$$\mu_{\text{máx}} (\text{LE17}) = -41,8470 + 1,4046.x_1 + 0,0021.x_2 + 4,5589.x_3 - 0,0128.x_1^2 - 0,00001.x_2^2 - 0,1616.x_3^2 - 0,0001.x_1.x_2 - 0,0556.x_1.x_3 + 0,0005.x_2.x_3$$

De acordo com a análise de variância do modelo quadrático (Tabela 25), o $F_{\text{calculado}}$ para a regressão foi significativo ($p < 0,00001$), sendo 4,9 vezes maior do que o F_{tabelado} e, o percentual de variação explicada pelo modelo foi de aproximadamente 70%. Assim, o modelo ajustou-se aos dados experimentais e, a partir disso, a superfície de resposta e as curvas de contorno foram construídas (Figura 35). O desvio relativo foi mais alto (68%) no ensaio 12 em que a intensidade luminosa foi de $600 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (Tabela 23), mostrando que o modelo não se ajustou para elevada intensidade luminosa. No entanto, nos ensaios (13 e 14) em que foram obtidos os maiores valores de $\mu_{\text{máx}}$, os desvios relativos foram baixos.

Tabela 25 - Análise de variância (ANOVA) do primeiro modelo quadrático para predição da velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) da cepa LE 17

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	$F_{\text{calculado}}$	p-valor
Regressão	7,28	9	0,81	10,56	<0,00001
Resíduos	3,14	41	0,07	0,00000	
Total	10,42	50			

Variação Explicada (R^2) = 0,69; $F_{9;41;0,05} = 2,12$

Através das análises da superfície de resposta e das curvas de contorno (Figura 35), nota-se que há uma região ótima para o crescimento celular na faixa de combinações de luz igual a $200\text{-}450 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e temperatura de 32°C a 38°C . Segundo Rodrigues e lemma (2005), a indicação de uma faixa ótima das variáveis é mais interessante do que um valor pontual, uma vez que se admite variação dos valores sem perda da condição otimizada. Contudo, os autores sugerem a realização de ensaios, nas condições definidas após a análise de superfície de resposta, para validação experimental do resultado previsto pelo modelo.

É interessante destacar que, em relação aos resultados obtidos na condição controle ($60 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, 24°C , pH 7,2) com adição de glicose (item 6.3.9, Tabela 20), houve

acréscimo significativo dos valores de $\mu_{\max}$ nos ensaios do DCCR, comprovando o uso desse planejamento experimental como meio para atingir as condições otimizadas das variáveis estudadas.

Figura 35 - Superfície de resposta (A) e curvas de contorno (B) para $\mu_{\max}$ (dia^{-1}) em função da Intensidade Luminosa (IL) ($\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) e temperatura ($^{\circ}\text{C}$), da cepa LE 17

Para validação do resultado sugerido pelo modelo, foram realizados quatro repetições do cultivo da cepa LE17 na condição pertencente à região ótima para o crescimento celular. Como a superfície de resposta apontou uma faixa ótima ampla (32-38°C e 200-450 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), os valores pontuais foram estabelecidos com base nas condições do DCCR em que os maiores resultados de $\mu_{\text{máx}}$ foram observados, no caso, os ensaios 13 e 14 (Tabela 23). As condições ótimas determinadas foram temperatura a 34,5°C, intensidade luminosa de 200 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e pH 8,2.

As respostas experimentais da $\mu_{\text{máx}}$ à condição ótima estão apresentadas na Tabela 26. Os resultados experimentais das quatro repetições foram próximos do previsto pelo modelo, conforme os desvios relativos baixos. Assim, o modelo gerado pelo DCCR foi aplicado com sucesso para otimização do crescimento celular da cepa LE17.

Tabela 26 - Respostas experimental e prevista da μ_{max} na condição ótima apontada pelo modelo do DCCR para a cepa LE17

Ensaio	Variáveis Experimentais			Resultados		
	Temperatura (°C)	Intensidade Luminosa ($\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)	pH	Experimental μ_{max} (dia^{-1})	Previsto μ_{max} (dia^{-1})	Desvio* Relativo %
1	34,5	200	8,2	2,81 $\pm$ 0,02	2,52	10,36
2	34,5	200	8,2	2,50 $\pm$ 0,01	2,52	-0,76
3	34,5	200	8,2	2,60 $\pm$ 0,10	2,52	3,12
4	34,5	200	8,2	2,13 $\pm$ 0,32	2,52	-18,26

* Desvio Relativo = $((Y - \hat{Y})/Y) \times 100$; onde Y = resposta experimental e $\hat{Y}$ = resposta prevista pelo modelo

Ho et al. (2012) destacaram a viabilidade da metodologia de superfície de resposta para otimização da velocidade específica de crescimento de *Scenedesmus obliquus* CNW-N. O experimento de validação foi realizado na condição sugerida e obteve velocidade específica de crescimento de 1,27 dia^{-1} , a qual foi semelhante ao resultado predito pela metodologia, com desvio de 3,1%. Observa-se que o valor da $\mu_{\text{máx}}$ de 2,52 dia^{-1} na condição otimizada da presente pesquisa foi superior ao reportado pelo estudo descrito.

Li et al. (2011) reportaram a efetividade do planejamento de superfície de resposta na otimização da produtividade de biomassa da microalga *Chlorella minutíssima* através da proporção de nitrogênio, carbono e fósforo no meio de cultura em condição fotoheterotrófica.

6.4.2. Primeiro DCCR para Otimização do Crescimento Celular – Cepa ITU07

A partir dos resultados obtidos nos cultivos da cepa ITU07 em diferentes condições físico-químicas (item 6.3), as faixas de temperatura (25-37°C), luz (100-600 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) e pH (9,2-10,2) foram estabelecidas para a otimização do crescimento celular.

A matriz dos ensaios com os valores experimentais e codificados das variáveis estudadas e as respostas das velocidades específicas máximas de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) está mostrada na Tabela 27. Os pontos centrais apresentaram pequena variação (desvio padrão de $\pm 0,03$), demonstrando boa repetibilidade experimental. Os valores de $\mu_{\text{máx}}$ variaram de 0,85 a 2,27 dia^{-1} (ensaios 16 e 3), alcançando valores superiores aos observados na condição controle (60 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 24°C, pH 7,2) com adição de diferentes concentrações de glicose (Tabela 20). Os desvios relativos foram baixos na região em que os valores de $\mu_{\text{máx}}$ estão maximizados. Entretanto, no ensaio 14 o desvio relativo foi alto (-43,7), o que mostra a falta de ajuste do modelo a baixos valores na resposta.

Os coeficientes de regressão foram determinados através dos resultados do planejamento (Tabela 28). As variáveis temperatura, luz e pH apresentaram efeito significativo, conforme os valores de significância (p-valor) menores do que 0,05. A Equação 6.2 foi determinada de acordo com os parâmetros obtidos, o que representa o modelo quadrático da $\mu_{\text{máx}}$ em função das variáveis estudadas para a cepa ITU07.

A análise de variância do modelo quadrático está apresentada na Tabela 29. O $F_{\text{calculado}}$ para a regressão foi significativo ($p < 0,00001$) com valor 5,58 vezes maior do que o F_{tabelado} e o percentual de variação explicada pelo modelo foi de 76%. Dessa forma, o modelo ajustou-se aos dados experimentais e, possibilitou que as superfícies de resposta e as curvas de contorno fossem construídas (Figura 36).

Tabela 27 - Matriz do primeiro DCCR com níveis experimentais e codificados das variáveis, respostas de $\mu_{\max}$ (dia^{-1}) experimentais e preditas pelo modelo para a cepa ITU07

Ensaio	Variáveis Experimentais			Variáveis Codificadas			Resultados		
	T ^a	IL ^b	pH	X ₁ ^c	X ₂ ^d	X ₃ ^e	Experimental ^f $\mu_{\max}$ (dia^{-1})	Predito ^g $\mu_{\max}$ (dia^{-1})	Desvio ^h Relativo %
1	25,0	350	9,7	-1,68179	0	0	1,31 ± 0,05	1,62	- 23,7
2	27,4	201	9,4	-1	-1	-1	2,09 ± 0,09	1,93	7,7
3	27,4	201	10,0	-1	-1	+1	2,27 ± 0,03	2,02	11,0
4	27,4	499	9,4	-1	+1	-1	1,52 ± 0,07	1,34	11,8
5	27,4	499	10,0	-1	+1	+1	1,53 ± 0,19	1,42	7,2
6	31,0	100	9,7	0	-1,68179	0	1,71 ± 0,08	1,93	-12,9
7	31,0	350	9,2	0	0	-1,68179	1,70 ± 0,17	1,85	-8,8
8	31,0	350	9,7	0	0	0	1,72 ± 0,08	1,71	0,6
9	31,0	350	9,7	0	0	0	1,73 ± 0,05	1,71	1,2
10	31,0	350	9,7	0	0	0	1,77 ± 0,01	1,71	3,4
11	31,0	350	10,2	0	0	+1,68179	1,36 ± 0,06	1,52	-11,8
12	31,0	600	9,7	0	+1,68179	0	0,89 ± 0,08	1,06	-19,1
13	34,6	201	9,4	+1	-1,00000	-1,00000	1,84 ± 0,12	1,73	6,0
14	34,6	201	10,0	+1	-1,00000	+1	0,87 ± 0,77	1,25	- 43,7
15	34,6	499	9,4	+1	+1	-1,00000	1,26 ± 0,15	1,28	- 1,6
16	34,6	499	10,0	+1	+1	+1	0,85 ± 0,03	0,79	7,1
17	37,0	350	9,7	+1,68179	0	0	-	-	-

- não houve crescimento celular

^a T – Temperatura (°C); ^b IL – Intensidade luminosa ($\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$);

^c temperatura; ^d intensidade luminosa; ^e pH;

^f Resultados experimentais e desvios padrão calculados a partir de triplicatas;

^e Valores de $\mu_{\max}$ preditos pelo modelo

^h Desvio Relativo = $((Y - \hat{Y})/Y) \cdot 100$; onde Y = resposta experimental e $\hat{Y}$ = resposta prevista pelo modelo

Tabela 28 - Coeficientes de regressão para a resposta da $\mu_{\text{máx}}$ do primeiro DCCR da cepa ITU07

Fator	Coeficiente da Regressão	Erro Padrão	p-valor
Média	-53,6305	20,57817	-2,60618*
X_1^a (L)	1,9493	0,22546	8,64574
X_1 (Q)	-0,0120	0,00178	-6,72264*
X_2^b (L)	-0,0008	0,00495	-0,15689*
X_2 (Q)	-0,000003	0,00000	-3,76905*
X_3^c (L)	5,7840	4,03213	1,43448
X_3 (Q)	-0,1021	0,20512	-0,49789*
X_1X_2	0,0001	0,00004	1,61585
X_1X_3	-0,1326	0,02000	-6,63135*
X_2X_3	-0,0001	0,00048	-0,12028*

*p<0,05; ^a Temperatura; ^b Luz; ^c pH; L – termos lineares; Q – termos quadráticos.

[6.2]

$$\mu_{\text{máx}} (\text{ITU07}) = -53,6305 + 1,9493 \cdot x_1 - 0,0008 \cdot x_2 + 5,7840 x_3 - 0,0120 \cdot x_1^2 - 0,000003 \cdot x_2^2 - 0,1021 \cdot x_3^2 + 0,0001 \cdot x_1 \cdot x_2 - 0,1326 \cdot x_1 \cdot x_3 - 0,0001 x_2 \cdot x_3$$

Tabela 29 - Análise de variância (ANOVA) do primeiro modelo quadrático para predição da velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) da cepa ITU07

Fator de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F _{calculado}	p-valor
Regressão	4,63	9	0,51428	12,33	<0,00001
Resíduos	1,46	35	0,04173		
Total	6,09	44			

Variação Explicada (R^2) = 0,76; $F_{9;35;0,05} = 2,21$

Verifica-se pela análise das superfícies de resposta e das curvas de contorno (Figura 36), que para o maior crescimento celular o modelo apontou intensidades luminosas abaixo de 200 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, temperatura entre 24°C e 32°C e pH abaixo de 9,2. São relevantes os valores superiores de $\mu_{\text{máx}}$ alcançados nos ensaios (2 e 3, respectivamente $\mu_{\text{máx}} = 2,09$ e 2,27) do DCCR em relação aos obtidos na condição controle com adição de glicose ($\mu_{\text{máx}} = 1,34 \text{ dia}^{-1}$) (item 6.3.9, Tabela 20). No entanto, não foi possível delimitar uma faixa ótima para o crescimento da cepa ITU07. Assim, optou-se por realizar outro planejamento com alteração das faixas de estudo das variáveis.

