UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS

PAULO VAGNER DOS SANTOS

Seleção de cepas oleaginosas da microalga *Chlorella* spp. e otimização do seu cultivo em meio sintético e vinhaça visando à produção sustentável de biodiesel.

Versão Corrigida

São Carlos

2013

PAULO VAGNER DOS SANTOS

Seleção de cepas oleaginosas da microalga *Chlorella* spp. e otimização do seu cultivo em meio sintético e vinhaça visando à produção sustentável 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: Engenharia Hidráulica e Saneamento.

Orientadora: Profa. Titular Maria do Carmo Calijuri

São Carlos

2013

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

S237s

Santos, Paulo Vagner
Seleção de cepas oleaginosas da microalga Chlorella spp. e otimização do seu cultivo em meio sintético e vinhaça visando à produção sustentável de biodiesel. / Paulo Vagner Santos; 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. biocombustíveis. 2. lipídeos. 3. biomassa. 4. água residuária. 5. óleo. 6. biotecnologia. 7. biorrefinaria. I. Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidato: Bacharel e Licenciado **PAULO VAGNER DOS SANTOS**.

Título da tese: "Seleção de cepas oleaginosas da microalga Chlorella spp. e otimização do seu cultivo em meio sintético e vinhaça visando à produção sustentável de biodiesel".

Data da defesa: 04/10/2013

Comissão Julgadora:	**Resultado:**
Profa. Titular **Maria do Carmo Calijuri (Orientadora)** (Escola de Engenharia de São Carlos/EESC)	Aprovado
Prof. Associado **Marcelo Zaiat** (Escola de Engenharia de São Carlos/EESC)	Aprovado
Profa. Dra. **Ana Teresa Lombardi** (Universidade Federal de São Carlos/UFSCar)	Aprovado
Profa. Dra. **Marli de Fátima Fiore** (Centro de Energia Nuclear na Agricultura/USP)	Aprovado
Profa. Dra. **Iracema de Oliveira Moraes** (Universidade Estadual de Campinas/UNICAMP)	Aprovado

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**

Dedico aos meus pais, Luiz e Cremilda,
e aos meus irmãos, Luis Carlos e Adriana,
por todo o apoio, carinho e dedicação prestados ao longo da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Profa. Maria do Carmo Calijuri, por ter confiado e acreditado no meu trabalho desde a concepção e proposta deste projeto, até a entrega da versão final da tese. Foram muitos os momentos de desafios, superações, aprendizado e amadurecimento pessoal e profissional ao longo dos quais pude contar com seu apoio incondicional. Muito obrigado!

Ao departamento de Engenharia Hidráulica e Saneamento, pela estrutura laboratorial oferecida e financiamentos para participação e realização de eventos científicos, os quais abriram infinitas oportunidades de aprendizado, integração e vivência com diversos profissionais que muito colaboraram com as ideias aqui registradas.

Às agências de financiamento Capes, CNPq e Fapesp, pela concessão de bolsas e recursos para a realização desta pesquisa.

À professora Dra. Ana Tereza Lombardi, pelos valiosos ensinamentos repassados, desde a disciplina de microalgas ministrada na pós até a participação em bancas do nosso grupo de pesquisa.

À professora Dra. Iracema de Oliveira Moraes, pela oportunidade de me integrar aos cursos de microalgas do CBAB no momento em que este projeto dava seus primeiros passos e carecia de suporte.

Ao engenheiro Sérgio Goldemberg e toda a equipe da Algae Biotecnologia, especialmente Moira, Daniella, Felipe e Luciana, com quem muito aprendi em reuniões, encontros e discussões acerca de ideias, projetos, eventos e financiamentos para as microalgas.

À professora Dra. Maria Bernadete Amâncio Varesche e ao professor Dr. Marcelo Zaiat que permitiram minha participação em disciplinas de graduação como monitor/aluno ouvinte, as quais foram enriquecedoras para minha formação.

À professora Dra. Ana Paula Ulian de Araújo, do Instituto de Física de São Carlos, por permitir meu acesso ao laboratório de Biofísica para uso da infra-estrutura e à técnica Isabel que muito me ajudou na etapa de centrifugação e sonicação de amostras.

Às empresas Foz do Brasil, grupo Raízen e Usina Santa Adélia, por colaborarem com coletas de águas residuárias.

Aos técnicos do Laboratório de Saneamento, Paulo e Júlio, pela disposição e ajuda com análises, orientação e revisão de métodos.

Às técnicas do Laboratório de Processos Biológicos, Eloísa e Maria Ângela, sempre dispostas a ajudar com análises microbiológicas e cromatográficas.

Aos funcionários do departamento de Hidráulica e Saneamento, Sá, Rose, Fernanda, Flávia e André, pela convivência, disposição e pronta ajuda com os afazeres burocráticos.

À equipe do LATAR, técnica Teresa e alunos Gabriel e Andressa, com quem pude conviver e trocar informações sobre análises e procedimentos laboratoriais.

À equipe do Biotace, Luci, Adriana, Patrícia, André, Juliana, Davi, Flávia, Simone, Sarah, Laís e Tacyo pela amizade, assistência, aprendizado, convivência, confraternizações e suporte técnico no decorrer de toda a pesquisa.

À minha amiga e braço direito desta pesquisa, Raquel de Rossi, que aceitou o desafio de executar este projeto e foi companheira de muitas reuniões, discussões, análises, eventos e aprendizado. Muito obrigado Rachel!

Aos amigos de moradia Rodrigo, Ronaldo e Johnson, pelos momentos de ajuda, descontração e apoio, principalmente nos momentos finais desta pesquisa.

À amiga Débora Faria Fonseca, com quem pude fazer verdadeiros *brainstorms* acerca de projetos e filosofia de vida e com quem sempre pude contar.

Ao amigo Rafael Vieira, que se tornou fiel escudeiro e assistente nos momentos em que eu mais precisei de ajuda para ir ao laboratório, principalmente após restrições de saúde nas etapas finais da pesquisa.

Aos amigos Bruno Braga, Sevê e Paula Martins, que apesar de estarem longe, estavam presentes no meu dia-a-dia, me ajudando com mensagens e palavras de força e fé.

E por último, mas sem diminuir a importância, a toda minha família que sempre cooperou, compreendeu e apoiou minhas escolhas profissionais que até aqui me trouxeram.

"Se fiz descobertas valiosas, foi mais por ter
paciência do que qualquer outro talento."
Isaac Newton

RESUMO

SANTOS, P. V. **Seleção de cepas oleaginosas da microalga *Chlorella* spp. e otimização do seu cultivo em meio sintético e vinhaça visando à produção sustentável de biodiesel**. 2013. 139 f. Tese (doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de Paulo.

Microalgas oleaginosas apresentam produtividade de biomassa oleaginosa maior do que vegetais vasculares e sua utilização como fonte de matéria-prima para biodiesel tem sido amplamente investigada. Ganha cada vez mais destaque a ideia de acoplar o cultivo de microalgas oleaginosas ao tratamento de águas residuárias para baratear custos de produção, resolver problemas ambientais e gerar biomassa com valor de mercado dentro de biorrefinarias. No Brasil, o aumento da produção de bioetanol gera como resíduo vinhaça, água residuária rica em compostos minerais e orgânicos que poderia sustentar o cultivo mixotrófico de microalgas oleaginosas. Visando explorar esta questão, esta pesquisa foi dividida em três etapas cujos objetivos centrais foram: (1) isolar e selecionar cepas potencialmente oleaginosas de *Chlorella* spp. (2) investigar e selecionar fatores químicos, físicos e tróficos para otimizar a produtividade de biomassa e lipídeos das cepas selecionadas; (3) adequar vinhaça ao cultivo otimizado de *Chlorella* potencialmente oleaginosa visando à produtividade de biomassa e remoção de nutrientes. O crescimento das microalgas foi monitorado por absorbância (683 nm) previamente calibrada com sólidos totais e o modelo de Gompertz foi utilizado para gerar curvas e parâmetros de crescimento (amplitude, tempo de geração e velocidade específica máxima de crescimento). Foram monitorados acúmulo de lipídeos neutros (fluorescência e extração), assimilação de nutrientes, clorofila *a* e avaliadas produtividades de biomassa e lipídeos. Na etapa 1, a indução de síntese e acúmulo de triglicerídeos pela via heterotrófica (5 g L^{-1} de glicose) detectou 3 cepas de *Chlorella* (VIN01, C203 e FAZ5-10) com elevados índices de fluorescência, as quais foram selecionadas para terem seu cultivo otimizado. Na etapa 2, a frente trófica destacou-se, dentre as três frentes de varredura investigadas, e promoveu melhorias expressivas nos parâmetros de crescimento das três cepas selecionadas. Cultivos mixotróficos utilizando glicose e ácido acético foram os mais promissores, dentre os pesquisados, para otimizar o cultivo de *Chlorella* spp. Glicose foi selecionada para compor o meio base dos cultivos mixotróficos, que foram otimizados por delineamento composto central rotacional (DCCR) e análises de superfície de resposta com os fatores luz e temperatura. Na etapa 3, as condições otimizadas do cultivo mixotrófico, determinadas pelos modelos preditivos, foram simuladas em fotobiorreatores aerados de 8L. Eles aumentaram a produtividade de biomassa da cultura mixotrófica otimizada (VIN01) em 59 vezes (de 8,1 para 482,3 mg L^{-1} dia^{-1}) e a produtividade de lipídeos em 51 vezes (de 1,4 para 73,2 mg L^{-1} dia^{-1}), em relação à sua cultura fototrófica. O cultivo otimizado de *Chlorella sp.* em vinhaça aumentou sua produtividade de biomassa em 19 vezes (de 8,1 para 154,4 mg L^{-1} dia^{-1}) e lipídeos em 13 vezes (de 1,4 para 18,7 mg L^{-1} dia^{-1}), em relação à sua cultura fototrófica. Além disso, a microalga assimilou da vinhaça 57,2 mg L^{-1} de nitrogênio, 13,0 mg L^{-1} de fósforo, 3030 mg L^{-1} de DQO (Demanda Química de Oxigênio) e 778 mg L^{-1} de COT (Carbono Orgânico Total). Desta forma, ficou comprovado que vinhaça pode favorecer o cultivo mixotrófico de *Chlorella*, que removeu matéria orgânica e minerais do efluente e produziu biomassa com potencial exploração à cadeia produtiva de biodiesel.

Palavras-chave: biocombustíveis, biomassa, lipídeos, água residuária, biotecnologia, óleos.

ABSTRACT

SANTOS, P. V. **Screening of oleaginous *Chlorella* spp strains and their growth optimization in synthetic medium and vinasse aiming at the sustainable production of biodiesel**. 2013. 139 f. Thesis (PhD) – Engineering School of São Carlos, University of São Paulo.

Oil-bearing microalgae have biomass and lipid productivities greater than vascular plants and use their biomass as a raw material for biodiesel production has been widely investigated. The idea of engaging oleaginous microalgae cultivation with wastewater treatment is becoming increasingly relevant in order to reduce the production costs of biofuel, to solve environmental problems and to produce biomass with economic value in the biorefineries. Brazilian bioethanol mills generate vinasse as wastewater, which is rich in minerals and organic compounds that might support mixotrophic growth of microalgae. Aiming to answer this question, this research was divided in three phases whose have the following purposes: (1) isolate and select oleaginous *Chlorella* strains; (2) study and select chemical, physical and trophic factors to optimize biomass and lipids productivities of selected strains; (3) bring vinasse suitable to cultivation of oleaginous *Chlorella* intending to biomass productivity and nutrient removal. Microalgae growth was monitored by optical density measurements (683 nm) previously calibrated with total solids. The growth curves and growth parameters (amplitude, doubling time and maximum specific growth rate) were calculated from the Gompertz mathematical model. It was monitored neutral lipids storage (by fluorescence and cellular extraction), nutrients assimilation, chlorophyll *a*, and biomass and lipids productivities were evaluated. In the phase 1, heterotrophic cultivation (5 g L^{-1} glucose) promoted synthesis and storage of neutral lipids and high fluorescence measurements among three *Chlorella* strains (VIN01, C203 and FAZ5-10) whose were selected to optimization of their cultures. In the phase 2, trofic factors improved significantly the growth parameters of the strains studied. Among factors investigated, mixotrophic cultures with glucose and acetic acid were the most promising organic compounds to optimize *Chlorella* cultures. Central composite design (CCD) and response surface analyses with factors light and temperature were carried out to optimize mixotrophic cultures (glucose). In the phase 3, optimal mixotrophic culture conditions were defined and reproduced in aerated photobioreactors (8 L). Optimal conditions increased the biomass productivity of mixotrophic culture (VIN01) by 59-fold (from 8,1 to 482,3 mg L^{-1} day^{-1}) and lipid productivity by 51-fold (from 1,4 to 73,2 mg L^{-1} day^{-1}) regarding the phototrophic culture (VIN01). Optimal conditions in vinasse increased the biomass productivity by 19-fold (from 8,1 to 154,4 mg L^{-1} day^{-1}) and lipid productivity by 13-fold (from 1,4 to 18,7 mg L^{-1} day^{-1}) regarding to photrophic culture. Moreover, the microalga assimilated from vinasse 57,2 mg L^{-1} of nitrogen, 13,0 mg L^{-1} of phosphorus, 3030 mg L^{-1} of QOD and 778 mg L^{-1} of TOC. Therefore, it was proved that vinasse enhanced mixotrophic culture of *Chlorella*, which removed organic matter and minerals from wastewater and produced biomass with potential commercial exploitation for biodiesel production.

Keywords: biofuels, biomass, lipids, wastewater, biotechnology, oils.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fluxograma experimental das principais etapas e atividades da pesquisa. 37
Figura 2 – Regressões entre sólidos suspensos totais e absorbância (683 nm) para as cepas de Chlorella VIN01, C203 e FAZ5-10 selecionadas na etapa de screening. 42
Figura 3 – Tubos de cultura com suspensão de microalgas incubados em experimento de varredura. 44
Figura 4 – Representação de DCCR executado para duas das cepas selecionadas na etapa de screening. Pontos pretos representam os pontos executados no DCCR. Pontos pretos ligados por linhas representam o fatorial 2^2 do DCCR adicionados de um ponto preto central e quatro pontos pretos axiais, totalizando 9 pontos experimentais. Pontos brancos representam pontos totais, caso o planejamento fatorial fosse completo e com 5 níveis (5^2 = 25 pontos experimentais). 45
Figura 5 – Gradientes de luz criados para realização dos experimentos de otimização. 46
Figura 6 – Fotobiorreatores utilizados para o cultivo fototrófico (A), mixotrófico otimizado (B) e otimizado em vinhaça (C) na Etapa 3 da pesquisa. 47
Figura 7 – Fotomicrografias de colônias de Chlorella spp. sob microscópio invertido. Colônia com células agregadas sem mucilagem (A) ou separadas por mucilagem (B). Aumento de 100x. 51
Figura 8 – Métodos de espalhamento com alça de Drigalsky (A) e alça de platina (B) utilizados na purificação de Chlorella spp. 52
Figura 9 – Comparação entre a densidade de Chlorella spp. e outros gêneros de microalgas presentes no início (Vin 2%) e final (Vin 10%) dos ensaios de aclimatação contendo 2% e 10% de vinhaça, respectivamente. ... 54
Figura 10 – Ensaios de isolamento e aclimatação de Chlorella spp. Gradientes de concentração (1% a 50%) de vinhaça no meio WC para isolar a cepa VIN01 (A); resultado final da aclimatação da amostra ambiental MIX à vinhaça diluída nas concentrações de 10% (resultado positivo) e 20% (resultado negativo), no meio WC (B). 55
Figura 11 – Curvas de crescimento (fluorescência da clorofila a) de Chlorella spp. sob diferentes condições de pH e iluminação, incubadas em meio WC líquido, à temperatura de 24º C e fotoperíodo de 12/12 horas. .. 56
Figura 12 – Curva de crescimento (fluorescência da clorofila a) da cepa VIN01 e consumo de $N\text{-}NO_3$ no substrato ao longo do tempo. Barras verticais representam o desvio padrão (n=3). 57
Figura 13 – Fluorescência de lipídeos neutros de 31 cepas de Chlorella spp. após 20 dias de cultivo nas condições controle (WC padrão), limitação de nitrogênio (7 mg L^{-1}) e heterotrofia (glicose 5 g L^{-1}). Barras verticais representam o desvio padrão (n=3). Linha vermelha tracejada representa a linha de base adotada para seleção das cepas potencialmente oleaginosas. 58
Figura 14 – Curvas de crescimento das cepas VIN01, C203 e FAZ5-10 e suas respectivas μ_{max} (barras) e tempo de geração (linhas tracejadas) nas diferentes relações N:P. Barras verticais representam o desvio padrão (n=3). 60
Figura 15 - Curvas de crescimento das cepas VIN01, C203 e FAZ5-10 e suas respectivas μ_{max} (barras) e tempo de geração (linhas tracejadas) nas diferentes concentrações de nitrato. Barras verticais representam o desvio padrão (n=3). 61
Figura 16- Curvas de crescimento das cepas VIN01, C203 e FAZ5-10 e suas respectivas μ_{max} (barras) e tempo de geração (linhas tracejadas) nas diferentes concentrações de nitrogênio amoniacal. Barras verticais representam o desvio padrão (n=3). "Controle (WC)" representa 1000 µM de $N\text{-}NO_3$. 62
Figura 17 - Curvas de crescimento das cepas VIN01, C203 e FAZ5-10 e suas respectivas μ_{max} (barras) e tempo de geração (linhas tracejadas) nas diferentes concentrações de micronutrientes. Barras verticais representam o desvio padrão (n=3). 63
Figura 18 - Curvas de crescimento das cepas VIN01, C203 e FAZ5-10 e suas respectivas μ_{max} (barras) e tempo de geração (linhas tracejadas) nas diferentes concentrações de bicarbonato. Barras verticais representam o desvio padrão (n=3). 64

Figura 19 - Curvas de crescimento das cepas VIN01, C203 e FAZ5-10 e suas respectivas μ_{max} (barras) e tempo de geração (linhas tracejadas) nas diferentes faixas de pH. Barras verticais representam o desvio padrão (n=3). 65
Figura 20 - Curvas de crescimento das cepas VIN01, C203 e FAZ5-10 e suas respectivas μ_{max} (barras) e tempo de geração (linhas tracejadas) nas diferentes concentrações de glicose do cultivo mixotrófico. Barras verticais representam o desvio padrão (n=3). Controle representa WC padrão sem glicose em cultivo fototrófico. ...66
Figura 21 - Curvas de crescimento das cepas VIN01, C203 e FAZ5-10 e suas respectivas μ_{max} (barras) e tempo de geração (linhas tracejadas) nas diferentes concentrações de glicose do cultivo heterotrófico. Barras verticais representam o desvio padrão (n=3). Controle representa WC padrão sem glicose na ausência de luz.....68
Figura 22 - Curvas de crescimento das cepas VIN01, C203 e FAZ5-10 e suas respectivas μ_{max} (barras) e tempo de geração (linhas tracejadas) nas diferentes concentrações de frutose do cultivo mixotrófico. Barras verticais representam o desvio padrão (n=3).....69
Figura 23 - Curvas de crescimento das cepas VIN01, C203 e FAZ5-10 e suas respectivas μ_{max} (barras) e tempo de geração (linhas tracejadas) nas diferentes concentrações de sacarose do cultivo mixotrófico. Barras verticais representam o desvio padrão (n=3).....70
Figura 24 - Curvas de crescimento das cepas VIN01, C203 e FAZ5-10 e suas respectivas μ_{max} (barras) e tempo de geração (linhas tracejadas) nas diferentes concentrações de etanol do cultivo mixotrófico. Barras verticais representam o desvio padrão (n=3).....71
Figura 25 - Curvas de crescimento das cepas VIN01, C203 e FAZ5-10 e suas respectivas μ_{max} (barras) e tempo de geração (linhas tracejadas) nas diferentes concentrações de glicerol do cultivo mixotrófico. Barras verticais representam o desvio padrão (n=3).....72
Figura 26 - Curvas de crescimento das cepas VIN01, C203 e FAZ5-10 e suas respectivas μ_{max} (barras) e tempo de geração (linhas tracejadas) na concentração de 0,4 g L^{-1} de diversos ácidos orgânicos do cultivo mixotrófico. 73
Figura 27 - Curvas de crescimento das cepas VIN01, C203 e FAZ5-10 e suas respectivas μ_{max} (barras) e tempo de geração (linhas tracejadas) em diferentes concentrações de ácido acético do cultivo mixotrófico. Barras verticais representam o desvio padrão (n=3). 74
Figura 28 - Curvas de crescimento das cepas VIN01, C203 e FAZ5-10 e suas respectivas μ_{max} (barras) e tempo de geração (linhas tracejadas) nas diferentes intensidades de luz. Cultivo mixotrófico contendo 2g L^{-1} de glicose. Barras verticais representam o desvio padrão (n=3). 76
Figura 29 - Curvas de crescimento das cepas VIN01, C203 e FAZ5-10 e suas respectivas μ_{max} (barras) e tempo de geração (linhas tracejadas) nas diferentes concentrações de inóculo. Cultivo mixotrófico contendo 2g L^{-1} de glicose. Barras verticais representam o desvio padrão (n=3). 77
Figura 30 - Curvas de crescimento das cepas VIN01, C203 e FAZ5-10 e suas respectivas μ_{max} (barras) e tempo de geração (linhas tracejadas) nas diferentes temperaturas. Cultivo mixotrófico contendo 2g L^{-1} de glicose. Barras verticais representam o desvio padrão (n=3). 78
Figura 31 – Diagrama de Pareto dos coeficientes do modelo preditivo para μ_{max} da cepa VIN01. Barras horizontais à direita do limite de significância ($p<0,05$) representam os coeficientes que foram estatisticamente significativos para o modelo.....82
Figura 32 - Diagrama de Pareto dos coeficientes do modelo preditivo para fluorescência de lipídeos da cepa VIN01. Barras horizontais à direita do limite de significância ($p<0,05$) representam os coeficientes que foram estatisticamente significativos para o modelo.....83
Figura 33 – Superfícies de resposta da μ_{max} da cepa VIN01 em função da luz e temperatura, de acordo com o modelo preditivo. Pontos azuis representam os pontos experimentais utilizados para gerar o modelo. 84
Figura 34 - Superfícies de resposta da fluorescência de lipídeos neutros da cepa VIN01 em função da luz e temperatura, de acordo com o modelo preditivo. Pontos azuis representam os pontos experimentais utilizados para gerar o modelo. 85

Figura 35 - Diagrama de Pareto dos coeficientes do modelo preditivo para μ_{max} da cepa C203. Barras horizontais à direita do limite de significância (p<0,05) representam os coeficientes que foram estatisticamente significativos para o modelo. 88
Figura 36 - Diagrama de Pareto dos coeficientes do modelo preditivo para fluorescência de lipídeos da cepa C203. Barras horizontais à direita do limite de significância (p<0,05) representam os coeficientes que foram estatisticamente significativos para o modelo. 89
Figura 37 - Superfícies de resposta da μ_{max} da cepa C203 em função da luz e temperatura, de acordo com o modelo preditivo. Pontos azuis representam os pontos experimentais utilizados para gerar o modelo. 90
Figura 38 - Superfícies de resposta da fluorescência de lipídeos neutros da cepa C203 em função da luz e temperatura, de acordo com o modelo preditivo. Pontos azuis representam os pontos experimentais utilizados para gerar o modelo. 91
Figura 39 - Diagrama de Pareto dos coeficientes do modelo preditivo para μ_{max} da cepa FAZ5-10. Barras horizontais à direita do limite de significância (p<0,05) representam os coeficientes que foram estatisticamente significativos para o modelo. 94
Figura 40 - Diagrama de Pareto dos coeficientes do modelo preditivo para fluorescência de lipídeos da cepa FAZ5-10. Barras horizontais à direita do limite de significância (p<0,05) representam os coeficientes que foram estatisticamente significativos para o modelo. 95
Figura 41 - Superfícies de resposta da μ_{max} da cepa FAZ5-10 em função da luz e temperatura, de acordo com o modelo preditivo. Pontos azuis representam os pontos experimentais utilizados para gerar o modelo. 96
Figura 42 - Superfícies de resposta da fluorescência de lipídeos da cepa FAZ5-10 em função da luz e temperatura, de acordo com o modelo preditivo. Pontos azuis representam os pontos experimentais utilizados para gerar o modelo. 97
Figura 43 - Fotomicrografias da cepa FAZ5-10 cultivada a 31 °C e com intensidades luminosas de (A) 0, (B) 150 e (C) 300 µmol fótons m^{-2} s^{-1} na fase estacionária do cultivo. Microscopia de fluorescência de suspensão celular corada com Vermelho do Nilo evidenciou vesículas de lipídeos neutros (amarelo). Organelas vermelhas são cloroplastos. Aumento de 400x. Escala de 20 µm. 98
Figura 44 - Curvas de crescimento da cepa FAZ5-10 e suas respectivas fluorescências e μ_{max} nas diferentes intensidades luminosas. Cultivo mixotrófico em meio WC modificado (3WC) contendo 2g L^{-1} de glicose. Barras verticais representam o desvio padrão (n=3). 99
Figura 45 – Relação entre velocidade de centrifugação (10 min) e turbidez da vinhaça visando remoção de sólidos suspensos totais. Poros de membrana apontam para turbidez obtida após filtrações para esterilização do efluente. 100
Figura 46 – Placas de Petri, contendo ágar nutriente, semeadas com vinhaça bruta (A), vinhaça congelada e descongelada por 4 vezes (B), vinhaça filtrada através de membrana com 0,45 µm (C) e 0,2 µm de poro (D). 101
Figura 47 – Varredura espectrofotométrica da vinhaça tratada (0,2 µm). Seta aponta para comprimento de onda adotado (683 nm) para monitorar o crescimento da cepa VIN01. 105
Figura 48 – Efeitos isolados dos fatores luz e concentração de vinhaça sobre μ_{max} da cepa VIN01 cultivada em vinhaça. 107
Figura 49 – Curva de crescimento da cepa VIN01, na condição "fototrófica", acompanhada das variáveis físico-químicas da fluorescência para lipídeos neutros monitoradas ao longo do cultivo. 108
Figura 50 - Curva de crescimento da cepa C203, na condição "fototrófica", acompanhada das variáveis físico-químicas e da fluorescência para lipídeos neutros monitoradas ao longo do cultivo. 108
Figura 51 - Curva de crescimento da cepa FAZ5-10, na condição "fototrófica", acompanhada das variáveis físico-químicas e da fluorescência para lipídeos neutros monitoradas ao longo do cultivo. 109
Figura 52 - Curva de crescimento da cepa VIN01, na condição "mixotrófica otimizada", acompanhada das variáveis físico-químicas e da fluorescência para lipídeos neutros monitoradas ao longo do cultivo. 110
Figura 53 - Curva de crescimento da cepa C203, na condição "mixotrófica otimizada", acompanhada das variáveis físico-químicas monitoradas ao longo do cultivo. 111

Figura 54 - Curva de crescimento da cepa FAZ5-10, na condição "mixotrófico otimizada", acompanhada das variáveis físico-químicas e da fluorescência para lipídeos neutros monitoradas ao longo do cultivo. 111
Figura 55 - Curva de crescimento da cepa VIN01, na condição "otimizada em vinhaça", acompanhada das variáveis físico-químicas e da fluorescência para lipídeos neutros monitoradas ao longo do cultivo. 113
Figura 56 – Fotomicrografias da cepa VIN01 na fase estacionária do cultivo em vinhaça. (A) Microscopia de luz de suspensão celular com coloração de lugol indicando ausência de grânulos de amido. (B) Microscopia de fluorescência de suspensão celular corada com Vermelho do Nilo evidenciando vesículas de lipídeos neutros (amarelo). Organelas vermelhas são cloroplastos. Aumento de 400x. Escala de 10 µm. 118
Figura 57 – Fotomicrografias da cepa FAZ5-10 na fase estacionária do cultivo mixotrófico otimizado. (A) Microscopia de luz de suspensão celular corada com lugol evidenciando células com grânulos de amido (roxo). (B) Microscopia de fluorescência de suspensão celular corada com Vermelho do Nilo evidenciando vesículas de lipídeos neutros (amarelo). Organelas vermelhas são cloroplastos. Aumento de 800x. Escala de 20 µm. 118

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição do meio WC (Guillard e Lorenzen, 1972) 39
Tabela 2 – Fatores e níveis investigados nas frentes química, física e trófica visando à otimização dos parâmetros de crescimento de cepas de Chorella spp. 43
Tabela 3 – Fatores e níveis investigados nos experimentos planejados com DCCR. 45
Tabela 4 - Variáveis físico-químicas e seus respectivos métodos de análise e referências. 48
Tabela 5 - Relação de cepas do gênero Chlorella isoladas de diferentes ambientes aquáticos e depositadas no banco de microalgas do Laboratório de Biotoxicologia de Águas Continentais e Efluentes – Biotace. 53
Tabela 6 – Abundância relativa de Chlorella spp. e outros gêneros de microalgas presentes no início (Vin 2%) e final (Vin 10%) dos ensaios de aclimatação de amostras ambientais contendo 2% e 10% de vinhaça, respectivamente. 54
Tabela 7 – Parâmetros de crescimento das cepas VIN01, C203 e FAZ5-10 obtidos nos cultivos mixotrófico e heterotrófico contendo 2g L^{-1} de glicose. * aponta para melhor condição (t-student, p<0,05) 69
Tabela 8 – Concentrações de nitrogênio, fósforo e glicose na composição do meio WC modificado para otimização e percentual de nutrientes assimilados pelas culturas mixotróficas cultivadas a 24 °C e 60 µmol fótons m^{-2} s^{-1} (12h/12h). 79
Tabela 9 – Matriz do delineamento composto central rotacional (DCCR) para cultivo da cepa VIN01 e respectivas respostas de μ_{max} e fluorescência aos fatores temperatura e luz. 81
Tabela 10 – Análise de variância (ANOVA) do DCCR da cepa VIN01 (μ_{max}). 82
Tabela 11 – Análise de variância (ANOVA) do DCCR da cepa VIN01 (fluorescência de lipídeos). 82
Tabela 12 - Matriz do delineamento composto central rotacional (DCCR) para cultivo da cepa C203 e respectivas respostas de μ_{max} e fluorescência aos fatores temperatura e luz. 87
Tabela 13 - Análise de variância (ANOVA) do DCCR da cepa C203 (μ_{max}). 88
Tabela 14 - Análise de variância (ANOVA) do DCCR da cepa C203 (fluorescência de lipídeos). 88
Tabela 15 - Matriz do delineamento composto central rotacional (DCCR) para cultivo da cepa FAZ5-10 e respectivas respostas de μ_{max} e fluorescência aos fatores temperatura e luz. 93
Tabela 16 - Análise de variância (ANOVA) do DCCR da cepa FAZ5-10 (μ_{max}). 94
Tabela 17 - Análise de variância (ANOVA) do DCCR da cepa C203 (fluorescência de lipídeos). 94
Tabela 18 – Caracterização físico-química da vinhaça bruta e tratada (centrifugação a 11.000 rpm seguida de filtrações através de membrana de até 0,2 µm e ajuste de pH para 9,2). 102
Tabela 19 – Matriz do delineamento fatorial contendo fatores e níveis testados e respostas das variáveis dependentes μ_{max}, Tg e biomassa (n=3 para μ_{max} e Tg) da cepa VIN01 cultivada em vinhaça. 106
Tabela 20 – Análise de variância (ANOVA) do planejamento fatorial para otimização do cultivo de VIN01 em vinhaça. 106
Tabela 21 – Compilação dos principais parâmetros de crescimento, do perfil bioquímico da biomassa e sua produção e produtividades e da remoção de nutrientes pelas culturas das cepas VIN01, C203 e FAZ-10 nas condições fototrófica, mixotrófica otimizada e em vinhaça (8 L de cultura aerada). 116
Tabela 22 – Perfil de ácidos graxos obtidos da fração lipídica da biomassa 119
Tabela 23 – Produção e produtividades de biomassa e lipídeos experimentais e estimadas, usando-se ajuste do tempo de colheita pela análise gráfica das culturas de 8L. Cálculo para lagoas de alta taxa hipotéticas considerando sistema com 30 cm de lâmina de água (300 L por m^2) e com condições de cultivo semelhantes aos laboratoriais. 120
Tabela 24 - Produtividades de biomassa e lipídeos da cepa VIN01 no cultivo mixotrófico otimizado, no cultivo otimizado em vinhaça e por espécies diversas de Chlorella de outras pesquisas. 129

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 25

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 27

3. OBJETIVOS 35

4. MATERIAIS E MÉTODOS 37

4.1. FLUXOGRAMA EXPERIMENTAL 37
4.2. ETAPA 1 – ISOLAMENTO, ACLIMATAÇÃO E *SCREENING* DE CEPAS OLEAGINOSAS 38
4.2.1. Amostragem de vinhaça 38
4.2.2. Amostragem de ambientes aquáticos 38
4.2.3. Ensaios de aclimatação 38
4.2.4. Análise qualitativa e quantitativa da comunidade fitoplanctônica 39
4.2.5. Isolamento e propagação das microalgas 39
4.2.6. Seleção (screening) de cepas potencialmente oleaginosas 40
4.3. ETAPA 2 – VARREDURA DE FATORES E OTIMIZAÇÃO DO CULTIVO 41
4.3.1. Axenização das cepas de Chlorella 41
4.3.2. Calibração das curvas de absorbância e sólidos 41
4.3.3. Varredura de fatores químicos, físicos e tróficos 42
4.3.4. Otimização do cultivo com DCCR 44
4.4. ETAPA 3: CULTIVO EM MÉDIA ESCALA (8L) 46
4.4.1. Cultivos fototrófico, mixotrófico otimizado em meio sintético e otimizado em vinhaça 46
4.4.2. Tratamento físico da vinhaça para adequação ao cultivo otimizado 47
4.4.3. Análises físico-químicas do meio WC e da vinhaça 47
4.4.4. Determinação da biomassa e análises bioquímicas 48
4.5. CÁLCULO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS E DA PRODUTIVIDADE 50

5. RESULTADOS 51

5.1. ETAPA 1 – ISOLAMENTO, ACLIMATAÇÃO E SEPARAÇÃO DE CEPAS OLEAGINOSAS 51
5.2. ETAPA 2 – VARREDURA DE FATORES E OTIMIZAÇÃO DO CULTIVO 59
5.2.1. Frente química 59
5.2.2. Frente trófica 66
5.2.3. Frente física 75
5.2.4. Seleção dos fatores e níveis para otimização 79
5.2.5. Otimização do cultivo com Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) 80
5.2.5.1. Otimização do cultivo da cepa VIN01 81
5.2.5.2. Otimização do cultivo da cepa C203 87
5.2.5.3. Otimização do cultivo da cepa FAZ5-10 93
5.3. CULTIVO EM MÉDIA ESCALA (8L) COM MEIO WC PADRÃO, WC MODIFICADO E VINHAÇA 99
5.3.1. Tratamento e caracterização da vinhaça 100
5.3.2. Experimento fatorial para otimizar a cepa VIN01 ao cultivo em vinhaça 105
5.3.3. Cultivo em média escala (8L) 107

6. DISCUSSÃO 121

7. CONCLUSÕES 131

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 133

1. INTRODUÇÃO

Com cerca de 50 mil espécies descritas e a expectativa de descoberta de mais de 100 mil novas espécies, microalgas eucarióticas (ANDERSEN, 1992), em conjunto com cianobactérias, constituem a comunidade fitoplanctônica. Sustentando as bases de diversas cadeias tróficas, estes micro-organismos fixam energia solar e CO_2 atmosférico em moléculas orgânicas, cujo conteúdo químico e energético transfere-se ao longo dos ecossistemas.

A aplicação de microalgas em processos biotecnológicos ganhou destaque na última década devido ao incremento massivo de pesquisas centradas na obtenção de biocombustíveis de terceira geração obtidos a partir da biomassa destes micro-organismos.

Micro-organismos oleaginosos, em cujo grupo estão inseridas as microalgas, são conhecidos por acumularem lipídeos em suas células e apresentarem produtividade mais alta do que vegetais vasculares. A produção de biodiesel usando este tipo de micro-organismos é conhecida internacionalmente como *Single Cell Oils e* tem atraído atenção de pesquisadores em todo o mundo.

Resultados promissores de biossíntese lipídica têm sido encontrados em estudos com a clorofícea *Chorella* spp., a qual apresenta versatilidade metabólica necessária ao seu cultivo em efluentes domésticos e industriais.

O conceito de biorrefinaria está centrado na utilização de microrganismos que geram produtos de valor agregado a partir de resíduos de processos industriais. O novo paradigma que se deseja instalar com biorrefinarias é o de produções de bioprodutos com valor de mercado e ciclagem de matéria-prima dentro das plantas fabris.

Microalgas são vistas como potenciais micro-organismos para utilização em biorrefinarias por produzirem variedade de produtos com aplicações comerciais que vão desde a área médica até a biorremediação. Por crescerem em ambientes inóspitos e com velocidades maiores do que plantas vasculares, microalgas são vistas como potencias produtoras de biocombustíveis tais como etanol, biodiesel e metano, por digestão anaeróbia da biomassa.

Para que a aplicação destes novos processos em escala comercial se torne viável, é preciso compreender não somente a diversidade de metabolismos com os quais as microalgas lançam estratégias de sobrevivência em ambientes eutrofizados e ricos em matéria orgânica, mas também sua possibilidade de adaptação e de cultivo otimizado nos variados efluentes sanitários e industriais.

Em face do aumento da produção de bioetanol pelas usinas sucroalcooleiras e a produção associada média de 14L de vinhaça para cada litro de etanol produzido, soluções alternativas de reutilização do resíduo para produção de bioenergia são desejadas.

Dentro do conceito de biorrefinarias, a carga nutricional da vinhaça poderia ser utilizada como substrato alternativo ao cultivo de *Chlorella* para produção de biomassa oleaginosa de

microalgas visando ao biodiesel. Deste modo, otimizar o cultivo mixotrófico de microalgas oleaginosas em meio sintético e vinhaça foi a proposta central desta pesquisa.

Espera-se que as informações geradas possam contribuir ao conhecimento e desenvolvimento de novos processos biológicos para tratar e agregar valor à vinhaça; gerar biodiesel a partir de uma nova rota biotecnológica e, finalmente, aperfeiçoar o desenvolvimento de processos sustentáveis de cultivo de microalgas, integrados às usinas sucroalcooleiras, para aproximá-las do almejado modelo de biorrefinarias.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A história da produção de biocombustíveis concretizou-se no país, a partir da década de 1970, com o programa conhecido como Proálcool, cujo objetivo foi substituir combustíveis fósseis por bioetanol em veículos automotivos (OLIVEIRA, 1988).

Mais de trinta anos após a consolidação do programa, o Brasil tornou-se referência mundial no uso de fontes renováveis de energia, sendo o bioetanol, resultante da fermentação da cana-de-açúcar, o biocombustível que tem mudado a matriz energética brasileira (BRASIL, 2006). Apesar do sucesso, impactos ambientais decorrentes da má gestão do setor sucroalcooleiro, embora amenizados, permanecem após mais de 30 anos da implantação do Proálcool (LANZOTI, 2000).

Um dos resíduos gerados no processo de fabricação do etanol é a vinhaça, efluente resultante da destilação que separa o mosto fermentado dos álcoois e outras substâncias de origem fermentativa (OLIVEIRA, 1988). Para cada litro de etanol produzido, são gerados de 10 a 14 litros de vinhaça. Conhecida pelo seu poder eutrofizante, devido a elevado teor de nutrientes, a vinhaça provocou e até hoje provoca problemas decorrentes de métodos de destinação inadequados. Apesar de utilizada em processos de fertirrigação nos canaviais, novas formas de tratar e destinar este resíduo devem ser desenvolvidas e empregadas (LANZOTI, 2000).

Uma alternativa que poderia agregar valor a este resíduo e melhorar a sustentabilidade das usinas, gerando um novo tipo de biocombustível, utiliza-se dos conceitos da fixação de carbono e ciclagem de nutrientes. No entanto, antes de apresentar tal idéia, é preciso explorar o estado de uma nova matriz energética renovável que está em fase de implantação no país: a produção do biodiesel.

Biodiesel é um combustível obtido de fontes renováveis como óleos vegetais, gorduras animais e resíduos contendo óleos e gorduras. O principal componente necessário à fabricação deste biocombustível é uma molécula neutra de lipídeo, o triglicerídeo. Nela, três moléculas de ácidos graxos esterificados a uma molécula de glicerol transformam-se em biodiesel por processo químico. Em 1980, pela primeira vez no mundo, o pesquisador brasileiro Expedito José de Sá Parente registrou a patente do processo de fabricação do biodiesel, o qual é caracterizado por reação química conhecida como transesterificação (BRASIL 2005, BRASIL 2006).

Há diversas tecnologias elaboradas para esta reação, destacando-se a transesterificação térmica (craqueamento catalítico e hidrocraqueamento), a transesterificação enzimática (em fase de pesquisa e desenvolvimento) e a transesterificação alcalina. Nesta última, triglicerídeos extraídos da matéria-prima reagem com álcool e são decompostos a ésteres metílicos ou etílicos dos ácidos graxos, os quais originam o biodiesel propriamente dito, e a glicerol, que é subproduto do processo com alto valor de mercado. (BRASIL, 2005; BRASIL, 2006).

De acordo com o álcool utilizado, as rotas tecnológicas do método de transesterificação alcalina variam e podem ser definidas como metílica e etílica para o uso de metanol e etanol, respectivamente (BRASIL, 2006). Apesar da rota metílica ser a mais empregada na transesterificação em diversos países, a rota etanólica é estrategicamente mais vantajosa para o Brasil em função da alta produtividade e baixos custos do bioetanol no mercado interno (BRASIL, 2005).

Embora o Brasil possua tecnologia para produção de bioetanol, existe uma lacuna a ser preenchida na matriz do biodiesel.

O PNA - Plano Nacional de Agroenergia (BRASIL, 2005) - salienta a importância de investimentos em pesquisa, desenvolvimento, inovação e transferência de tecnologia dentro da cadeia produtiva do biodiesel para que a transformação da matéria-prima em produto atenda à demanda do mercado energético. O PNA incentiva a busca de fontes alternativas de matéria-prima para o biodiesel. O enfoque é dado à utilização de resíduos com óleos animal e vegetal e às espécies de vegetais superiores que acumulam lipídeos. Contudo, o potencial de produção dos óleos vegetais não está limitado a estes representantes da biota terrestre. É neste contexto inovativo, que as microalgas podem desenvolver um importante papel na produção de energia.

Micro-organismos são potenciais produtores de óleos e insumos de alto valor agregado e, fazendo parte deste grupo, microalgas oleaginosas são definidas como aquelas que acumulam mais do que 20% de lipídeos em relação à sua biomassa seca (RATLEDGE; COHEN, 2008). A produção de biodiesel usando microrganismos como matéria-prima tem sido chamada de *Single Cell Oils* (SCO) e atrai a atenção de pesquisadores em todo mundo pelo fato dos triglicerídeos serem biossintetizados em grandes quantidades (MENG et al., 2009).

Além do biodiesel gerado após transesterificação dos triglicerídeos, a biomassa algal tem potencial para sustentar pelo menos mais três vias biológicas de produção energética: metano e hidrogênio produzidos através de digestão anaeróbia; e etanol obtido a partir da fermentação dos carboidratos (TSUKAHARA; SAWAYAMA, 2005; BRENNAN; OWENDE, 2010).

A ideia da utilização de algas como fonte renovável de energia não é nova, contudo tornou-se emergente nesta década devido ao aumento do preço do petróleo e aos impactos causados pela queima de combustíveis fósseis sobre o aquecimento global (CHISTI, 2007).

Também não é nova a tradição de cultivar microalgas em larga escala. Usadas há séculos na alimentação humana (RICHMOND, 1988), os altos custos da sua produção, associados aos problemas de aceitação no comércio e à segurança do consumo das microalgas, levaram à pesquisa em aspectos fundamentais e aplicados da ficologia visando aprimorar os métodos de cultivo (BECKER, 1994).

Hoje, os mais empregados na produção em larga escala de microalgas são: lagoas abertas e fotobiorreators tubulares para espécies autotróficas, e fermentadores comuns para espécies heterotróficas (LI; DU; LIU, 2008)

Microalgas são fontes promissoras de compostos bioquimicamente ativos com alto valor no mercado mundial. Tanto a biomassa algal quanto os seus metabólitos podem ser aplicados na alimentação animal e humana, em produtos terapêuticos e suplementos vitamínicos, pigmentos naturais, hormônios, fertilizantes, tratamentos de efluentes domésticos e industriais e produção de biocombustíveis; (OSWALD, 1988; DERNER et al. 2006; CARDOZO et al., 2007).

Algumas destas áreas produtivas já são realidade em países como Japão, Austrália, Índia, China, Israel, Alemanha e EUA e exploradas por empresas como Cyanotech, AlgaTec, Algenol, DSM, BASF e Cognis. No Brasil, estas tecnologias ainda não são exploradas em larga escala por empresas, o que pode deixar o país para trás na corrida pelos biocombustíveis de terceira geração.

A exploração do biodiesel de microalgas é enfatizada por Hu et al. (2008), Wang et al. (2008), Rittmann (2008) e Yoo et al. (2010). Os autores salientam que o destaque dado à produtividade lipídica das microalgas ocorre em função das vantagens que apresentam quando comparados aos vegetais vasculares, destacando-se:

(1) acúmulo de lipídeos em células isoladas, o que torna a extração dos triglicerídeos mais eficiente pelo fato da matéria-prima não precisar de grandes processamentos antes da transesterificação; nos vegetais vasculares os lipídeos podem ser sintetizados e estocados em células, tecidos ou órgãos específicos que precisam ser triturados ou sofrer algum tipo de processamento prévio;

(2) colheita contínua devido ao tempo de duplicação pequeno (dias) enquanto nos vegetais vasculares é sazonal (uma a duas vezes ao ano) devido ao longo tempo de duplicação (semanas);

(3) produção de lipídeos em toda biomassa dada sua natureza unicelular; nos vegetais vasculares somente algumas partes podem ser aproveitadas, o que diminui o rendimento das culturas agrícolas tradicionais;

(4) maior rendimento lipídico por área (aproximadamente 100.000L ha^{-1} ano^{-1}); nos vegetais vasculares o rendimento está abaixo de 1000L ha^{-1} ano^{-1};

(5) crescimento sob taxas elevadas e captação de energia solar com eficiência pelo menos 10 vezes maior do que a dos vegetais terrestres, tornando-as mais produtivas;

(6) tolerância às condições extremas em regiões que não sejam favoráveis à agricultura convencional;

É interessante mencionar que, da biodiversidade de microalgas existentes, apenas quinze espécies são utilizadas em aplicações comerciais (RAJA et al., 2008). E o gênero *Chlorella* destaca-se

por crescer facilmente e ser frequentemente utilizado como modelo em investigações fisiológicas e bioquímicas (HOEK; MANN; JAHNS, 1995).

Pesquisas centradas no acúmulo de lipídeos por espécies de *Chlorella* tem sido promissoras em escala laboratorial. Contudo, o biodiesel de microalgas ainda é inviável devido ao alto custo de produção, quando comparado ao diesel fóssil. Um dos problemas do custo está relacionado à tecnologia de cultivo fototrófico, já consolidada para cultivar microalgas para fins alimentares, mas que apresenta baixas produtividades de biomassa oleaginosa para o biodiesel de microalgas.

Manipulação de variáveis físico-químicas e metabólicas é uma das ferramentas biológicas utilizadas na otimização do cultivo de microalgas oleaginosas. Dentre elas, as mais exploradas são limitação de nitrogênio (ILLMAN; SCRAGG; SHALES, 2000; MUJTABA et al. 2012) e mudanças no metabolismo do carbono pela fototrofia, heterotrofia e mixotrofia. Estas ferramentas buscam acelerar a velocidade de crescimento das microalgas e o acúmulo de óleo para otimizar a produtividade de biomassa e lipídeos.

A condição de estresse e limitação nutricional altera as rotas de biossíntese protéica direcionando o fluxo de carbono à formação de moléculas não nitrogenadas, tais como carboidratos e lipídeos (RIGANO et al., 1998). Desta forma, ocorre formação e acúmulo de lipídeos neutros em vesículas densas localizadas no citossol ou também, no caso de algumas clorofíceas, nos espaços entre tilacóides do cloroplasto.

A via do nitrogênio está associada ao aumento do acúmulo de óleos nas microalgas. MILLER et al. (2010) verificaram que a limitação de nitrogênio em culturas de *Chlamydomonas reinhardtii* modificou o fluxo metabólico do acetato celular. Baseados em estudos de expressão gênica, os autores sugerem que o aumento de óleos está ligado a duas vias principais de formação de triglicerídeos: uma sustentada pela conversão do acetato celular a lipídeos neutros e outra sustentada pela atividade de lipases que participariam da transformação de lipídeos de membrana e outros lipídeos polares a lipídeos neutros.

Contudo, a escassez de nitrogênio no meio pode reduzir a biomassa final da cultura. Desta forma, é preciso encontrar a concentração de nitrogênio ideal que possibilite balanço favorável entre produtividade de biomassa e óleos (WANG, 2008). Também são propostos processos de cultivo divididos em duas fases distintas para solucionar o problema das perdas de biomassa: a primeira fase, repleta de nitrogênio, favorece o crescimento da microalga e a segunda fase, deficiente em nitrogênio, favorece o acúmulo de óleos (MUJTABA et al. 2012; DEVI; SUBHASH; MOHAN, 2012).

Como a produtividade está diretamente relacionada à velocidade específica de crescimento, gêneros com maiores velocidades de crescimento são preferidos. A literatura reporta produtividades que variam de 0,004 a 7,7 $g.L^{-1}.dia^{-1}$ em função da espécie e das condições de cultivo adotadas. Na

microalga *Botryococcus braunii*, o conteúdo de óleo pode atingir 75% da biomassa seca, contudo está associado à produtividade de biomassa baixa. Por outro lado, gêneros como *Chlorella*, *Cylindrotheca* e *Nannochloropsis*, apresentam conteúdo de óleo menor, 20 a 50% da biomassa seca, mas podem atingir produtividade de biomassa elevada, sendo o gênero *Chlorella* uma boa opção de uso para produção de biodiesel de microalgas (MATA; MARTINS; CAETANO, 2010).

A condição trófica em que o cultivo é realizado é outro fator de estudo relevante, pois gêneros de microalgas podem apresentar flexibilidade e crescerem sob condições de fototrofia mixotrofia e heterotrofia (ABELIOVICH; WEISMAN, 1978; BISSINGER; GAEDKE; KAMJUNKE, 2005; WANG et al., 2010). Na fototrofia, a energia é obtida da luz e a fonte de carbono é o CO_2. Na heterotrofia, a energia e o carbono são provenientes de molécula orgânica. Na mixotrofia, fototrofia e heterotrofia ocorrem simultaneamente (CHOJNACKA; MARQUEZ-ROCHA, 2004).

Processos mixotróficos e heterotróficos de cultivo aumentam significativamente a produtividade de biomassa e óleos de culturas de *Chlorella* sp. (MIAO; WU, 2006; BHATNAGAR et al., 2011) bem como o seu cultivo em batelada alimentada (CHEIRSILP; TORPEE, 2012). Como nem todas as cepas do gênero *Chlorella* tem a via de assimilação de carbono orgânico, uma varredura por cepas mixotróficas e heterotróficas é desejada, pois águas residuárias e, mais especificamente a vinhaça, são ricas em compostos orgânicos.

A pesquisa de Miao e Wu (2006) e Li, Xu e Wu (2007) exemplificam como a trofia pode aumentar o percentual de lipídeos na biomassa de *Chlorella*. Na primeira pesquisa, culturas fototróficas e heterotróficas (10 g L^{-1} de glicose) de *C. protothecoides* acumularam, respectivamente, 14% e 55% de lipídeos em relação à biomassa seca. Na segunda, cultura heterotrófica da mesma espécie acumulou até 48% de lipídeos e o biodiesel resultante da biomassa processada cumpriu normas estadunidenses referentes à sua qualidade. Liang, Sarkany e Cui (2009) reportaram produtividades de biomassa de *C. vulgaris* de 10 mg L^{-1} dia^{-1} (fototrófico), 151 mg L^{-1} dia^{-1} (heterotrófico, 1 g L^{-1} de glicose) e 254 mg L^{-1} dia^{-1} (mixotrófico, 1 g L^{-1} de glicose). A produtividade de lipídeos foi de 4, 35 e 53 mg L^{-1} dia^{-1}, para as culturas fototrófica, heterotrófica e mixotrófica, respectivamente.

Radiação luminosa também é um dos fatores limitantes ao cultivo de microalgas e, particularmente em culturas densas, o efeito de sombreamento celular pode prejudicar a penetração de luz (HUANG et al., 2010). No entanto, parte da cultura pode ficar exposta a elevada intensidade de radiação luminosa provocando o processo conhecido como fotoinibição, que reduz a produção de biomassa. Portanto, é necessária a identificação e seleção de espécies tolerantes à luminosidade sem perdas de produtividade (BECKER, 1994).

Além das variáveis físico-químicas, o perfil genético também regula a síntese de lipídeos. Entre diferentes espécies e linhagens de uma mesma espécie, a síntese lipídica pode variar enormemente tanto quantitativa quanto qualitativamente (MENG et al., 2009). E neste aspecto, é preciso saber quais tipos de ácidos graxos são sintetizados pelas células. O comprimento da cadeia carbônica dessas moléculas, aliado ao grau de sua insaturação, afetam propriedades finais do biodiesel, tais como fluidez, vulnerabilidade à oxidação e emissão de NO_x após sua queima (DURRENT; BENNING; OHLROGGE, 2008).

Agregados a estas variações, há mecanismos metabólicos, ativados por condições ambientais específicas, que podem desencadear o catabolismo das reservas de triglicerídeos. Cohen et al. (2000) estudaram a microalga *Porphyridium cruentum* e reportaram descréscimo dos triglicerídeos quando as culturas foram expostas a baixas temperaturas. De acordo com os autores, os triglicerídeos nas microalgas, além de reserva energética, atuam como reserva de ácidos graxos poli-insaturados, e o estresse térmico levaria à quebra dos triglicerídeos e à síntese de lipídeos de membrana a partir destes ácidos graxos.

O consórcio de algas com bactérias também modifica o crescimento de culturas. Na revisão de de-Bashan et al. (2008), são citadas bactérias promotoras do crescimento de microalgas, tais como *Pseudomonas diminuta* e *Pseudomonas vesicularis.* Ambas foram isoladas de bancos de culturas algais, inoculadas em culturas de *Scenedesmus bicellularis* e *Chlorella* sp., o que favoreceu seus crescimentos.

Embora apresente vantagens de produtividade em relação às culturas terrestres tradicionais (HU et al., 2008, WANG et al., 2008, RITTMANN, 2008; YOO et al., 2010), a produção de biodiesel de microalgas ainda não é ambientalmente e economicamente favorável, apesar de todos os esforços despendidos nesta área de pesquisa.

Ánalises do Ciclo de Vida de sistemas de cultivo de microalgas sugerem que é possível baratear custos de produção e mitigar agravantes ambientais, decorrentes da produção de biodiesel de microalgas, pela adoção de sistemas de cultivo acoplados ao tratamento de águas residuárias (CLARENS et al., 2010). Segundo estes autores, nitrogênio e fósforo estão disponíveis no efluente e não há o custo adicional de sua obtenção, balanceando favoravelmente o sistema produtivo. Esta medida é relatada como essencial à redução de demanda de energia externa e à reciclagem de nutrientes minerais (LARDON et al., 2009). Além disso, há processo de biorremediação pela absorção de nutrientes pelas microalgas (HU et al., 2008), que geram biomassa com valor econômico oferecendo valiosa alternativa de tratamento de efluentes (CRAGGS, 1997). A implantação de Mecanismo de Desenvolvimento Limpo a esta cadeia produtiva também pode agregar créditos de

carbono ao sistema (MENG et al., 2009) e, em conjunto com as demais medidas descritas, viabilizar o almejado modelo de plantas industriais que funcionem como biorrefinarias.

O estudo de microalgas em processos biológicos de tratamento de águas residuárias, incluindo vinhaça da fermentação de cana-de-açúcar, ocorre há algumas décadas (OSWALD, 1988; OLIVEIRA, 1988; BELTRÃO, 1992; VALLDERAMA, 2002). Recentemente, essa linha de pesquisa foi direcionada para o cultivo sustentado de microalgas oleaginosas em águas residuárias, no qual a biomassa gerada pode ser matéria-prima alternativa para produção de óleos e biodiesel (ÓRPEZ et al., 2009; WOERTZ et al., 2009; PITTMAN; DEAN; OSUNDEKO, 2011; DEVI; SUBHASH; MOHAN, 2012).

Com a crescente produção de bioetanol no país e a geração de 10 a 14 litros de vinhaça como resíduo por litro de etanol produzido, é urgente a necessidade de manejá-la adequadamente nas usinas sucroalcooleiras. A riqueza de nutrientes minerais e compostos orgânicos da vinhaça, que variam de monossacarídeos a açúcares complexos e ácidos orgânicos, já foi explorada para cultivo de microrganismos, tais como fungos (NITAYAVARDHANA; KHANAL, 2010) e microalgas (OLIVEIRA, 1988; ÖZTÜRK; DEMIR, 2001), que poderiam aproveitar a natureza orgânica da vinhaça para serem cultivadas em sistemas mixotrófico e heterotrófico.

Por ser um gênero metabolicamente versátil, *Chlorella* tem ativas as vias fototrófica, heterotrófica e mixotrófica (LIANG; SARKANY; CUI, 2009) e possui estratégias ecológicas que garantem sua presença em ambientes aquáticos com diversas configurações, inclusive eutrofizados (REYNOLDS, 1988). Essas características lhe conferem vantagens competitivas e rápido crescimento em águas residuais, tornando-o excelente candidato à produção de biodiesel em biorrefinarias.

Embora a produção de biomassa de *Chlorella* em águas residuárias seja efetiva, não há estudos direcionados à produção de lipídeos pelo gênero em vinhaça. As pesquisas neste efluente estiveram centradas na produção de biomassa para reaproveitamento de proteínas ou biosorção de nitrogênio e fósforo. A seleção e otimização do cultivo de microalgas em águas residuárias é uma das áreas da pesquisa em biodiesel que carece de estudos (BRENNAN, OWENDE, 2010).

Desta forma, a proposta deste projeto de pesquisa foi selecionar cepas potencialmente oleaginosas de *Chlorella* spp. e otimizar seu cultivo em meio sintético e vinhaça visando ao aumento de produtividade de biomassa oleaginosa e tratamento do efluente.

3. OBJETIVOS

A hipótese desta pesquisa foi baseada na premissa de que vinhaça é um substrato adequado ao cultivo de *Chlorella* spp., devido à sua composição, rica em nutrientes e compostos orgânicos, ter perfil necessário ao crescimento da microalga via mixotrofia, que é uma das rotas metabólicas mais utilizadas para otimizar a produtividade de biomassa oleaginosa. Partindo-se desta premissa, o plano de desenvolvimento da pesquisa baseou-se na divisão em três etapas, cujos objetivos centrais (em itálico) e secundários estão descritos a seguir.

ETAPA 1 – *Isolar, aclimatar e selecionar cepas oleaginosas de* Chlorella.

- isolar microalgas do gênero *Chlorella* de diversos ambientes aquáticos buscando diversidade de cepas;
- aclimatar amostras ambientais à vinhaça para selecionar cepas robustas e tolerantes às condições de cultivo nesta água residuária;
- selecionar cepas potencialmente oleaginosas de *Chlorella* utilizando ferramentas químicas de indução de síntese e acúmulo intracelular de lipídeos neutros;

ETAPA 2 – *Otimizar o cultivo de cepas de* Chlorella *potencialmente oleaginosas.*

- investigar fatores químicos, físicos e tróficos associados ao aumento de produtividade de biomassa oleaginosa;
- ajustar o meio de cultura às condições necessárias à otimização;
- planejar e executar experimentos de otimização visando ao aumento de produtividade de biomassa oleaginosa;

ETAPA 3 – *Adequar vinhaça ao cultivo otimizado de* Chlorella *potencialmente oleaginosa visando produtividade de biomassa e remoção de nutrientes.*

- caracterizar física e quimicamente vinhaça coletada de usina de bioetanol;
- adequar a vinhaça ao cultivo de *Chlorella*;
- planejar e executar experimentos de otimização do cultivo de *Chlorella* em vinhaça amparados pelos resultados obtidos na Etapa 2;
- realizar o cultivo de cepas potencialmente oleaginosas em média escala (8 L) e comparar suas produtividades nas condições basais e otimizadas;
- avaliar a remoção de nutrientes pelas culturas e o perfil bioquímico da biomassa produzida.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. FLUXOGRAMA EXPERIMENTAL

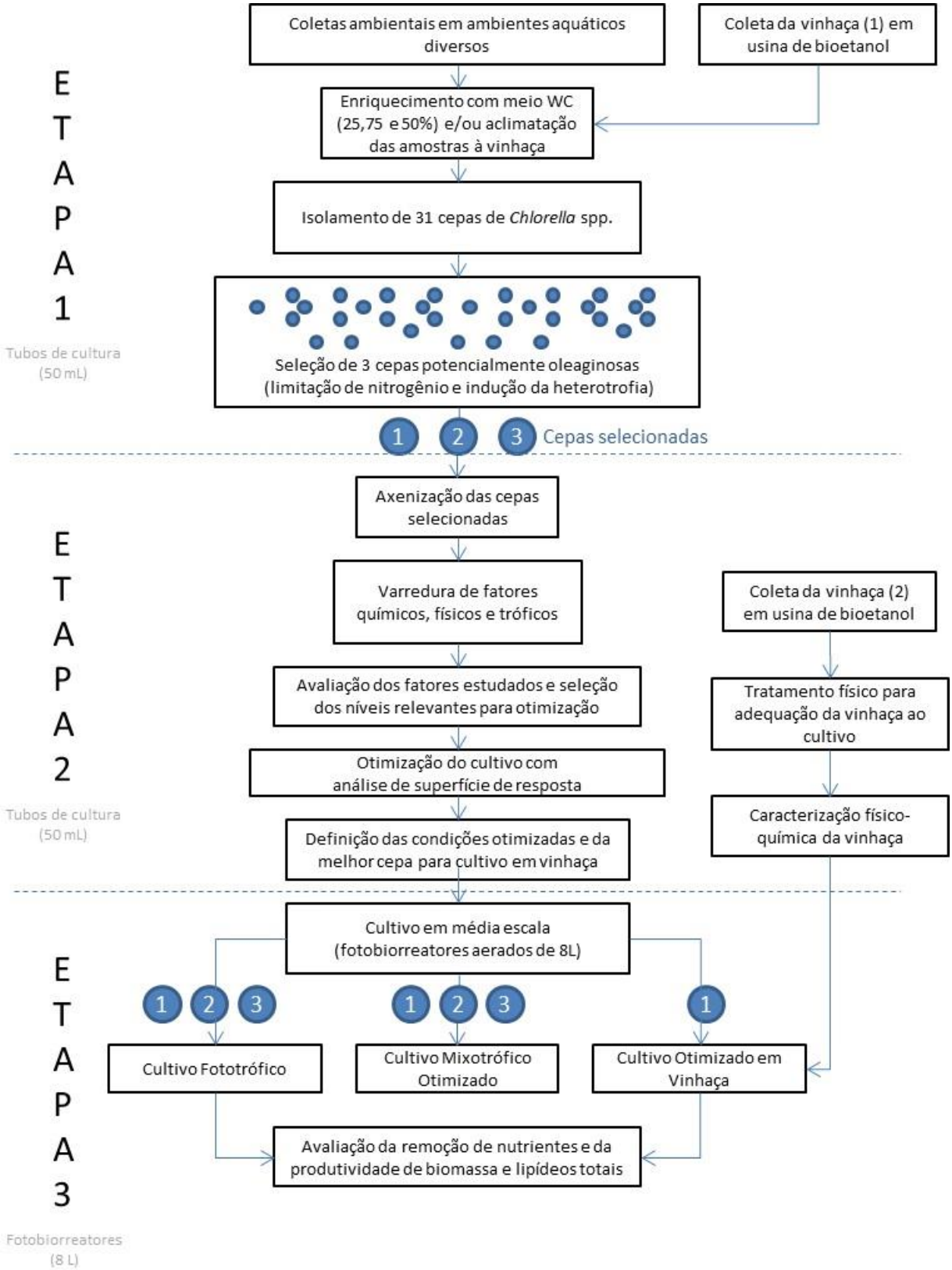

Figura 1 – Fluxograma experimental das principais etapas e atividades da pesquisa.

4.2. ETAPA 1 – Isolamento, aclimatação e *screening* de cepas oleaginosas

4.2.1. Amostragem de vinhaça

Foram realizadas duas campanhas de coleta de vinhaça, uma para isolamento de microalgas e outra para coleta do efluente a ser utilizado nos experimentos de cultivo.

Na primeira campanha, realizada em junho/2010 na Usina Santa Adélia, Jaboticabal-SP, coletou-se amostra de vinhaça (2 L) de lagoa de retenção do resíduo, para fins de isolamento de microalgas.

Na segunda, realizada em novembro de 2011, vinhaça foi obtida da Usina Serra, localizada no município de Ibaté – SP (15 Km de São Carlos), e operada pelo grupo Raízen. Foram amostrados 50 L de vinhaça de um duto de coleta logo após o processo de destilação e resfriamento do resíduo até 60 ºC (informação técnica pessoal). A amostra foi transportada até o laboratório de Biotoxicologia de Águas Continentais e Efluentes em tambor de plástico e o volume total foi dividido em alíquotas de 2 L que foram congeladas (-20 ºC) até o uso.

4.2.2. Amostragem de ambientes aquáticos

Amostras coletadas de ambientes de água doce (tanque de vinhaça, lagos, tanques de abastecimento, lagoas de estabilização e outros) foram separadas em duas frações. Uma foi fixada com 5% de formaldeído-40% (SANT'ANNA, 2006) para posterior identificação da comunidade fitoplanctônica. Outra foi levada a fresco ao laboratório e enriquecida com meio WC (Tabela 1) (GUILLARD; LORENZEN, 1972) nas diluições de 25%, 50% e 75% para favorecer a diversidade de espécies fitoplanctônicas. Estas frações foram mantidas em sala climatizada de cultivo (24 ºC, 60 µmol fótons m^{-2} s^{-1}, fotoperíodo 12h/12h) para posterior isolamento das microalgas do gênero *Chlorella* conforme item 4.2.5.

4.2.3. Ensaios de aclimatação

Parte das amostras coletadas de ambientes aquáticos foi submetida a ensaios de aclimatação à vinhaça, visando selecionar cepas de *Chlorella* tolerantes ao efluente. Em frascos Duran de 500 mL, foram inoculados 20 mL de amostra ambiental em 180 ml de meio WC (pH 8,0 tamponado com 250 mg L^{-1} TRIS) contendo, respectivamente, 1%, 2%, 5% e 10% de vinhaça no primeiro, segundo, terceiro e quarto mês de repique e incubação. Os ensaios foram mantidos em sala climatizada de cultivo (24 ºC, 60 µmol fótons m^{-2} s^{-1} e fotoperíodo 12h/12h).

Tabela 1 - Composição do meio WC (GUILLARD; LORENZEN, 1972)

Reagente	Reagente (mg L^{-1})	Elemento (mg L^{-1})	Elemento (µM)
$CaCl_2$ $2H_2O$	36,76	10,019 mg Ca	250
$MgSO_4$. $7H_2O$	36,97	3,65 mg Mg	150
$NaHCO_3$	12,6	9,15 mg HCO_3	150
K_2HPO_4	8,71	1,55 mg P-PO_4	50
$NaNO_3$	85,01	14 mg N-NO_3	1000
Na_2SiO_3. $9H_2O$	28,42	2,81 mg Si	100
Na_2. EDTA	4,36	-	11,7
$FeCl_3$. $6H_2O$	3,15	0,65 mg Fe	11,7
$CuSO_4$. $5H_2O$	0,01	2,5 µg Cu	0,04
$ZnSO_4$. $7H_2O$	0,022	5,0 µg Zn	0,08
$CoCl_2$. $6H_2O$	0,01	2,5 µg Co	0,05
$MnCl_2$. $4H_2O$	0,18	0,05 mg Mn	0,9
Na_2MoO_4. $2H_2O$	0,006	2,5 µg Mo	0,03
H_3BO_3	1,00	0,17 mg B	16
Tiamina	0,1 mg L^{-1}		
Biotina	0,5 µg L^{-1}		
Vitamina B12	0,5 µg L^{-1}		

4.2.4. Análise qualitativa e quantitativa da comunidade fitoplanctônica

A contagem e identificação de células das amostras ambientais e dos experimentos de aclimatação foram realizadas utilizando-se método descrito por Uthermöhl (1958), que consiste na distribuição aleatória da amostra em câmaras de sedimentação, as quais foram observadas em microscópio invertido (Olympus, CKX41), em aumento de 400x. O número de organismos por unidade de volume foi calculado segundo APHA (2005).