A Superfície de Resposta

Curva de Contorno

B

C

Figura 36 - Superfície de resposta e curvas de contorno para $\mu_{\max}$ (dia⁻¹) em função da Intensidade Luminosa (IL) ($\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) e pH (A); pH e temperatura (°C) (B); temperatura (°C) e Intensidade Luminosa ($\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) (C), do primeiro DCCR da cepa ITU07

6.4.3. Segundo DCCR para Otimização do Crescimento Celular – Cepa ITU07

O objetivo de realizar um novo planejamento experimental foi o de explorar novas faixas de estudo da temperatura e da intensidade luminosa, com base nos resultados apontados pelo primeiro planejamento (item 6.4.2), com a intenção de definir a região ótima para o crescimento da cepa ITU07. As faixas estudadas para o segundo DCCR foram de 30-37°C para temperatura e 50-300 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ para intensidade luminosa e o pH foi fixado em 8,2.

A Tabela 30 representa a matriz dos ensaios com valores experimentais e codificados das variáveis estudadas e respostas obtidas para a $\mu\text{máx}$. Os maiores valores de $\mu\text{máx}$ foram observados nos pontos centrais do DCCR (ensaios 6-9; média = 2,29 dia^{-1}) e no ensaio 10 ($\mu\text{máx}$ = 2,26), os quais foram próximos ao valor máximo observado no primeiro DCCR (2,27 dia^{-1}). Logo, o segundo DCCR foi útil para definir a temperatura de 34°C e a intensidade luminosa próxima a 175 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, como as melhores condições para o crescimento da cepa ITU07.

Pela análise estatística dos resultados, os coeficientes de regressão foram obtidos, como mostrados na Tabela 31. Obteve-se a Equação 6.3, através da consideração dos parâmetros significativos ($p < 0,05$), a qual representa o modelo quadrático da $\mu\text{máx}$ em função das variáveis estudadas no segundo DCCR.

A análise de variância (ANOVA) dos resultados está apresentada na Tabela 32. O coeficiente de determinação (R^2) foi igual a 0,83 e o valor de $F_{\text{calculado}}$ para a regressão foi 18,5 vezes maior que o valor de F_{tabelado} . Os desvios relativos (Tabela 27) foram baixos, contudo os ensaios 1-3 apresentaram desvios mais altos (respectivamente, 34, -37, -29%), mostrando que o modelo não se ajustou a baixos valores na resposta.

Tabela 30 - Matriz do segundo DCCR com níveis experimentais e codificados das variáveis, respostas de $\mu_{\text{máx}}$ (dia^{-1}) experimentais e preditas pelo modelo para a cepa ITU07

Ensaio	Variáveis Experimentais		Variáveis Codificadas		Resultados		
	T ^a	IL ^b	X ₁ ^c	X ₂ ^d	Experimental ^e $\mu_{\text{máx}}$ (dia^{-1})	Predito ^f $\mu_{\text{máx}}$ (dia^{-1})	Desvio ^g Relativo %
1	30	175	-1,41421	0	1,00 ± 0,05	0,66	34
2	31	87	-1	-1	0,71 ± 0,02	0,97	-37
3	31	263	-1	+1	1,07 ± 0,07	1,38	-29
4	34	50	0	-1,41421	1,88 ± 0,03	1,82	3
5	34	50	0	-1,41421	1,88 ± 0,05	1,82	3
6	34	175	0	0	2,43 ± 0,18	2,29	6
7	34	175	0	0	2,38 ± 0,03	2,29	4
8	34	175	0	0	2,35 ± 0,09	2,29	3
9	34	175	0	0	2,00 ± 0,03	2,29	-15
10	34	300	0	+1,41421	2,26 ± 0,08	1,97	13
11	34	300	0	+1,41421	1,87 ± 0,14	1,97	-5
12	36	87	+1	-1	1,84 ± 0,24	1,87	-2
13	36	87	+1	-1	1,88 ± 0,03	1,87	1
14	36	263	+1	+1	1,68 ± 0,15	1,68	0
15	36	263	+1	+1	1,62 ± 0,17	1,68	-4
16	37	175	+1,41421	0	1,47 ± 0,19	1,50	-2
17	37	175	+1,41421	0	1,52 ± 0,17	1,50	1

^a T – Temperatura (°C); ^b IL – Intensidade luminosa ($\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$);

^c temperatura; ^d intensidade luminosa;

^e Resultados experimentais e desvios padrão calculados a partir de triplicatas;

^f Valores de $\mu_{\text{máx}}$ preditos pelo modelo

^g Desvio Relativo = $((Y - \hat{Y})/Y) \cdot 100$; onde Y = resposta experimental e $\hat{Y}$ = resposta prevista pelo modelo

[6.3]

$$\mu_{\text{máx}} (\text{ITU07}) = -117,74 + 6,87 \cdot x_1 + 0,032 \cdot x_2 - 0,099 \cdot x_1^2 - 0,000025 \cdot x_2^2 - 0,00067 \cdot x_1 \cdot x_2$$

Tabela 31 - Coeficientes de regressão para a resposta da $\mu_{\max}$ do segundo DCCR da cepa ITU07

Fator	Coeficiente de Regressão	Erro Padrão	p-valor
Média	-117,743	8,27772	0,00000*
x_1^a (L)	6,876	0,48388	0,00000*
x_2^b (L)	0,032	0,00807	0,00026*
x_1 (Q)	-0,099	0,00714	0,00000*
x_2 (Q)	-0,00003	0,00001	0,00001*
$x_1 \cdot x_2$	-0,00067	0,00023	0,006*

*p<0,05; ^a Temperatura; ^b Luz; L – termos lineares; Q – termos quadráticos

Tabela 32 - Análise de variância (ANOVA) do segundo modelo quadrático para predição da velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\max}$) da cepa ITU07

Fator de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F _{calculado}	p-valor
Regressão	10,1313	5	2,0262	45,44	<0,00001
Resíduos	2,0063	45	0,0445		
Total	12,1376	50			

Variação Explicada (R^2) = 0,83; $F_{5;45;0,05} = 2,45$

A superfície de resposta e as curvas de contorno foram construídas como mostradas na Figura 37. Observa-se na superfície de resposta que a região ótima para a maior $\mu_{\max}$ da cepa ITU07 situa-se na faixa de 33 a 34°C para a temperatura e de 120 a 240 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ para a intensidade luminosa. O modelo gerado pelo DCCR foi aplicado com sucesso para otimização do crescimento celular da cepa LE17, visto que os valores de $\mu_{\max}$ foram superiores aos obtidos na condição controle com diferentes concentrações de glicose (Item 6.3.9, Tabela 20), além de ter definido uma região ótima para o crescimento celular da microalga.

Azma et al. (2011) ressaltaram a eficiência da metodologia de superfície de resposta na otimização da formulação do meio para o cultivo heterotrófico da clorofícea *Tetraselmis suecica*. Nesse estudo, a concentração celular final obtida no cultivo com meio otimizado foi duas vezes maior do que o alcançado no meio não otimizado.

A

B

Figura 37 - Superfície de resposta (A) e curvas de contorno (B) para $\mu_{\max}$ (dia⁻¹) em função da Intensidade Luminosa (IL) ($\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) e temperatura (°C), do segundo DCCR da cepa ITU07

O resultado sugerido pelo modelo foi validado pelo cultivo da cepa ITU07 (quatro repetições) nas condições pertencentes à região ótima para o crescimento celular. Os valores pontuais estabelecidos foram temperatura de 34,0°C, intensidade luminosa de 180 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e pH 8,2.

As respostas experimentais da $\mu_{\text{máx}}$ à condição ótima estão apresentadas na Tabela 33. Os resultados experimentais das quatro repetições foram próximos do previsto pelo modelo conforme os desvios relativos baixos. Desta forma, o modelo gerado pelo DCCR foi aplicado com sucesso para otimização do crescimento celular da cepa ITU07.

Tabela 33 - Respostas experimentais e previstas da $\mu_{\text{máx}}$ na condição ótima apontada pelo modelo do DCCR para a cepa ITU07

Ensaio	Variáveis Experimentais			Resultados		
	Temperatura (°C)	Intensidade Luminosa ($\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)	pH	Experimental $\mu_{\text{máx}}$ (dia^{-1})	Previsto $\mu_{\text{máx}}$ (dia^{-1})	Desvio* Relativo %
1	34	180	8,2	$2,36 \pm 0,07$	2,33	1,3
2	34	180	8,2	$2,41 \pm 0,04$	2,33	3,3
3	34	180	8,2	$2,27 \pm 0,09$	2,33	-2,6
4	34	180	8,2	$2,44 \pm 0,03$	2,33	4,5

* Desvio Relativo = $((Y - \hat{Y})/Y) \cdot 100$; onde Y = resposta experimental e $\hat{Y}$ = resposta prevista pelo modelo

A condição de cultivo de *Chlorella* sp. foi otimizada pelas análises do DCCR e pelo uso de superfície de resposta. A produção de biomassa da microalga aumentou de forma significativa, indicando que as análises foram úteis para a otimização do processo (KIM et al., 2012).

García et al. (2005) ao avaliarem o efeito de diferentes fontes de carbono orgânico na produtividade de biomassa da diatomácea *Phaeodactylum tricornutum*, descreveram que a microalga apresentou velocidades específicas máximas de $1,33 \text{ dia}^{-1}$ e $0,96 \text{ dia}^{-1}$ em cultivo mixotrófico com $2,0 \text{ g.L}^{-1}$ e $5,0 \text{ g.L}^{-1}$ de glicose, respectivamente. Esses valores de $\mu_{\text{máx}}$ estão abaixo do que o obtido na condição ótima ($2,44 \text{ dia}^{-1}$) para a cepa ITU07 (Tabela 33).

6.5. Cultivo das Microalgas em Batelada – Escala de Bancada

Com as condições de crescimento otimizadas em tubos, realizaram-se cultivos das cepas selecionadas (LE17 e ITU07) em meio de cultura WC modificado (meio sintético) e no efluente de reator UASB em sistema de batelada simples (8 litros). O objetivo foi de analisar as produtividades de biomassa e o conteúdo lipídico final das microalgas na condição otimizada em meio sintético e no efluente de reator UASB, além de verificar a aplicação desse efluente como meio ao cultivo das microalgas e a capacidade desses micro-organismos em removerem nitrogênio e fósforo do mesmo.

Microalgas apresentam a capacidade de tratar efluentes pela remoção de nutrientes e metais pesados de forma sustentável e baixo custo (DE-BASHAN e BASHAN, 2010). O cultivo de microalga em efluente para produção de energia foi proposto há muito tempo, no entanto só recentemente foi considerada candidata favorita a esse propósito, devido a sua facilidade de cultivo e a possibilidade favorável da sua utilização como fonte alternativa à produção de biomassa para bioenergia. A elevação do aquecimento global, o esgotamento dos combustíveis fósseis e a necessidade de mitigação dos gases de efeito estufa fez com que a exploração da viabilidade de tratamento de águas residuárias por microalgas associada à produção de biocombustíveis fosse vital (HOFFMANN, 1998; MALLICK, 2002; RAWAT; 2010).

6.5.1. Caracterização do Efluente

O efluente empregado nos cultivos decorreu de uma única coleta em que houve mistura dos efluentes dos quatro módulos que compreendem o reator UASB da ETE Jardim das Flores (Rio Claro – SP). Na Tabela 34, estão apresentados os resultados sobre as variáveis analisadas para a caracterização do efluente, além da Tabela 35 na qual mostra as concentrações de ácidos orgânicos, carboidratos e alcoóis e, na Tabela 36, consta a composição em íons metálicos.

Pela análise dos resultados verifica-se que o efluente tem uma relação N:P de 61,2:1 (NH_4^+ , NO_3^- e PO_4^{3-}), o que indica uma possível deficiência de fósforo (P) (Tabela 34). Elevadas relações entre nitrogênio e fósforo, em torno de 30:1, sugerem limitação de fósforo (P), enquanto baixas relações ao redor de 5:1 apontam limitação de nitrogênio (N). Embora as águas residuárias exponham as microalgas a concentrações de nutrientes maiores até

três ordens de magnitude do que sob as condições naturais, é provável que o crescimento seja limitado por carbono e luz (DE LA NOÛE et al., 1992; LARSDOTTER, 2006).