Para a identificação, foram utilizadas chaves de identificação e bibliografias específicas.

4.2.5. Isolamento e propagação das microalgas

Uma vez identificadas na comunidade fitoplanctônica das amostras ambientais e no final dos ensaios de aclimatação, as células de *Chlorella* foram isoladas pelo método de diluições em série ou esgotamento em placas de Petri (HOSHAW; ROSOWSKI, 1973) contendo meio WC solidificado com 1% de ágar. Após incubação de aproximadamente um mês, as colônias formadas nas placas foram observadas em microscópio invertido (Olympus, CKX41) e as cepas de *Chlorella* identificadas foram isoladas com agulha estéril e semeadas em tubos de cultura contendo meio WC líquido. As cepas foram mantidas em sala climatizada de cultivo (24 ºC, 60 µmol fótons m^{-2} s^{-1}, fotoperíodo 12h/12h)

do banco de microalgas e cianobactérias do Laboratório de Biotoxicologia de Águas Continentais e Efluentes.

4.2.6. Seleção (*screening*) de cepas potencialmente oleaginosas

Após isolamento das cepas de *Chlorella*, elas foram novamente estriadas e purificadas em placas de Petri contendo meio WC solidificado para reduzir contaminação bacteriana e sua interferência nos ensaios de *screening*.

Os ensaios foram planejados para induzir acúmulo de lipídeos neutros frente a dois fatores amplamente utilizados e reportados na literatura: limitação de nitrogênio no meio de cultura e indução da heterotrofia.

O cultivo foi realizado em triplicata, em tubos de cultura de vidro de 50 mL, com tampa rosqueável destravada para permitir trocas gasosas, contendo 20 mL de meio WC líquido previamente autoclavado (121 ºC, 20 minutos) e com pH ajustado para 8,2. Os tubos foram incubados em temperatura de 24 ºC, luz de 60 µmol fótons m^{-2} s^{-1} e fotoperíodo de 12h/12h por período de vinte dias. Todos os tubos foram mantidos em incubadora com fotoperíodo BOD 411D (Nova Ética).

Para limitação de nitrogênio, a concentração de $N\text{-}NO_3$ do meio WC líquido foi reduzida de 14 mg L^{-1} (1000 µM) para 7 mg L^{-1} (500 µM), definidos após estudos de assimilação reportados no item 5.1.

Para indução da via heterotrófica, cepas de *Chlorella* foram cultivadas em meio WC líquido por 18 dias. Neste ponto, 5g L^{-1} de glicose foram adicionados aos tubos de cultura, que permaneceram no escuro até o 20º dia de cultivo. Esta estratégia foi utilizada porque, nesta etapa da pesquisa, as cepas ainda não eram axênicas e, em estudos prévios, a adição de glicose no início do cultivo favoreceu o crescimento de bactérias, que sobrepunham o crescimento de *Chlorella*.

No 20º dia, o cultivo nas duas condições foi interrompido e as culturas foram tratadas com corante Vermelho do Nilo para determinação da fluorescência dos lipídeos neutros em fluorômetro 10AU (Turner Designs), conforme protocolo de fluorescência desenvolvido e adaptado de Chen, Sommerfeld e Hu (2011).

Tubos de 50 mL contendo suspensão de cultura de *Chlorella* foram ajustados com água destilada para o mesmo valor de absorbância em espectrofotômetro DR4000 (HACH), a fim de normalizar as concentrações de biomassa. Para a etapa 1 da pesquisa, foi adotada absorbância de 0,5 para normalização ao passo que, nas etapas 2 e 3, foi adotada absorbância de 0,2 para normalização. Os reagentes e procedimentos do protocolo estão descritos a seguir:

REAGENTES:

- Solução de corante Vermelho do Nilo (100 µg/mL em acetona);
- DMSO (padrão analítico);
- Solução de algas com absorbância ajustada entre 0,1 e 0,5 (683 nm);
- Água deionizada ou ultrapura;

MÉTODO:

PARA VOLUME FINAL DE 20 mL:

- Reservar 18 mL de solução de algas em tubos de cultura, com absorbância previamente ajustada com água deionizada, em espectrofotômetro;
- Adicionar 1,8 mL de DMSO e agitar com vortex;
- Levar ao micro-ondas por 1,5 minutos em potência 60% (temperatura não pode ultrapassar 40°C conforme recomendações de Chen, Sommerfeld e Hu (2011));
- Adicionar 200 µL da solução Vermelho do Nilo e agitar com vortex;
- Levar ao micro-ondas por 1,5 minutos em potência 60% (temperatura da solução não pode ultrapassar 40 °C conforme recomendações de Chen, Sommerfeld e Hu (2011));
- Aguardar 1 hora (manter amostras no escuro) e efetuar a leitura em fluorômetro equipado com filtros de excitação e emissão de 490 nm e 580 nm, respectivamente;
- Observação importante: a quantidade de tubos e volume de meio em cada tubo deve ser constante e padronizada em todos os ciclos de aquecimento no micro-ondas para evitar sob ou superaquecimento das amostras. Padronizar o número de tubos necessários para que a temperatura não ultrapasse os 40 °C e adotá-la em todas as análises efetuadas.
- Micro-ondas utilizado neste protocolo: modelo Maxi, 1,4 KW de potência, 30 L de capacidade (Brastemp).

4.3. ETAPA 2 – Varredura de fatores e otimização do cultivo

4.3.1. Axenização das cepas de *Chlorella*

O protocolo de axenização executado foi adaptado pela modificação dos métodos propostos por Stein (1973) e Andersen (2005).

As cepas selecionadas nos ensaios de *screening* foram axenizadas com a utilização de antibióticos e fungicidas (anfotericina, 2,5 µg mL^{-1}; estreptomicina, 25 µg mL^{-1}; penicilina 100 µg mL^{-1}; gentamicina, 25 µg mL^{-1}). As soluções de antibióticos foram preparadas individualmente e esterilizadas por filtração através de membrana estéril (Sartorius, 0,2 µm) em capela de fluxo laminar. Após adição dos antibióticos em tubos de cultura de 10 mL contendo 5 mL de meio WC líquido previamente autoclavado, as cepas foram inoculadas e incubadas (24 ºC, 60 µmol fótons m^{-2} s^{-1}, fotoperíodo 12h/12h) por períodos de 12h, 24h, 48h e 72h.

Em cada período, alíquota de 500 µL foi retirada e inoculada em tubo de cultura de 10 mL contendo 5 mL de meio WC estéril enriquecido com 1g L^{-1} de peptona e glicose. Os tubos foram incubados por sete dias (24 ºC, 60 µmol fótons m^{-2} s^{-1}, fotoperíodo 12h/12h) e naqueles em que não houve turvação, foi realizada análise microscópica para confirmação da axenização.

4.3.2. Calibração das curvas de absorbância e sólidos

Nesta etapa da pesquisa, adotou-se a estimativa de biomassa baseada na relação entre leitura espectrofotométrica a 683 nm (pico da clorofila *a* selecionado após varredura) e medida de

sólidos totais (APHA, 2005) como metodologia para monitoramento do crescimento das culturas nos tubos. Para cada cepa selecionada, foram construídas suas respectivas regressões lineares entre absorbância e biomassa, conforme Figura 2.

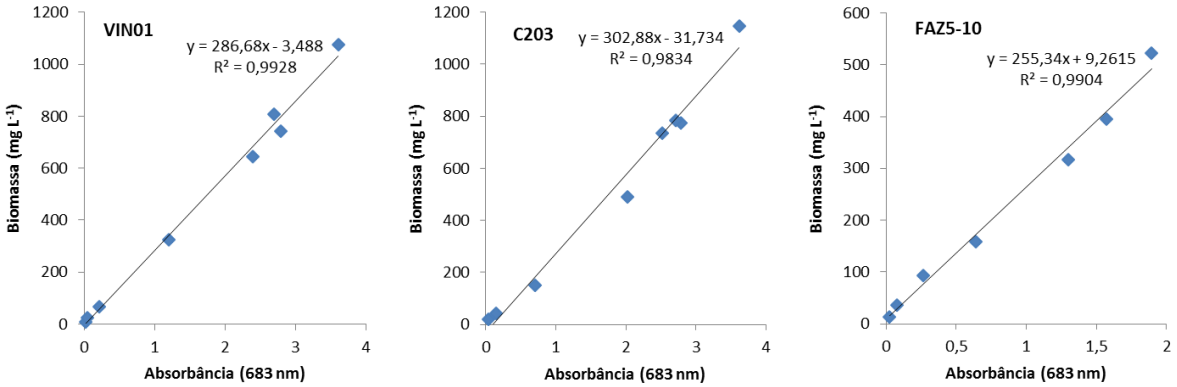

Figura 2 – Regressões entre sólidos suspensos totais e absorbância (683 nm) para as cepas de *Chlorella* VIN01, C203 e FAZ5-10 selecionadas na etapa de *screening*.

4.3.3. Varredura de fatores químicos, físicos e tróficos

Para encontrar os fatores adequados à otimização das culturas das cepas selecionadas nos ensaios de *screening*, foram delineadas três frentes de estudos: frente química, frente física e frente trófica. Os fatores e níveis investigados em cada frente foram estudados isoladamente e estão dispostos na Tabela 2.

Na frente química, buscaram-se simular algumas das propriedades químicas da vinhaça para investigar seus efeitos no crescimento das cepas de *Chlorella*, tais como elevadas concentrações de $N\text{-}NH_4^+$ (forma iônica de nitrogênio predominante na vinhaça), tolerância a elevadas concentrações de micronutrientes (até 50 vezes maiores do que o WC), respostas às concentrações elevadas de bicarbonato (que poderia ser subproduto da respiração devido ao metabolismo mixotrófico) e pH variado (acidez da vinhaça).

Tabela 2 – Fatores e níveis investigados nas frentes química, física e trófica visando à otimização dos parâmetros de crescimento de cepas de *Chorella* spp.

Frentes e fatores	Níveis
Química	
Relação N:P (M)	20:1 a 1:1
$N\text{-}NO_3$ (mg L^{-1})	1,4 (100 µM) a 14 (1000 µM)
$N\text{-}NH_3$ (mg L^{-1})	1,4 (100 µM) a 140 (10000 µM)
Micronutrientes (WC)	0,1 a 50
Bicarbonato (mg L^{-1})	9,15 (0,15mM) a 1464 (24 mM)
pH	5,2 a 11,2
Trófica[A]	
Glicose (mg L^{-1})	0,02 a 50
Frutose (mg L^{-1})	0,02 a 50
Sacarose (mg L^{-1})	0,2 a 50
Etanol (mg L^{-1})	0,2 a 10
Glicerol (mg L^{-1})	0,2 a 10
Ácidos orgânicos (mg L^{-1})	0,4
Ácido acético (mg L^{-1})	0,04 a 10
Física	
Percentual de Inóculo (%)	5 a 50
Luz (µmol fótons m^{-2} s^{-1})	60 a 1000
Temperatura (°C)	20 a 40

A – Exceto pela glicose e frutose, as demais substâncias foram esterilizadas por filtração (0,2µm) para evitar degradação térmica dos compostos orgânicos.

Na frente trófica, procurou-se explorar a diversidade de metabolismos das cepas para assimilação de fontes variadas de carbono orgânico do cultivo mixotrófico. Elas estão frequentemente presentes em águas residuárias, tal como a vinhaça, além do glicerol, que é resíduo da fabricação de biodiesel e poderia ser utilizado como substrato para cultivo de microalgas.

Na frente física, fixou-se a condição ótima encontrada no cultivo mixotrófico para explorar o efeito de luz, temperatura e percentual de inóculo na otimização do cultivo.

Todos os experimentos desta etapa foram realizados em batelada, em tubos de cultura de vidro de 50 mL com tampa rosqueável e contendo 20 mL de cultura axênica (Figura 3). Foi utilizado meio WC líquido modificado à necessidade de cada frente investigada. A condição de cultivo basal fototrófica, ou referida como "controle" nos experimentos, foi de 24 ºC, 60 µmol fótons m^{-2} s^{-1}, fotoperíodo 12h/12h e meio WC estéril tamponado com 250 mg L^{-1} de Tris ajustado para pH 8,2.

Os experimentos foram mantidos em incubadora com fotoperíodo BOD 411D (Nova Ética) e a radiação fotossinteticamente ativa na superfície dos tubos e fotobiorreatores foi determinada com sensor de quantum LI-190 acoplado a Data Logger LI-1400 (LI-COR Biosciences).

Figura 3 – Tubos de cultura com suspensão de microalgas incubados em experimento de varredura.

4.3.4. Otimização do cultivo com DCCR

Adotou-se o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) como método de planejamento experimental para otimizar culturas das cepas selecionadas na fase de *screening*. Fatores e níveis adotados nesta etapa da pesquisa basearam-se nas melhores respostas dos parâmetros de crescimento, frente aos fatores investigados na etapa de varredura.

O DCCR executado foi baseado na exploração de planejamento fatorial completo 2^2 adicionado de quatro pontos axiais e um central, totalizando 9 pontos experimentais (Figura 4). Este tipo de planejamento otimiza não somente as respostas da variável em estudo como também a execução física do experimento, já que diminui o número de experimentos previstos no planejamento de pesquisa. No entanto, é preciso ter conhecimento prévio dos fatores investigados para que as respostas ótimas da variável em estudo possam ficar situadas na região central do experimento.

Todos os pontos experimentais foram executados em triplicata, exceto o ponto central, no qual se executaram 12 repetições para calcular com maior precisão o erro puro, que está associado a problemas experimentais. Desta forma, cada DCCR foi composto de 36 unidades experimentais.

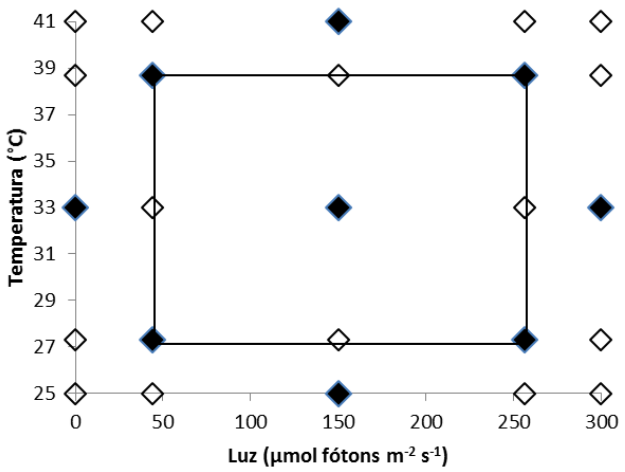

Figura 4 – Representação de DCCR executado para duas das cepas selecionadas na etapa de *screening*. Pontos pretos representam os pontos executados no DCCR. Pontos pretos ligados por linhas representam o fatorial 2^2 do DCCR adicionados de um ponto preto central e quatro pontos pretos axiais, totalizando 9 pontos experimentais. Pontos brancos representam pontos totais, caso o planejamento fatorial fosse completo e com 5 níveis (5^2 = 25 pontos experimentais).

Os fatores e níveis investigados no cultivo mixotrófico de cada cepa e previstos pelo DCCR estão dispostos na Tabela 3.

Tabela 3 – Fatores e níveis investigados nos experimentos planejados com DCCR.

Cepas e fatores	Níveis codificados e reais				
	-1,4142	**-1**	**0**	**1**	**1,4142**
VIN01 e C203					
Temperatura (°C)	25	27,3	33	38,7	41
Luz (µmol fótons m^{-2} s^{-1})	0	44	150	256	300
FAZ5-10					
Temperatura (°C)	25	26,9	31,5	36,1	38
Luz (µmol fótons m^{-2} s^{-1})	0	44	150	256	300

Os resultados dos experimentos foram avaliados e validados com análise de variância (ANOVA) e as superfícies de resposta do modelo quadrático preditivo foram traçadas para determinar-se a faixa ótima de cultivo das cepas. O modelo preditivo foi validado em sua região ótima com experimentos em tubos de ensaio (n=5) e posterior comparação da variável resposta pesquisada (μ_{max}). Foi utilizado o software Statistica 12 para planejamento e análise dos resultados.

A cepa com os melhores parâmetros de crescimento no cultivo mixotrófico otimizado foi selecionada para o cultivo em vinhaça.

O meio WC foi modificado para cada cepa em estudo e adotado como padrão para o cultivo mixotrófico otimizado do DCCR. Todos os experimentos desta etapa foram realizados em batelada, em tubos de cultura de vidro de 50 mL com tampa rosqueável e contendo 20 mL de cultura axênica (Figura 5).

Figura 5 – Gradientes de luz criados para realização dos experimentos de otimização.

4.4. ETAPA 3: Cultivo em média escala (8L)

4.4.1. Cultivos fototrófico, mixotrófico otimizado em meio sintético e otimizado em vinhaça

Fotobiorreatores de 9L de vidro (Pyrex) contendo 8L de cultura axênica aerada (ar esterilizado com membranas de filtração de 0,2 µm, Sartorius, vazão de 0,5 L volume ar/volume meio por minuto) foram utilizados para simular as condições de cultivo fototrófico, mixotrófico otimizado e otimizado em vinhaça (Figura 6) encontradas nos tubos de ensaio.

Devido ao aumento de volume, o meio WC basal e WC modificado para otimização foram autoclavados nos fotobiorreatores por 70 minutos (121 °C). Para vinhaça, utilizou-se fotobiorreator vazio previamente esterilizado (20 minutos, 121 °C), que foi posteriormente preenchido, em capela de fluxo laminar, com vinhaça estéril tratada (item 4.4.2).

Amostras de culturas foram coletadas, em condições assépticas, em períodos de 0,5 a 1 dia, e submetidas às análises físico-químicas e de monitoramento da biomassa.

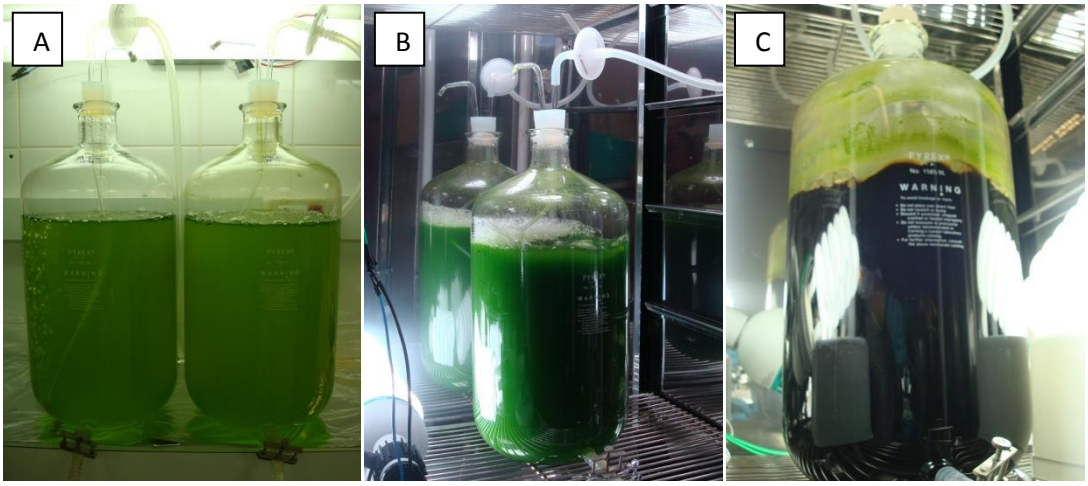

Figura 6 – Fotobiorreatores utilizados para o cultivo fototrófico (A), mixotrófico otimizado (B) e otimizado em vinhaça (C) na Etapa 3 da pesquisa.

4.4.2. Tratamento físico da vinhaça para adequação ao cultivo otimizado

Vinhaça bruta foi tratada por centrifugação e filtrações através de membrana (1,2, 0,45 e 0,2 µm) para remover a elevada concentração de sólidos suspensos totais do efluente e esterilizá-lo. A presença de sólidos suspensos teria interferência direta nos métodos de quantificação da biomassa de *Chlorella*, caso não fossem removidos.

Após série de testes em diferentes velocidades de centrifugação, foi fixado o tempo de 10 minutos e velocidade de 11000 rpm para remoção de sólidos grosseiros suspensos. Na sequência, a amostra foi filtrada através de membranas estéreis (0,45 e 0,2 µm), em condições assépticas, para garantir esterilização do meio e assegurar o crescimento axênico da cultura de *Chlorella*. O pH da vinhaça foi ajustado para 9,2 com solução de NaOH 6M.

4.4.3. Análises físico-químicas do meio WC e da vinhaça

As variáveis físico-químicas necessárias à adequada caracterização do meio de cultura sintético e vinhaça foram mensuradas conforme metodologia descrita na Tabela 4.

Para as análises espectrofotométricas foi utilizado espectrofotômetro DR4000 (HACH) equipado com luz UV. Para as análises de NTK e N-NH_4 foi utilizado sistema Buchii automatizado (Digestor automático K-438, Unidade Kjeldahl Automática K-370 e Scrubber B 414). Para as medidas de oxigênio dissolvido, pH e condutividade foram utilizados oxímetro DM4 (Digimed), pHmetro TEC-2mp (Tecnal) e condutivímetro DM-32 (Digimed).

Análises de ácidos orgânicos, carboidratos e álcoois constituintes da vinhaça foram realizadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) em um sistema SHIMADZU® do Laboratório de

Processos Biológicos (LPB) da EESC – USP seguindo protocolo desenvolvido por Penteado, Adorno e Zaiat (2012).

Tabela 4 - Variáveis físico-químicas e seus respectivos métodos de análise e referências.

Variáveis	Métodos	Referência
Temperatura (^{0}C)	Termo-resistivo	-
Oxigênio Dissolvido (mg.L^{-1})	Potenciométrico	-
pH	Potenciométrico	-
Condutividade (µS.cm^{-1})	Potenciométrico	-
SST, SSI e SSO	Gravimétrico - Método 2540D e 2540E	APHA (2005)
P-Total	Espectrofotométrico - Método 4500P B - Digestão com perssulfato	APHA (2005)
P-PO_4	Espectrofotométrico - Método 4500P E – Ácido ascórbico	APHA (2005)
NTK	Método 4500N C – Digestão com perssulfato e Método 4500Norg –	APHA (2005)
N-NO_3	Espectrofotométrico Ultravioleta – Método 4500NO_3 B	APHA (2005)
N-NH_4	Método 4500NH_3 B – Destilação e Método 4500NH_3 C – Titulométrico	APHA (2005)
Carbono orgânico total (COT),	Método 5310 B - Combustão à alta temperatura	APHA (2005)
DBO_5 (mg L^{-1})	Método 5210B – Teste do quinto dia	APHA (2005)
DQO (mg L^{-1})	Colorimétrico – Método 5220D – Refluxo fechado	APHA (2005)
Série de metais	Espectrofotometria de Absorção Atômica	APHA (2005)
Carboidratos totais e glicose	Método espectrofotométrico	Dubois et al.

SST: sólidos suspensos totais; SSI: sólidos suspensos inorgânicos; SSO: sólidos suspensos orgânicos; P-Total: fósforo total; P-PO_4: ortofosfato; NTK: nitrogênio total Kjeldahl; N-NO_3: nitrato; N-NH_4: nitrogênio amoniacal; DBO_5: demanda bioquímica de oxigênio no quinto dia; DQO: demanda química de oxigênio.

4.4.4. Determinação da biomassa e análises bioquímicas

A biomassa das culturas, na etapa 3, foi monitorada por determinação de sólidos suspensos totais (APHA, 2005) e clorofila *a* (NUSH, 1980 modificado por NEDERLANDSE NORM, 1981).

No cultivo em vinhaça, o método para sólidos suspensos totais foi modificado devido à interferência de componentes orgânicos do efluente nas membranas de filtração. Alíquotas da cultura foram previamente centrifugadas em centrífuga de bancada 5204R (Eppendorf) por 5 minutos a 4000 rpm. O sobrenadante foi descartado e a biomassa peletizada foi enxaguada com água destilada, em volume semelhante ao da amostra inicial. Repetiu-se a centrifugação e o enxague por mais um ciclo e a amostra foi submetida à análise de Sólidos Suspensos Totais (APHA,2005) e clorofila *a* (NUSH, 1980 modificado por NEDERLANDSE NORM, 1981).

Para caracterização bioquímica da biomassa, culturas na fase estacionária de *Chlorella* foram retiradas dos reatores de 8L e centrifugadas em frascos Nalgene de 1L por 45 minutos e 4000 rpm, em centrífuga de chão de baixa rotação Sorvall RC 3BP+ (Thermo Scientific). A biomassa peletizada foi acondicionada em cadinho de porcelana e seca em estufa à temperatura de 60 ºC por 24 horas. A biomassa seca foi macerada e congelada em frascos de vidro (-20 ºC) para análises posteriores do perfil bioquímico.

Análises bioquímicas de proteínas, carboidratos, lipídeos totais e cinzas foram realizadas, respectivamente, pelo método do NTK (APHA,2005) com fator de conversão para proteínas de 4,71

sugerido para microalgas (LOURENÇO et al., 2007), método do fenol (DUBOIS et al. 1956), método adaptado de Folch, Lees e Stanley (1957) e cinzas (sólidos suspensos inorgânicos) (APHA, 2005). As porcentagens dessas substâncias foram calculadas em relação à biomassa seca.

O protocolo adaptado de Folch, Lees e Stanley (1957) para extração e determinação de lipídeos totais foi estabelecido após sucessivos testes com diversos solventes e agentes de lise celular.

Materiais:

- 100 mg de biomassa de microalga seca (60 °C por 24 horas ou liofilizada);
- cadinho de porcelana com superfície rugosa e pistão;
- Solução de clorofórmio:metanol (2:1) padrão analítico;
- Solução salina (NaCl 0,73%);
- Tubos de centrífuga de 10 mL.
- Vortex e centrífuga
- Pipeta Pasteur de vidro
- Frascos de vidro

Método:

Etapa 1

Macerar 100 mg de biomassa de microalga seca no cadinho e enxaguar com 1 mL da solução de clorofórmio:metanol, homogeneizando a mistura com o pistão. Coletar a suspensão com pipeta Pasteur e reservar no tubo de centrífuga A. Realizar mais três enxagues do cadinho com a solução de clorofórmio:metanol até que a solução não fique mais verde ou tenha coloração clara, reservando-a no tubo A. Agitar a suspensão reservada no tubo A em vortex, por 1 minuto, e deixar em estufa (60 °C) overnight para otimizar a extração. Após a estufa, agitar novamente o tubo em vortex, por 1 minuto, e centrifugá-lo a 4000 rpm por 5 minutos para concentrar a biomassa no fundo do tubo. Coletar o sobrenadante com pipeta Pasteur e reservar em um novo tubo de centrífuga (B).

Etapa 2

Adicionar 3 mL da solução clorofórmio:metanol ao tubo A contendo resíduo da biomassa centrifugada, agitar em vortex por 1 minuto, centrifugar a 4000 rpm por 5 minutos para concentrar a biomassa no fundo do tubo. Coletar o sobrenadante com pipeta Pasteur e reservar no tubo B.

Separação das fases

No final dos ciclos de extração, o tubo B conterá 7 mL de solução clorofórmio:metanol (4 mL da Etapa 1 + 3 mL da Etapa 2). Segundo Folch (1957), o balanço final da mistura para separação das fases deve ficar em 8:4:3 (clorofórmio:metanol:água), ou seja, 24% de água. Aos 7 mL de solução no tubo B, adicionar 2,21 mL de solução salina para separação das fases. Centrifugar a 4000 rpm por 5 minutos e coletar a fase inferior com auxílio de pipeta Pasteur. Quantificar os lipídeos extraídos por gravimetria.

Reservar frascos de vidro secos (100 °C por 1 hora), resfriados em dessecador e previamente pesados. Transferir a solução da fase inferior do tubo B para um frasco de vidro, secá-lo em estufa a 60 °C por 24h para evaporação do solvente, retirá-lo da estufa e mantê-lo em dessecador com sílica até temperatura ambiente e pesá-lo novamente. Calcular a massa de lipídeos pela diferença de pesos inicial e final do frasco de vidro.

Os lipídeos totais foram submetidos à análise de Cromatografia Gasosa (GC) para caracterizar o perfil de ácidos graxos presentes nos triglicerídeos. O método de Christie (1989) foi adotado para metilação dos ácidos graxos e as análises foram realizadas em Cromatógrafo a Gás HP7820A equipado com detector por ionização de chamas. Utilizou-se coluna INNOWAX (HP) 15m x 0,25mm x 0,20μ, com gradiente de temperatura no cromatógrafo de 100 °C em 0min e incrementos de 7 °C por min até 240 °C. As análises foram realizadas no laboratório de cromatografia, do Departamento de Química da UFMG (responsável técnica, Vanny Ferraz).

4.5. CÁLCULO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS E DA PRODUTIVIDADE

Dados relativos ao crescimento das culturas (absorbância ou biomassa) foram normalizados para escala logarítmica com a equação $y=\ln(X/X_0)$, sendo X a biomassa determinada no dia de interesse de cultivo e X_0 a biomassa determinada no dia 0, conforme recomendações de Zwietering et al. (1990).

Os dados normalizados foram plotados contra o tempo e ajustados ao modelo de Gompertz:

$$y = ae^{-e^{(-k(x-x_c))}}$$

Os parâmetros obtidos pela modelagem (a, xc e k) foram utilizados no cálculo da velocidade específica máxima de crescimento μ_{max} (μ_{max}= a.k/e) e tempo de geração ($Tg=\ln 2/\mu_{max}$). O parâmetro amplitude, adotado nas comparações das curvas, referiu-se ao maior valor de crescimento final obtido pela equação $y=\ln(X/X_0)$. Nos casos em que a modelagem não se ajustou aos dados, o cálculo da μ_{max} foi realizado manualmente pela equação $\mu_{max}= \ln(X/X_0)/(t-t_0)$, em que X_0 e t_0 são biomassa e tempo inicial, X e t são biomassa e tempo final, respectivamente, da fase exponencial de crescimento.

A modelagem das curvas de crescimento foi realizada no software OriginPro 8 e as comparações estatísticas entre μ_{max}, Tg e amplitude de crescimento foram feitas com ANOVA, seguida de teste Tukey para comparações de médias. Foi adotado $p<0,05$ para indicar diferença significativa entre os parâmetros analisados. As ANOVAs foram validadas com testes de normalidade dos dados e homogeneidade das variâncias.

A produtividade de biomassa e lipídeos totais foi calculada em função da equação P=X/t, sendo "X" a produção final de biomassa ou lipídeos totais pela cultura e "t" o tempo total de cultivo.

5. RESULTADOS

5.1. ETAPA 1 – Isolamento, aclimatação e separação de cepas oleaginosas

Um dos fatores críticos encontrados durante o isolamento de microalgas de ambientes eutrofizados foi a predominância de bactérias na amostra, que dificultou o crescimento das microalgas por competirem por espaço e recursos na superfície do meio WC solidificado.

A utilização de antibióticos e antifúngicos ajudou a eliminar estes contaminantes das placas, todavia reduziu drasticamente a velocidade de crescimento e diversidade de colônias de microalgas que cresceram em meio WC solidificado. Por isso, a utilização de antibióticos e antifúngicos nesta etapa não se mostrou uma alternativa viável.

Visando reduzir a densidade de bactérias e adaptar a comunidade fitoplanctônica ambiental às condições laboratoriais, foi realizado enriquecimento das amostras em concentrações de 25%, 50% e 75% de meio WC. Somente após o crescimento da amostra nestas condições, é que foi retirada alíquota de 50 a 100 µL para plaqueamento e isolamento. Com a adaptação do método nesta fase da pesquisa, conseguiu-se o desenvolvimento de colônias diversas e com contaminação reduzida de bactérias.

A olho nu ou sob lupa, não foi possível distinguir colônias de diferentes gêneros de microalgas e, quando na placa havia dominância de um determinado grupo, não foi possível diferenciá-lo dos demais existentes. Esta característica, em particular, reduziu a eficiência do isolamento pelo fato de cepas repetidas serem repescadas sucessivamente. Para otimizar o método, foi necessário substituir a lupa pelo microscópio invertido, aliado ao uso de agulhas estéreis, para separar colônias e iniciar a purificação das microalgas. A partir de então, o microscópio invertido possibilitou identificar diferenças entre colônias na própria placa, inclusive entre colônias de cepas distintas de *Chlorella* sp. Características como crescimento de mucilagem, morfologia colonial, morfologia celular e outros aspectos foram utilizados na separação e seleção de colônias (Figura 7).

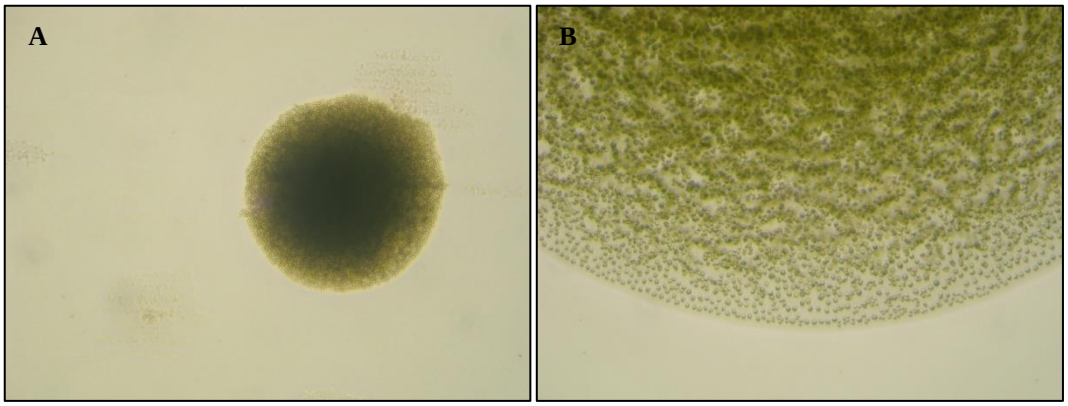

Figura 7 – Fotomicrografias de colônias de *Chlorella* spp. sob microscópio invertido. Colônia com células agregadas sem mucilagem (A) ou separadas por mucilagem (B). Aumento de 100x.

Com as duas fases de otimização mencionadas, tanto de enriquecimento quanto de utilização do microscópio invertido, e aplicação dos métodos de plaqueamento com alça de Drigalsky e estriamento com alça de platina (Figura 8), foram isoladas 124 cepas de microalgas sendo 31 cepas do gênero *Chlorella.* (Tabela 5).

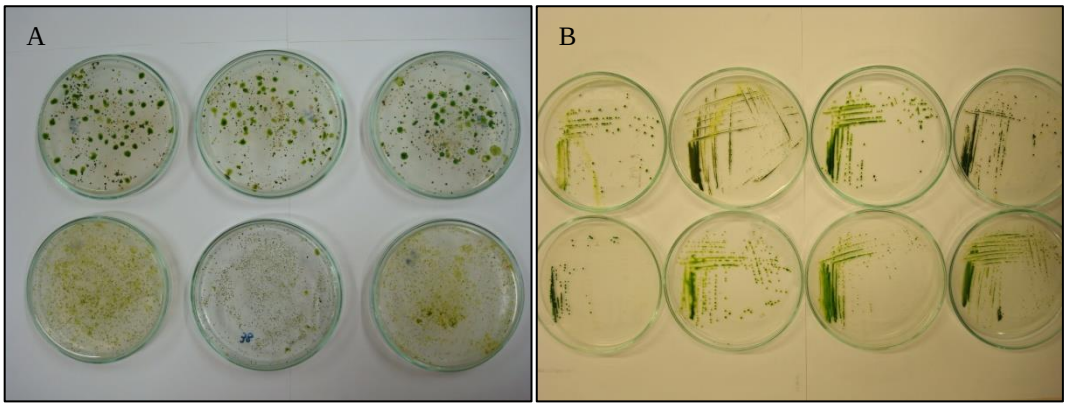

Figura 8 – Métodos de espalhamento com alça de Drigalsky (A) e alça de platina (B) utilizados na purificação de *Chlorella* spp.

Padronizados os métodos de isolamento, iniciaram-se os ensaios de aclimatação das amostras ambientais à vinhaça 10%. Destes ensaios, foram isoladas 9 cepas de *Chlorella* spp., conforme descrito na Tabela 5. Por serem cepas potencialmente tolerantes à vinhaça, foi dada atenção especial a estes isolados durante os ensaios de *screening* de cepas oleaginosas.

Tabela 5 - Relação de cepas do gênero *Chlorella* isoladas de diferentes ambientes aquáticos e depositadas no banco de microalgas do Laboratório de Biotoxicologia de Águas Continentais e Efluentes – Biotace.

Fonte	Ambiente	Coordenadas[A] (Latitude e Longitude)	Data da coleta ou número do ensaio	Código das cepas no banco de microalgas
Coletas no campo	Lagoa de estabilização de Ajapi operada pela Foz do Brasil - Rio Claro - SP	-22.284664, -47.569372	Coleta 1 (C1) – Junho/2010 Coleta 2 (C2) – Out./2010	C101, C102, C202, C203, C207
	Lago Fazenda São José – Ilicínea - MG	-20.991243, -45.862889	jul/10	FAZ05, FAZ09, FAZ11, FAZ16, FAZ19,
	Reservatório de Itupararanga - SP	-23.612284, -47.339428	Abril e Junho de 2010	ITU 20
	Lago UFSCar – São Carlos - SP	-21.985955, -47.881192	dez/09	FED01
	Lago Floresta Estadual "Edmundo Navarro de Andrade" – Rio Claro - SP	-22.41327, -47.522699	nov/10	HOR02, HOR05, HOR06, HOR09, HOR12
	Lago Parque Lago Azul – Rio Claro - SP	-22.393194, -47.56341	nov/10	LAZ05, LAZ10, LAZ13, LAZ19, LAZ20
	Lago Parque Zeca Malavazzi – Paulínia SP	-22.762797, -47.145806	dez/10	PAU02
	Lagoa de retenção de vinhaça da Usina Santa Adélia – Jaboticabal - SP	-21.336141, -48.285643	jun/10	VIN01
Ensaios de aclimatação com vinhaça 5%	Lagoa de estabilização de Ajapi – Foz do Brasil - Rio Claro - SP	-21.951733, -47.900242	1	VIN2M02
	Reservatório de Itupararanga e Lago UFSCar – São Carlos - SP		2	VINMIX02
	Reservatório de Itupararanga - SP		3	ITU5-04, ITU5-07
	Lago Fazenda São José – Ilicínea - MG		4	FAZ5-06, FAZ5-07, FAZ5-10
	Lago Condomínio Dahma – São Carlos - SP		5	DAM5-01, DAM5-04
	Lago Floresta Estadual "Edmundo Navarro de Andrade" – Rio Claro - SP		6	NA*
	Lago Parque Lago Azul – Rio Claro - SP		7	NA*
	Lago Parque Zeca Malavazzi – Paulínia SP		8	NA*

*NA – Não houve aclimatação, A – Coordenada aproximada, obtida no aplicativo Google Maps

Os ensaios de aclimatação tiveram como característica marcante elevada abundância relativa de *Chlorella* spp. nas amostras Mix, Dahma e Itupararanga (Tabela 6).

Tabela 6 – Abundância relativa de *Chlorella* spp. e outros gêneros de microalgas presentes no início (Vin 2%) e final (Vin 10%) dos ensaios de aclimatação de amostras ambientais contendo 2% e 10% de vinhaça, respectivamente.

Gênero	Abundância relativa (%)							
	Mix		Dahma		Fazenda MG		Itupararanga	
	Vin 2%	Vin 10%	Vin 2%	Vin 10%	Vin 2%	Vin 10%	Vin 2%	Vin 10%
Chlorella spp.	14,6	57,5	59,2	93,3	5,3	4,0	39,1	97,1
Outros	85,4	42,5	40,8	6,7	94,7	96,0	60,9	2,9

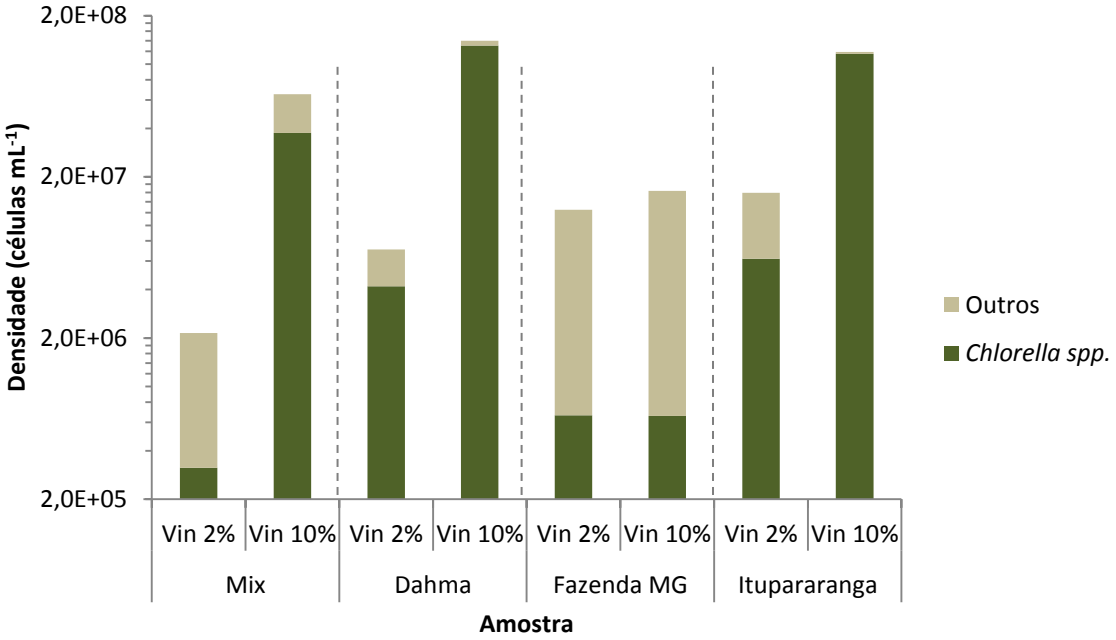

Figura 9 – Comparação entre a densidade de *Chlorella* spp. e outros gêneros de microalgas presentes no início (Vin 2%) e final (Vin 10%) dos ensaios de aclimatação contendo 2% e 10% de vinhaça, respectivamente.

Da Figura 9, duas importantes informações puderam ser extraídas. A primeira é que, reforçando os dados da Tabela 6, *Chlorella* spp. tornou-se mais abundante em três (Mix, Dahma e Itupararanga) dos quatro ensaios realizados. A segunda é que, em todas as amostras, a densidade celular final do tratamento vin 10% foi maior do que a do tratamento vin 2%.

Deste modo, os ensaios de aclimatação demonstraram o potencial adaptativo de cepas de *Chlorella* spp. Aclimatar amostras ambientais ao meio sintético e à própria vinhaça foi uma importante ferramenta para selecionar, de ambientes aquáticos naturais, cepas de *Chlorella* spp. tolerantes à vinhaça. Os experimentos deixaram claro que o gênero *Chlorella* adaptou-se com sucesso em três dos quatro experimentos em que foi sujeito às condições de eutrofia/hipereutrofia decorrentes das características minerais e orgânicas da vinhaça.

Também foram realizados experimentos de aclimatação contendo mais de 20% de vinhaça (Figura 10), mas como houve inibição do crescimento a partir desta concentração, os resultados apresentados referem-se aos experimentos de até 10% de vinhaça.

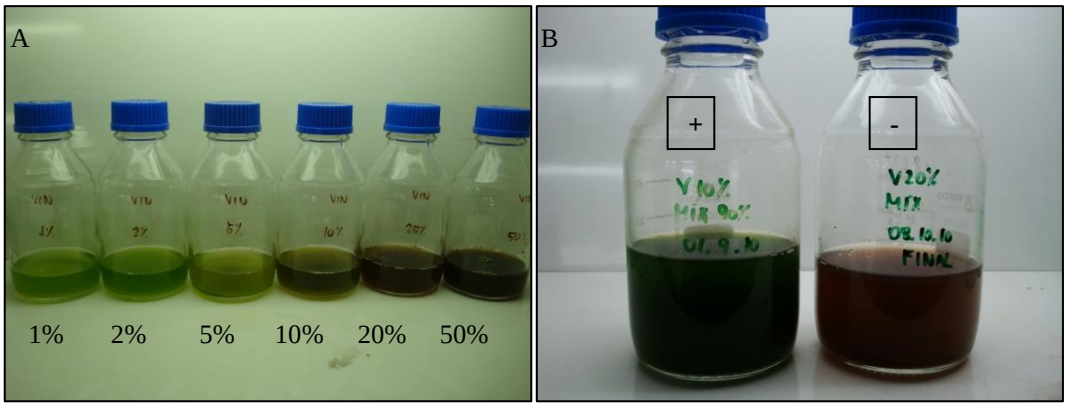

Figura 10 – Ensaios de isolamento e aclimatação de *Chlorella* spp. Gradientes de concentração (1% a 50%) de vinhaça no meio WC para isolar a cepa VIN01 (A); resultado final da aclimatação da amostra ambiental MIX à vinhaça diluída nas concentrações de 10% (resultado positivo) e 20% (resultado negativo), no meio WC (B).

Uma vez constituído o banco de microalgas, iniciaram-se os experimentos de *screening* das cepas isoladas. Verificou-se o potencial oleaginoso de cada cepa em resposta a três condições: (1) meio WC padrão que foi adotado como condição controle; (2) limitação da fonte de nitrogênio no meio; (3) modificação da via metabólica fototrófica para heterotrófica mediante adição de fonte de carbono orgânico no meio e supressão do fotoperíodo.

Antes dos ensaios de *screening*, foi necessário fixar condições semelhantes de cultivo para todas as cepas, em meio WC líquido, já que na etapa de isolamento o cultivo foi realizado em meio WC diluído ou solidificado.

Foram realizados experimentos prévios com quatro cepas (VIN01, C202, FAZ11 e FAZ 16), variando-se pH (6,2; 7,2; 8,2) e intensidade de luz (60 e 90 µmol fótons m^{-2} s^{-1}). Os resultados obtidos estão descritos na Figura 11.

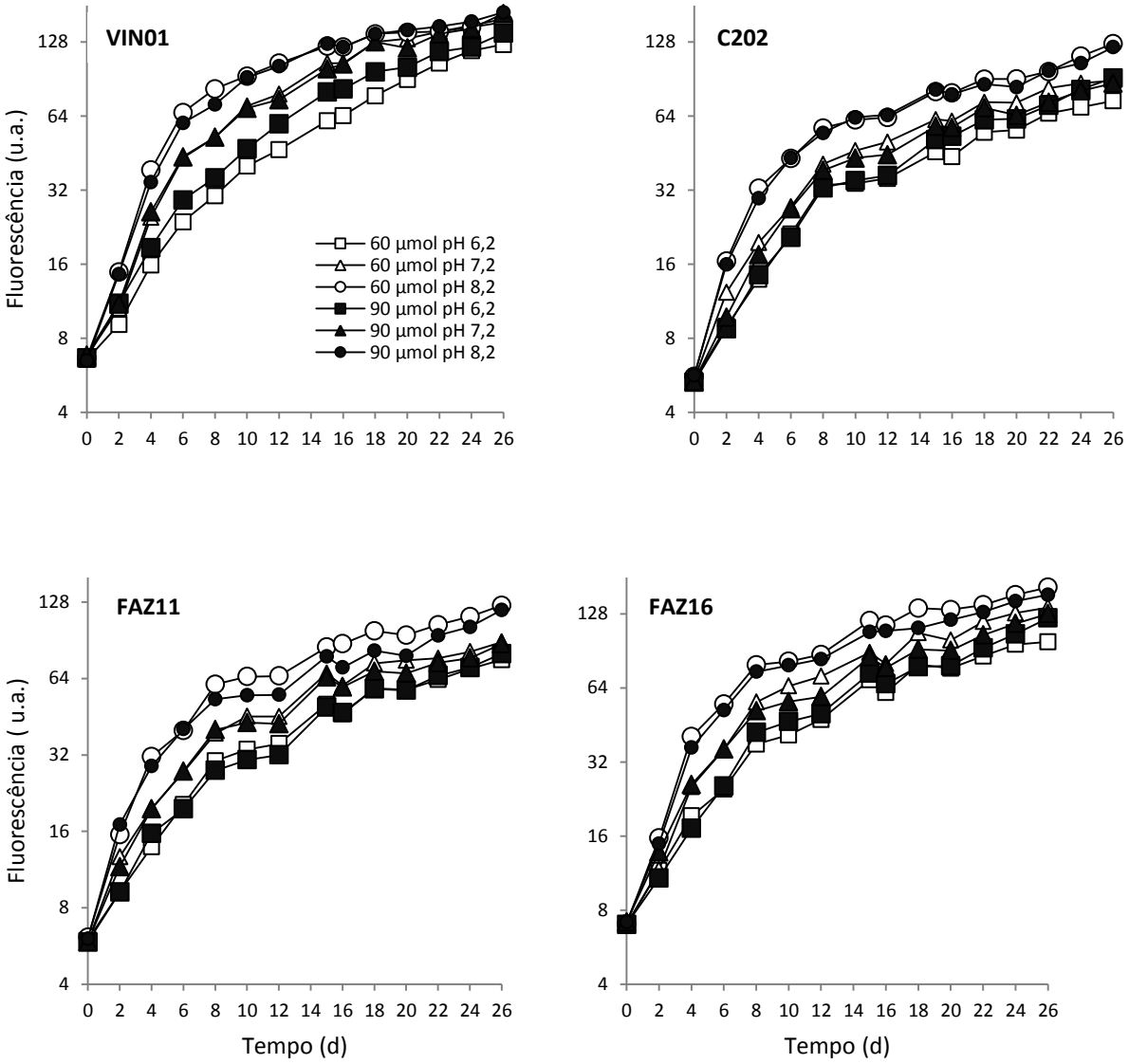

Figura 11 – Curvas de crescimento (fluorescência da clorofila *a*) de *Chlorella* spp. sob diferentes condições de pH e iluminação, incubadas em meio WC líquido, à temperatura de 24º C e fotoperíodo de 12/12 horas.

Os maiores patamares de crescimento ocorreram sob pH 8,2 e iluminação de 60 µmol fótons m^{-2} s^{-1}. Além disso, verificou-se que o final da fase exponencial e início da fase estacionária ocorreu a partir do 14º dia de cultivo nas quatro cepas.

Obtidas estas informações, fixaram-se as condições de cultivo ao pH 8,2 e à intensidade luminosa de 60 µmol fótons m^{-2} s^{-1} e iniciou-se a pesquisa pela concentração limitante de nitrogênio a ser utilizada nos experimentos.

A limitação de nitrogênio induz o acúmulo de lipídeos, mas é fundamental que ela ocorra somente na fase estacionária do cultivo. Isto porque nitrogênio é constituinte protéico e limitá-lo durante o crescimento exponencial implica em perdas de biomassa e redução da velocidade

específica de crescimento. Por isso, nos ensaios de *screening*, adotou-se a estratégia de tornar o nitrogênio limitante somente a partir da fase estacionária.

Para estimar a concentração de nitrogênio existente no meio a partir do ponto em que as culturas entraram na fase estacionária, ou seja, aproximadamente no 14º dia, foi construída uma curva de crescimento e de consumo de N-NO_3 pela cepa VIN01, representada na Figura 12.

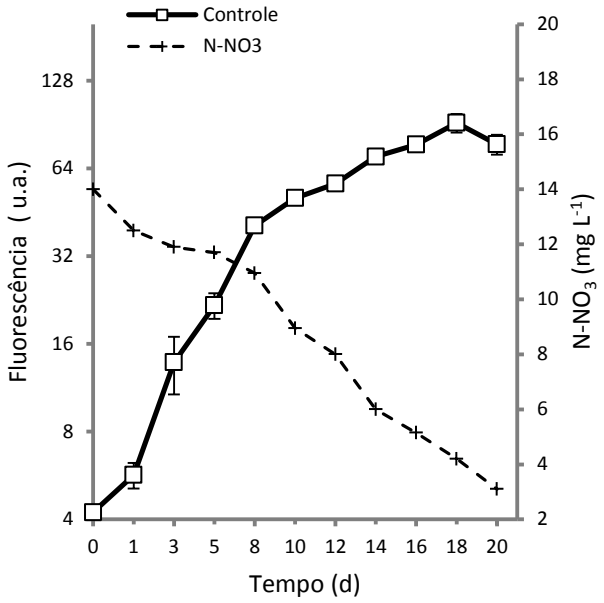

Figura 12 – Curva de crescimento (fluorescência da clorofila *a*) da cepa VIN01 e consumo de N-NO_3 no substrato ao longo do tempo. Barras verticais representam o desvio padrão (n=3).

No 14º dia, a concentração de N-NO_3 reduziu de 14 mg L^{-1} para 6 mg L^{-1}, com consumo estimado de 8 mg L^{-1} de nitrato até a fase estacionária. Baseando-se nestas informações e nos dados sugeridos pela literatura (ILLMAN; SCRAGG; SHALES, 2000), fixou-se a concentração de 7 mg L^{-1} de N-NO_3 (500 µM) como limitante do nitrogênio. O meio WC foi modificado para a referida concentração e utilizado nos experimentos de *screening* de cepas oleaginosas.

A segunda condição utilizada no *screening*, baseada na indução da via heterotrófica, consistiu na adição de 5 g L^{-1} de glicose no 18º dia de cultivo. A partir deste ponto, o fotoperíodo de 12h/12h foi suprimido e as culturas permaneceram no escuro até o 20º dia. No 20º dia, o cultivo foi interrompido e as culturas foram tratadas com corante Vermelho do Nilo para determinação da fluorescência dos lipídeos neutros em fluorômetro (Figura 13)

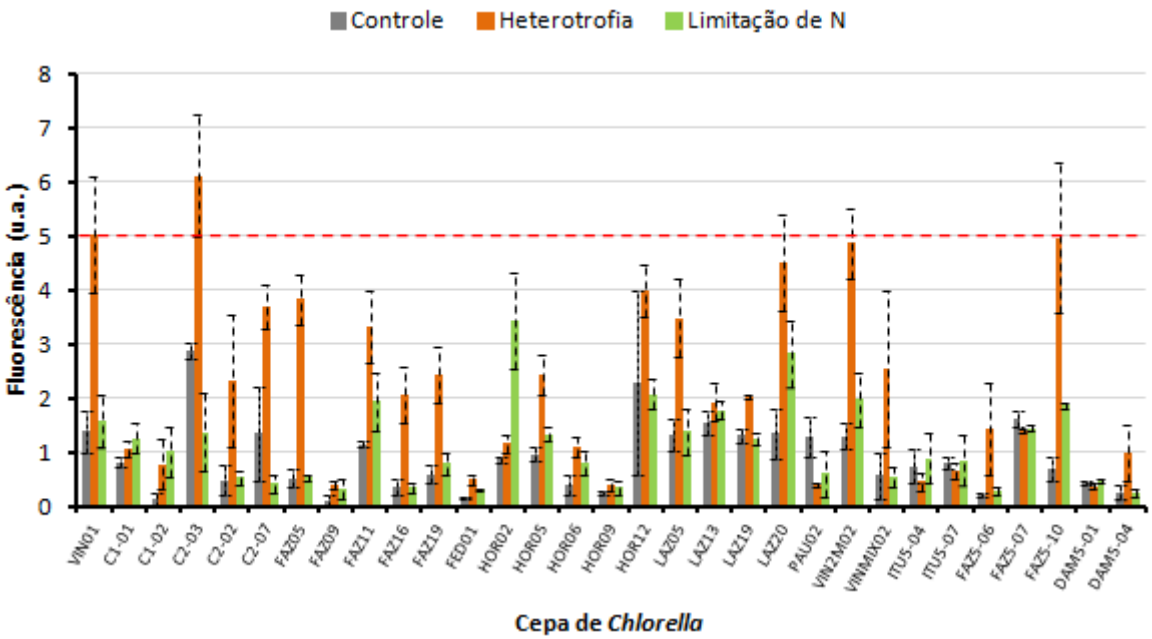

Figura 13 – Fluorescência de lipídeos neutros de 31 cepas de *Chlorella* spp. após 20 dias de cultivo nas condições controle (WC padrão), limitação de nitrogênio (7 mg L^{-1}) e heterotrofia (glicose 5 g L^{-1}). Barras verticais representam o desvio padrão (n=3). Linha vermelha tracejada representa a linha de base adotada para seleção das cepas potencialmente oleaginosas.

Dentre as trinta e uma cepas analisadas, a indução da heterotrofia foi o fator que mais elevou a fluorescência dos lipídeos neutros. Enquanto vinte e uma cepas aumentaram sua fluorescência na condição heterotrófica (ANOVA, $p<0,05$), somente uma cepa (HOR02) aumentou sua fluorescência na condição de limitação de nitrogênio (ANOVA, $p<0,05$), quando comparadas aos seus respectivos controles.

Em razão da elevada fluorescência da condição heterotrófica, estabeleceu-se uma linha de base fundamentada nesta condição (Figura 13, linha tracejada vermelha) para selecionar cepas com potencial oleaginoso. Esta linha foi desenhada baseando-se na fluorescência da cepa VIN01, que foi definida como potencialmente oleaginosa por apresentar teores de lipídeos totais maiores do que 20% em relação à sua biomassa seca.

Cinco cepas (VIN01, C203, LAZ20, VIN2M02 e FAZ5-10) se destacaram no *screening* e tiveram fluorescências médias semelhantes (ANOVA, $p=0,383$) na faixa de 5 (u.a.). Nesta condição, LAZ20 teve fluorescência maior somente em relação ao seu controle (ANOVA, $p<0,05$) enquanto VIN01, C203, VIN2M02 e FAZ5-10 fluoresceram mais do que os tratamentos controle e limitação de nitrogênio (ANOVA, $p<0,05$).

Aliado ao perfil da fluorescência, considerou-se também a característica ambiental às quais as cinco cepas em destaque estiveram associadas. VIN01, isolada da própria vinhaça, C203, isolada de sistema de lagoas de estabilização e FAZ5-10, isolada de um lago da Fazenda São José e aclimatada ao cultivo em vinhaça (Tabela 5), foram cepas provenientes de ambientes aquáticos

eutrofizados ou aclimatada a tal condição e, por isso, as escolhidas para otimização do cultivo na Etapa 2.

5.2. ETAPA 2 – Varredura de fatores e otimização do cultivo

Os resultados da varredura estão agrupados de acordo com as três frentes de experimentos planejados e serão apresentados na sequência em que foram executados: frente química, frente trófica e frente física.

Baseando-se nos parâmetros obtidos pela modelagem das curvas de crescimento, selecionaram-se fatores e seus respectivos níveis que melhoraram as condições de cultivo, isto é, que concomitantemente aumentaram amplitude de crescimento e μ_{max} e que reduziram Tg.

Dentre as três frentes investigadas, a frente trófica destacou-se por incrementar expressivamente μ_{max}, a amplitude da fase estacionária e reduzir o tempo de geração e, consequentemente, a duração do cultivo. A frente física também melhorou significativamente os parâmetros de cultivo citados, em oposição à frente química, que teve pouca ou nenhuma influência na melhoria dos parâmetros.

5.2.1. Frente química

Nesta frente, foram executados experimentos com variação dos fatores relação N:P, concentrações de $N\text{-}NO_3$, $N\text{-}NH_4$, micronutrientes, bicarbonato e pH.

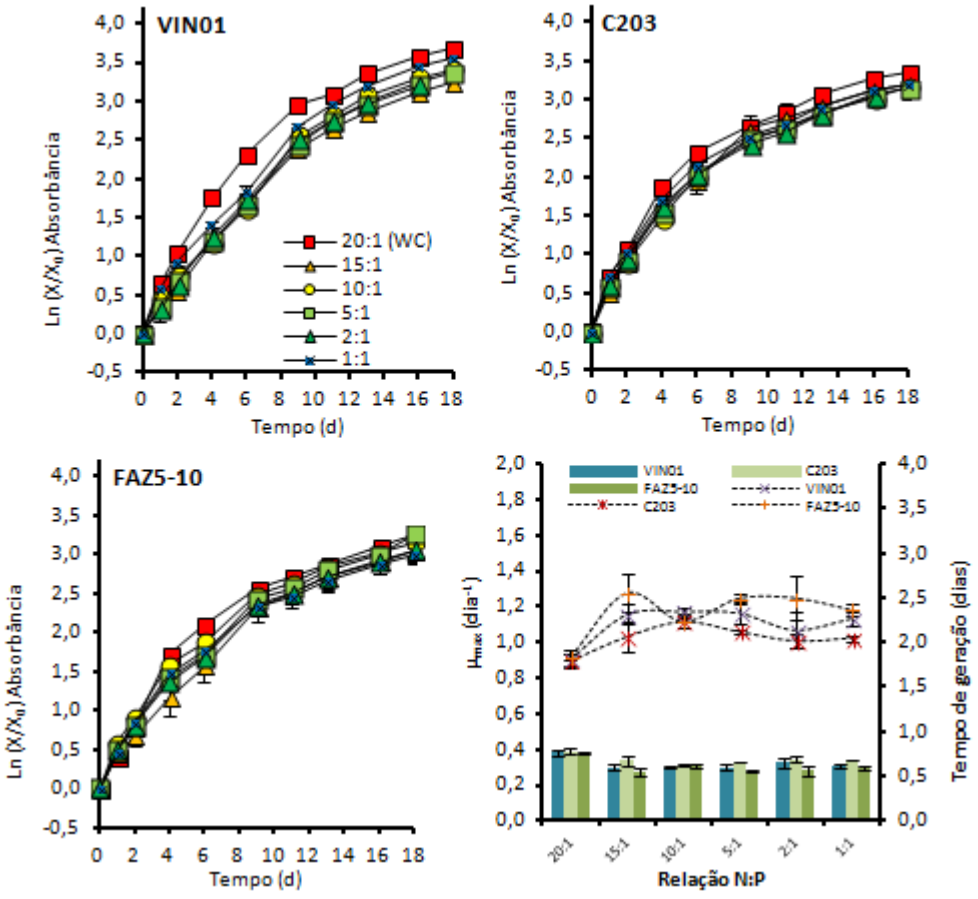

Figura 14 – Curvas de crescimento das cepas VIN01, C203 e FAZ5-10 e suas respectivas μ_{max} (barras) e tempo de geração (linhas tracejadas) nas diferentes relações N:P. Barras verticais representam o desvio padrão (n=3).

A relação N:P de 20:1, que é a relação encontrada no meio WC, foi a melhor dentre as investigadas e manteve amplitude, μ_{max} e Tg em seus melhores níveis (Figura 14).

Em relação ao WC padrão (20:1), as relações de 15:1, 10:1, 5:1 e 2:1 reduziram a amplitude de crescimento da cepa VIN01. Também houve redução de amplitude da cepa C203 na relação 2:1. Para a cepa FAZ5-10 não houve mudança de amplitude em nenhuma condição. Todas as condições reduziram μ_{max} e aumentaram Tg das três cepas, exceto o Tg na relação 2:1 (ANOVA, $p<0,05$).

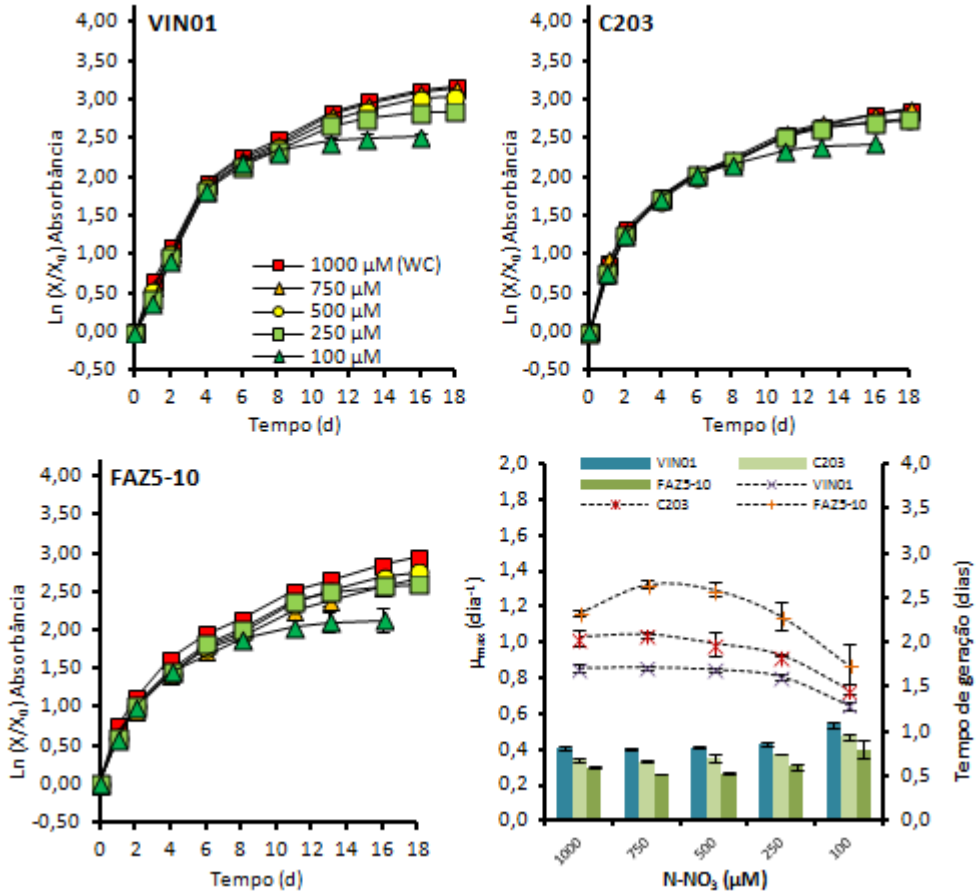

Figura 15 - Curvas de crescimento das cepas VIN01, C203 e FAZ5-10 e suas respectivas μ_{max} (barras) e tempo de geração (linhas tracejadas) nas diferentes concentrações de nitrato. Barras verticais representam o desvio padrão (n=3).

A concentração de nitrato de 1000 µM, que é a concentração do WC, possibilitou maiores amplitudes de crescimento nas três cepas, quando comparada à menor concentração, de 100 µM (ANOVA, $p<0,05$). Embora 100 µM de $N\text{-}NO_3$ tenham melhorado μ_{max} e Tg em relação a todas as demais concentrações (ANOVA, $p<0,05$), ela reduziu a amplitude de crescimento das três cepas (Figura 15) por caracterizar-se como condição limitante de nitrogênio. Este perfil não é desejado na otimização do cultivo, uma vez que há redução da produção final de biomassa e, consequentemente, na produtividade.

Em relação ao WC padrão (1000 µM), a amplitude de crescimento diminuiu nas concentrações de 250 e 100 µM para a cepa VIN01, de 100 µM para a cepa C203, e de 750, 250 e 100 µM para a cepa FAZ5-10 (ANOVA, $p<0,05$).

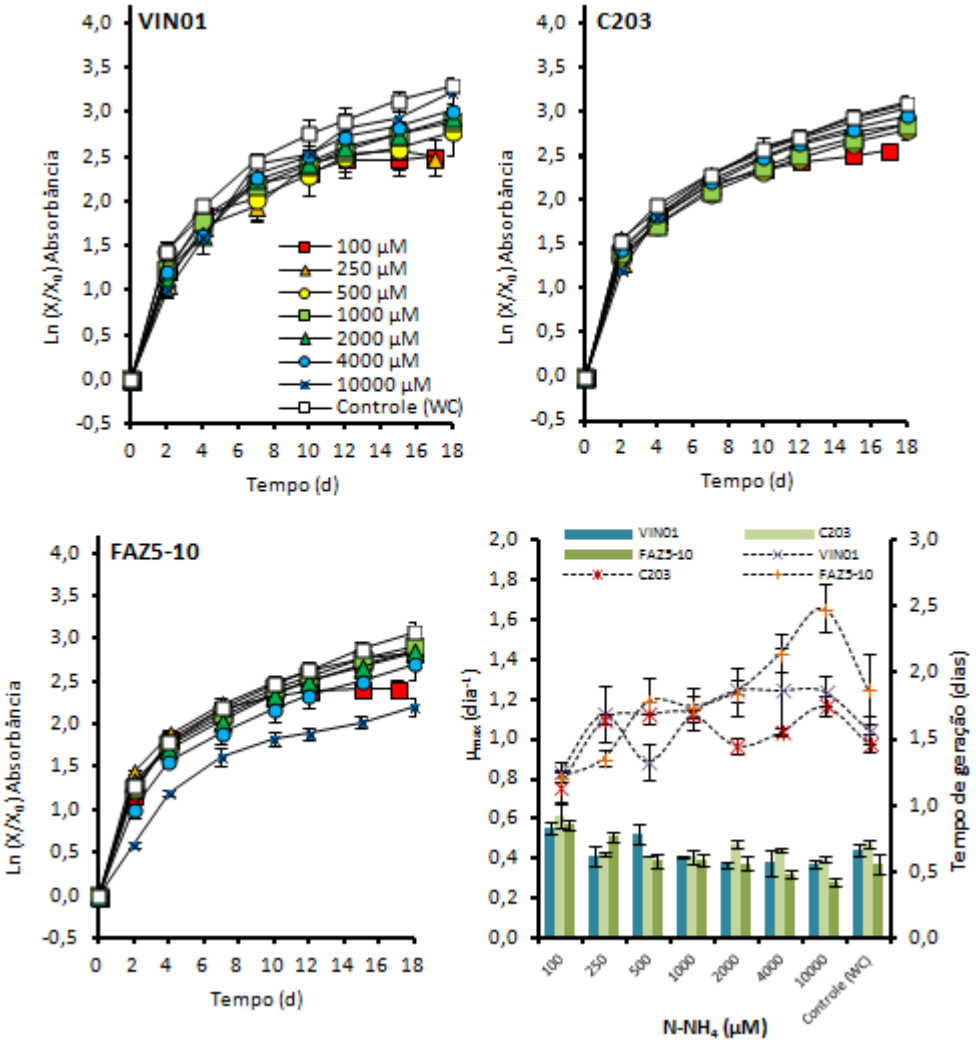

Figura 16- Curvas de crescimento das cepas VIN01, C203 e FAZ5-10 e suas respectivas μ_{max} (barras) e tempo de geração (linhas tracejadas) nas diferentes concentrações de nitrogênio amoniacal. Barras verticais representam o desvio padrão (n=3). "Controle (WC)" representa 1000 µM de N-NO_3.