Após a filtração do efluente, as concentrações de fósforo total e nitrogênio total Kjeldahl e a demanda química de oxigênio foram reduzidas de forma acentuada, já a condutividade sofreu leve alteração (Tabela 34). Contudo, as concentrações de carbono (Total), nitrogênio (N-NH_4^+ e N-NO_3^-) e fósforo (PO_4^{3-}) disponíveis para assimilação das microalgas no efluente (Tabela 34) são maiores do que as presentes no meio de cultura WC (C - $1,8 \text{ mg.L}^{-1}$, N - 14 mg.L^{-1} e P - $1,55 \text{ mg.L}^{-1}$). A concentração de nitrogênio amoniacal (40 mg.L^{-1}) é superior a 20 mg.L^{-1} , sendo essa a máxima apropriada para o crescimento das microalgas devido à toxicidade da amônia (BOROWITZKA, 1998).

Tabela 34 - Variáveis determinadas para caracterização do efluente de reator UASB utilizado

Variável	Unidade	Valor	
		Efluente Bruto	Efluente Filtrado
pH		7,14	-
Condutividade	$\mu\text{S.cm}^{-1}$	864,2	793,5
Oxigênio Dissolvido	mg.L^{-1}	0,0	0,0
Demanda Química de Oxigênio	mg.L^{-1}	$333,4 \pm 31,5$	$122,4 \pm 16,6$
Cor	Pt-Co	-	71
Turbidez	NTU	-	3,26
Nitrogênio Total Kjeldahl	mg.L^{-1}	$135,8 \pm 1,5$	$43,40 \pm 0,8$
Nitrato	mg.L^{-1}	-	$1,20 \pm 0,1$
Nitrogênio amoniacal	mg.L^{-1}	-	$40,00 \pm 0,6$
Fósforo Total	mg.L^{-1}	11,00	$3,85 \pm 1,4$
Ortofosfato	mg.L^{-1}	-	$3,48 \pm 0,2$
Carbono Total	mg.L^{-1}	-	$68,1 \pm 0,7$
Carbono Inorgânico	mg.L^{-1}	-	$55,8 \pm 1,2$
Carbono Orgânico	mg.L^{-1}	-	$12,3 \pm 1,9$

- a análise não foi realizada

Dentre as fontes de carbono orgânico determinadas no efluente, o metanol destaca-se pela maior concentração, seguido pelo ácido propiônico, etanol e glicose (Tabela 35). Liang et al. (2013), ao estudarem a influência de compostos do bio-óleo no crescimento de *Chlamydomonas reinhardtii*, observaram a ausência de efeitos inibitórios do metanol na faixa de concentração de $0,01\text{-}0,6 \text{ g.L}^{-1}$. Os autores concluíram que esse resultado está relacionado às baixas concentrações testadas. Venkataramanan et al. (2012) verificaram

que o metanol não afetou o crescimento da bactéria *Clostridium pasteurianum* até a concentração de 5 g.L⁻¹. Esses autores descreveram que o metanol aumenta a fluidez da membrana celular e, de forma negativa, afeta o crescimento celular e o metabolismo.

Na presente pesquisa, foi observado em cultivos anteriores que tanto 0,02 g.L⁻¹ de ácido propiônico quanto de glicose favoreceram o crescimento das cepas LE17 e ITU07 (Tabelas 18 e 20). Portanto, a despeito das baixas concentrações de ácidos orgânicos, alcoóis e açúcar no efluente (Tabela 35), há a possibilidade das microalgas utilizarem essas fontes de carbono orgânico para o crescimento. De acordo com Mallick e Rai (1994), o esgoto sanitário contém vários compostos orgânicos como ácidos voláteis, ácidos solúveis não voláteis, ácidos graxos, aminoácidos e carboidratos muitos dos quais são utilizados pelas microalgas para os crescimentos mixotrófico e heterotrófico.

Tabela 35 - Concentração de ácidos orgânicos, carboidratos e alcoóis analisados no efluente de reator UASB utilizado

Compostos	Efluente Filtrado
	Concentração (mg.L ⁻¹)
<i>Ácidos Orgânicos</i>	
Cítrico	-
Málico	2,8
Succínico	2,0
Lático	-
Fórmico	-
Acético	2,5
Propiônico	13,1
Iso-butírico	7,0
Butírico	-
Iso-valérico	-
Valérico	-
Capróico	-
<i>Carboidratos</i>	
Glicose	10,2
Frutose	-
<i>Alcoóis</i>	
Metanol	27,9
Etanol	10,3
n-Butanol	-

- não detectado pelo método

No geral, os íons metálicos analisados no efluente filtrado estão em baixa concentração, com exceção do cálcio, sódio e potássio (Tabela 36) que estão em

concentrações acima do que as presentes no meio de cultura WC (Na - 23 mg.L⁻¹, Ca - 10 mg.L⁻¹ e K - 39 mg.L⁻¹).

Sydney et al. (2010) quantificaram o consumo de nutrientes pela clorofícea *Chlorella vulgaris* LEB-104 em cultivo fotoautotrófico com adição de ar enriquecido com 5% de CO₂. Observaram que a microalga ao final do período de cultivo (15 dias) assimilou 4,96 mg.L⁻¹ de magnésio e 56 mg.L⁻¹ de potássio, sendo que a velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) alcançada foi de 0,29 dia⁻¹.

Mata et al. (2013) estudaram o efeito dos macro e micronutrientes no crescimento da microalga *Dunaliella tertiolecta*. Ao aumentarem a concentração desses nutrientes em 10 e 20 vezes em comparação ao meio de cultura de água marinha artificial (SAG⁴, 2008), observaram que o magnésio, zinco e manganês reduziram a produtividade de biomassa. O potássio não afetou de forma significativa a produtividade de biomassa e o ferro favoreceu o crescimento da microalga.

Tabela 36 - Concentração de íons metálicos analisados no efluente de reator UASB utilizado

Metais	Concentração (mg.L ⁻¹)	
	Efluente Bruto	Efluente Filtrado
Zinco	0,12	0,07
Chumbo	0,07	0,07
Cádmio	0,02	0,01
Níquel	0,04	0,03
Ferro	2,12	0,13
Manganês	0,10	0,04
Cobre	0,04	0,01
Cromo	0,04	0,01
Alumínio	1,37	0,01
Bário	0,16	0,05
Magnésio	2,39	2,02
Cálcio	77,35	56,42
Cobalto	0,05	0,03
Sódio	50,00	34,00
Potássio	2320,00	2000,00

⁴ SAG - Sammlung von Algenkulturen Göttingen (2008). Artificial Seawater Medium with Vitamins, Germany, <sagdb.uni-goettingen.de/culture_media/25 Artificial Seawater Medium.pdf>, accessed 27.11.2012.

6.5.2. Cultivo das Microalgas em Diferentes Concentrações do Efluente

Com a intenção de verificar qual a concentração mais adequada ao crescimento das cepas selecionadas (LE17 e ITU07), foram realizados cultivos em diferentes concentrações do efluente de reator UASB na condição controle ($60 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, pH 7,2 e 24°C).

Na Figura 38 estão apresentadas as curvas de crescimento e na Figura 39 as velocidades específicas máximas de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) das cepas em cada concentração do efluente testada. As maiores concentrações celulares ao final do período de cultivo (16º dia) foram obtidas na concentração de 50% do efluente tanto para a cepa LE17 quanto para a cepa ITU07. Os maiores valores de $\mu_{\text{máx}}$ também foram observados na concentração de 50% do efluente para as duas cepas. Provavelmente na concentração de 75% e no efluente não diluído, os componentes presentes em elevada concentração desfavoreceram o crescimento das microalgas. Como já comentado anteriormente (item 5.5.1), a concentração de nitrogênio amoniacal no efluente (40 mg.L^{-1}) é maior do que a sugerida (20 mg.L^{-1}) para que não seja tóxica às microalgas. Conforme os resultados observados, a concentração de 50% do efluente foi determinada como a mais apropriada para o crescimento das microalgas selecionadas.

Figura 38 - Curvas de crescimento, pela absorbância a 683 nm, das cepas LE17 e ITU07 cultivadas em diferentes concentrações do efluente de reator UASB

Figura 39 - Velocidades específicas máximas de crescimento (μ_{max}) das cepas LE17 e ITU07 cultivadas em diferentes concentrações do efluente de reator UASB

6.5.3. Cultivos na Condição Otimizada

Em função dos resultados obtidos a partir dos Delineamentos Compostos Centrais Rotacionais (DCCR), os cultivos otimizados da cepa LE17 foram realizados nas seguintes condições: 34,5°C, 200 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e pH inicial de 8,2 e da cepa ITU07 foram realizados em: temperatura de 34°C, intensidade luminosa de 180 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e pH inicial de 8,2. Todos os cultivos (controle e otimizado) foram aerados por borbulhamento de ar filtrado (4,5 L.min^{-1}). Na Figura 40 estão as fotos dos cultivos na condição otimizada em meio sintético em dias seguidos (A - 1º dia e B - 2º dia), evidenciando o aumento da concentração celular pela modificação da cor.

Figura 40 - Aspecto dos cultivos na condição otimizada em meio sintético no 1º dia (A) e no 2º dia (B)

Nas Figuras 41 e 42 estão apresentados os resultados dos cultivos na condição otimizada em meio sintético (meio de cultura WC modificado) e no efluente de reator UASB (50%), referentes ao perfil de crescimento das cepas LE17 e ITU07, aos valores de pH durante o cultivo, à fluorescência dos lipídeos acumulados e à remoção de nitrogênio, fósforo e glicose, além dos cultivos realizados na condição determinada como controle.

Os cultivos foram realizados até a fase estacionária do crescimento celular das microalgas LE17 e ITU07. Dessa forma, os cultivos nas condições controle, otimizada em meio sintético (meio WC modificado) e otimizada em efluente permaneceram 15, 6 e 10

dias, respectivamente. De acordo com as curvas de crescimento (colunas A, Figuras 41 e 42), a condição otimizada favoreceu o crescimento celular das duas cepas em relação à condição controle. A biomassa final da cepa LE17 nas condições otimizadas em efluente ($0,243 \text{ g.L}^{-1}$) e meio sintético ($2,03 \text{ g.L}^{-1}$) foram, respectivamente de 2,3 e 19,3 vezes maiores do que a obtida na condição controle ($0,105 \text{ g.L}^{-1}$). A biomassa final da cepa ITU07 na condição otimizada em efluente ($0,342 \text{ g.L}^{-1}$) e em meio sintético ($1,5 \text{ g.L}^{-1}$) foram 2 e 9 vezes maiores, respectivamente, do que a observada na condição controle ($0,166 \text{ g.L}^{-1}$).

Os valores de biomassa finais obtidos nos cultivos na condição otimizada das duas microalgas em efluente foram maiores do que o relatado por Xin et al. (2009) que, ao cultivarem oito espécies de microalgas em efluente, observaram que ao final de 15 dias a maior concentração de biomassa foi da clorofícea *Scenedesmus* sp. LX1 com $0,11 \text{ g.L}^{-1}$. Cheirsilp e Torpee (2012), ao realizarem cultivos mixotróficos em batelada de *Chlorella* sp. e *Nannochloropsis* sp. com 10 g.L^{-1} de glicose em meio de cultura durante 7 dias, obtiveram $3,76$ e $3,83 \text{ g.L}^{-1}$ de biomassa, respectivamente. Esses valores de biomassa são maiores do que os observados nos cultivos na condição otimizada em meio sintético da presente pesquisa. Contudo, em relação à condição controle os cultivos das cepas LE17 e ITU07 na condição otimizada apresentaram aumentos significativos da biomassa final.

Os valores de pH dos cultivos (cepas LE17 e ITU07) na condição controle aumentaram de 7,2 para aproximadamente 8,0 (15º dia) conforme a elevação da concentração celular. É um fato que a fotossíntese causa o aumento do pH (GARCIA et al., 2006). Isso posto, o crescimento celular das cepas através do metabolismo fotossintético elevou o pH nos cultivos fotoautotróficos (controle). Na condição otimizada em meio sintético, houve pequena variação do pH tanto no cultivo da cepa LE17 (pH 8,2 - 8,38) quanto no da cepa ITU07 (8,2 - 8,33). Nesses cultivos mixotróficos (5 g.L^{-1} de glicose), o aumento do pH pela fotossíntese, provavelmente, foi compensado pela respiração. Segundo Borowitzka (1998), o pH em lagoas de alta taxa pode ser regulado pela presença de matéria orgânica a qual promove a respiração das microalgas e por consequência diminui o pH.