Os experimentos com nitrogênio amoniacal tiveram perfil semelhante ao dos experimentos com nitrogênio na forma de nitrato (Figura 15 e Figura 16). As melhores condições de crescimento ocorreram na concentração de 1000 µM e as piores na concentração limitante de 100 µM e na de excesso (10000 µM).

Comparadas à condição controle, as maiores amplitudes de crescimento ocorreram na concentração de 1000 µM de N-NH_4 e acima dela (ANOVA, $p<0,05$), exceto para a cepa FAZ5-10. Ela diminuiu a amplitude nas concentrações de 4000 µM e, mais expressivamente, na de 10000 µM com aumento concomitante da Tg e redução da μ_{max} (ANOVA, $p<0,05$). Desta forma, houve indícios de que VIN01 e C203 foram tolerantes a concentrações elevadas do íon amônio, enquanto FAZ5-10 foi intolerante e reduziu seu crescimento nestas condições. Tolerância ao nitrogênio amoniacal é característica essencial para cultivo em vinhaça, visto que o nitrogênio disponível neste efluente ocorre como íons amônio.

De maneira análoga ao nitrato, 100 µM de N-NH_4 foi a concentração que melhorou μ_{max} e Tg das três cepas (ANOVA, p<0,05). Contudo, a limitação de nitrogênio diminuiu a amplitude de crescimento das cepas nas concentrações de 100, 250 e 500 µM para VIN01 e 100 µM para C203 e FAZ5-10 (ANOVA, p<0,05).

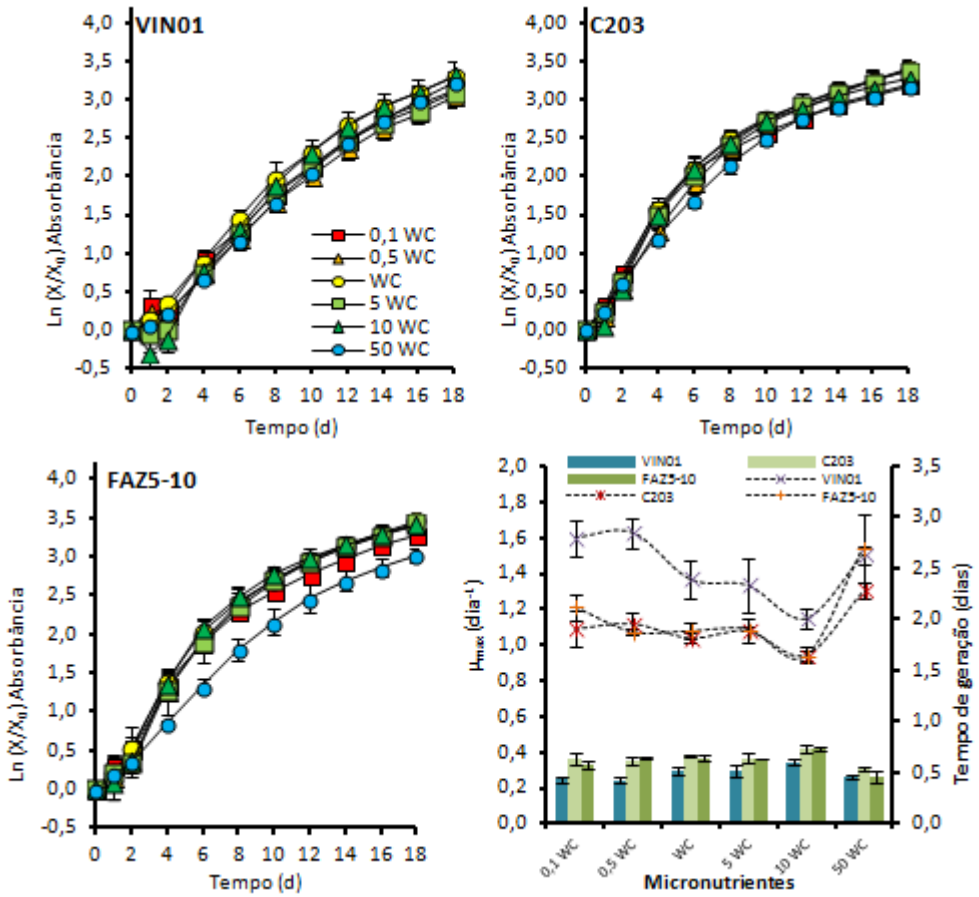

Figura 17 - Curvas de crescimento das cepas VIN01, C203 e FAZ5-10 e suas respectivas μ_{max} (barras) e tempo de geração (linhas tracejadas) nas diferentes concentrações de micronutrientes. Barras verticais representam o desvio padrão (n=3).

Concentrações de micronutrientes 10 e 50 vezes maiores do que a do WC foram as que efetivamente alteraram o crescimento das três cepas, em relação à concentração padrão (Figura 17).

Enquanto a concentração 10WC aumentou a μ_{max} das três cepas sem modificar suas amplitudes de crescimento, a concentração 50WC piorou o crescimento das três cepas, tanto pela redução da amplitude de crescimento e da μ_{max} quanto pelo aumento do Tg (ANOVA, p<0,05).

Evidenciou-se que a concentração nominal (ou seja, a concentração adicionada e não necessariamente disponível para assimilação, devido a diversas interações e complexações químicas) de micronutrientes equivalente a 10WC foi a melhor faixa experimental investigada e que a composição padrão do meio WC pode ser limitante para as culturas obterem maiores velocidades específicas de crescimento.

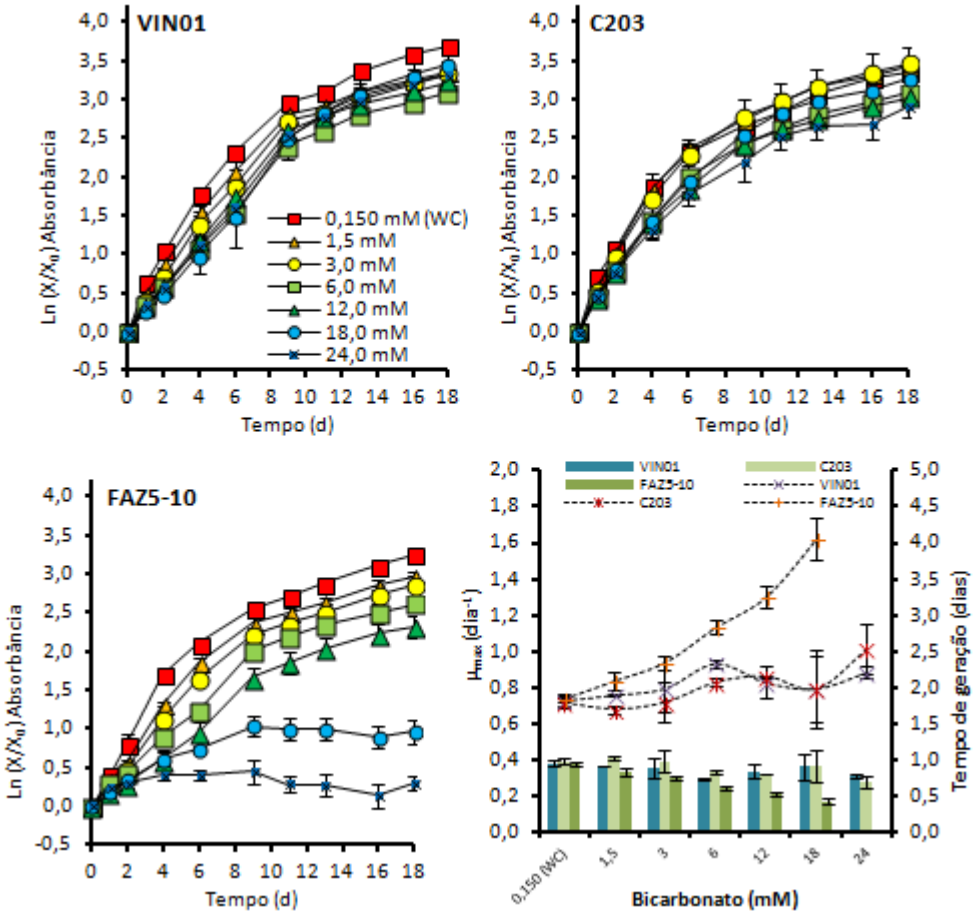

Figura 18 - Curvas de crescimento das cepas VIN01, C203 e FAZ5-10 e suas respectivas μ_{max} (barras) e tempo de geração (linhas tracejadas) nas diferentes concentrações de bicarbonato. Barras verticais representam o desvio padrão (n=3).

Em relação à concentração padrão de 0,150 mM, o efeito da variação do bicarbonato foi distinto sobre as três cepas (Figura 18). Seu gradiente de concentração reduziu a amplitude de crescimento da cepa VIN01 a partir de 6 mM sem, contudo , alterar μ_{max} e Tg em nenhuma das concentrações pesquisadas (ANOVA, $p<0,05$). Para a cepa C203, somente a maior concentração, de 24 mM de bicarbonato, diminuiu amplitude e parâmetros de crescimento (ANOVA, $p<0,05$).

O gradiente positivo de concentrações gerou gradiente de inibição do crescimento na cepa FAZ5-10, a partir de 3mM. Houve redução significativa da amplitude de crescimento e μ_{max} e aumento da Tg até a concentração de 18 mM (ANOVA, $p<0,05$). Na maior concentração, a cepa não cresceu.

C203 foi, portanto, a cepa mais tolerante ao aumento de bicarbonato, seguida pela VIN01 e FAZ5-10, cujo crescimento foi totalmente inibido na concentração de 24 mM.

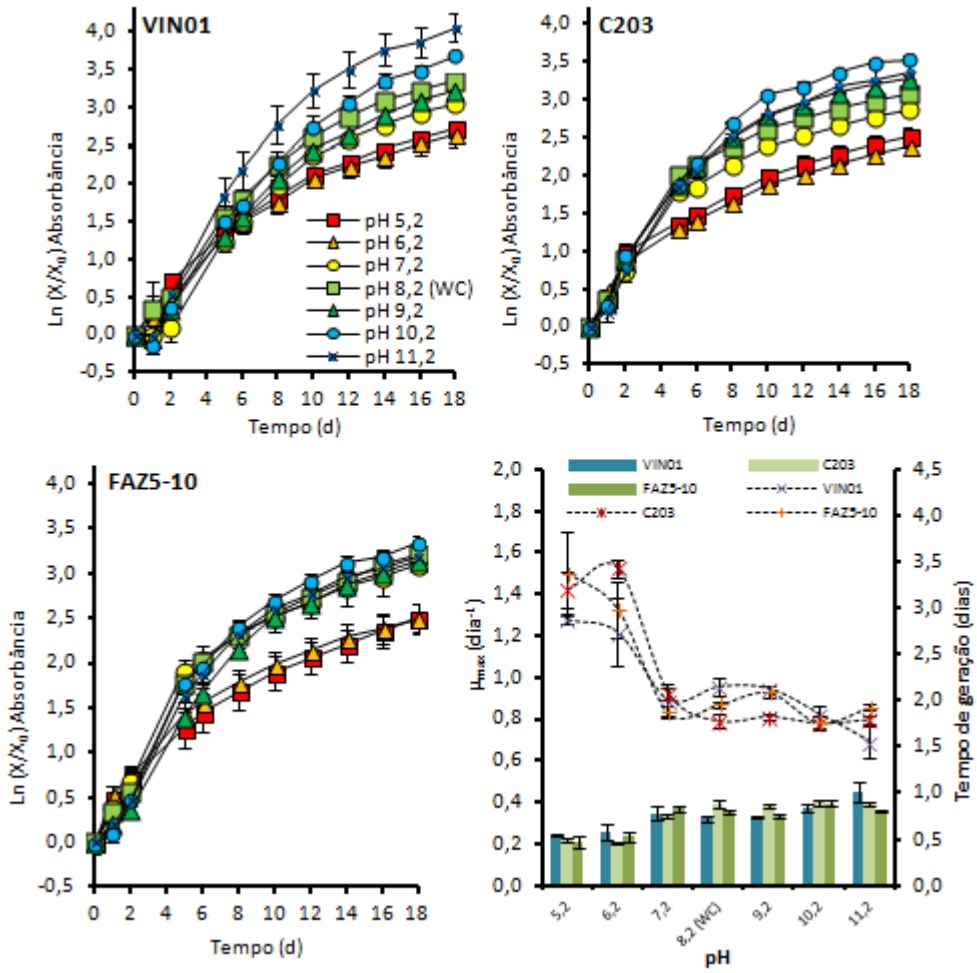

Figura 19 - Curvas de crescimento das cepas VIN01, C203 e FAZ5-10 e suas respectivas μ_{max} (barras) e tempo de geração (linhas tracejadas) nas diferentes faixas de pH. Barras verticais representam o desvio padrão (n=3).

Nos experimentos de varredura de pH, verificou-se que pHs ácidos reduziram o crescimento das três cepas enquanto pHs neutros e alcalinos aumentaram o crescimento de *Chlorella* (Figura 19).

VIN01, C203 e FAZ5-10 cresceram menos nos pHs 5,2 e 6,2 quando comparadas ao pH 8,2 (ANOVA, $p<0,05$), adotado como pH de referência por ser utilizado na manutenção dos inóculos e demais ensaios. Nestes pHs ácidos, também houve redução da μ_{max} e aumento da Tg, reforçando o caráter inibidor de crescimento do meio ácido.

Por outro lado, pH alcalino de 10,2 ou 11,2 melhorou amplitude de crescimento, μ_{max} e Tg das cepas VIN01 e C203, respectivamente (ANOVA, $p<0,05$). A cepa FAZ5-10 não modificou seu crescimento nas condições alcalinas, nem mesmo no maior pH (ANOVA, $p=0,21$).

Evidenciou-se, desta forma, que o pH ácido da vinhaça precisaria ser corrigido para pHs mais alcalinos em virtude da inibição do crescimento de *Chlorella.*

Finalizada a frente química e detectadas as melhores faixas nutricionais e de pH para o cultivo das cepas, iniciou-se a varredura de fatores na frente trófica, que consistiu na adição de fontes variadas de carbono orgânico ao meio WC padrão.

5.2.2. Frente trófica

Nesta frente, o primeiro passo foi investigar a relevância do metabolismo heterotrófico para crescimento das cepas selecionadas. Glicose é uma das fontes de carbono de melhor assimilação e utilizada como substância padrão na maioria dos estudos de trofia em microalgas e, por isso, foi adotada como fonte de carbono orgânico nos experimentos iniciais. Foram realizados dois tipos de cultivo para avaliar o crescimento das culturas enriquecidas com carbono orgânico: o cultivo mixotrófico, no qual foram disponibilizadas glicose e luz como fontes de energia, e o cultivo heterotrófico, no qual foi disponibilizada glicose como fonte de energia e nenhuma luz.

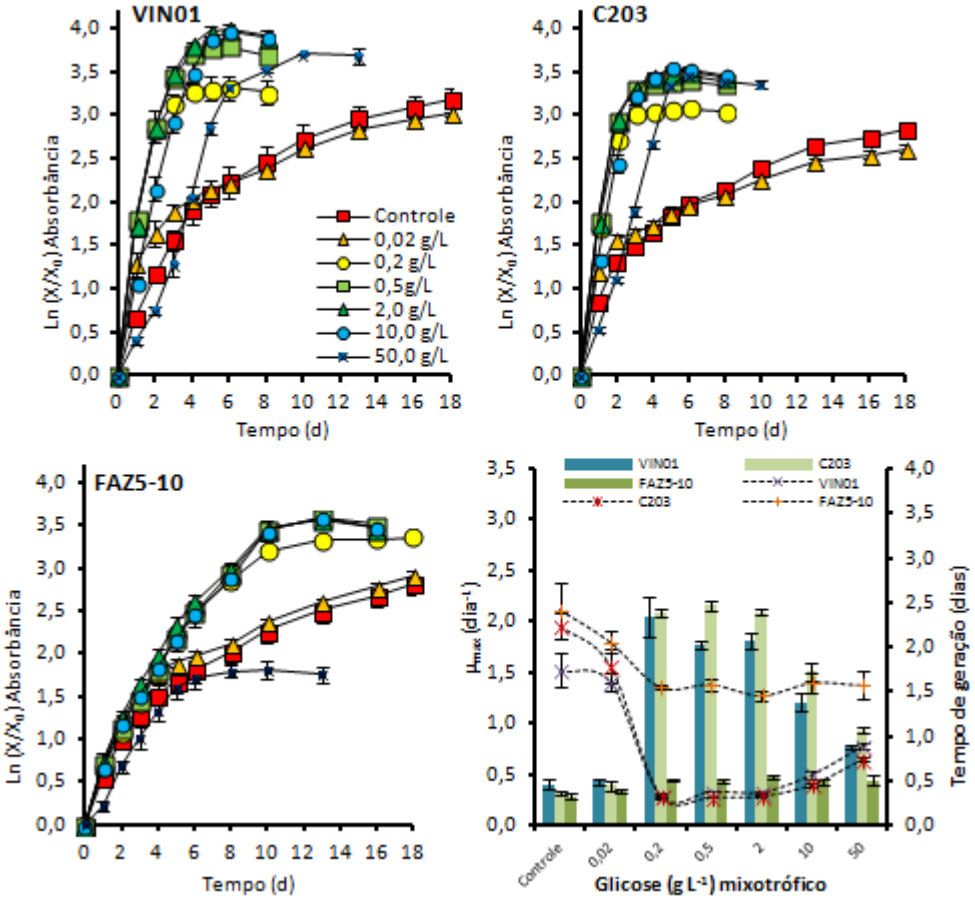

Figura 20 - Curvas de crescimento das cepas VIN01, C203 e FAZ5-10 e suas respectivas μ_{max} (barras) e tempo de geração (linhas tracejadas) nas diferentes concentrações de glicose do cultivo mixotrófico. Barras verticais representam o desvio padrão (n=3). Controle representa WC padrão sem glicose em cultivo fototrófico.

O cultivo mixotrófico contendo glicose teve como características marcantes a antecipação da fase estacionária das culturas associada à melhoria expressiva dos parâmetros de crescimento, as quais evidenciaram atividade do metabolismo heterotrófico nas três cepas (Figura 20).

Enquanto o controle fototrófico das três cepas levou cerca de 18 dias para chegar ao final da fase exponencial/início da fase estacionária, as cepas VIN01 e C203 chegaram à fase estacionária em 5 dias nas condições mixotróficas favoráveis (0,2 a 10 g L^{-1} de glicose). Esse período representa apenas 28% do tempo necessário para a cultura fototrófica chegar à sua maturidade. A cepa FAZ5-10 também antecipou sua fase estacionária, mas o efeito foi mais tardio e ocorreu no dia 10, que equivale ao dobro do tempo das outras cepas. Além disso, não houve perda de amplitude do crescimento e essa característica, associada à antecipação da fase estacionária, aponta para aumento de produtividade das culturas.

Os parâmetros de crescimento (amplitude, μ_{max} e Tg) das três cepas melhoraram, em relação ao controle, nas concentrações acima de 0,02 g L^{-1} de glicose (ANOVA, $p<0,05$). A única exceção foi a redução da amplitude de crescimento da cepa FAZ5-10 na concentração de 50 g L^{-1} (ANOVA, $p<0,05$). Também houve gradiente de redução da μ_{max} e de aumento da Tg à medida que a concentração de glicose aumentou de 2 a 50 g L^{-1}, apontando para seu efeito inibidor em concentrações elevadas.

Dentre todas as concentrações testadas, a faixa entre 0,5 e 2 g L^{-1} de glicose foi a que mais aumentou amplitude de crescimento e μ_{max} e que mais reduziu Tg, concomitantemente, nas três cepas, sendo que VIN01 e C203 se destacaram em relação à cepa FAZ5-10. Na cepa VIN01, μ_{max} médio aumentou de 0,40 (controle) para 1,78 dia^{-1} (mixotrófico) enquanto o Tg médio decaiu de 1,74 (controle) para 0,39 dias (mixotrófico). Na cepa C203, μ_{max} médio aumentou de 0,31 (controle) para 2,16 dia^{-1} (mixotrófico) enquanto o Tg médio decaiu de 2,23 (controle) para 0,33 dias (mixotrófico). E na cepa FAZ5-10, μ_{max} médio aumentou de 0,29 (controle) para 0,44 dia^{-1} (mixotrófico) enquanto o Tg médio decaiu de 2,41 (controle) para 1,59 dias (mixotrófico).

Perante os ganhos obtidos, a faixa entre 0,5 e 2 g L^{-1} de glicose foi selecionada como ideal para ser explorada na fase de otimização.

Uma vez confirmada atividade do metabolismo heterotrófico nas três cepas, realizou-se novo experimento em que a condição de cultivo foi alterada de mixotrófica para heterotrófica. Utilizaram-se as mesmas concentrações de glicose do experimento de mixotrofia e os resultados obtidos estão representados na Figura 21.

Conforme esperado, nenhuma das cepas cresceu na condição controle, em razão da ausência de fontes energéticas (luz e fonte de carbono orgânico).

As culturas anteciparam suas fases estacionárias em tempos similares ao experimento de mixotrofia (Figura 20). Também houve gradiente de redução da μ_{max} e do aumento da Tg associado ao aumento da concentração de glicose, a partir de 0,2 g L^{-1}. Esta concentração também foi referência, dentre as concentrações testadas, por possibilitar as maiores μ_{max} e menores Tg das cepas VIN01 (2,62 dia^{-1} e 0,26 dias) e C203 (2,71 dia^{-1} e 0,26 dias) (ANOVA, $p<0,05$). Contudo, ela reduziu a

amplitude de crescimento das três cepas, quando comparada às demais concentrações acima dela (ANOVA, p<0,05). Tal efeito, reportado também no experimento de mixotrofia, provavelmente está ligado à limitação de glicose no meio de cultura, a qual ocorre antes das culturas atingirem seu pleno crescimento.

Por esse motivo, a faixa entre 0,5 a 2 g L^{-1} de glicose foi selecionada como a melhor dentre as testadas, por permitir em sincronia maior amplitude de crescimento e de μ_{max} e menor Tg (ANOVA p<0,05).

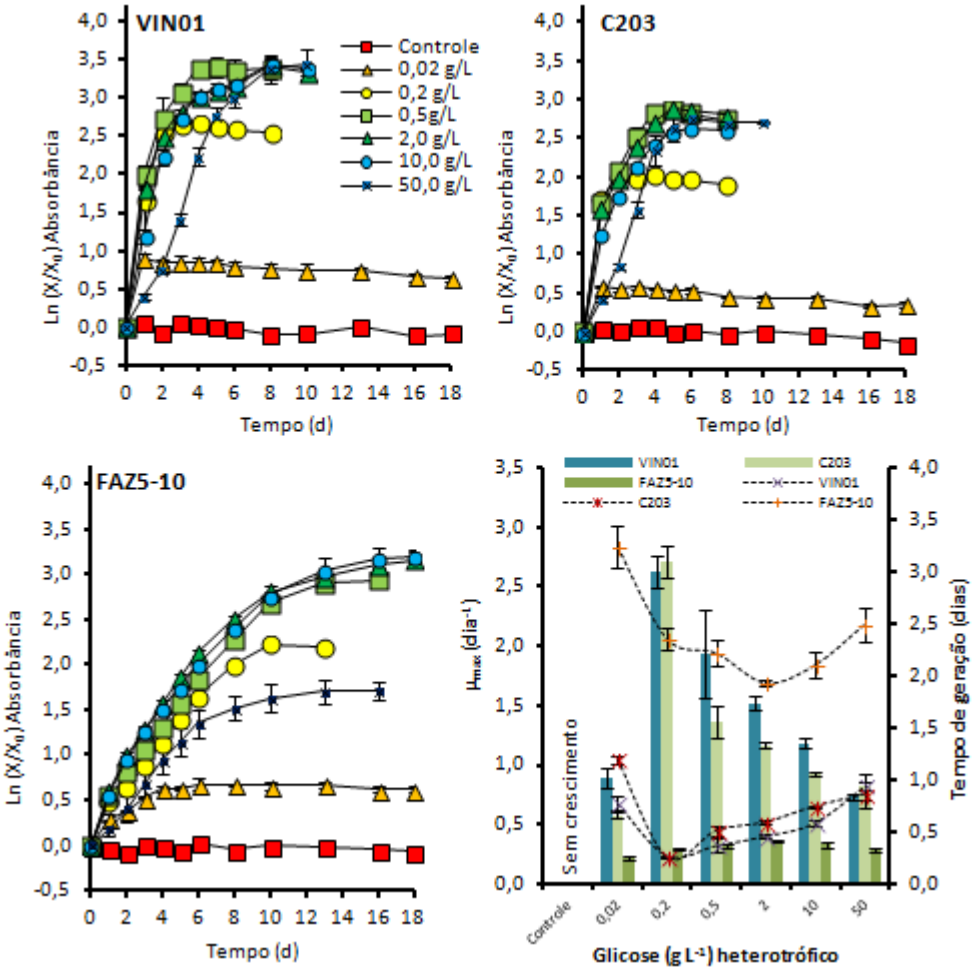

Figura 21 - Curvas de crescimento das cepas VIN01, C203 e FAZ5-10 e suas respectivas μ_{max} (barras) e tempo de geração (linhas tracejadas) nas diferentes concentrações de glicose do cultivo heterotrófico. Barras verticais representam o desvio padrão (n=3). Controle representa WC padrão sem glicose na ausência de luz.

Visto que os parâmetros de crescimento das culturas mixotróficas foram melhores em relação aos parâmetros das culturas heterotróficas (Tabela 7), adotou-se a mixotrofia como forma de cultivo nos demais experimentos da frente trófica.

Na sequência, foram testadas como fontes de carbono orgânico: frutose, sacarose, etanol, glicerol e ácidos orgânicos, com ênfase no ácido acético.

O metabolismo heterotrófico também foi detectado nas culturas mixotróficas contendo frutose. As maiores respostas ao crescimento ocorreram nas concentrações de 2 e 10 g L^{-1} do açúcar (Figura 22).

Tabela 7 – Parâmetros de crescimento das cepas VIN01, C203 e FAZ5-10 obtidos nos cultivos mixotrófico e heterotrófico contendo 2g L^{-1} de glicose. * aponta para melhor condição (*t-student*, p<0,05)

Parâmetros	Amplitude		μ_{max} (dia^{-1})		Tg (dias)	
	Mixotrófico	Heterotrófico	Mixotrófico	Heterotrófico	Mixotrófico	Heterotrófico
VIN01	3,92 ± 0,07*	3,34 ± 0,05	1,81 ± 0,08*	1,52 ± 0,06	0,38 ± 0,02*	0,46 ± 0,02
C203	3,44 ± 0,03*	2,79 ± 0,04	2,09 ± 0,03*	1,17 ± 0,03	0,33 ± 0,01*	0,59 ± 0,01
FAZ5-10	3,47 ± 0,04*	3,15 ± 0,09	0,48 ± 0,02*	0,36 ± 0,01	1,46 ± 0,06*	1,93 ± 0,04

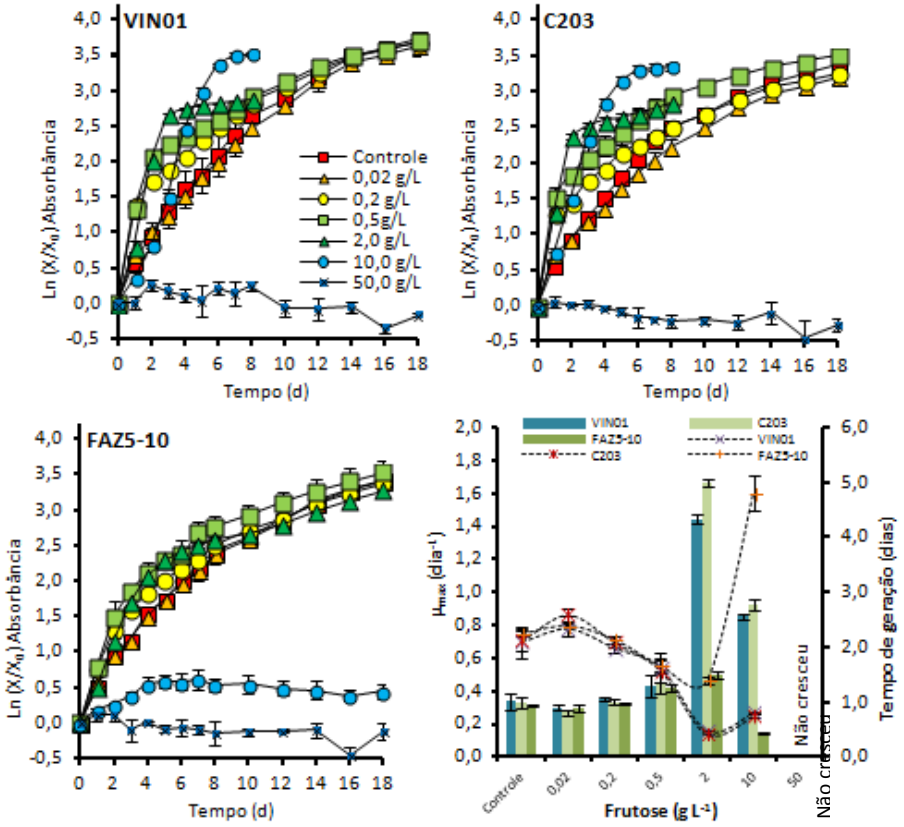

Figura 22 - Curvas de crescimento das cepas VIN01, C203 e FAZ5-10 e suas respectivas μ_{max} (barras) e tempo de geração (linhas tracejadas) nas diferentes concentrações de frutose do cultivo mixotrófico. Barras verticais representam o desvio padrão (n=3).

Dentre as concentrações testadas, 2g L^{-1} de frutose foi a que retornou maiores μ_{max} e Tg para as três cepas (ANOVA, p<0,05). Nesta concentração, VIN01, C203 e FAZ5-10 tiveram μ_{max} médias de 1,44, 1,67 e 0,50 dia^{-1}, respectivamente, e Tg médios de 0,48, 0,42 e 1,39 dias, respectivamente. Contudo, ela limitou a amplitude de crescimento das cepas VIN01 e C203, as quais cresceram melhor na concentração de 10g L^{-1} de frutose (ANOVA, p<0,05).

Nenhuma das cepas cresceu com 50g L^{-1} de frutose, indicando que ela inibiu mais do que glicose, quando comparadas na referida concentração (Figura 20).

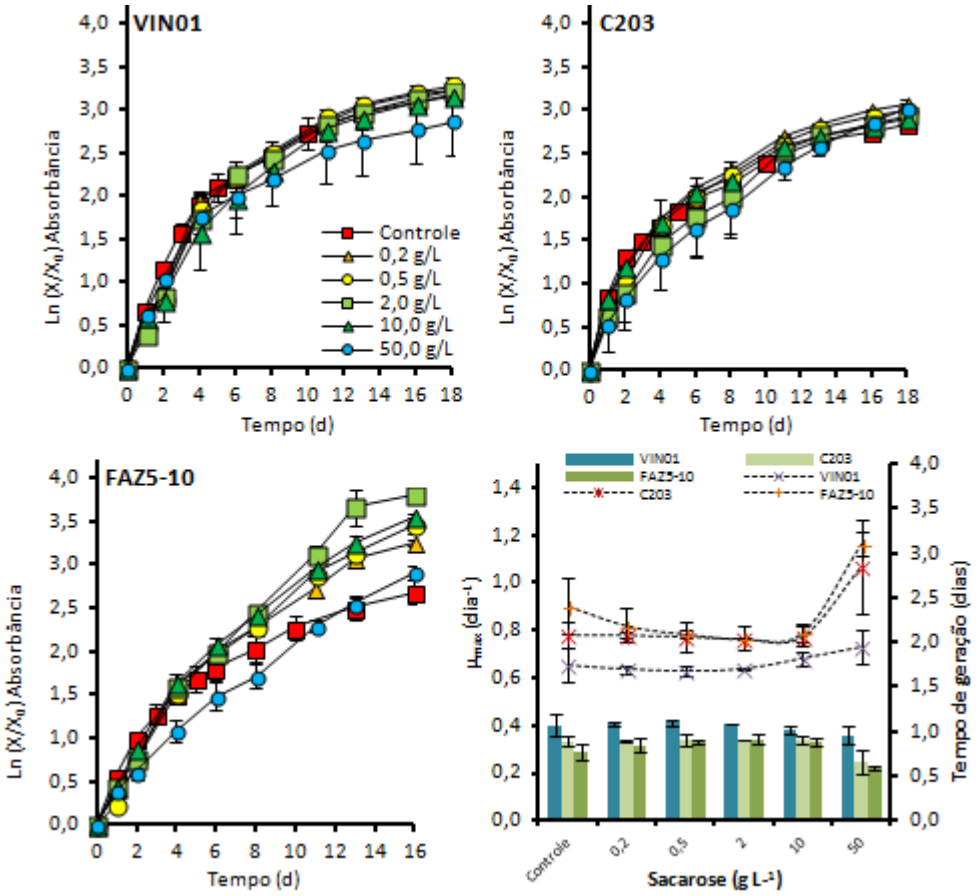

Figura 23 - Curvas de crescimento das cepas VIN01, C203 e FAZ5-10 e suas respectivas μ_{max} (barras) e tempo de geração (linhas tracejadas) nas diferentes concentrações de sacarose do cultivo mixotrófico. Barras verticais representam o desvio padrão (n=3).

No cultivo mixotrófico contendo sacarose, não foi detectada atividade heterotrófica nas cepas VIN01 e C203. Nenhum dos parâmetros de crescimento de VIN01 modificou-se nas concentrações estudadas e os valores de "p" obtidos na ANOVA dos parâmetros amplitude, μ_{max} e Tg foram, respectivamente, 0,14, 0,16 e 0,15.

Todavia, a cepa FAZ5-10 diferenciou-se por apresentar ganhos significativos na amplitude de crescimento em todas as concentrações de sacarose (ANOVA, $p<0,05$). Porém, a maior concentração do açúcar (50 g L^{-1}) reduziu μ_{max} e aumentou Tg das cepas FAZ5-10 e C203, em relação às demais concentrações (ANOVA, $p<0,05$).

Devido ao caráter inibidor dos açúcares na concentração de 50 g L^{-1}, os experimentos com etanol e glicerol foram executados até o limite de concentração de 10 g L^{-1}. Os resultados desses experimentos estão representados na Figura 24 (etanol) e na Figura 25 (glicerol).

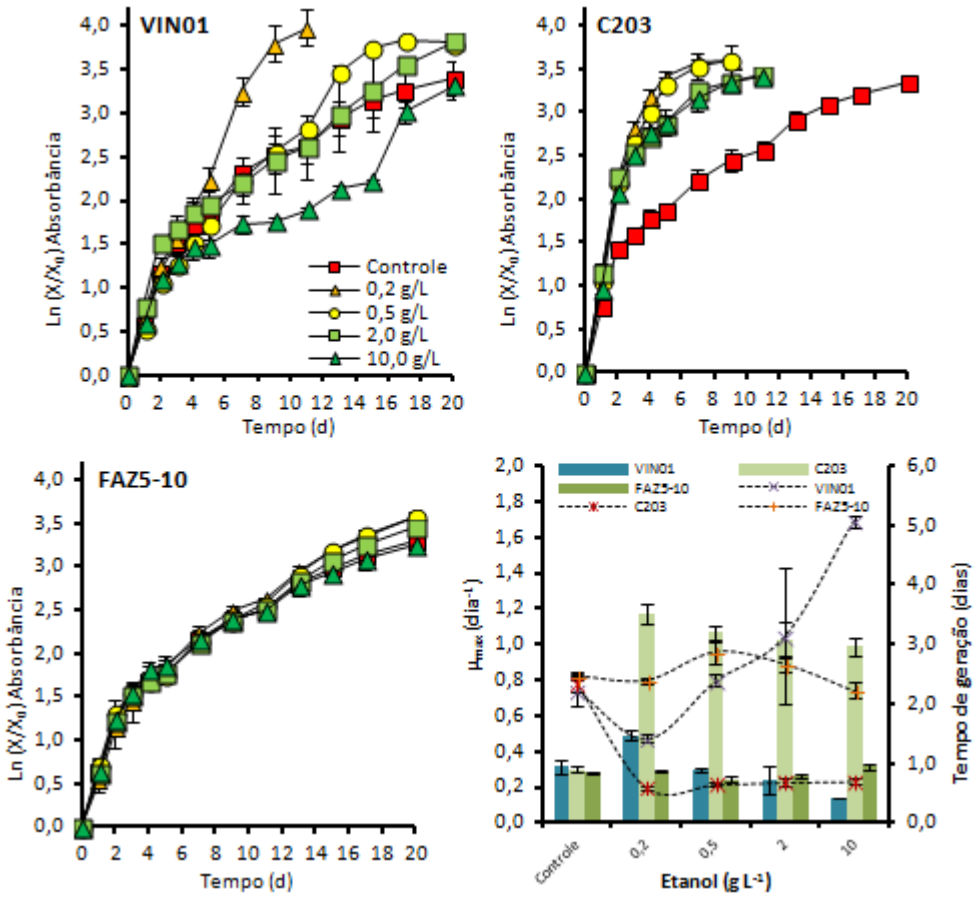

Figura 24 - Curvas de crescimento das cepas VIN01, C203 e FAZ5-10 e suas respectivas μ_{max} (barras) e tempo de geração (linhas tracejadas) nas diferentes concentrações de etanol do cultivo mixotrófico. Barras verticais representam o desvio padrão (n=3).

No cultivo mixotrófico contendo etanol, os parâmetros de crescimento da cepa FAZ5-10 não mudaram em nenhuma concentração (ANOVA, $p>0,05$), indicando ausência de metabolismo heterotrófico.

VIN01 e C203 cresceram melhor com etanol e demonstraram atividade heterotrófica, porém apresentaram perfis distintos de crescimento nas variadas concentrações do álcool.

Na concentração de 0,2 g L^{-1} de etanol, não só os parâmetros μ_{max} e Tg da cepa VIN01 melhoraram (de 0,31 para 0,49 dia^{-1} e de 2,23 para 1,41 dias) como também a amplitude de crescimento aumentou em relação ao controle (ANOVA, $p<0,05$). Todavia, a concentração de 10 g L^{-1} inibiu o crescimento ao reduzir os parâmetros μ_{max} e Tg (de 0,31 para 0,14 dia^{-1} e de 2,23 para 5,07 dias), quando comparados aos do controle (ANOVA, $p<0,05$).

O crescimento da cepa C203 foi marcado pela antecipação da fase estacionária em todas as concentrações de etanol bem como pelo significativo aumento de μ_{max} (de 0,30 para 1,10 dia^{-1}) e redução da Tg (de 2,33 para 0,66 dias), em relação ao controle (ANOVA $p<0,05$). Graficamente, as concentrações de 0,2 e 0,5 g L^{-1} de etanol proporcionaram as melhores condições de cultivo.

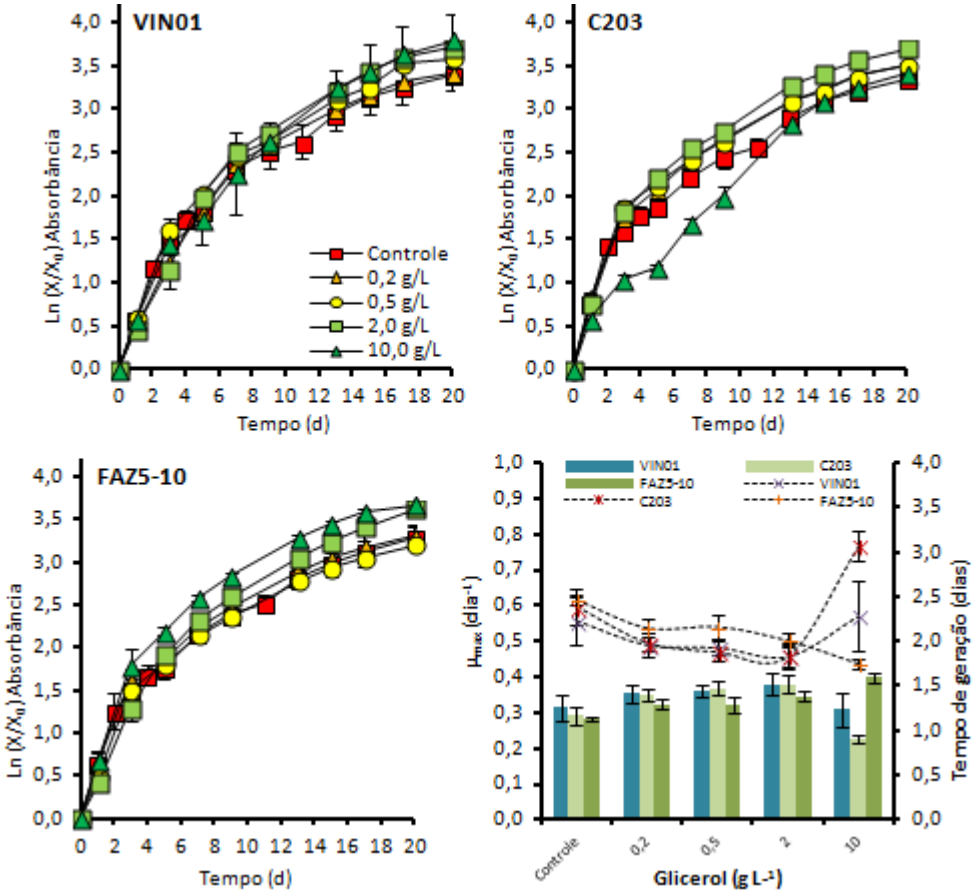

Figura 25 - Curvas de crescimento das cepas VIN01, C203 e FAZ5-10 e suas respectivas μ_{max} (barras) e tempo de geração (linhas tracejadas) nas diferentes concentrações de glicerol do cultivo mixotrófico. Barras verticais representam o desvio padrão (n=3).

O cultivo mixotrófico com glicerol não modificou os parâmetros de crescimento da cepa VIN01 (ANOVA, $p<0,05$) e provocou pequenas melhorias no crescimento das cepas C203 e FAZ-10 (Figura 25).

Em relação ao controle, a concentração de 2 g L^{-1} de glicerol melhorou os três parâmetros de crescimento da cepa C203, enquanto as concentrações de 0,2 e 0,5 g L^{-} melhoraram somente μ_{max} e Tg (ANOVA, $p<0,05$). E na concentração de 10 g L^{-1}, houve inibição com redução da μ_{max} (de 0,291 para 0,226 dia^{-1}) e aumento da Tg (de 2,39 para 3,07 dias).

Para a cepa FAZ5-10, as concentrações de 2 e 10 g L^{-1} de glicerol aumentaram sua amplitude de crescimento, em relação ao controle (ANOVA, $p<0,05$). À medida que a concentração de glicerol aumentou, μ_{max} também aumentou e Tg diminuiu gradativamente (ANOVA, $p<0,05$), apontado para melhores crescimentos.

Comparando-se os dois álcoois estudados, as modificações no crescimento devido ao glicerol foram menos expressivas do que as do etanol, todavia houve indícios de que as cepas C203 e FAZ5-10 conseguiram metabolizar glicerol.

Finalizados os estudos com açúcares e álcoois, investigou-se o efeito de oito ácidos orgânicos no cultivo mixotrófico. Os resultados estão descritos na Figura 26.

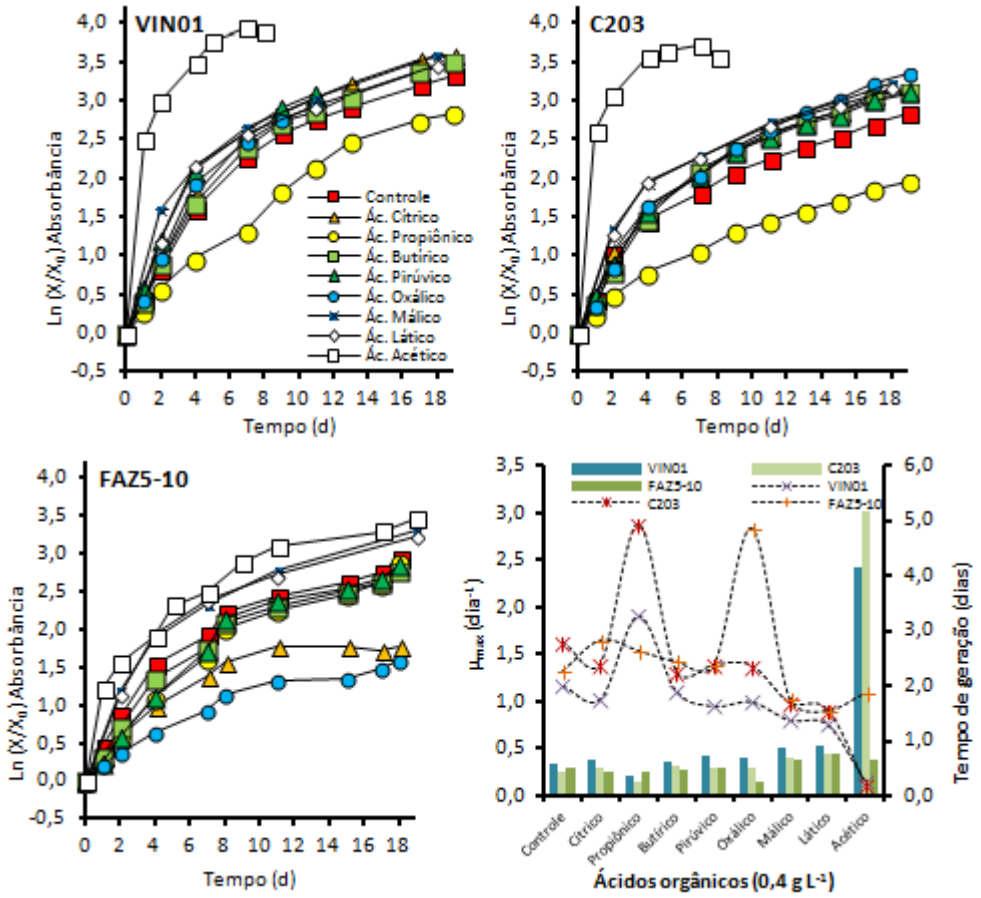

Figura 26 - Curvas de crescimento das cepas VIN01, C203 e FAZ5-10 e suas respectivas μ_{max} (barras) e tempo de geração (linhas tracejadas) na concentração de 0,4 g L^{-1} de diversos ácidos orgânicos do cultivo mixotrófico.

Nestes ensaios, a concentração foi fixada em 0,4 g L^{-1} e os experimentos foram realizados com uma repetição. Por isso, as comparações de crescimento foram baseadas somente na análise gráfica, sem estudos estatísticos.

Ácido cítrico e oxálico inibiram o crescimento da cepa FAZ5-10 ao diminuir sua amplitude de crescimento e μ_{max} além de aumentar Tg, que teve ampla elevação com ácido oxálico em relação ao controle (de 2,26 para 4,85 dias). Ácido acético aumentou a amplitude, mas sem provocar melhorias tão significativas quanto as das cepas VIN01 e C203.

Também em relação ao controle, as cepas VIN01 e C203 foram inibidas pelo ácido propiônico com marcantes reduções da amplitude de crescimento e μ_{max}, além de picos de Tg análogos aos picos provocados pelo ácido oxálico na cepa FAZ5-10.

Este experimento evidenciou que o metabolismo das microalgas para ácidos orgânicos é diferenciado entre cepas de *Chlorella* e que este caráter pode estar associado à origem ambiental de cada cepa.

Também ficou demonstrado o potencial do ácido acético em melhorar expressivamente parâmetros de crescimento e antecipar a fase estacionária de duas cepas, VIN01 e C203. Por isso, foi executado novo experimento em triplicata e com gradientes de concentração do ácido acético.

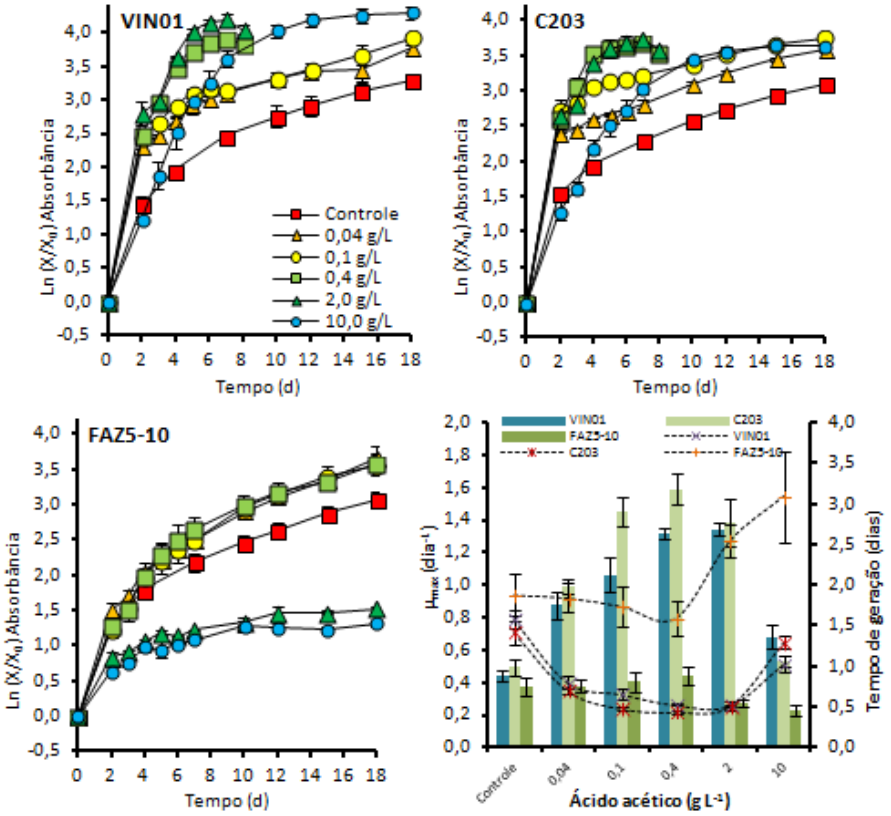

Figura 27 - Curvas de crescimento das cepas VIN01, C203 e FAZ5-10 e suas respectivas μ_{max} (barras) e tempo de geração (linhas tracejadas) em diferentes concentrações de ácido acético do cultivo mixotrófico. Barras verticais representam o desvio padrão (n=3).

Com perfil semelhante ao da glicose (Figura 20) e ao da frutose (Figura 22), o cultivo mixotrófico contendo ácido acético aumentou amplitudes de crescimento da cepa FAZ5-10, antecipou a fase estacionária das cepas VIN01 e C203 além de melhorar expressivamente seus parâmetros de crescimento, apontando para atividade do metabolismo heterotrófico nas três cepas (Figura 27).

Em relação à cepa FAZ5-10, nenhuma concentração melhorou μ_{max} ou Tg ao passo que concentrações de 0,04 a 0,4 g L^{-1} de ácido acético aumentaram amplitude de crescimento, em relação ao controle (ANOVA, $p<0,05$). A partir da concentração de 2 g L^{-1} houve redução de amplitude e com 10 g L^{-1} os três parâmetros de crescimento pioraram evidenciando inibição do cultivo (ANOVA, $p<0,05$).

VIN01 e C203 tiveram as melhores respostas ao tratamento com ácido acético. Todas as concentrações melhoraram, em relação ao controle, os três parâmetros de crescimento destas cepas, exceto a concentração de 10g L^{-1} (ANOVA, $p<0,05$).

Para chegar ao final da fase exponencial, enquanto os controles levaram 18 dias, a melhor faixa de cultivo com ácido acético (0,4 e 2 g L^{-1}) levou apenas 6 dias, representando 33% do tempo de cultivo e que ainda teve maiores amplitudes (ANOVA, $p<0,05$). A convergência destes resultados apontou para ganhos de produtividade nestas condições, semelhante ao que ocorreu com a glicose.

Comparando-se controle e concentração de 0,4 g L^{-1} de ácido acético, na cepa VIN01 μ_{max} médio aumentou de 0,44 para 1,32 dia^{-1} (3 vezes maior) enquanto o Tg médio reduziu de 1,57 para 0,53 dias. Na cepa C203, μ_{max} médio aumentou de 0,49 para 1,59 dia^{-1} (3,2 vezes maior) enquanto o Tg médio reduziu de 1,42 para 0,44 dias .

Finalizados os experimentos da frente trófica, a mixotrofia com glicose foi selecionada como o melhor fator, dentre os testados, para estimular o crescimento das cepas de *Chlorella*. Por esse motivo e visando diminuir o período experimental, esta condição de cultivo foi fixada na frente física.

5.2.3. Frente física

Nesta frente, fixou-se a mixotrofia com 2g L^{-1} de glicose em meio WC como meio de cultivo padrão, em face das respostas obtidas na frente trófica. Desta forma, o tempo experimental de 18 dias (frente química e trófica) foi reduzido para 9 dias na frente física. Os fatores investigados foram gradientes de intensidade de luz, porcentagem de inóculo e temperatura, que foi a que trouxe melhorias mais significativas dentre as três.

No primeiro experimento (Figura 28), foram pesquisados gradientes de luz com inóculos aclimatados à intensidade de 250 µmol fótons m^{-2} s^{-1}. A aclimatação foi realizada a partir de 60 µmol fótons m^{-2} s^{-1} (condição basal de cultivo) e com incrementos diários de aproximadamente 50 µmol fótons m^{-2} s^{-1}, num período de quatro dias. Tal procedimento fez-se necessário visto que, sem aclimatação, as culturas morreram nas intensidades mais elevadas, provavelmente devido a danos provocados por fotoinibição.

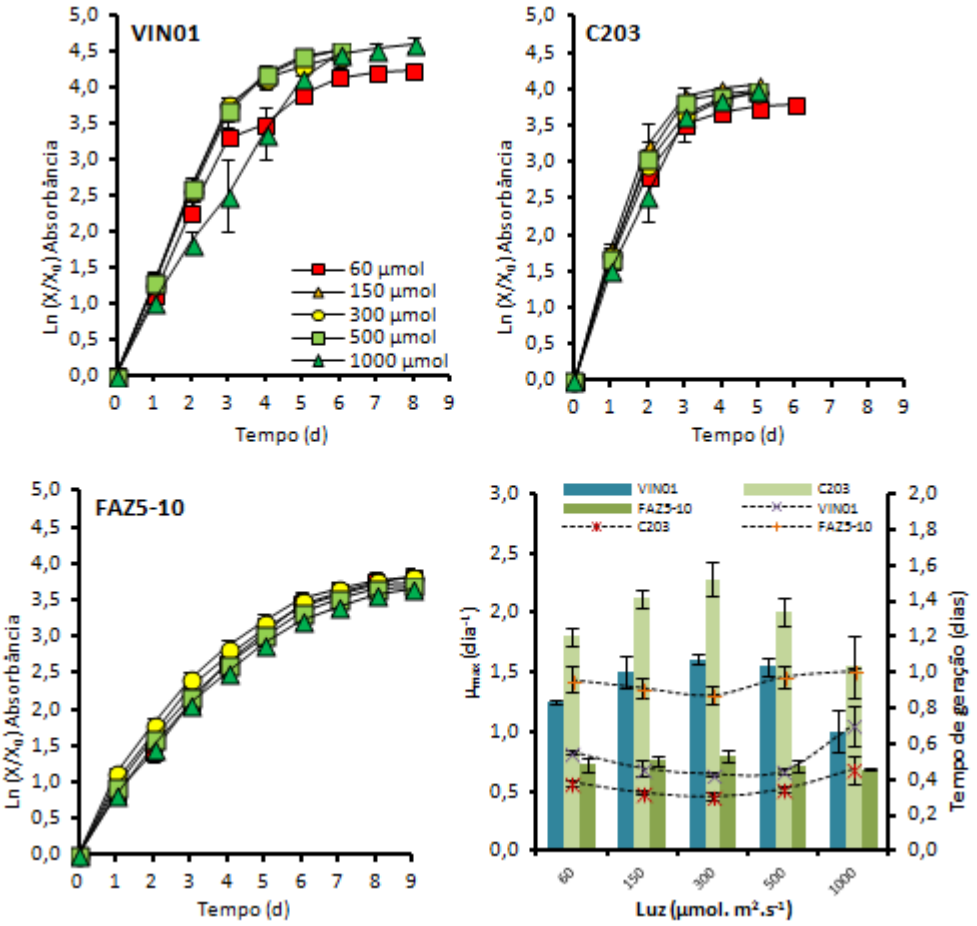

Figura 28 - Curvas de crescimento das cepas VIN01, C203 e FAZ5-10 e suas respectivas μ_{max} (barras) e tempo de geração (linhas tracejadas) nas diferentes intensidades de luz. Cultivo mixotrófico contendo 2g L^{-1} de glicose. Barras verticais representam o desvio padrão (n=3).

Para as cepas VIN01 e C203, as intensidades de luz de 150 e 500 µmol fótons m^{-2} s^{-1} tiveram maiores amplitudes médias quando comparadas à intensidade de 60 µmol fótons m^{-2} s^{-1}, que foi a que apresentou menor amplitude média de crescimento (ANOVA, $p<0,05$). As melhores μ_{max} e Tg foram obtidas na faixa de 150 a 300 µmol fótons m^{-2} s^{-1}, enquanto os extremos de 60 e 1000 µmol fótons m^{-2} s^{-1} pioraram tais parâmetros (ANOVA, $p<0,05$), apontando para efeito de inibição de crescimento por limitação de luz e fotoinibição, respectivamente.

Neste experimento, FAZ5-10 cresceu igual em todas as intensidades luminosas (ANOVA, $p<0,05$) e isto a diferenciou das demais pelo fato da cepa não apresentar inibição de crescimento nos extremos de luminosidade. Mais uma vez, demonstrou-se que o fator em estudo tem efeito distinto entre as cepas e poderia estar relacionado à origem ambiental de cada uma delas.

O segundo experimento revelou que 5% de inóculo foi a melhor concentração para maximizar, simultaneamente, os parâmetros amplitude, μ_{max} e Tg das três cepas (ANOVA, $p<0,05$) (Figura 29).

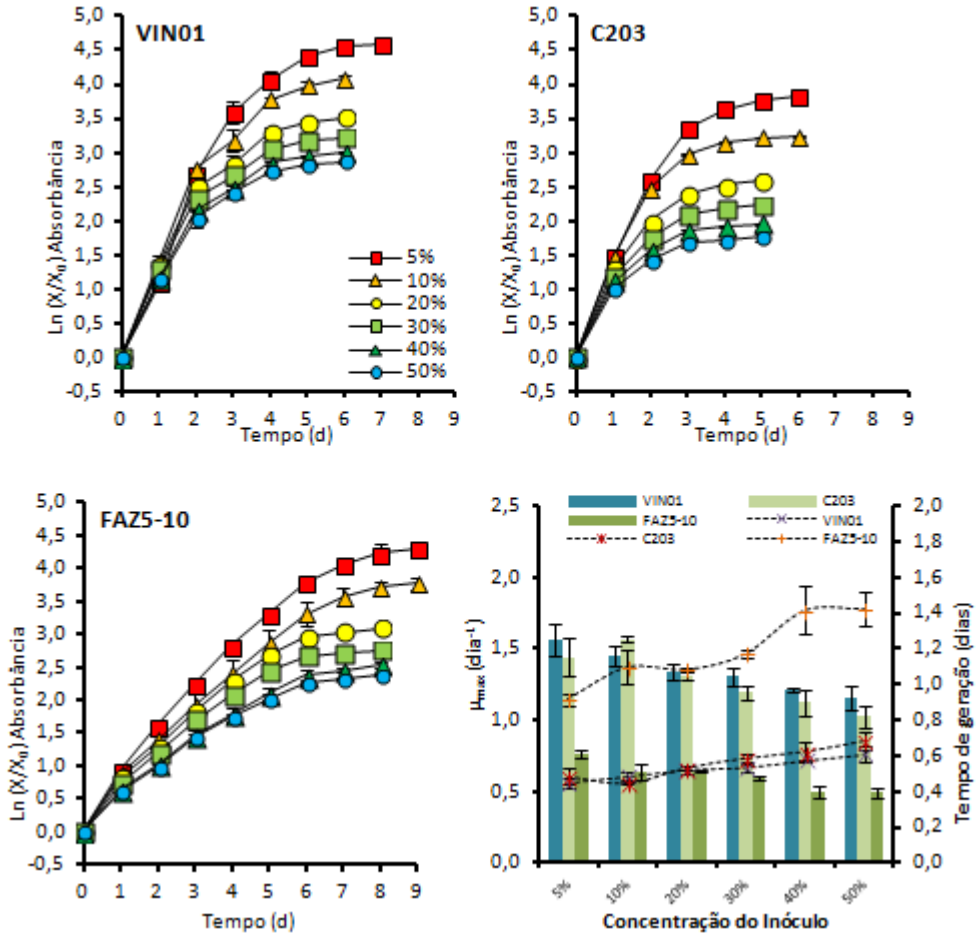

Figura 29 - Curvas de crescimento das cepas VIN01, C203 e FAZ5-10 e suas respectivas μ_{max} (barras) e tempo de geração (linhas tracejadas) nas diferentes concentrações de inóculo. Cultivo mixotrófico contendo 2g L^{-1} de glicose. Barras verticais representam o desvio padrão (n=3).

Gradiente negativo de velocidade e positivo de Tg ocorreram das menores para as maiores concentrações de inóculo. Como o menor inoculo (5%) foi utilizado desde o início da pesquisa, ele foi mantido até o final dos experimentos.

No último experimento, também houve gradiente positivo dos parâmetros com o aumento da temperatura (Figura 30).

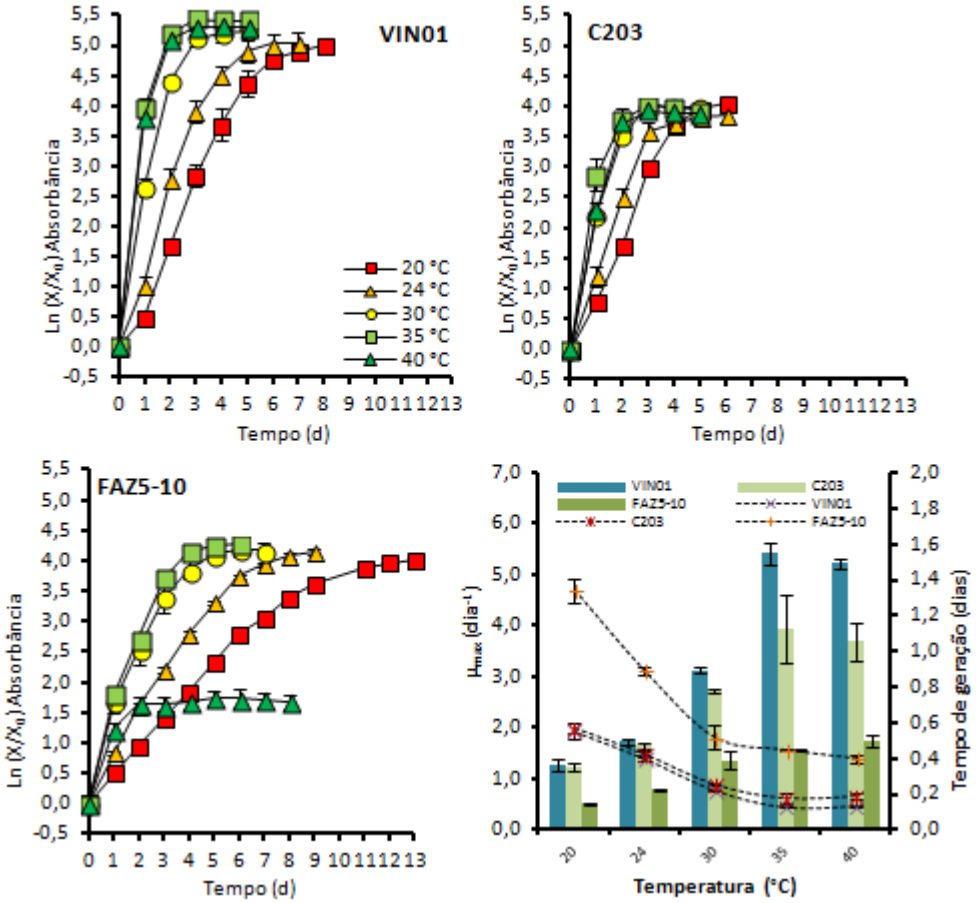

Figura 30 - Curvas de crescimento das cepas VIN01, C203 e FAZ5-10 e suas respectivas μ_{max} (barras) e tempo de geração (linhas tracejadas) nas diferentes temperaturas. Cultivo mixotrófico contendo 2g L^{-1} de glicose. Barras verticais representam o desvio padrão (n=3).

VIN01 e C203 cresceram melhor nas temperaturas de 35 e 40 ºC ao obterem melhores μ_{max} e Tg dentre as temperaturas testadas. Comparando-se o crescimento da pior faixa de temperatura (20 ºC) com o da melhor faixa (35 ºC), μ_{max} médio da VIN01 aumentou de 1,26 para 5,42 (4,3 vezes maior), enquanto o Tg médio reduziu de 0,55 para 0,13 dias. Na cepa C203, μ_{max} médio aumentou de 1,23 para 3,94 dia^{-1} (3,2 vezes maior), enquanto o Tg médio reduziu de 0,57 para 0,18 dias.

FAZ5-10 cresceu melhor nas temperaturas de 30 e 35 ºC. A faixa de 40 ºC a inibiu ao reduzir sua amplitude de crescimento em relação às demais temperaturas (de 4,14 para 1,69) (ANOVA $p<0,05$).

Em função do aumento das μ_{max}, também houve antecipação da fase estacionária das três cepas. Nas melhores condições (35 e 40 ºC), VIN01 e C203 chegaram à fase estacionária em apenas dois dias, que representam 17% do tempo necessário para o cultivo fototrófico chegar à mesma fase (considerando-se os 18 dias das condições controle das frentes química e trófica). FAZ5-10, cultivada a 35 ºC, chegou à fase estacionária em quatro dias, que representam 22% do tempo utilizado pelo cultivo fototrófico.

Devido ao potencial de crescimento em temperaturas de até 40 ºC, as cepas VIN01 e C203 foram identificadas como termotolerantes e como potenciais candidatas ao cultivo em vinhaça, visto que o efluente é emitido em temperaturas elevadas (~60 a 90 ºC) nas usinas de bioetanol.

5.2.4. Seleção dos fatores e níveis para otimização

Inicialmente, buscou-se melhoria do meio WC para que macro e micronutrientes não fossem limitantes ao crescimento das culturas de *Chlorella*.