Nos cultivos das cepas LE17 e ITU07, na condição otimizada em efluente, os perfis do pH foram semelhantes. Observa-se aumento do pH com a elevação da concentração celular até o 8º dia de cultivo e, após esse período, queda (8º - 10º dia) com a estabilização do crescimento. No efluente (50%), a assimilação metabólica do íon NH_4^+ (principal fonte de N) pela microalga causou o decréscimo do pH, devido à liberação de H^+ , como mostrado na

Equação 6.4 simplificada (GOLDMAN et al., 1982). O mesmo efeito foi reportado por Xin et al. (2010) ao estudarem o efeito de N-NH_4^+ no crescimento de *Scenedesmus* sp. LX1.

[6.4]

As fluorescências dos lipídeos acumulados durante os cultivos da cepa LE17 estão demonstrados na Figura 41 (coluna B). Na condição controle há uma tendência de aumento dos lipídeos neutros na fase estacionária do crescimento celular. Observa-se nos cultivos na condição otimizada (meio sintético e efluente - 50%) diminuição do conteúdo lipídico na fase exponencial do crescimento celular seguida pelo aumento do conteúdo na fase estacionária. Em todos os cultivos da cepa LE17 o conteúdo lipídico foi mais pronunciado na condição de limitação de nutriente, de acordo com os gráficos de remoção de N e P (coluna C). Na condição controle, no 15º dia de cultivo a concentração de P-fosfato estava escassa ($0,22 \text{ mg.L}^{-1}$) enquanto havia disponíveis 4 mg.L^{-1} de N-nitrato. No cultivo na condição otimizada em meio sintético, no 3º dia a concentração de P-fosfato foi reduzida a $0,01 \text{ mg.L}^{-1}$ e, ao final do cultivo (6º dia), ainda havia $4,8 \text{ mg.L}^{-1}$ de N-nitrato e $0,8 \text{ mg.L}^{-1}$ de glicose. No cultivo na condição otimizada em efluente (50%), no 2º dia houve remoção acentuada tanto da concentração de N-amoniaco quanto de P-fosfato e a partir do 6º dia, o N-amoniaco foi totalmente removido e as concentrações de N-nitrato e P-fosfato foram reduzidas, respectivamente a $0,1$ e $0,01 \text{ mg.L}^{-1}$. Conforme os resultados descritos, nos cultivos na condição controle e otimizada há a possibilidade do fósforo ter sido o fator limitante do crescimento das microalgas.

As fluorescências dos lipídeos acumulados durante os cultivos da microalga ITU07 estão apresentadas na Figura 42 (coluna B). No cultivo controle, o conteúdo lipídico da microalga não apresentou alteração ao longo dos dias. No cultivo na condição otimizada em meio sintético, nota-se tendência de diminuição do conteúdo lipídico na fase exponencial do crescimento celular seguida por seu aumento na fase estacionária. O mesmo efeito pode ser observado no cultivo em efluente (50%). O aumento do conteúdo lipídico no final dos cultivos pode estar relacionado à limitação nutricional.

Pelos gráficos de remoção dos nutrientes (Figura 42, coluna c), observa-se que, nos cultivos da cepa ITU07 controle e na condição otimizada em meio sintético, a partir do 13º e 5º dia de cultivo, respectivamente, há limitação de P-fosfato enquanto o N-nitrato está

presente nos meios. No cultivo em meio sintético a glicose também não foi totalmente assimilada pela microalga ITU07, já que ao final do cultivo (6º dia) havia 1,1 g.L⁻¹. No cultivo na condição otimizada em efluente (50%) a partir do 6º dia, o nitrogênio (N-amoniaco e N-nitrato) e o fósforo (P-fosfato) ficaram em baixas concentrações o que fez com que a cepa ITU07 alcançasse a fase estacionária do crescimento celular e apresentasse uma tendência de aumento do conteúdo lipídico, de acordo com a curva de crescimento e as fluorescências dos lipídeos acumulados, respectivamente, demonstrados na coluna A e coluna B (Figura 41).

O acúmulo de lipídeos em microalgas pode ocorrer em condições de limitação de nitrogênio (LI et al., 2008) e de fósforo (GOLDBERG e COHEN, 2006). Entretanto, o tempo de cultivo sob limitação de nutrientes deve ser considerado para se obter uma produção lipídica eficiente, visto que elevado conteúdo lipídico e elevada produtividade lipídica são inversamente relacionados (XIN et al., 2010).

Na presente pesquisa, houve elevação da produtividade de biomassa das microalgas (LE17 e ITU07) nos cultivos na condição otimizada (meio sintético e efluente) em comparação aos cultivos na condição controle de acordo com as concentrações de biomassa finais maiores alcançadas em menor tempo. Em relação ao conteúdo lipídico das cepas nos cultivos na condição otimizada, houve uma tendência de diminuição na fase exponencial do crescimento celular, no entanto ao final dos cultivos (fase estacionária) os conteúdos lipídicos foram maiores do que os iniciais.

Figura 41 - Perfil de crescimento da cepa LE17 e os valores de pH (coluna A); fluorescências dos lipídeos acumulados (coluna B); remoção de nutrientes (N e P) e glicose (meio sintético) (coluna C) nos cultivos na condição otimizada em meio sintético e otimizada em efluente (50%), além dos valores obtidos na condição controle

Figura 42 - Perfil de crescimento da cepa ITU07 e os valores de pH (coluna A); fluorescências dos lipídeos acumulados (coluna B); remoção de nutrientes (N e P) e glicose (meio sintético) (coluna C) nos cultivos na condição otimizada em meio sintético e otimizada em efluente (50%), além dos valores obtidos na condição controle

A condição otimizada favoreceu o crescimento celular das cepas LE17 e ITU07 tanto no cultivo em efluente (50%) quanto no meio sintético em comparação ao crescimento na condição controle, conforme os valores de $\mu_{\text{máx}}$ e de produtividade da biomassa maiores e, os tempos de geração menores, mostrados na Tabela 37. Os valores de produtividade de biomassa das cepas LE17 ($0,024 \text{ g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$) e ITU07 ($0,034 \text{ g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$) cultivadas em efluente (50%) foram, respectivamente 3,4 e 3 vezes maiores do que os observados na condição controle (LE17 - $0,007 \text{ g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ e ITU07 - $0,011 \text{ g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$).

Artigos na literatura apresentaram valores de produtividade da biomassa próximos aos obtidos na presente pesquisa. O cultivo de *Scenedesmus obliquus* em esgoto sanitário (tratamento secundário) obteve produtividade de biomassa de $0,026 \text{ g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ (MARTÍNEZ et al., 2000). Samorì et al. (2013), ao cultivarem *Desmodesmus communis* em esgoto sanitário (tratamento secundário), observaram produtividade de biomassa de $0,029 \text{ g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$. No entanto, em esgoto sanitário (tratamento primário) enriquecido com 2% de CO_2 essa microalga alcançou produtividade de $0,227 \text{ g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$. A microalga *Scenedesmus accuminatus* atingiu produtividade de biomassa de $0,045 - 0,056 \text{ g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ quando cultivada em 10% de efluente suíno (digestão anaeróbia) com diferentes concentrações iniciais de inóculo (PARK et al., 2010).

Os valores das produtividades de biomassa das cepas LE17 ($0,338 \text{ g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$) e ITU07 ($0,249 \text{ g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$) na condição otimizada em meio sintético foram, respectivamente 48,3 e 22,6 vezes maiores do que os observados na condição controle. Ho et al. (2010) reportaram que *Scenedesmus obliquus* CNW-N obteve produtividade de biomassa de $0,292 \text{ g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ em cultivo fotoheterotrófico, com 10% de CO_2 em meio de cultura enriquecido e 24 horas de fotoperíodo. El-Sheekh et al. (2013) para otimização do crescimento mixotrófico de *S. obliquus*, utilizaram diferentes concentrações de melaço de cana-de-açúcar no meio de cultura. A microalga alcançou produtividades de $0,241 - 0,292 \text{ g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$. Essas produtividades de biomassa relatadas na literatura são comparáveis às obtidas nos cultivos das microalgas LE17 e ITU07 em meio sintético.

Diante dos resultados de crescimento das duas microalgas na condição otimizada, verifica-se que a cepa LE17 exibiu as melhores respostas à condição otimizada em meio sintético, já a cepa ITU07 mostrou as melhores respostas em efluente de reator UASB (50%).

Tabela 37 - Velocidades específicas máximas de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$), tempos de geração (Tg) e produtividades das biomassas das cepas LE17 e ITU07 nos cultivos: controle, condição otimizada em efluente (50%) e otimizada em meio sintético

Cultivo	$\mu_{\text{máx}}$ (dia ⁻¹)		Tg (dia)		Produtividade (g.L ⁻¹ .dia ⁻¹)	
	LE17	ITU07	LE17	ITU07	LE17	ITU07
Condição Controle	0,31	0,49	2,20	1,42	0,007	0,011
Condição Otimizada - Meio Sintético	2,31	2,17	0,30	0,32	0,338	0,249
Condição Otimizada – Efluente 50%	1,66	1,59	0,42	0,44	0,024	0,034

As porcentagens de remoção de nutrientes pelas microalgas LE17 e ITU07 nos cultivos na condição controle e na otimizada (meio sintético e no efluente) estão mostradas na Tabela 38. Nesses cultivos as microalgas removeram os nutrientes com eficiência variando de 50% a 100%. Observa-se que, nos cultivos controle e na condição otimizada em meio sintético, a remoção de P-fosfato foi mais eficaz do que a de N-nitrato tanto pela cepa LE17 quanto pela cepa ITU07. A remoção de P-fosfato variou entre 85,8% a 99,8%, enquanto de N-nitrato oscilou entre 71,6% a 93,7%. As concentrações de N-nitrato presentes ao final dos cultivos podem estar relacionadas à limitação do fósforo.

As cepas LE17 e ITU07 removeram a glicose, respectivamente em 84% e 78% das concentrações iniciais, o que demonstra a sua utilização pelas microalgas para o crescimento celular, além de favorecer o acúmulo lipídico desses micro-organismos na limitação de nutrientes (N-nitrato e P-fosfato) (Tabela 38).

Segundo Siaut et al. (2011), em condições de estresse, como deficiência nutricional, o carbono em microalgas é fixado como compostos ricos em energia, lipídeos e carboidratos. Nos cultivos na condição otimizada em efluente, o P-fosfato foi removido com eficiência acima de 99% e a remoção do N-nitrato foi de 83,3% e 50% pelas cepas LE17 e ITU07, respectivamente.

No geral, microalgas preferem amônio ao nitrato como fonte de nitrogênio e o consumo de nitrato só ocorrerá quando o amônio for esgotado do meio (MAESTRINI et al., 1986). O amônio não é removido apenas pelo metabolismo celular mas também pela sua volatilização com os aumentos do pH e temperatura. Em cultivos com valores de pH maiores do que 7,0, na Equação 6.5 o equilíbrio se desloca para produção de NH₃ que é geralmente retirado do meio por fluxo de ar borbulhado.

Martínez et al. (2000) mostraram que a remoção de amônio de efluente urbano (tratamento secundário) no cultivo de *Scenedesmus obliquus* foi determinado por dois fatores: o consumo de amônio pela microalga e eliminação por volatilização. De acordo com o exposto, a remoção total de N-amoniaco nos cultivos em efluente na condição otimizada (pH 8,2 e 34°C) pode ser devido à assimilação pelas microalgas quanto pela sua volatilização. A presença de N-nitrato no final do cultivo pode estar relacionada com a limitação de fósforo.

Li et al. (2011), ao cultivarem *Chlorella* sp. em esgoto sanitário concentrado durante 14 dias, verificaram que houve remoção de 94% de amônia, 89% de nitrogênio total e 81% de fósforo total. A remoção de nitrogênio e fósforo pela microalga *Scenedesmus* sp. LX1 em meio de cultura com diferentes fontes de nitrogênio foi estudada por Xin et al. (2010). Os autores observaram que após 13 dias de cultivo com nitrato, amônio e ureia, as eficiências de remoção do nitrogênio total foram 90,4%, 31,1% e 87,8%, respectivamente. As eficiências de remoção de nutrientes (N e P) das microalgas selecionadas na presente pesquisa são comparáveis aos resultados relatados na literatura.