Inicialmente, determinou-se que o cultivo mixotrófico contendo 2 g L^{-1} de glicose seria adotado como padrão nos ensaios, em face das respostas obtidas na frente trófica. A partir desta definição, determinou-se a assimilação de macronutrientes (N e P) e glicose pelas três cepas. Após uma série de ajustes, baseada nas concentrações remanescentes dos nutrientes e glicose, chegaram-se às seguintes composições de meio para os experimentos de otimização:

- cepas VIN01 e C203 – Meio WC contendo 10 vezes a concentração de macro e micronutrientes, 12 vezes a concentração de fósforo e 4 g L^{-1} de glicose;
- cepa FAZ5-10 – Meio WC contendo 3 vezes a concentração de macro e micronutrientes e 2 g L^{-1} de glicose;

Após tais definições, executou-se novo cultivo mixotrófico até a fase estacionária e com as modificações do meio WC propostas. Os resultados das análises de nutrientes remanescentes estão na Tabela 8

Tabela 8 – Concentrações de nitrogênio, fósforo e glicose na composição do meio WC modificado para otimização e percentual de nutrientes assimilados pelas culturas mixotróficas cultivadas a 24 °C e 60 µmol fótons m^{-2} s^{-1} (12h/12h).

cepas	N-NO_3 (mg L^{-1})			P-PO_4 (mg L^{-1})			Glicose (g L^{-1})		
	WC	**Assimilado**	**%**	**WC**	**Assimilado**	**%**	**WC**	**Assimilado**	**%**
VIN01	140	100,0	71,4	18,60	18,35	98,7	4,0	2,1	52,2
C203	140	115,8	82,7	18,60	18,56	99,8	4,0	3,1	77,8
FAZ5-10	42	32,1	76,5	4,65	4,58	98,5	2,0	1,2	57,6

Embora fósforo tenha sido assimilado praticamente em sua totalidade, testes com maiores concentrações provocaram inibição do crescimento, principalmente na cepa FAZ5-10, além da precipitação do meio após sua autoclavagem. Em razão desses fatores, fixou-se o limite relativo ao WC original de 12 vezes a concentração de fósforo, para VIN01 e C203, e de 3 vezes a concentração de fósforo, para FAZ5-10. De outro modo, nitrogênio e glicose foram assimilados em até cerca de 80% da concentração inicial, restando o limite mínimo de 20% de disponibilidade para a otimização.

Feitos estes ajustes, iniciou-se o planejamento de otimização propriamente dito.

Da frente química, optou-se por explorar o fator pH em diferentes níveis alcalinos, os quais melhoraram o crescimento das três cepas (Figura 19). Os demais fatores foram excluídos da otimização, visto que melhoraram μ_{max} e Tg em condições de limitação da amplitude de crescimento. A faixa de concentração de micronutrientes fixada para VIN01 e C203 (10WC) correspondeu à concentração que aumentou suas μ_{max} nos ensaios de varredura (Figura 17). Tal condição não foi adotada para FAZ5-10 pois, além dela assimilar menos nitrogênio e fósforo do que VIN01 e C203, esta cepa não tolerou o aumento combinado de macro e micronutrientes acima de 3 vezes a concentração do WC.

Da frente trófica, optou-se por fixar glicose como fonte de carbono orgânico para os experimentos de otimização, visto que ela foi o fator que trouxe melhores respostas de crescimento às três cepas (Figura 20). Assim sendo, adotaram-se as concentrações de glicose descritas na Tabela 8 como fatores fixos dos experimentos.

Da frente física, optou-se por explorar os fatores luz e temperatura, em diferentes níveis reportados como ótimos na varredura, e fixar o fator inóculo em 5%, que foi a concentração que melhorou os parâmetros de crescimento das três cepas.

Em ensaios prévios planejados com delineamento central composto rotacional (DCCR), três fatores foram investigados de acordo com os seguintes limites: pH – de 9,2 a 11,2 -, temperatura – de 24 a 37 ºC -, luz – de 100 a 600 µmol fótons m^{-2} s^{-1}.

Verificou-se que o fator pH não teve influência significativa na otimização e, por isso, ele foi eliminado dos planejamentos seguintes e fixado em 9,2. Também verificaram-se que faixas de luz mais baixas deram melhores respostas ao crescimento e, por isso, os novos DCCRs foram planejados para compreender faixas de 0 a 300 µmol fótons m^{-2} s^{-1}. Desta forma, foi possível explorar, em um mesmo experimento, o desempenho de cultivos mixotróficos (com luz) e heterotróficos (sem luz). Quanto à temperatura, fizeram-se ajustes particulares para cada cepa e os níveis investigados estão descritos no item 5.2.5.

5.2.5. Otimização do cultivo com Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)

As matrizes dos delineamentos experimentais contendo fatores, níveis e variáveis dependentes investigadas estão acompanhadas de elementos da ANOVA para avaliar e validar o planejamento fatorial e o modelo preditivo gerado para otimização das culturas. Também estão representados os gráficos de superfície de resposta contendo as possibilidades de resolução do modelo preditivo, dentro dos níveis testados para cada fator.

5.2.5.1. Otimização do cultivo da cepa VIN01

Na Tabela 9, estão descritos fatores, níveis e respostas das variáveis dependentes μ_{max} e fluorescência para cada experimento realizado.

Tabela 9 – Matriz do delineamento composto central rotacional (DCCR) para cultivo da cepa VIN01 e respectivas respostas de μ_{max} e fluorescência aos fatores temperatura e luz.

Experimento	Temperatura (°C)	Luz (µmol fótons m^{-2} s^{-1})	μ_{max} (dia^{-1})	Fluorescência (u.a.)
1	25,0	150	1,98	3,09
2	25,0	150	1,74	3,13
3	25,0	150	1,77	2,84
4	27,3	256	1,94	2,76
5	27,3	256	2,05	2,98
6	27,3	256	2,09	2,82
7	27,3	44	2,08	2,35
8	27,3	44	1,86	2,45
9	27,3	44	-	-
10	33,0	0	1,02	0,41
11	33,0	0	1,05	0,35
12	33,0	0	1,07	0,37
13	33,0	150	3,43	1,69
14	33,0	150	3,56	1,79
15	33,0	150	3,67	2,05
16	33,0	150	3,35	1,74
17	33,0	150	3,25	1,60
18	33,0	150	3,63	2,17
19	33,0	150	3,45	2,52
20	33,0	150	3,45	1,21
21	33,0	150	3,66	1,62
22	33,0	150	3,38	1,37
23	33,0	150	3,21	2,24
24	33,0	150	3,54	1,99
25	33,0	300	2,72	1,12
26	33,0	300	2,89	1,92
27	33,0	300	2,82	2,12
28	38,7	256	2,87	0,75
29	38,7	256	2,87	0,62
30	38,7	256	2,87	0,91
31	38,7	44	2,34	1,00
32	38,7	44	2,29	0,93
33	38,7	44	2,36	0,94
34	41,0	150	3,16	1,17
35	41,0	150	3,01	1,22
36	41,0	150	2,79	1,16

Tabela 10 – Análise de variância (ANOVA) do DCCR da cepa VIN01 (μ_{max}).

Fonte	SQ	gl	QM	F	p
Regressão	19,2291	5	3,8458	242,3297	6,10E-21
Temperatura	3,1859	1	3,1859	200,7450	9,71E-14
Temperatura^2	4,8302	1	4,8302	304,3562	7,16E-16
Luz	3,7285	1	3,7285	234,9377	1,55E-14
Luz^2	10,4778	1	10,4778	660,2146	5,23E-20
Temperatura x Luz	0,0731	1	0,0731	4,6059	4,14E-02
Resíduo	1,8012	29	0,0621		
Falta de ajuste	1,3886	3	0,4629	29,1656	1,78E-08
Erro puro	0,4126	26	0,0159		
Total	21,0304	34			
R^2	0,9144				
R^2 ajustado	0,8996				

Tabela 11 – Análise de variância (ANOVA) do DCCR da cepa VIN01 (fluorescência de lipídeos).

Fonte	SQ	gl	QM	F	p
Regressão	18,6707	5	3,7341	43,9522	3,86E-12
Temperatura	13,7146	1	13,7146	161,4261	6,64E-13
Temperatura^2	0,5561	1	0,5561	6,5456	1,64E-02
Luz	0,9247	1	0,9247	10,8837	2,73E-03
Luz^2	2,4623	1	2,4623	28,9821	1,09E-05
Temperatura x Luz	0,4129	1	0,4129	4,8603	3,62E-02
Resíduo	4,5552	30	0,1518		
Falta de ajuste	2,2613	3	0,7538	8,8721	2,95E-04
Erro puro	2,2939	27	0,0850		
Total	23,2259	35			
R^2	0,8039				
R^2 ajustado	0,7712				

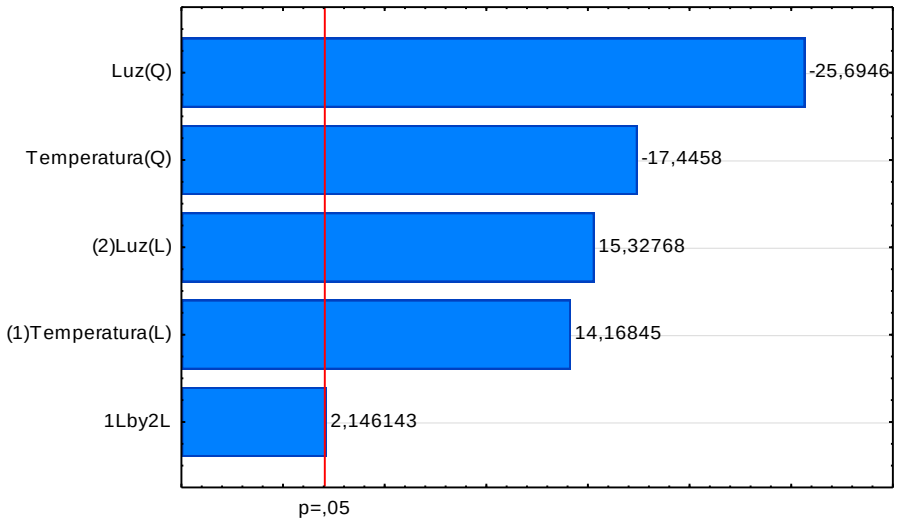

Figura 31 – Diagrama de Pareto dos coeficientes do modelo preditivo para μ_{max} da cepa VIN01. Barras horizontais à direita do limite de significância (p<0,05) representam os coeficientes que foram estatisticamente significativos para o modelo.

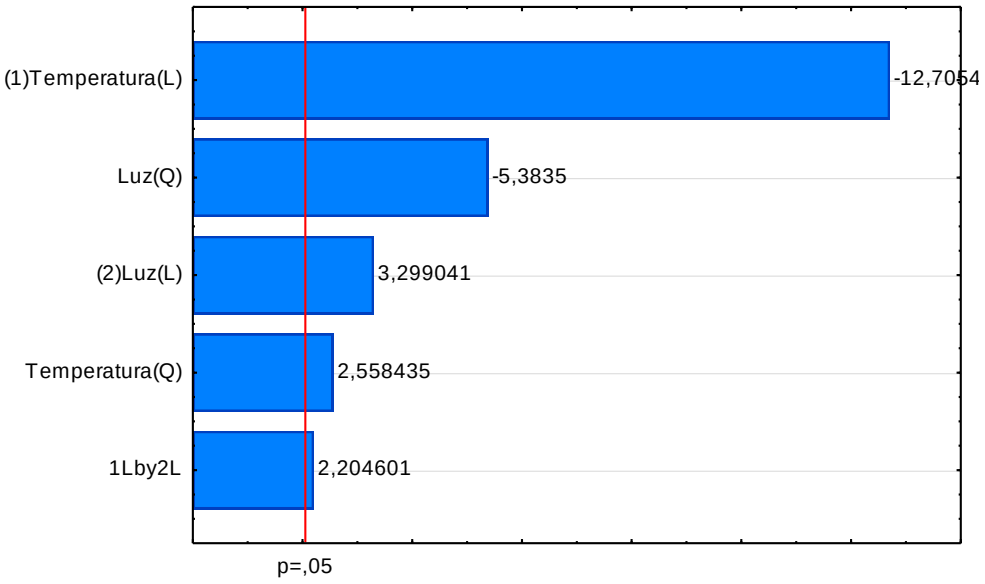

Figura 32 - Diagrama de Pareto dos coeficientes do modelo preditivo para fluorescência de lipídeos da cepa VIN01. Barras horizontais à direita do limite de significância ($p<0,05$) representam os coeficientes que foram estatisticamente significativos para o modelo.

De acordo com a ANOVA do DCCR (Tabela 10 e Tabela 11) e conforme representação esquemática da significância dos coeficientes do modelo pelo diagrama de Pareto (Figura 31 e Figura 32), todos os termos do modelo quadrático (temperatura, temperatura^2, luz, luz^2, luz x temperatura) foram significativos e incluídos ao modelo tanto para previsão da μ_{max} quanto para previsão da fluorescência de lipídeos.

Na Figura 33, estão ilustradas as superfícies de resposta geradas pelo modelo para predizer μ_{max} em função da luz e temperatura do cultivo. As condições de otimização previstas pelo modelo apontam para μ_{max} maiores do que 3,2 dia^{-1} em níveis de temperatura de 34 a 37 ºC e luz de 150 a 200 µmol fótons m^{-2} s^{-1}.

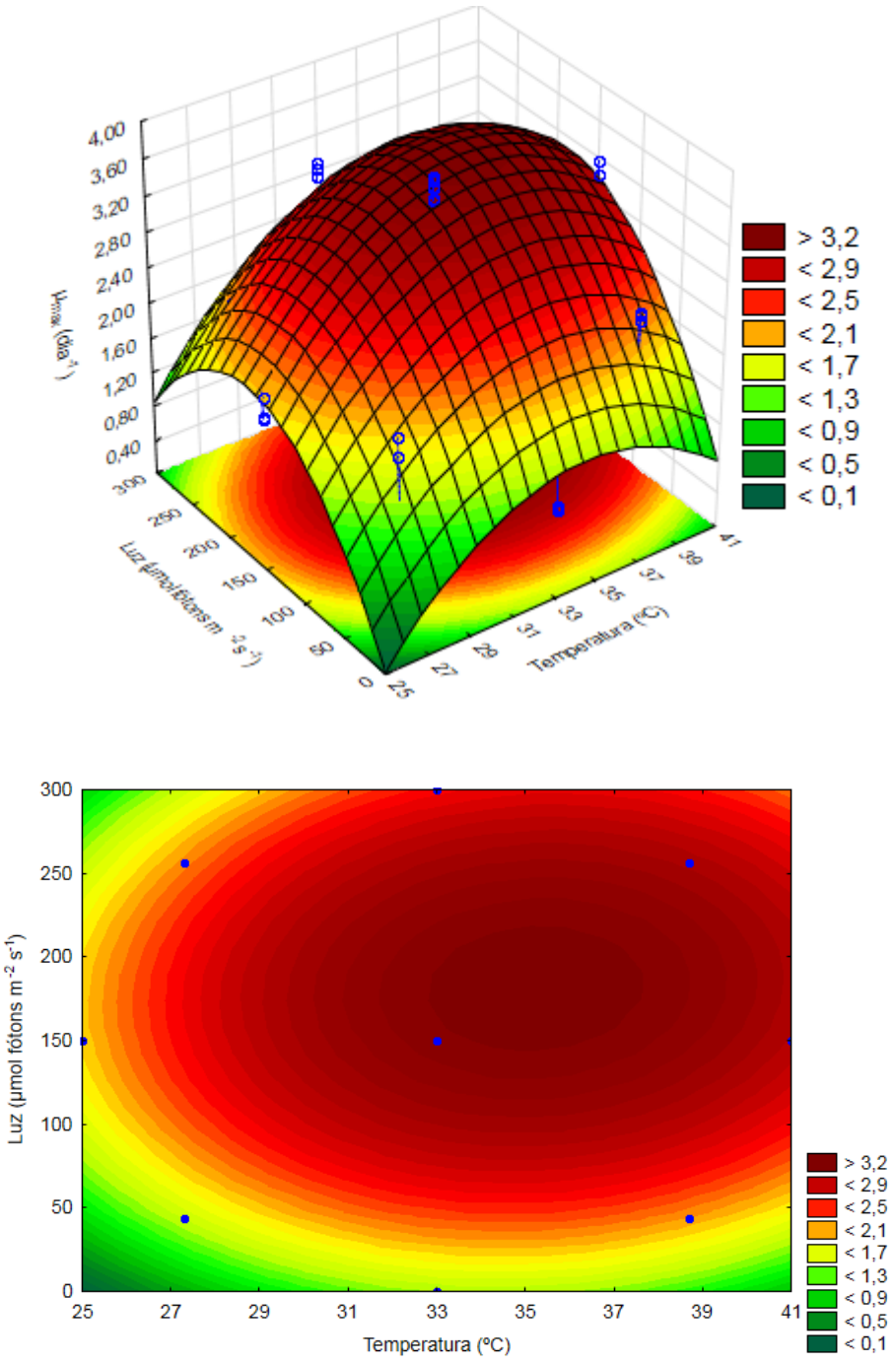

Figura 33 – Superfícies de resposta da μ_{max} da cepa VIN01 em função da luz e temperatura, de acordo com o modelo preditivo. Pontos azuis representam os pontos experimentais utilizados para gerar o modelo.

Na Figura 34, estão ilustradas as superfícies de resposta geradas pelo modelo para predizer fluorescência de lipídeos em função da luz e temperatura do cultivo. A condição de maior fluorescência apontada pelo modelo ocorre em níveis médios de temperatura abaixo de 25 ºC e luz média de 150 µmol fótons m^{-2} s^{-1}.

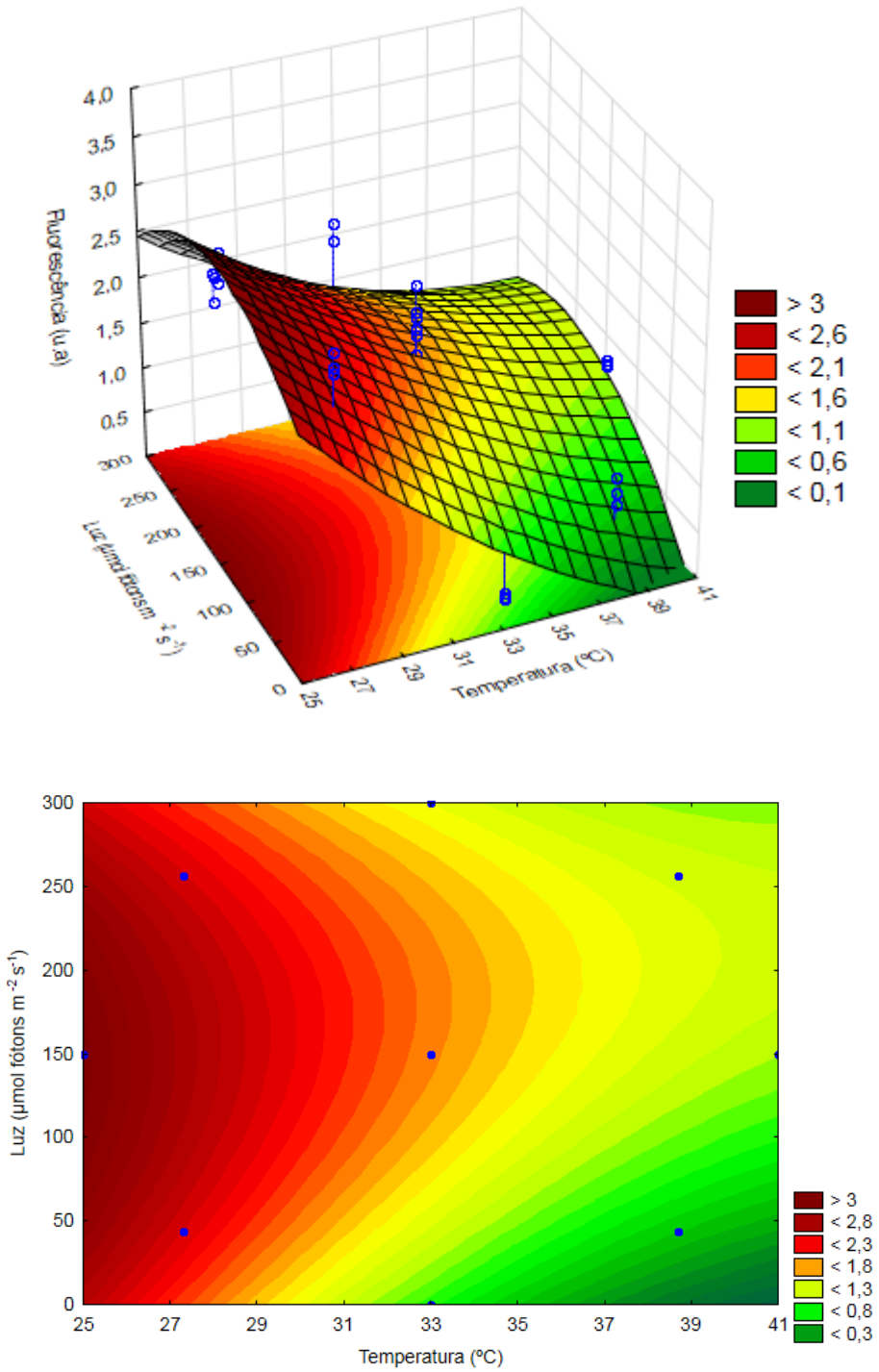

Figura 34 - Superfícies de resposta da fluorescência de lipídeos neutros da cepa VIN01 em função da luz e temperatura, de acordo com o modelo preditivo. Pontos azuis representam os pontos experimentais utilizados para gerar o modelo.

O modelo preditivo gerado para μ_{max} da cepa VIN01, compreendido nas faixas de temperatura de 25 a 41 ºC e luz de 0 a 300 µmol fótons m^{-2} s^{-1}, foi:

$$\mathbf{VIN01_{\mu max} = -17{,}1919 + 1{,}0817.temperatura - 0{,}0157.temperatura^2 + 0{,}0191.luz - 0{,}0001.luz^2 + 0{,}0001.temperatura.luz}$$

Na condição escolhida de 37 ºC e 170 µmol fótons m^{-2} s^{-1}, que está dentro da faixa ótima para otimização da μ_{max}, o valor de μ_{max} previsto pelo modelo foi de 3,54 dia^{-1} e o valor encontrado experimentalmente para validá-lo (n=5) foi de 3,34 ± 0,18 dia^{-1}. Houve variação de apenas 6% entre o valor previsto e o valor real, apontando que o modelo para predição de μ_{max} da cepa VIN01 foi bem calibrado. De acordo com a ANOVA (Tabela 10), R^2 ajustado para este modelo foi de 0,8996.

Também é válido salientar que, de acordo com as previsões do modelo e os resultados experimentais (Tabela 9), a otimização da μ_{max} ocorreu em níveis de luz e temperatura opostos aos da otimização da fluorescência para lipídeos. Por isso, parece plausível afirmar que a otimização de biomassa e lipídeos não pode ser concomitante e teria de acontecer em duas etapas distintas.

O modelo para predição de fluorescência de lipídeos apontou para regiões ótimas de fluorescência fora da faixa experimental. Em função dessa característica, novos experimentos precisariam ser realizados em níveis mais baixos de temperatura visando ao deslocamento do ponto ótimo de fluorescência para níveis centrais, e o consequente ajuste do modelo.

Desta forma, a condição otimizada de cultivo mixotrófico para a cepa VIN01 foi definida para temperatura de 37 ºC e intensidade luminosa de 170 µmol fótons m^{-2} s^{-1}, visando à produção de biomassa.

A cepa também foi selecionada para o cultivo em vinhaça, visto que o efluente foi seu ambiente de origem e que suas μ_{max} e fluorescência para lipídeos neutros apresentaram os maiores valores associados, quando comparados aos das cepas C203 e FAZ5-10. O experimento para otimizar seu cultivo na vinhaça está descrito no item 5.3.2.

5.2.5.2. Otimização do cultivo da cepa C203

Na Tabela 12, estão descritos fatores, níveis e respostas das variáveis dependentes μ_{max} e fluorescência para cada experimento realizado.

Tabela 12 - Matriz do delineamento composto central rotacional (DCCR) para cultivo da cepa C203 e respectivas respostas de μ_{max} e fluorescência aos fatores temperatura e luz.

Experimento	Temperatura (°C)	Luz (µmol fótons m^{-2} s^{-1})	μ_{max} (dia^{-1})	Fluorescência (u.a.)
1	25,0	150	1,185	1,456
2	25,0	150	1,150	1,356
3	25,0	150	1,183	1,196
4	27,3	256	1,615	0,915
5	27,3	256	1,474	0,665
6	27,3	256	1,634	1,045
7	27,3	44	1,396	1,205
8	27,3	44	1,330	1,365
9	27,3	44	1,388	1,405
10	33,0	0	0,572	0,937
11	33,0	0	0,507	1,047
12	33,0	0	0,488	-
13	33,0	150	2,493	0,812
14	33,0	150	2,494	0,664
15	33,0	150	2,422	0,609
16	33,0	150	2,395	0,902
17	33,0	150	2,396	0,61
18	33,0	150	2,184	0,602
19	33,0	150	2,332	0,762
20	33,0	150	2,395	0,882
21	33,0	150	2,649	0,802
22	33,0	150	2,748	0,882
23	33,0	150	3,172	0,912
24	33,0	150	2,523	-
25	33,0	300	2,401	1,316
26	33,0	300	2,508	1,266
27	33,0	300	2,363	1,106
28	38,7	256	2,666	0,985
29	38,7	256	2,519	0,935
30	38,7	256	2,409	1,095
31	38,7	44	2,402	0,638
32	38,7	44	2,384	0,838
33	38,7	44	2,418	0,838
34	41,0	150	3,243	0,777
35	41,0	150	3,108	0,777
36	41,0	150	3,158	0,877

Tabela 13 - Análise de variância (ANOVA) do DCCR da cepa C203 (μ_{max}).

Fonte	SQ	gl	QM	F	p
Regressão	15,2961	4	3,8240	132,9434	2,38E-17
Temperatura	8,6703	1	8,6703	301,4240	3,56E-16
Temperatura^2	0,3521	1	0,3521	12,2422	1,64E-03
Luz	2,0834	1	2,0834	72,4288	4,01E-09
Luz^2	4,5103	1	4,5103	156,8028	9,31E-13
Temperatura x Luz	*parâmetro excluído do modelo (p>0,05)*				
Resíduo	4,6111	31	0,1487		
Falta de ajuste	3,8345	4	0,9586	33,3268	4,40E-10
Erro puro	0,7766	27	0,0288		
Total	19,9073	35			
R^2	0,7684				
R^2 ajustado	0,7385				

Tabela 14 - Análise de variância (ANOVA) do DCCR da cepa C203 (fluorescência de lipídeos).

Fonte	SQ	gl	QM	F	p
Regressão	1,5502	5	0,3100	21,2545	2,85E-08
Temperatura	0,5097	1	0,5097	34,9425	3,61E-06
Temperatura^2	0,3044	1	0,3044	20,8684	1,14E-04
Luz	0,1098	1	0,1098	7,5298	1,11E-02
Luz^2	0,3548	1	0,3548	24,3242	4,44E-05
Temperatura x Luz	0,3506	1	0,3506	24,0319	4,80E-05
Resíduo	0,4679	28	0,0167		
Falta de ajuste	0,1032	3	0,0344	2,3590	9,57E-02
Erro puro	0,3647	25	0,0146		
Total	2,0181	33			
R^2	0,7681				
R^2 ajustado	0,7267				

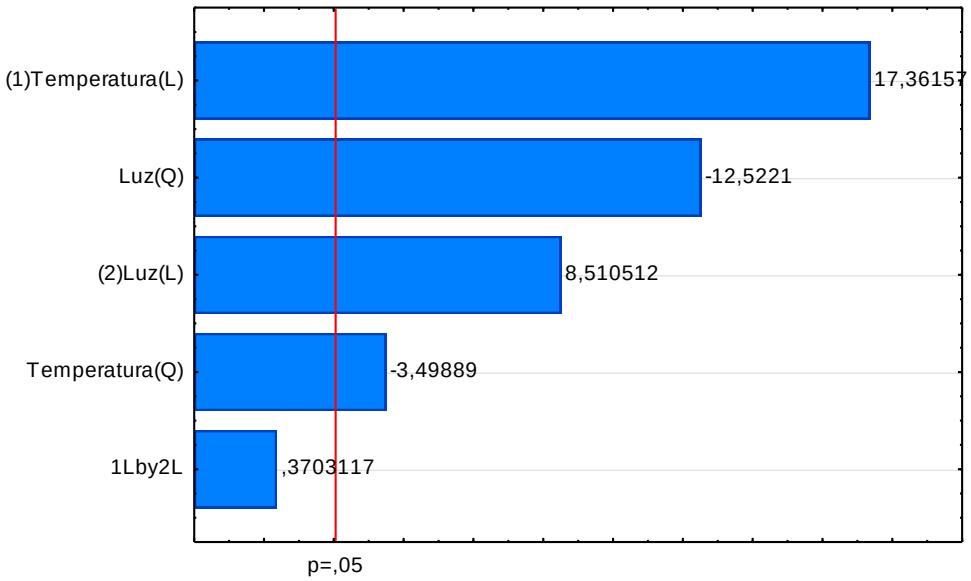

Figura 35 - Diagrama de Pareto dos coeficientes do modelo preditivo para μ_{max} da cepa C203. Barras horizontais à direita do limite de significância (p<0,05) representam os coeficientes que foram estatisticamente significativos para o modelo.

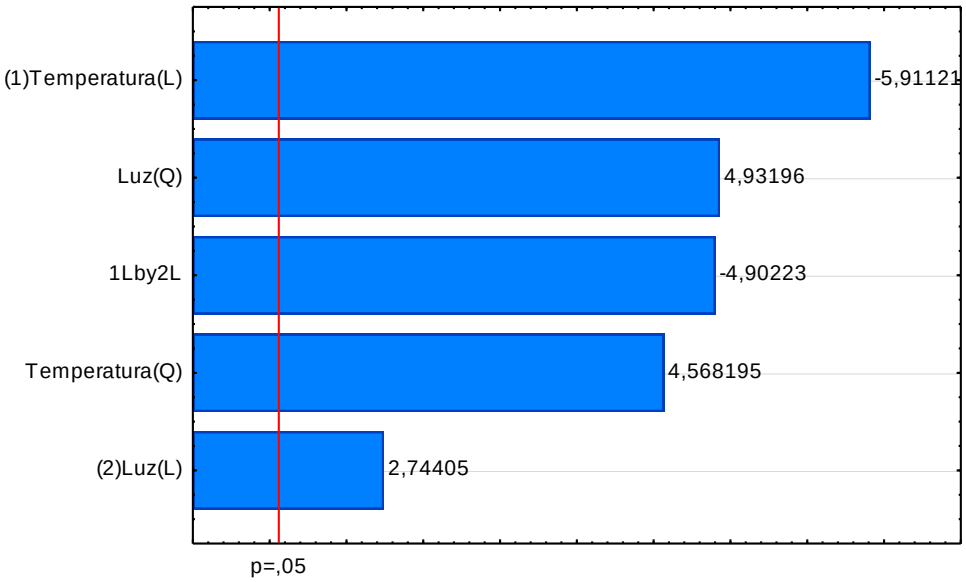

Figura 36 - Diagrama de Pareto dos coeficientes do modelo preditivo para fluorescência de lipídeos da cepa C203. Barras horizontais à direita do limite de significância ($p<0,05$) representam os coeficientes que foram estatisticamente significativos para o modelo.

De acordo com a ANOVA do DCCR (Tabela 13) e conforme representação esquemática da significância dos termos do modelo quadrático pelo diagrama de Pareto (Figura 35), o termo "luz x temperatura" não foi significativo para ajuste das curvas de resposta de μ_{max} e, portanto, foi excluído do modelo. Com relação à fluorescência para lipídeos, todos os termos do modelo foram significativos e incluídos a ele (Tabela 14 e Figura 36).

Na Figura 37, estão ilustradas as superfícies de resposta geradas pelo modelo para predizer μ_{max} em função da luz e temperatura do cultivo. As condições de otimização previstas pelo modelo apontam para μ_{max} maiores do que 2,8 dia^{-1} em temperaturas médias de 40 ºC e intensidade luminosa de 150 a 220 µmol fótons m^{-2} s^{-1}.

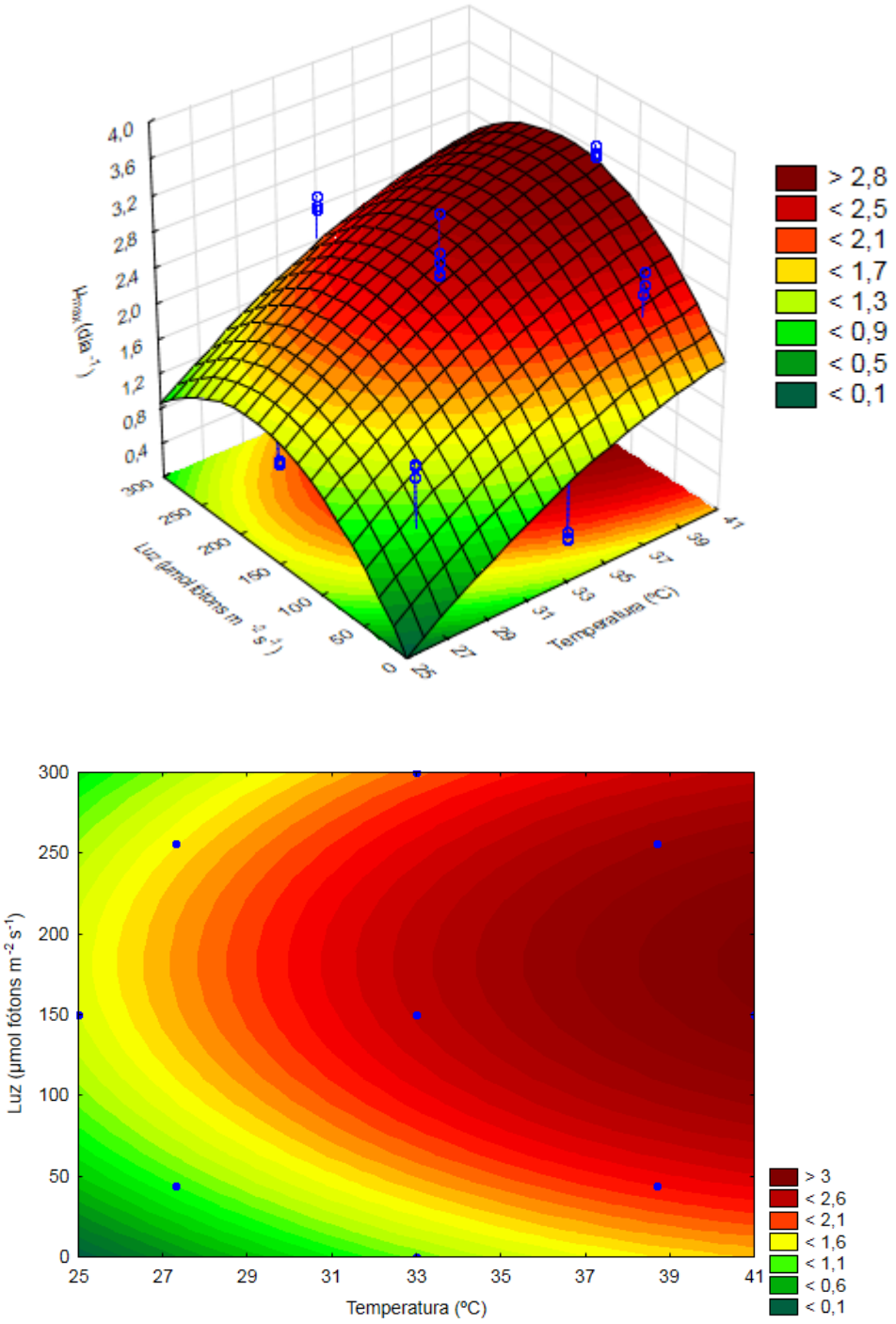

Figura 37 - Superfícies de resposta da μ_{max} da cepa C203 em função da luz e temperatura, de acordo com o modelo preditivo. Pontos azuis representam os pontos experimentais utilizados para gerar o modelo.