Tabela 38 - Remoção de nutrientes (N e P) e glicose (meio sintético) das cepas LE 17 e ITU07 nos cultivos: controle, na condição otimizada em efluente (50%) e otimizada em meio sintético

Cultivo	N-nitrato		N-amoniaco		P-fosfato		Glicose	
	LE17	ITU07	LE17	ITU07	LE17	ITU07	LE17	ITU07
Controle								
Remoção (%)	71,6	93,7	-	-	85,8	99,8	-	-
Meio Sintético								
Remoção (%)	88,6	90,9	-	-	99,8	99,8	84,0	78,0
Efluente (50%)								
Remoção (%)	83,3	50,0	100	100	99,7	99,7	*	*

- ausente no cultivo; * não detectado pelo método;

Xin et al. (2010) reportaram que, ao cultivarem *Scenedesmus* sp. LX1 em meio com relação N:P de 12:1 e 20:1, observaram que a relação final de nutrientes foi de

aproximadamente 10:1 e 9:1, respectivamente, indicando uma maior retirada de nitrogênio. No entanto, o nitrogênio não foi totalmente removido do meio devido à limitação de fósforo. Para eficientes remoções de nitrogênio e fósforo, os autores verificaram que a relação N:P deveria ser controlada em uma faixa adequada de 5:1-8:1. Kapdan e Aslan (2008) relataram que a relação N:P tem efeito substancial na eficiência de remoção de nutrientes e notaram que a relação ótima para *Chlorella vulgaris* foi de 8:1. No estudo de Lee et al. (2013), o equilíbrio da relação N:P pela adição de fósforo elevou a remoção de nutrientes (N e P) e a produção de ácidos graxos em um cultivo misto de microalgas. Segundo os estudos na literatura, nos cultivos do presente trabalho, na condição otimizada em meio sintético e em efluente (50%) que apresentaram relação N:P, respectivamente de 20:1 e 61,2:1, a elevação da eficiência da remoção de nitrogênio pelas microalgas (LE17 e ITU07) poderia ser alcançada pela diminuição da relação N:P dos meios.

A composição da biomassa das microalgas LE17 e ITU07 foram determinadas ao final dos cultivos nas condições controle (15º dia), otimizada em meio sintético (6º dia) e otimizada em efluente (10º dia) (Tabela 39). Observa-se que em comparação com o cultivo controle, as biomassas das microalgas na condição otimizada (meio sintético e efluente) apresentaram decréscimo do conteúdo de proteína e aumento do conteúdo de carboidratos. O conteúdo lipídico da cepa LE17 aumentou na condição otimizada, em relação ao cultivo controle (8,5%), tanto no cultivo em efluente (10,7%) quanto no meio sintético (13,8%). O conteúdo lipídico da cepa ITU07 aumentou na condição otimizada em efluente (15,2%) e no meio sintético (10,1%) em comparação ao cultivo controle (9,1%).

Tabela 39 - Composição da biomassa das cepas LE17 e ITU07 cultivadas nas condições: controle, condição otimizada em efluente (50%) e otimizada em meio sintético

Composição da Biomassa (%)	Cepa LE17			Cepa ITU07		
	Controle	Efluente (50%)	Meio Sintético	Controle	Efluente (50%)	Meio Sintético
Lipídeos	8,5	10,7	13,8	9,1	15,2	10,1
Proteínas	43,6	21,4	11,0	42,6	20,6	16,0
Carboidratos	26,4	64,6	65,4	27,6	60,0	64,6
Cinzas	4,6	2,2	1,4	4,8	2,2	1,6
<i>Total</i>	<i>83,1</i>	<i>98,9</i>	<i>91,6</i>	<i>84,1</i>	<i>98,0</i>	<i>92,3</i>

Conforme os resultados de composição da biomassa das cepas LE17 e ITU07 nos cultivos na condição otimizada (Tabela 39), a limitação de nutrientes na fase estacionária inicial do crescimento favoreceu principalmente o acúmulo de carboidratos (60,0% - 65,4%) em detrimento do conteúdo de proteínas (11% - 21,4%). No estudo de Ho et al. (2011) *Scenedesmus obliquus* foi cultivada por nove dias sob condição de deficiência de nitrogênio. Durante o período de limitação desse nutriente, o conteúdo de proteínas diminuiu de 41,20% para 15,43%, enquanto os conteúdos de lipídeos e carboidratos aumentaram de 11,48% para 22,40% e 38,25% para 51,81%, respectivamente. O conteúdo de carboidratos atingiu o valor máximo (51,81%) após 3 dias de limitação de nitrogênio, enquanto o maior acúmulo lipídico (22,40%) ocorreu após 5 dias de limitação. Os autores sugeriram que o período de limitação de nitrogênio pode ser um importante indicador e parâmetro de operação para manipular o acúmulo desses dois componentes ricos em energia, lipídeos e carboidratos.

Siaut et al. (2011) ao investigarem o processo de acúmulo de lipídeos em *Chlamydomonas reinhardtii*, concluíram que em casos de estresse ambiental prolongado o amido seria o primeiro composto sintetizado como reserva de energia, e então o lipídeo seria produzido como um mecanismo de armazenamento de longo prazo. Segundo esses resultados da literatura, o acúmulo de lipídeos pelas cepas LE17 e ITU07 na condição otimizada (em efluente e meio sintético) pode ser favorecido pelo aumento do período de cultivo sob limitação de nutrientes (N e P). Outra estratégia para elevação do acúmulo lipídico é a realização do cultivo em duas fases, como proposto por Li et al. (2008). Na primeira fase um meio rico em nutrientes é utilizado para promover o crescimento celular das microalgas. Após a concentração de biomassa atingir um nível elevado, a cultura é transferida para um meio com limitação de nitrogênio (LI et al., 2008), limitação de fósforo (REITAN et al., 1994) ou elevada salinidade (RAO et al., 2007).

A microalga *Scenedesmus obliquus* elevou o conteúdo lipídico de 12,3% da biomassa seca para 24% quando cultivada em duas fases (meio rico em nutrientes e meio deficiente em nutrientes). Os resultados sugeriram que o acúmulo lipídico foi estimulado no ambiente de estresse nutricional (HO et al., 2010). Diante das elevadas porcentagens de carboidratos nas biomassas dos cultivos em condição otimizada (60,0% - 65,4%), há a perspectiva de cultivar as microalgas LE17 e ITU07 com vista à produção de bioetanol.

Os teores (%) de triacilgliceróis (TAG) dos lipídeos totais das cepas LE17 e ITU07 nos cultivos realizados estão demonstrados na Figura 43. Houve aumento dos TAG nos cultivos das duas cepas na condição otimizada (em efluente e em meio sintético), em relação à condição controle. A elevação do teor de TAG da cepa LE17 foi mais pronunciada

no cultivo em meio sintético (99,2%) do que no efluente (40,1%). Já o teor de TAG da cepa ITU07 foi mais acentuado no efluente (99,9%) do que no meio sintético (78,4%). Esses resultados sugerem que ao final dos cultivos otimizados as microalgas estavam sob estresse de nutrientes, visto que em condições desfavoráveis ao crescimento, muitas microalgas alteram suas vias de biossíntese lipídica para a formação de ácidos graxos que não desempenham função estrutural, mas servem como reserva de energia (principalmente na forma de TAG) (LIN e LIN, 2011).

Figura 43 - Teor (%) de triacilgliceróis (TAG) da fração lipídica das cepas LE17 e ITU07 no último dia dos cultivos: controle, na condição otimizada em efluente (50%) e otimizada em meio sintético

Os perfis de ácidos graxos das biomassas das cepas LE17 e ITU07 ao final dos cultivos foram determinados, pela detecção de 16 ácidos graxos por cromatografia gasosa (Tabela 40). Os ácidos graxos mais abundantes nas biomassas das microalgas foram: o ácido palmítico (C16:0), ácido oleico (C18:1), ácido linolênico (C18:3n3) e o ácido linoleico (C18:2n6). O ácido graxo saturado mais abundante foi o ácido palmítico (C16:0), enquanto o ácido oleico (C18:1) mostrou ser o monoinsaturado mais abundante. Os principais ácidos graxos poli-insaturados identificados foram linolênico (C18:3n3) e ácido linoleico (C18:2n6). Nos cultivos em efluente os ácidos graxos saturados (LE17 - 31,2% e ITU07 - 31,4%) e poli-insaturados (LE17 - 35,5% e ITU07 - 40,4%) foram os mais representativos, enquanto nos cultivos em meio sintético os saturados (LE17 - 45,6% e ITU07 - 42,3%) foram os mais abundantes, seguidos pelos monoinsaturados (LE17 - 36,7% e ITU07 - 33,5 %) e poli-insaturados (LE17 - 14,6% e ITU07 - 19,7%).

As porcentagens dos ácidos graxos saturados nos cultivos, da presente pesquisa, em efluente de reator UASB ultrapassaram o teor determinado por Martínez et al. (2000)

para a microalga *Scenedesmus obliquus* (27,1%), quando o meio de cultura utilizado foi esgoto sanitário (tratamento secundário).

Ácidos graxos insaturados são suscetíveis à oxidação durante o armazenamento, o que não é vantajoso para comercialização de biodiesel. As porcentagens de ácidos graxos saturados e mono insaturados observados nos cultivos das cepas LE17 e ITU07 em efluente (>55%) e em meio sintético (>75%) demonstram elevada estabilidade oxidativa dos lipídeos acumulados por essas microalgas.

Botryococcus braunii cultivada em efluente (100%) apresentou perfil lipídico adequado para produção de biodiesel, o qual era composto principalmente pelos ácidos graxos C18:1 (~45%) e C16:0 (~20%) (SYDNEY et al, 2011). Os ácidos graxos sintetizados com frequência pelas microalgas têm cadeia que variam de C16 a C18 e dentre estes, os principais encontrados nas clorofíceas são os C16:0 e C18:1 (HU et al., 2008), os quais foram os mais abundantes nos cultivos realizados na presente pesquisa e que apresentam boas propriedades para produção de biodiesel. Além dessa aplicação, podem ser utilizados na elaboração de cosméticos (C16:0) e, como estabilizantes e emulsificantes (C18:1) em remédios e aerossóis (DEVI et al., 2011).

Tabela 40 - Composição em ácidos graxos da fração lipídica da biomassa das cepas LE 17 e ITU 07 no último dia dos cultivos: controle, condição otimizada em efluente (50%) e condição otimizada em meio sintético

Ácido Graxo	Conteúdo (%) Cepa LE 17			Conteúdo (%) Cepa ITU 07		
	Controle	Efluente (50%)	Meio Sintético	Controle	Efluente (50%)	Meio Sintético
C6:0	6,2	1,5	0,2	2,6	0,1	0,9
C8:0	5,3	1,6	0,3	2,4	0,1	0,8
C12:0	0,6	0,3	0,1	0,5	0,1	0,2
C14:0	0,4	0,4	0,5	0,4	0,4	0,4
C16:0	21,5	23,2	37,3	16,6	26,4	31,3
C16:1	3,0	4,3	2,7	3,0	2,0	3,3
C16:2n4	1,4	1,5	0,2	5,2	0,6	0,7
C16:3n3	0,8	1,2	1,7	0,7	2,0	1,1
C16:4	3,3	8,3	1,9	12,4	8,0	3,9
C18:0	7,3	3,6	5,4	5,6	3,9	8,0
C18:1	13,8	20,7	32,3	11,0	21,8	28,5
C18:2n6	3,1	10,9	7,1	8,5	13,8	8,0
C18:3n3	5,8	13,1	3,4	19,4	15,7	5,5
C18:4n3	0,4	0,5	0,3	0,4	0,3	0,5
C19:1n8	4,8	3,6	1,7	4,5	1,9	1,7
C20:0	0,7	0,6	1,8	0,7	0,4	0,7
<i>não identificado^a</i>	21,6	4,7	3,1	6,1	2,5	4,5
<i>Saturados</i>	42,0	31,2	45,6	28,8	31,4	42,3
<i>Monoinsaturados</i>	21,6	28,6	36,7	18,5	25,7	33,5
<i>Poli-insaturados</i>	14,8	35,5	14,6	46,6	40,4	19,7

^aÁcidos graxos não identificados

7. CONCLUSÕES

- Foram isoladas 22 cepas e destas, 2 foram selecionadas para o estudo da otimização de produção de biomassa. Estas duas microalgas apresentam características morfológicas (espinhos nas células) que as inserem no gênero *Desmodesmus*;
- O planejamento experimental aplicado (Delineamento Composto Central Rotacional) permitiu a definição das condições ótimas de cultivo; Para a microalga LE17, as condições ótimas de crescimento foram temperatura de 34,5°C, intensidade luminosa de 200 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e pH 8,2. Para a cepa ITU07, as melhores condições para o crescimento foram temperatura de 34°C, intensidade luminosa de 180 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e pH 8,2;
- As cepas LE17 e ITU07 adaptaram-se ao efluente de reator UASB, sendo que a concentração de 50% foi considerada a mais apropriada para o crescimento celular das microalgas, de acordo com as maiores concentrações celulares finais obtidas nessa condição;
- Os cultivos em batelada simples (8 litros) na condição otimizada em meio sintético favoreceram o crescimento das duas microalgas. Os valores de produtividade de biomassa das cepas LE17 (0,338 $\text{g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$) e ITU07 (0,249 $\text{g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$) foram, respectivamente, 48,3 e 22,6 vezes maiores do que os observados na condição controle (não otimizada);
- Os cultivos em batelada simples (8 litros) na condição otimizada em efluente (50%) apresentaram produtividade de biomassa das cepas LE17 (0,024 $\text{g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$) e ITU07 (0,034 $\text{g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$), respectivamente, 3,4 e 3 vezes maiores do que os obtidos na condição controle, o que demonstra a viabilidade do efluente de reator UASB como meio ao cultivo de microalgas;
- As microalgas LE17 e ITU07 foram eficientes na remoção de nitrogênio e fósforo tanto do efluente quanto do meio sintético. Entretanto, no geral as porcentagens de remoção de fósforo (>85,8%) foram superiores as de nitrogênio (>50%), o que sugere limitação de fósforo nos cultivos;
- Em relação à composição da biomassa das microalgas LE17 e ITU07, os cultivos na condição otimizada (em meio sintético e no efluente) favoreceram o acúmulo de

carboidratos (60% a 65,4% da biomassa seca). Assim, há perspectiva de utilizar as cepas LE17 e ITU07 para produção de bioetanol;

- Os cultivos em meio sintético e no efluente de reator UASB foram otimizados sem decréscimo do conteúdo lipídico das microalgas. Houve elevação das produtividades de biomassa das duas cepas e por consequência, aumento da produção de lipídeos;
- Os perfis de ácidos graxos dos lipídeos acumulados pelas cepas LE17 e ITU07 nos cultivos em meio sintético e no efluente são apropriados para a produção de biodiesel, visto que são constituídos principalmente por ácidos graxos de cadeia C16 e C18.

8. RECOMENDAÇÕES

As recomendações a seguir poderão auxiliar no alcance de maiores produtividades de biomassa e de lipídeos, das cepas LE17 e ITU07, do que as obtidas na presente pesquisa, além de agregar a biomitigação de CO₂.

- Realizar o cultivo das microalgas em duas etapas. A primeira fase em meio rico de nutrientes e na segunda fase, em meio com limitação de nutrientes. Estudar o efeito do tempo de limitação de nutrientes na produtividade lipídica das microalgas;
- Estudar o efeito do CO₂ no crescimento das microalgas e nos seus acúmulos lipídicos;
- Avaliar a influência de diferentes condições físicas e químicas na composição em ácidos graxos dos lipídeos acumulados pelas microalgas.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOMOHR, A.; WAGNER, M.; EL-SHEEKH, M.; HANELT, D. (2013) Lipid and total fatty acid productivity in photoautotrophic fresh water microalgae: screening studies towards biodiesel production. **Journal of Applied Phycology**, v. 25, n. 4, p. 931-936.
- ABOU-SHANAB, R. A. I.; HWANG, J. -H.; CHO, Y.; MIN, B.; JEON, B. -H. (2011). Characterization of microalgal species isolated from fresh water bodies as a potential source for biodiesel production. **Applied Energy**, v. 88, n. 10, p. 3300-3306.
- ANDERSEN, R. A.; KAWACHI, M. (2005). **Algal Culture Techniques**. Elsevier Academic Press: San Diego, 2005. 578p.
- APHA – American Public Health Association. (2005). **Standard Methods for the examination of water and wastewater**. Baltimore: Port City, 1268p.
- ARAD, S.; LEVY-ONTMAN, O. (2010). Red microalgal cell-wall polysaccharides: biotechnological aspects. **Current Opinion Biotechnology**, v. 21, n.3, 358–364.
- ARBIB, Z.; RUIZ, J.; DÍAZ, P. A.; PÉREZ, C. G.; BARRAGAN, J.; PERALES, J. A. (2013). Photobiotreatment: influence of nitrogen and phosphorus ratio in wastewater on growth kinetics of *Scenedesmus obliquus*. **International Journal of Phytoremediation**, v. 15, n. 8. p. 774-788.
- ASLAN, S.; KAPDAN, I.K. (2006). Batch kinetics of nitrogen and phosphorus removal from synthetic wastewater by algae. **Ecological Engineering**, v. 28, p. 64-70.
- AZMA, M.; MOHAMED, M. S.; MOHAMAD, R.; RAHIM, R. A.; ARIFF, A. B. (2011). Improvement of medium composition for heterotrophic cultivation of green microalgae, *Tetraselmis suecica*, using response surface methodology. **Biochemical Engineering Journal**, v. 53, p. 187-195.
- BARSANTI, L; GUALTIERI, P. (2006). **Algae: anatomy, biochemistry, and biotechnology**. CRC Press, Taylor & Francis Group: Boca Raton, 320p.
- BAS, D.; BOYACI, I.H. (2007). Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. **Journal of Food Engineering**, v.78, p.836-845.
- BECKER, E.W. (2007). Micro-algae as a source of protein. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 2, p. 207-210.
- BELTRÃO, M. I. (1992). **Cultivo de algas clorofíceas (*Ankistrodesmus densus*, *Chlorella vulgaris* e *Scenedesmus bijugatus*) em resíduos líquidos de indústria de suco de laranja concentrado**. 120f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Hidráulica e Saneamento). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.

BERTOLIN, T. B. P.; COSTA, J. A. V.; BERTOLIN, T. E.; COLLA, L. M.; HEMKEMEIER, M. (2005). Cultivo da cianobactéria *Spirulina platensis* a partir de efluente sintético de suíno. **Ciência Agrotécnica**, v. 29, p. 118-125.

BHATNAGAR, A.; CHINNASAMY, S.; SINGH, M.; DAS, K. C. (2011). Renewable biomass production by mixotrophic algae in the presence of various carbon sources and wastewaters. **Applied Energy**, v. 88, p. 3425-3431.

BICUDO, C. E. M.; MENEZES, M. (2005). **Gêneros de algas de águas continentais do Brasil - chave para identificação e descrições**. RiMa: São Carlos, 489p.

BIGOGNO, C.; KHOZIN-GOLDBERG, I.; BOUSSIBA, S.; VONSHAK, A.; COHEN, Z. (2002). Lipid and fatty acid composition of the green oleaginous alga *Parietochloris incisa*, the richest plant source of arachidonic acid. **Phytochemistry**, v. 60, p. 497-503.

BOROWITZKA, M.A.; BOROWITZKA, L. (1998). (Ed.) **Scenedesmus. Microalgal Biotechnology**. Cambridge: University Press, Cambridge, p. 57-84.

BOYLE, N. R.; MORGAN, J. A. (2009). Flux balance analysis of primary metabolism in *Chlamydomonas reinhardtii*. **BMC Systems Biology**, 3:4.

BREUER, G.; LAMERS, P. P.; MARTENS, D. E.; DRAAISMA, R. B.; WIJFFELS, R. (2012). The impact of nitrogen starvation on the dynamics of triacylglycerol accumulation in nine microalgae strains. **Bioresource Technology**, v. 124, p. 217-226.

CASALI, S. P. (2008). **Variabilidade temporal da comunidade fitoplanctônica em lagoas facultativas de dois sistemas de tratamento de esgoto com diferentes configurações (Baixo Ribeira de Iguape, SP)**. 106f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Hidráulica e Saneamento). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.

CHEIRSILP, B.; TORPEE, S. (2012). Enhanced growth and lipid production of microalgae under mixotrophic culture condition: Effect of light intensity, glucose concentration and fed-batch cultivation. **Bioresource Technology**, v. 110, p. 510-516.

CHEN, C. -Y.; ZHAO, X. -Q; YEN, H. -W; HO, S. -H.; CHENG, C. -L. (2013). Microalgae-based carbohydrates for biofuel production. **Biochemical Engineering Journal**. In Press. doi.org/10.1016/j.bej.2013.03.006

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

CHEN, W.; SOMMERFELD, M.; HU, Q. (2011b). Microwave-assisted Nile red method for *in vivo* quantification of neutral lipids in microalgae. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 135-141.

CHENG, Y.; LU, Y.; GAO, C.; WU, Q. (2009). Alga-based biodiesel production and optimization using sugar cane as the feedstock. **Energy & Fuels**, v. 23, p. 4166-4173.

CHERNICHARO, C. A. L.; VAN HAANDEL, A. C.; FORESTI, E.; CYBIS, L. F. (2001). Introdução. In: CHERNICHARO, C. A. L. (Coordenador) **Pós-tratamento de efluentes de reatores anaeróbios**. ABES. Rio de Janeiro.

CHIA, M. A.; LOMBARDI, A. T.; MELÃO, M. G. M.; PARRISH, C. C. (2013). Effects of cadmium and nitrogen on lipid composition of *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). **European Journal of Phycology**, v. 48, n. 1, p. 1-11.

CHIARAMONTI, D.; OASMAA, A.; SOLANTAUSTA, Y. (2007). Power generation using fast pyrolysis liquids from biomass. **Renew Sustain Energy Reviews**, v. 11, p.1056-1086.

CHISTI, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, 25, p. 294-306.

CHOCHOIS, V.; DAUVILLEE, D.; BEYLY, A.; TOLLETER, D.; CUINE, S.; TIMPANO, H.; BALL, S.; CURNAC, L.; PELTIER, G. (2009). Hydrogen production in *Chlamydomonas*: photosystem II dependent and independent pathways differ in their requirement for starch metabolism. **Plant Physiology**, v.151, p. 631–640.

CHOJNACKA, K.; NOWORYTA, A.; (2004). Evaluation of *Spirulina* sp. growth in photoautotrophic, heterotrophic and mixotrophic cultures. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 34, p. 461-465.

CHRISMADHA, T.; BOROWITZKA, M.A. (1994). Effect of cell-density and irradiance on growth, proximate composition and eicosapentaenoic acid production of *Phaeodactylum-tricornutum* grown in a tubular photobioreactor. **Journal of Applied Phycology**, v. 6, n. 1, p. 67-74.

CHRISTAKI, E.; FLOROU-PANERI, P.; BONOS, E. (2011). Microalgae: a novel ingredient in nutrition. **International Journal of Food Science and Nutrition**, v. 62, n. 8, p. 794-799.

CHRISTIE, W.W. (1988). ECN-equivalent chain lengths. **Journal of Chromatography**, v. 447, p. 305-314.

CHRISTIE, W.W. (1989). Gas Chromatography and Lipids, Pergamon Press.

CLARENS, A. F.; RESURRECCION, E. P.; WHITE, M. A.; COLOSI, L. M. (2010). Environmental life cycle comparison of algae to other bioenergy feedstocks. **Environmental Science and Technology**, v. 44, p. 1813-1819.

DAS, P.; AZIZ, S. S.; OBBARD, J. P. (2011). Two phase microalgae growth in the open system for enhanced lipid productivity. **Renewable Energy**, n. 36, p. 2525-2528.

DE-BASHAN LE, BASHAN Y. (2010). Immobilized microalgae for removing pollutants: review of practical aspects. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 1611–1627.

DE LA NOÛE, J.; LALIBERTÉ, G.; PROULX, D. (1992). Algae and waste water. **Journal of Applied Phycology**, v. 4, p. 247-254.

- DEMIRBAS, M. F. (2011). Biofuels from algae for sustainable development. **Applied Energy**, v. 88, n. 10, p. 3473-3480.
- DEVI, M. P.; SUBHASH, G. V.; MOHAN, S. V. (2011). Heterotrophic cultivation of mixed microalgae for lipid accumulation and wastewater treatment during sequential growth and starvation phases: effect of nutrient supplementation. **Renewable Energy**, v. 43, p. 276-283.
- DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 350-356.
- DURRET, T. P; BENNING, C.; OHLROGGE, J. (2008). Plant triacylglycerols as feedstocks for the productions of biofuels. **The Plant Journal**, v. 54, p. 593-607.
- EL-SHEEKH, M.; ABOMOHR, A. E. -F.; HANELT, D. (2013). Optimization of biomass and fatty acid productivity of *Scenedesmus obliquus* as a promising microalga for biodiesel production. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, p. 915-922.
- FIORESI, T. B. (2007). **Uso de meio a base de esterco suíno no cultivo de Ankistrodesmus gracilis (CHLOROPHYTA) em laboratório**. 2007. 55f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Campus de Jaboticabal, Jaboticabal.
- FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G. H. S. (1956). A simple method for isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, v. 226, p. 497-509.
- GARCIA, J.; GREEN, B.; OSWALD, W. (2006). Long term diurnal variations in contaminant removal in high rate ponds treating urban wastewater. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 1709-1715.
- GARCÍA, M. C.C.; MIRÓN, A. S.; SEVILLA, J. M. F.; GRIMA, E. M.; CAMACHO, F. G. (2005). Mixotrophic growth of the microalga *Phaeodactylum tricornutum* influence of different nitrogen and organic carbon sources on productivity and biomass composition. **Process Biochemistry**, v.40, p. 297-305.
- GARDNER, R.; PETERS, P.; PEYTON, B.; COOKSEY, K. E. (2011). Medium pH and nitrate concentration effects on accumulation of triacylglycerol in two members of the chlorophyta. **Journal of Applied Phycology**, v. 23, p. 1005-1016.
- GIM, G. H.; KIM, J. K.; KIM, H. S.; KATHIRAVAN, M. N.; YANG, H.; JEONG, S. -H.; KIM, S. W. (2013). Comparison of biomass production and total lipid content of freshwater green microalgae cultivated under various culture conditions. **Bioprocess and Biosystems Engineering**. In press. DOI 10.1007/s00449-013-0920-8
- GOLDBERG, I.K., COHEN, Z. (2006). The effect of phosphate starvation on the lipid and fatty acid composition of the fresh water euglenophyte *Monodus subterraneus*. **Phytochemistry**, v. 67, p. 696-701.

GOLDMAN, J. C.; DENNETT, M. R.; RILEY, C. B. (1982). Effect of nitrogen-mediated changes in alkalinity on pH control and CO₂ supply in intensive microalgal cultures. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 24, p. 619-631.

GORDILLO, F.; GOUTX, M.; FIGUEROA, F.; NIELL, F. (1998). **Journal of Applied Phycology**, v. 10, p. 135-144.

GRANADO, D. C. (2004). **Variações nictemerais e sazonais na estrutura da comunidade fitoplanctônica num sistema de lagoas de estabilização (Novo Horizonte, SP)**. 130p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Hidráulica e Saneamento). Escola de Engenharia de São Carlos, São Carlos.

GRIFFITHS, M.; HARRISON, S. (2009). **Journal of Applied Phycology**, v. 21, p. 493–507.

GUILLARD, R. R. L.; LORENZEN, C. J. (1972). Yellow-green algae with chlorophyllide c. **Journal of Phycology**, v. 8, p. 10-14.

HARRISON, P. J. Phytoplankton strains. In: LOBBAN, C. S.; CHAPMAN, D. J.; KREMER, B. P. (1988). **Experimental Phycology: a laboratory manual**. Cambridge University Press: Cambridge, p. 23-26.

HARWATI, T. U.; WILKE, T.; VORLOP, K. D. (2012). Characterization of the lipid accumulation in a tropical freshwater microalgae *Chlorococcum* sp.. **Bioresource Technology**, v. 121, p. 54-60.

HEGEWALD, E. (2000). New combinations in the genus *Desmodesmus* (Chlorophyceae, Scenedesmaceae). **Algol. Stud.**, Stuttgart, v. 96, p. 1-18.

HIRATA, S. et al. Carbon dioxide fixation in batch culture of *Chlorella* sp. using a photobioreactor with a sun light-collection device. (1996). **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 81, p. 470-472.

HODAIFA, G.; MARTÍNEZ, M. U.; SÁNCHEZ, S. (2009). Daily doses of light in relation to the growth of *Scenedesmus obliquus* in diluted three-phase olive mill wastewater. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 84, p. 1550-1558.

HOFFMANN, JP. (1998). Wastewater treatment with suspended and nonsuspended algae. **Journal of Phycology**, v. 34, p.757-763.

HO, S., CHEN, W.; CHANG, J. (2010). *Scenedesmus obliquus* CNW-N as a potential candidate for CO₂ mitigation and biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 8725-8730.

HO, S. -H.; LU, W. -B.; CHANG, J. -S. (2012). Photobioreactor strategies for improving the CO₂ fixation efficiency of indigenous *Scenedesmus obliquus* CNW-N: statistical optimization of CO₂ feeding, illumination, and operation mode. **Bioresource Technology**, v. 105, p. 106-113.

- HOSHAW, R. W.; ROSOWISKI, J. R. (1973). Isolation and purification – Methods for microscopic algae. In: STEIN, J. R. (Ed.). **Handbook of phycological methods: culture methods and growth measurements**. Cambridge: Cambridge University, p. 53-67.
- HU, B.; MIN, M.; ZHOU, W.; DU, Z.; MOHR, M.; CHEN, P.; ZHU, J.; CHENG, Y.; LIU, Y.; RUAN, R. (2012). Enhanced mixotrophic growth of microalga *Chlorella* sp. on pretreated swine manure for simultaneous biofuel feedstock production and nutrient removal. **Bioresource Technology**, v. 126, p. 71-79.
- HU, Q.; SOMMERFELD, M.; JARVIS, E.; GHIRARDI, M.; POSEWITZ, M.; SEIBERT, M.; DARZINS, A. (2008). Microalgal triacylglycerol as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. **The Plant Journal**, v. 54, p. 621-639.
- IBAÑEZ, E; CIFUENTES, A. (2013). Benefits of using algae as natural sources of functional ingredients. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, p. 70-709.
- JOHN, R.P.; ANISHA, G.S.; NAMPOOTHIRI, K.M.; PANDEY, A. (2011). Micro and macroalgal biomass: a renewable source for bioethanol. **Bioresource Technology**, v. 102, 186–193.
- KAPDAN, I. K. A.; ASLAN, S. (2008). Application of the Stover– Kincannon kinetic model to nitrogen removal by *Chlorella vulgaris* in a continuously operated immobilized photobioreactor system. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 83, p. 998-1005.
- KIM, S. K.; KANG, K. H. (2011). Medicinal effects of peptides from marine microalgae. **Advances in Food Nutrition Research**, v. 64, p. 313-323.
- KIM, W.; PARK, J. M.; GIM, G. H.; JEON, S. -H.; KANG, C. M.; KIM, D. -J.; KIM, S. W. (2012). Optimization of culture conditions and comparison of biomass productivity of three green algae. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 35, p. 19-27.
- KOMÁREK, J.; FOTT, B.(1983). Chlorophyceae (Grünalgen). Ordiniung: Chlorococcales. In: **HUBER-PESTALOZZI, G. Das phytoplankton des süßwassers; systematic und biologie**, v. 7 (1), E. Schweizerbat'sche Verlagsbuch-handlung: Stuttgart, 1044p.
- KONG, Q. X.; LI, L.; CHEN, P.; RUAN, R. (2010). Cultura of microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* in wastewater for biomass feedstock production. **Applied of Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, p. 9-18.
- LARSDOTTER, K. (2006). Wastewater treatment with microalgae – a literature review. **Vatten**, v. 62, p. 31-38.
- LEE, R. E. (2008). **Phycology**. Cambridge University Press: New York, 547p.
- LEE, S. -H; AHN, C. -Y.; JO, B. -H.; LEE, S. -A.; PARK, J. -Y.; AN, K. -G.; OH, H. -M. (2013). Increased microalgae growth and nutrient removal using balanced N:P ratio in wastewater. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, n. 1, p. 92-98.

- LIANG, Y. N.; SARKANY, N.; CUI, Y. (2009). Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. **Biotechnology Letters**, v. 31, p. 1043-1049.
- LIANG, Y.; ZHAO, X.; CHI, Z.; ROVER, M.; JOHNSTON, P.; BROWN, R.; JARBOE, L.; WEN, Z. (2013). Utilization of acetic acid-rich pyrolytic bio-oil by microalga *Chlamydomonas reinhardtii*: Reducing bio-oil toxicity and enhancing algal toxicity tolerance. **Bioresource Technology**, v. 133, p. 500-506.
- LIN, Q.; LIN, J. (2011). Biomass and oil productivity of a *Scenedesmus rubescens*-like microalga, a promising candidate for biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 1615-1621.
- LIU, J.; HUANG, J.; FAN, K. W.; JIANG, Y.; ZHONG, Y.; SUN, Z.; CHEN, FENG. (2010). Production potential of *Chlorella zofingienesis* as a feedstock for biodiesel. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 8658-8663.
- LIU, J.; YUAN, C.; HU, G.; LI, F. (2012). Effects of light intensity on the growth and lipid accumulation of microalga *Scenedesmus* sp. 11-1 under nitrogen limitation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 166, n. 8, p. 2127-2137.
- LI, Y. Q.; ZHANG, X. W.; CHEN, G.; WEI, D.; CHEN, F. (2008). Algal lectins for potential prevention of HIV transmission. **Current Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 11, p. 1096-1104.
- LI, Z.; YUAN, H.; YANG, J.; LI, B. (2011). Optimization of the biomass production of oil algae *Chlorella minutissima* UTEX2341. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 9128-9134.
- LODI, A.; BINAGHI, L.; DE FAVERI, D.; CARVALHO, J. C. M.; CONVERTI, A. (2005). Fed-batch mixotrophic cultivation of *Arthrospira (Spirulina) platensis* (Cyanophyceae) with carbon source pulse feeding. **Ann. Microbiology**, v. 55, n. 3, p. 181-185.
- LOMBARDI, A. T.; HIDALGO, T. M. R.; VIEIRA, A. A. H. (2005). Copper complexing properties of dissolved organic materials exuded by the freshwater microalgae *Scenedesmus acuminatus* (Chlorophyceae). **Chemosphere**, v. 60, p. 453-459.
- MAESTRINI, S. Y.; ROBERT, J. M.; LEFTLEY, J. W.; COLLOS, Y. (1986). Ammonium thresholds for simultaneous uptake of ammonium and nitrate by oyster-pond algae. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 102, p. 75-98.
- MANDAL, S. MALLICK, N. (2009). Microalga *Scenedesmus obliquus* as a potential source for biodiesel production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 84, p. 281-291.
- MALLICK N. (2002). Biotechnological potential of immobilized algae for wastewater N, P and metal removal: a review. **Biometals**, v. 15, p. 377-390.
- MALLICK, N.; RAI, L.C. (1994). Removal of inorganic ions from wastewaters by immobilized microalgae. **Microbiology and Biotechnology**, v. 10, p. 439-443.

- MANSOUR, M. P.; VOLKMAN, J. K.; BLACKBURN, S.I. (2003). The effect of growth phase on the lipid class, fatty acid and sterol composition in the marine dinoflagellate, *Gymnodinium* sp. in batch culture. **Phytochemistry**, v. 63, p. 145-153.
- MARTÍNEZ, L.; REDONDAS, V.; GARCÍA, A. I. MORÁN, A. (2010). Optimization of growth operational conditions for CO₂ biofixation by native *Synechocystis* sp. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 86, p. 681-690.
- MARTÍNEZ, M. E.; SÁNCHEZ, S.; JIMÉNEZ, J. M.; EL YOUSFI, F.; MUÑOZ, L. (2000). Nitrogen and phosphorus removal from urban wastewater by the microalga *Scenedesmus obliquus*. **Bioresource Technology**, n. 73, p. 263-272.
- MATA, T. M.; ALMEIDA, R.; CAETANO, N. S. (2013). Effect of the culture nutrients on the biomass and lipid productivities of microalgae *Dunaliella tertiolecta*. **Chemical Engineering Transactions**, v. 32, p. 973-978.
- MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, p. 217-232.
- MENDONÇA, S. R. (2000). **Sistemas de Lagunas de Stabilización: como utilizar águas residuales tratadas em sistemas de regadío**. Santa Fé de Bogotá: McGraw – Hill Interamericana, 370p.
- MENG, X.; YANG, J.; XU, X.; ZHANG, L.; NIE, Q.; XIAN, M. (2009). Biodiesel production from oleaginous microorganisms. **Renewable Energy**, v. 34, p. 1-5.
- MONTEIRO, C. M.; CASTRO, P. M. L.; MALCATA, X. M. (2010). Cadmium removal by two strains of *Desmodesmus pleiomorphus* cells. **Water Air Soil Pollut**, v. 208, p. 17-27.
- MORALES-SÁNCHEZ, D.; TINOCO-VALENCIA, R., KYNDT, J.; MARTÍNEZ, A. (2013). Heterotrophic growth of *Neochloris oleoabundans* using glucose as a carbon source. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 100, p. 1-12.
- MUNOZ, R.; GUIEYSSE, B. (2006). Algal-bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: a review. **Water Research**, v. 40, p. 2799-2815.
- NEILSON, A. H.; LEWIN, R. A. (1974). The uptake and utilization of organic carbon by algae: an essay In comparative biochemistry. **Phycologia**, v. 13, n. 3, 227-264.
- OLIVEIRA, H. T. (1988). **Utilização de vinhaça como meio de cultura para *Chlorella vulgaris* (CCAP/211/11b)**. Dissertação (Mestrado). Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Federal de São Carlos, 146p.
- ÓRPEZ, R.; MARTÍNEZ, M. E.; HODAIFA, G.; EL YOUSFI, F.; JBARI, N.; SÁNCHEZ, S. (2009). Growth of the microalga *Botryococcus braunii* in secondarily treated sewage. **Desalination**, v.246, p. 625-630.

- PAN, Y. -Y.; WANG, S. -T.; CHUANG, L. -T.; CHANG, Y. -W.; CHEN, C. -N. N. (2011). Isolation of thermo-tolerant and high lipid content green microalgae: Oil accumulation is predominantly controlled by photosystem efficiency during stress treatments in *Desmodesmus*. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 10510-10517.
- PARK, J.; JIN, H. -F.; LIM, B. -R.; PARK, K. -Y.; LEE, K. (2010). Ammonia removal from anaerobic digestion effluent of livestock waste using green alga *Scenedesmus* sp. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 8649-8657.
- PARRA, O. O.; GONZALEZ, M.; DELLAROSSA, V. (1983) **Manual taxonomico del fitoplancton de aguas continentales (con especial referencia al fitoplancton de Chile). Classe Chlorophyceae**. Concepcion: Universidad de Concepcion, 151p.
- PEARSON, H. W. (1996) The microbiology of waste stabilization ponds and wastewater storage and treatment reservoirs and its impact on design. In: **Seminário Internacional de Tratamento e Disposição de Esgotos Sanitários: tecnologias e perspectivas para o futuro**. Brasília: Companhia de Águas e Esgotos de Brasília, 203p.
- PENTEADO, E. D.; M. A. T.; ADORNO, ZAIAT, M. (2012). Simple and accurate method for determination of fatty acids, alcohols and carbohydrates by HPLC with UV/DAD and RID detectors. **38th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques**. Los Angeles, USA.
- PEREZ-GARCIA , O.; ESCALANTE, F. M. E.; DE-BASAHAN, L. E.; BASHAN, Y. (2011). Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. **Water Research**, v. 45, n. 1, p. 11-36.
- PÉREZ, M.V.J.; CASTILLO, P.S.; ROMERA, O.; MORENO, D.F.; MARTÍNEZ, C.P. (2004). Growth and nutrient removal in free and immobilized planktonic green algae isolated from pig manure. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 34, p. 392-398.
- PETKOV, G.; GARCIA, G. (2007). Which are fatty acids of the green alga *Chlorella*? **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 35, p. 281–285.
- PITTMAN, J. K.; DEAN, A. P.; OSUNDEKO, O. (2011). The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 17-25.
- PULZ, O.; GROSS, W. (2004). Valuable products from biotechnology of microalgae. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 65, n. 6, p. 635-648.
- RAO, A. R.; DAYANANDA, C.; SARADA, R.; SHAMALA, T. R.; RAVISHANKAR, G. A. (2007). Effect of salinity on growth of green alga *Botryococcus braunii* and its constituents. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 560-564.
- RATLEDGE, C. (2002). Regulation of lipid accumulation in oleaginous micro-organisms. **Biochemical Society Transactions**, v. 30, n. 6, p. 1047-1050.
- RAWAT, I.; KUMAR, R.; BUX, T. M. F. (2010). Dual role of microalgae: Phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production. **Applied Energy**, v. 88, p. 3411-3424.

REITAN, K. I.; RAINUZZO, J. R.; OLSEN, Y. (1994). Effect of nutrient limitation on fatty acid and lipid content of marine microalgae. **Journal of Phycology**, v. 30, p. 972-979.

RENAUD, S. M.; THINH, L. V.; LAMBRINIDIS, G.; PARRY, D. L. (2002). Effect of temperature on growth, chemical composition and fatty acid composition of tropical Australian microalgae grown in batch cultures. **Aquaculture**, v. 211, p. 195-214.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. (2005). **Planejamento de experimentos e otimização de processos: uma estratégia sequencial de planejamento**. Casa do Pão Editora: Campinas, 325p.

ROLEDA, M. Y.; SLOCOMBE, S. P.; LEAKEY, R. J. G.; DAY, J. G.; BELL, E. M.; STANLEY, M. S. (2013). Effects of temperature and nutrient regimes on biomass and lipid production by six oleaginous microalgae in batch culture employing a two-phase cultivation strategy. **Bioresource Technology**, v. 129, p. 439-449.

ROSENBERG, J. N.; OYLER, G. A.; WILKINSON, L.; BETENBAUGH, M. J. (2008). A green light for engineered algae: redirecting metabolism to fuel a biotechnology revolution. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 19, p. 430-436.

RUIZ-MARIN, A.; MENDOZA-ESPINOSA, L.G.; STEPHENSON, T. (2010). Growth and nutrient removal in free and immobilized green algae in batch and semi-continuous cultures treating real wastewater. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 58-64.

SAMORÌ, G.; SAMORÌ, C.; GUERRINI, F.; PISTOCCHI, R. (2013). Growth and nitrogen removal capacity of *Desmodesmus communis* and of a natural microalgae consortium in a batch culture system in view of urban wastewater treatment: Part I. *Water Research*, v. 47, p. 791-801.

SANTOS, A. M.; JANSSEN, M.; LAMERS, P. P.; EVERS, W. A. C.; WIJFFELS, R. (2012). Growth of oil accumulating microalga *Nannochloris oleoabundans* under alkaline-saline conditions. **Bioresource Technology**, v. 104, p. 593-599.

SEBASTIEN, N. Y.; KLEIN, V. L. M. (2006). Efeito do meio Erd Schreiber no cultivo das microalgas *Dunaliella salina*, *Tetraselmis chuii* e *Isochrysis galbana*. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v. 28, p. 149-152.

SIAUT, M.; CUINE, S.; CAGNON, C.; FESSLER, B.; NGUYEN, M.; CARRIER, P.; BEYLY, A.; BEISSON, F.; TRIANTAPHYLIDES, C.; LI-BEISSON, Y.H.; PELTIER, G. (2011). Oil accumulation in the model green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: characterization, variability between common laboratory strains and relationship with starch reserves. **BMC Biotechnology**, 11:7.

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

SOLOVCHENKO, A. E. (2012). Physiological role of neutral lipid accumulation in eukaryotic microalgae under stresses. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 59, n. 2, 192-202.

SYDNEY, E. B.; SILAVA, T. E.; TOKARSKI, A.; NOVAK, A. C.; CARVALHO, J. C.; WOICIECHOWSKI, A. L.; LARROCHE, C.; SOCCOL, C. R. (2011). Screening of microalgae with potential for biodiesel production and nutrient removal from treated domestic sewage. **Applied Energy**, v. 88, p. 3291-3294.

SYDNEY, E. B.; STURM, W.; CARVALHO, J. C.; THOMAZ-SOCCOL, V.; LARROCHE, C.; PANDEY, A.; SOCCOL, C. R. (2010). Potential carbon dioxide fixation by industrially important microalgae. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 5892-5896.

TAM, N. F. Y.; WONG, Y. S. (2000). Effect of immobilized microalgal bead concentrations on wastewater nutrient removal. **Environmental Pollution**, v. 107, p. 145-151.

TSUKAHARA, K.; SAWAYAMA, S. (2005). Liquid fuel production using microalgae. **Journal of the Japan Petroleum Institute**, v. 48, p. 251-259.

UM, B.H.; KIM, Y.S., (2009). Review: a chance for Korea to advance algal-biodiesel technology. **Journal of Industrial Engineering Chemistry**, v. 15, p. 1-7.

VANTHOOR-KOOPMANS, M.; WIJFFELS, R.; BARBOSA, M. J.; EPPINK, M. H. M. (2013). Biorefinery of microalgae for food and fuel. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 142-149.

VAZHAPPILLY, R.; CHEN, F. (1998). Eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid production potential of microalgae and their heterotrophic growth. **J. Am. Oil Chem. Soc.** v. 75, p. 393-397.

VENKATARAMANAN, K. P.; BOATMAN, J. J.; KURNTAWAN, Y.; TACONI, K. A.; BOTHUN, G. D.; SCHOLZ, C. (2012). Impact of impurities in biodiesel-derived crude glycerol on the fermentation by *Clostridium pasteurianum* ATCC 6013. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, p. 1325–1335.

VIEIRA, A. A. H. (1983). Purification of phytoplankton cultures with Dakin solution. **Revista de Microbiologia**, v.14, p. 202-203.

VILLAREJO, A.; ORÚS, M.I.; MARTÍNEZ, F., (1995). Coordination of photosynthetic and respiratory metabolism in *Chlorella vulgaris* UAM 101 in the light. **Physiol. Plant.** v. 94, p. 680-686.

XIE, T; SUN, Y.; DU, K.; LIANG, B.; CHENG, R.; ZHANG, Y. (2012). Optimization of heterotrophic cultivation of *Chlorella* sp. for oil production. **Bioresource Technology**, v. 118, p. 235-242.

XIN, L.; HONG-YING, H.; JIA, Y. (2009). Lipid accumulation and nutrient removal properties of a newly isolated freshwater microalga, *Scenedesmus* sp. LX1, growing in secondary effluent. **New Biotechnology**, v. 27, n. 1, p. 59-63.

XIN, L.; HONG-YING, H.; KE, G.; JIA, Y. (2010). Growth and nutrient removal properties of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. LX1 under different kinds of nitrogen sources. **Ecological Engineering**, v. 36, p. 379-381.

- XIN, L.; HONG-YING, H.; YU-PING, Z. (2011). Growth and lipid accumulation properties of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. under different cultivation temperature. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 3098-3102.
- ZHAO, G.; YU, J.; JIANG, F.; ZHANG, X.; TAN, T. (2012). The effect of different trophic modes on lipid accumulation of *Scenedesmus quadricauda*. **Bioresource Technology**, v. 114, p. 466-471.
- ZHENG, Y.; LI, T.; YU, X.; BATES, P. D.; DONG, T.; CHEN, S. (2013). High-density fed-batch culture of a thermotolerant microalga *Chlorella sorokiniana* for biofuel production. **Applied Energy**, v. 108, p. 281-287.
- WANG, B.; LI, Y.; WU, N.; LAN, C. Q. (2008). **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 79, p. 707-718.
- WEATHERELL, C. A.; ELLIOTT, D. J.; FALLOWFIELD, H. J.; CURTIS, T. P. Variable photosynthetic characteristics in waste stabilization ponds. (2003). **Water Science and Technology**, v. 48, p. 219-226.
- WESTERHOFF, P.; HU, Q.; SOTO, M.E.; VERMAAS, W. (2010). Growth parameters of microalgae tolerant to high levels of carbon dioxide in batch and continuous-flow photobioreactors. **Environmental Technology**, v. 31, n.5, p. 523-532.
- WIJFFELS, R.; BARBOSA, M. J. (2010). An outlook on microalgal biofuels. **Science**, v. 329, p. 796-799.
- WOERTZ, I.; FEFFER, A.; LUNDQUIST, T., NELSON, Y. (2009). Algae grown on dairy and municipal wastewater for simultaneous nutrient removal and lipid production for biofuel feedstock. **Journal of Environmental and Engineering**, v. 135, p. 1115-1122.
- YANG, C.; HUA, Q.; SHIMIZU, K. (2000). Energetics and carbon metabolism during growth of microalgal cells under photoautotrophic, mixotrophic and cyclic light-autotrophic/dark-heterotrophic conditions. **Biochemical Engineering Journal**, v. 6, p. 87-102.
- YEH, K. -L.; CAHNG, J. -S. (2012). Effects of cultivation conditions and media composition on cell growth and lipid productivity of indigenous microalga *Chlorella vulgaris* ESP-31. **Bioresource Technology**, v. 105, p. 120-127.
- YEN, H. -W.; HU, I. -C.; CHEN, C. -Y.; HO, S. -H.; LEE, D. -J.; CHANG, J. -S. (2013). Microalgae-based biorefinery - From biofuels to natural products. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 166-174.