Na Figura 38, estão ilustradas as superfícies de resposta geradas pelo modelo para predizer fluorescência de lipídeos em função da luz e temperatura do cultivo. A condição de maiores fluorescências apontada pelo modelo ocorre em direção à temperatura de 25 ºC e luz de 300 µmol fótons m^{-2} s^{-1}.

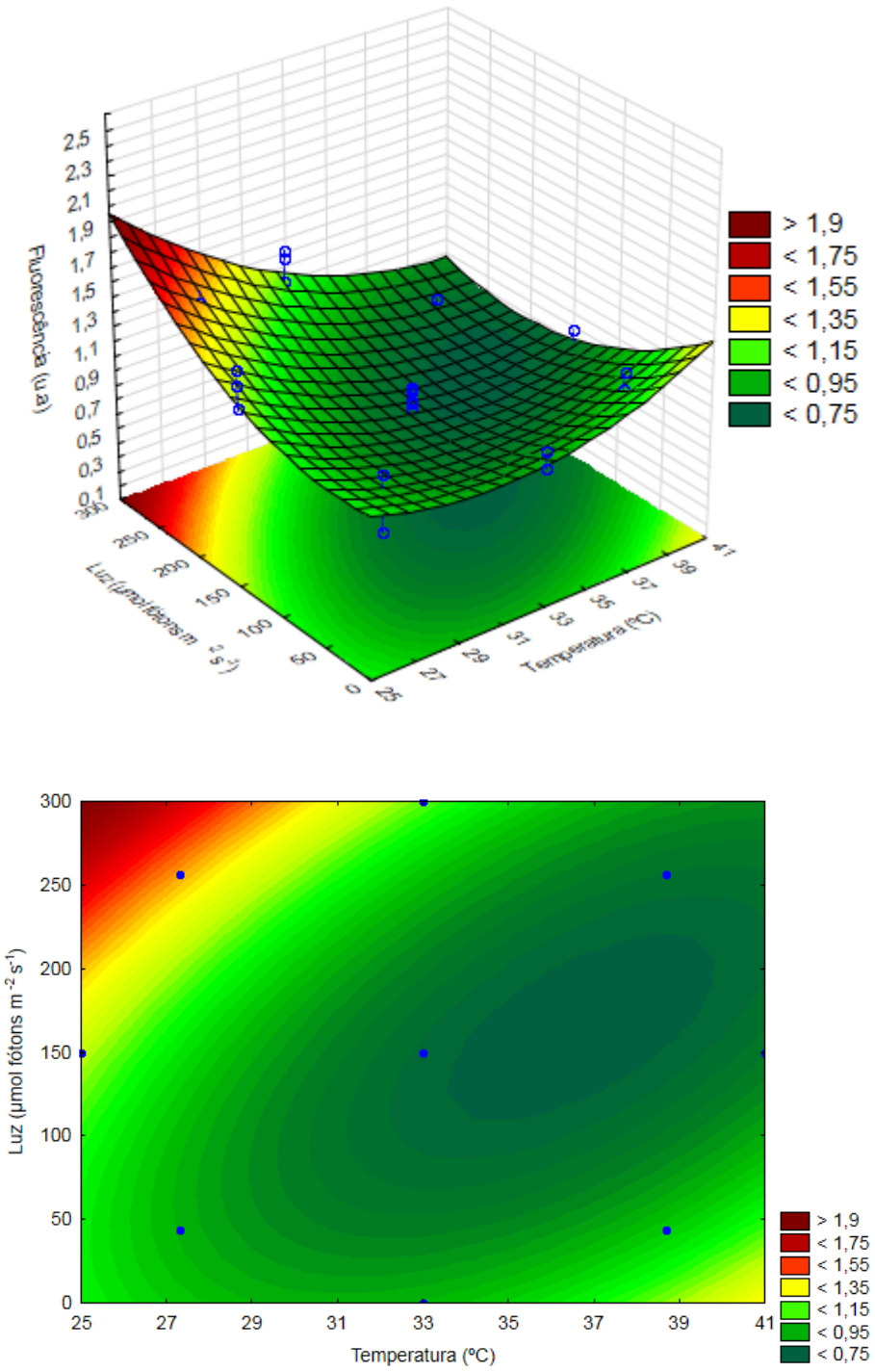

Figura 38 - Superfícies de resposta da fluorescência de lipídeos neutros da cepa C203 em função da luz e temperatura, de acordo com o modelo preditivo. Pontos azuis representam os pontos experimentais utilizados para gerar o modelo.

O modelo para predição de fluorescência de lipídeos para a cepa C203 também apontou para regiões ótimas de fluorescência fora da faixa experimental, como ocorrido com a cepa VIN01. Por isso, novos experimentos precisariam ser realizados em níveis mais baixos de temperatura e mais altos de luz, visando ao deslocamento do ponto ótimo de fluorescência para níveis centrais, e o consequente ajuste do modelo.

O modelo preditivo gerado para μ_{max} da cepa C203, compreendido nas faixas de temperatura de 25 a 41 ºC e luz de 0 a 300 µmol fótons m^{-2} s^{-1}, foi:

$$\mathbf{C203_{\mu max} = -6{,}95367 + 0{,}38411.temperatura - 0{,}0042.temperatura^2 + 0{,}01570.luz - 0{,}00004.luz^2}$$

Na condição escolhida de 40 ºC e 200 µmol fótons m^{-2} s^{-1}, que está dentro da faixa ótima para otimização da μ_{max}, o valor de μ_{max} previsto pelo modelo foi de 3,08 dia^{-1} e o valor encontrado experimentalmente para validá-lo (n=5) foi de 3,58 ± 0,23 dia^{-1}. Houve variação de 14% entre o valor previsto e o valor real, apontando que o modelo para predição de μ_{max} da cepa VIN01 foi bem calibrado, mas poderia ser melhorado, caso seu R^2 ajustado (Tabela 13) de 0,7385 fosse maior.

Com caráter análogo ao da cepa VIN01, a otimização da μ_{max} ocorreu em níveis de luz e temperatura opostos aos da otimização da fluorescência para lipídeos e, por isso, sua otimização de biomassa e lipídeos teria de acontecer em duas etapas distintas.

Não foi possível validar o modelo para predição de fluorescência de lipídeos, pois as regiões ótimas de fluorescência ficaram fora da faixa experimental investigada. São necessários novos experimentos em níveis que tragam o ponto ótimo de fluorescência para níveis centrais e que permitam o consequente ajuste do modelo.

Desta forma, a condição otimizada de cultivo mixotrófico para a cepa C203 foi definida para temperatura de 40 ºC e intensidade luminosa de 200 µmol fótons m^{-2} s^{-1}, visando à produção de biomassa.

5.2.5.3. Otimização do cultivo da cepa FAZ5-10

Na Tabela 15, estão descritos fatores, níveis e respostas das variáveis dependentes μ_{max} e fluorescência para cada experimento realizado.

Tabela 15 - Matriz do delineamento composto central rotacional (DCCR) para cultivo da cepa FAZ5-10 e respectivas respostas de μ_{max} e fluorescência aos fatores temperatura e luz.

Experimento	Temperatura (°C)	Luz (µmol fótons m^{-2} s^{-1})	μ_{max} (dia^{-1})	Fluorescência (u.a.)
1	25	150	0,665	2,599
2	25	150	0,629	2,819
3	25	150	0,668	2,729
4	26,9	44	0,746	1,567
5	26,9	44	0,859	1,967
6	26,9	44	0,799	2,067
7	26,9	256	0,733	4,290
8	26,9	256	0,716	5,400
9	26,9	256	0,768	5,970
10	31,5	0	0,824	1,449
11	31,5	0	0,986	1,419
12	31,5	0	0,916	1,489
13	31,5	150	1,105	2,057
14	31,5	150	1,235	1,987
15	31,5	150	1,281	2,697
16	31,5	150	1,302	2,717
17	31,5	150	1,249	2,567
18	31,5	150	1,336	2,597
19	31,5	150	1,320	2,837
20	31,5	150	1,154	2,667
21	31,5	150	1,201	2,697
22	31,5	150	1,221	2,607
23	31,5	150	1,197	2,317
24	31,5	150	1,249	2,557
25	31,5	300	1,380	4,849
26	31,5	300	1,311	5,699
27	31,5	300	1,372	5,859
28	36,1	44	1,180	1,742
29	36,1	44	1,198	1,922
30	36,1	44	1,245	1,942
31	36,1	256	1,520	3,360
32	36,1	256	1,599	3,460
33	36,1	256	1,523	3,780
34	38,0	150	1,579	1,993
35	38,0	150	1,485	1,793
36	38,0	150	1,578	2,043

Tabela 16 - Análise de variância (ANOVA) do DCCR da cepa FAZ5-10 (μ_{max}).

Fonte	SQ	gl	QM	F	p
Regressão	2,8971	5	0,5794	177,8613	8,85E-20
Temperatura	2,301714	1	2,3017	706,5395	6,76E-21
Temperatura^2	0,119898	1	0,1199	36,8041	1,78E-06
Luz	0,308900	1	0,3089	94,8208	2,50E-10
Luz^2	0,077743	1	0,0777	23,8642	4,15E-05
Temperatura x Luz	0,120843	1	0,1208	37,0943	1,67E-06
Resíduo	0,1463	30	0,0049		
Falta de ajuste	0,058296	3	0,0194	5,9649	2,95E-03
Erro puro	0,087959	27	0,0033		
Total	3,043373	35			
R^2	0,9519				
R^2 ajustado	0,9439				

Tabela 17 - Análise de variância (ANOVA) do DCCR da cepa C203 (fluorescência de lipídeos).

Fonte	SQ	gl	QM	F	p
Regressão	53,6260	4	13,4065	114,8534	1,54E-16
Temperatura	2,89390	1	2,8939	24,7920	3,22E-05
Temperatura^2	*parâmetro excluído do modelo*				
Luz	42,92008	1	42,9201	367,6958	2,95E-17
Luz^2	5,67419	1	5,6742	48,6107	1,71E-07
Temperatura x Luz	2,13785	1	2,1379	18,3149	2,10E-04
Resíduo	3,7897	31	0,1222		
Falta de ajuste	0,63808	4	0,1595	1,3666	2,72E-01
Erro puro	3,15163	27	0,1167		
Total	57,41574	35			
R^2	0,9340				
R^2 ajustado	0,9255				

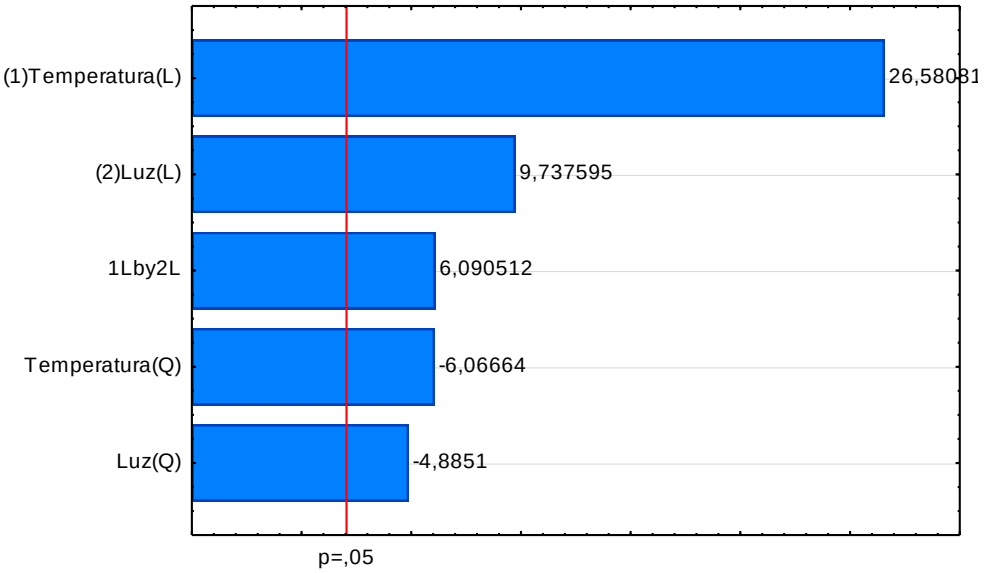

Figura 39 - Diagrama de Pareto dos coeficientes do modelo preditivo para μ_{max} da cepa FAZ5-10. Barras horizontais à direita do limite de significância (p<0,05) representam os coeficientes que foram estatisticamente significativos para o modelo.

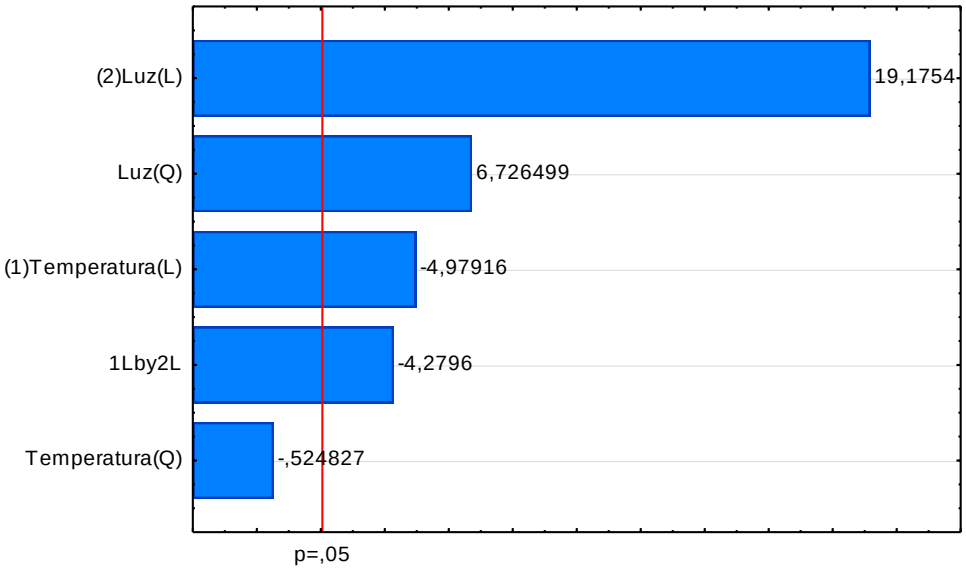

Figura 40 - Diagrama de Pareto dos coeficientes do modelo preditivo para fluorescência de lipídeos da cepa FAZ5-10. Barras horizontais à direita do limite de significância ($p<0,05$) representam os coeficientes que foram estatisticamente significativos para o modelo.

De acordo com a ANOVA do DCCR (Tabela 17) e conforme representação esquemática da significância dos termos do modelo quadrático pelo diagrama de Pareto (Figura 40), o termo "temperatura^2" não foi significativo para ajuste das curvas de resposta de fluorescência e, portanto, foi excluído do modelo. Com relação à μ_{max}, todos os termos do modelo foram significativos e incluídos a ele (Tabela 16 e Figura 39).

Na Figura 41, estão ilustradas as superfícies de resposta geradas pelo modelo para predizer μ_{max} em função da luz e temperatura do cultivo. As condições de otimização previstas pelo modelo apontam para μ_{max} maiores do que 1,6 dia^{-1} em temperaturas médias de 38 ºC e intensidade luminosa média de 300 µmol m^{-2} s^{-1}.

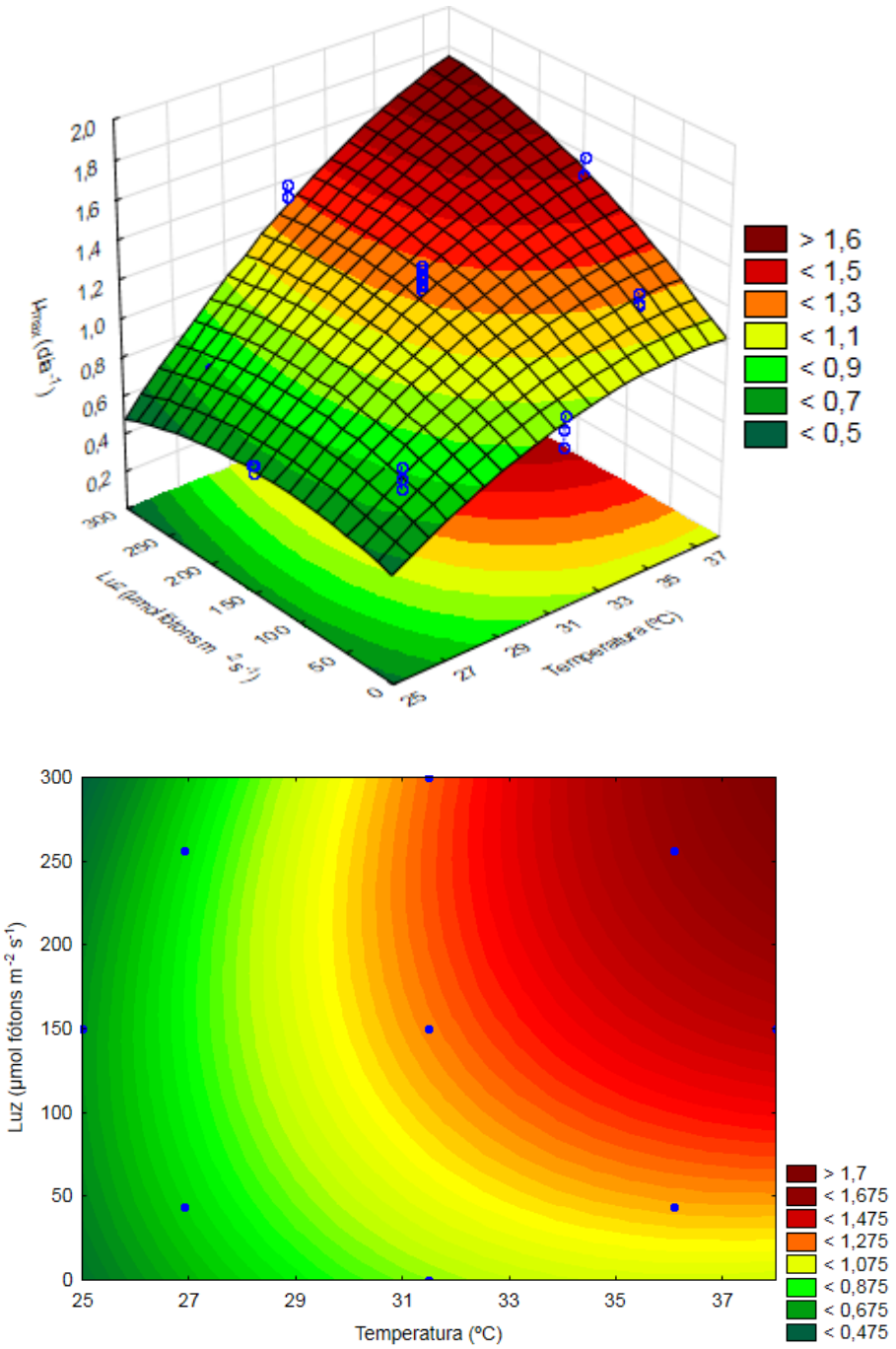

Figura 41 - Superfícies de resposta da μ_{max} da cepa FAZ5-10 em função da luz e temperatura, de acordo com o modelo preditivo. Pontos azuis representam os pontos experimentais utilizados para gerar o modelo.

Na Figura 42, estão ilustradas as superfícies de resposta geradas pelo modelo para predizer fluorescência de lipídeos em função da luz e temperatura do cultivo. A condição de maiores fluorescências apontada pelo modelo ocorre em direção à temperatura de 25 ºC e luz de 300 µmol fótons m^{-2} s^{-1}.

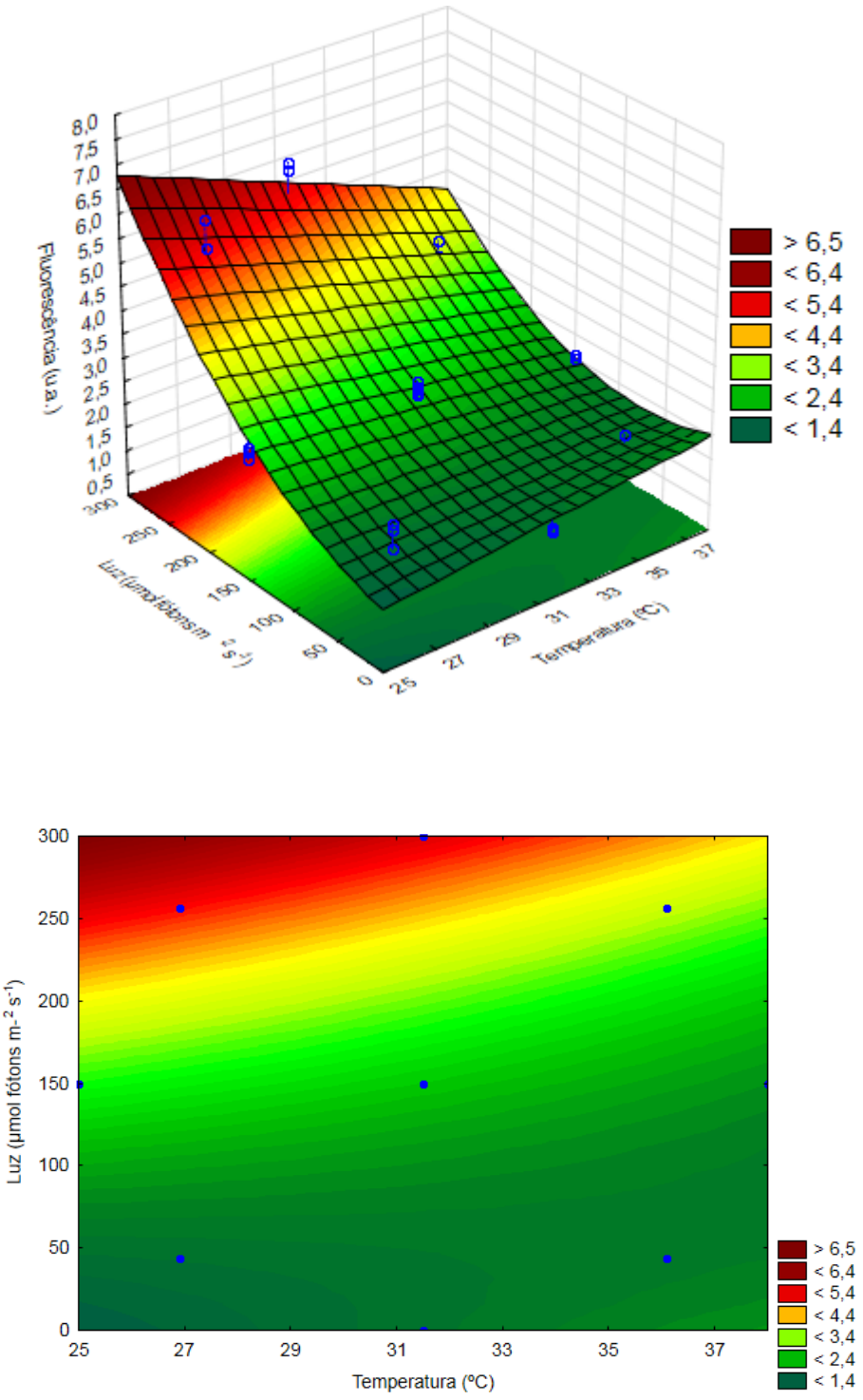

Figura 42 - Superfícies de resposta da fluorescência de lipídeos da cepa FAZ5-10 em função da luz e temperatura, de acordo com o modelo preditivo. Pontos azuis representam os pontos experimentais utilizados para gerar o modelo.

A cepa FAZ5-10 destacou-se dentre as demais no que diz respeito ao aumento da fluorescência de lipídeos nas condições experimentais testadas, atingindo valores de até 5,89 u.a. (Tabela 15, experimento 27). Nesta etapa da otimização, optou-se por não utilizar os pontos ótimos gerados pelo modelo, mas os pontos que fossem intermediários tanto para aumento da μ_{max} quanto

para aumento da fluorescência de lipídeos, visando à busca de condições que otimizassem o acúmulo de lipídeos na biomassa.

Baseando-se nas superfícies dos modelos e nos valores experimentais de fluorescência (Tabela 15, experimento 10 ao 27), observou-se que, nas faixas centrais de temperatura (31,5 ºC), houve gradiente de aumento da fluorescência em função do aumento da intensidade de luz (0 a 300 µmol fótons m^{-2} s^{-1}). O acúmulo de vesículas de lipídeos neutros foi documentado em fotomicrografias que estão dispostas na Figura 43.

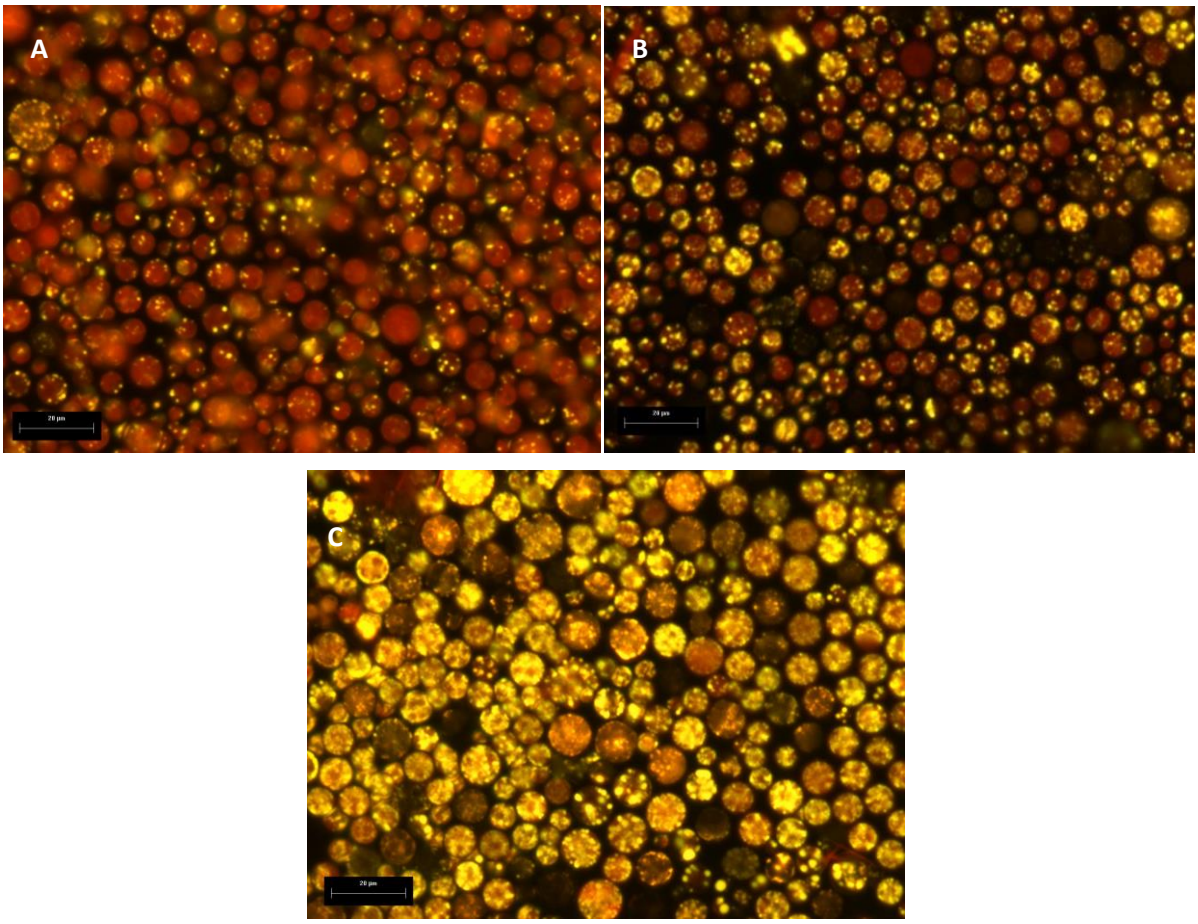

Figura 43 - Fotomicrografias da cepa FAZ5-10 cultivada a 31 °C e com intensidades luminosas de (A) 0, (B) 150 e (C) 300 µmol fótons m^{-2} s^{-1} na fase estacionária do cultivo. Microscopia de fluorescência de suspensão celular corada com Vermelho do Nilo evidenciou vesículas de lipídeos neutros (amarelo). Organelas vermelhas são cloroplastos. Aumento de 400x. Escala de 20 µm.

Devido aos resultados experimentais e ao modelo preditivo apontarem para aumento da fluorescência de FAZ5-10 em maiores intensidades de luz, executou-se um novo experimento para explorar as intensidades de 300 e 500 µmol fótons m^{-2} s^{-1} em temperatura de 31,5 ºC. Os resultados estão ilustrados na Figura 44.

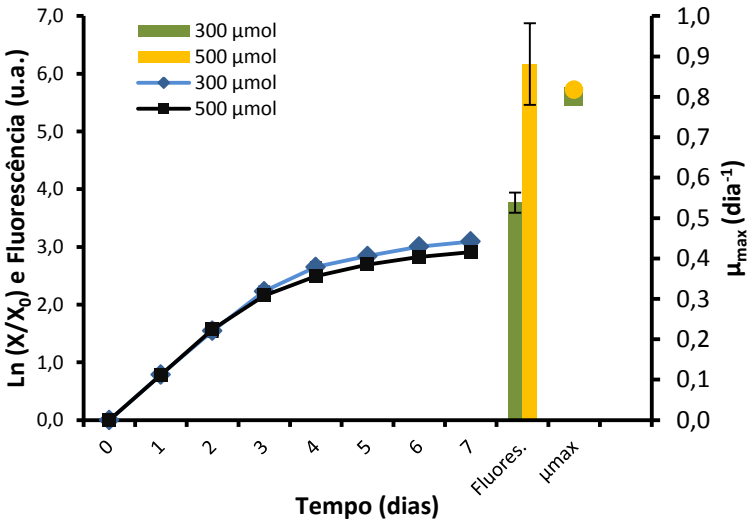

Figura 44 - Curvas de crescimento da cepa FAZ5-10 e suas respectivas fluorescências e μ_{max} nas diferentes intensidades luminosas. Cultivo mixotrófico em meio WC modificado (3WC) contendo 2g L^{-1} de glicose. Barras verticais representam o desvio padrão (n=3).

O aumento de intensidade luminosa (de 300 para 500 µmol fótons m^{-2} s^{-1}) não modificou os parâmetros de crescimento da cultura (amplitude, μ_{max} e Tg) (ANOVA, $p<0,05$) que tiveram μ_{max} média de 0,85 dia^{-1}. No entanto, conforme apontado pelo modelo preditivo, a fluorescência média para lipídeos neutros aumentou significativamente de 3,8 para 6,2 (u.a.) (ANOVA, $p<0,05$) com o aumento da intensidade de luz. Sólidos totais aumentaram de 824 mg L^{-1} para 934 mg L^{-1}.

Em virtude destas respostas, *a condição otimizada de cultivo mixotrófico para a cepa FAZ5-10 foi definida para temperatura de 31,5 ºC e intensidade luminosa de 500 µmol fótons m^{-2} s^{-1}, visando à produção associada de biomassa e lipídeos.*

5.3. Cultivo em média escala (8L) com meio WC padrão, WC modificado e vinhaça

Antes de iniciar a descrição dos resultados obtidos com os cultivos em média escala, serão descritos os principais resultados relacionados aos métodos de tratamento da vinhaça empregados na pesquisa, à sua caracterização e às respostas da cepa VIN01 ao cultivo em gradientes de concentração de vinhaça e luz.

5.3.1. Tratamento e caracterização da vinhaça

Para remover os sólidos grosseiros da vinhaça, de modo que eles não interferissem na quantificação da biomassa algal, foi utilizada centrifugação do efluente em diferentes velocidades e com tempo fixado em 10 minutos. Na Figura 45, está traçada a relação entre velocidade de centrifugação e turbidez da vinhaça, bem como a condição do efluente após filtração através das membranas para esterilização.

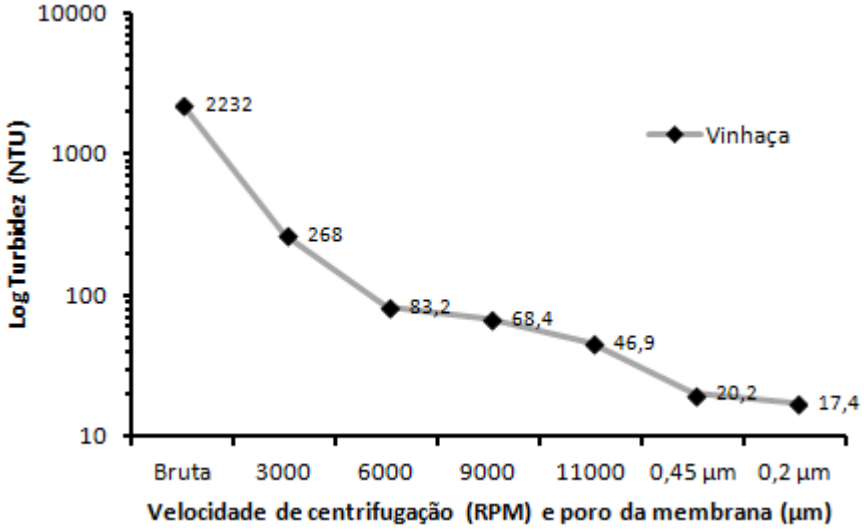

Figura 45 – Relação entre velocidade de centrifugação (10 min) e turbidez da vinhaça visando remoção de sólidos suspensos totais. Poros de membrana apontam para turbidez obtida após filtrações para esterilização do efluente.

O tratamento físico, através da centrifugação a 11000 rpm por 10 minutos, removeu 98% da turbidez da vinhaça (de 2232 para 46,9 NTU). Após filtrações através de membranas de 0,45 e 0,2 µm, para esterilização do efluente, o índice de remoção da turbidez chegou a 99% (de 2232 para 17,4 NTU), garantindo perfil adequado para a etapa posterior de caracterização e cultivo das microalgas na vinhaça.

Para validar a esterilização do efluente, 100 µL de amostras submetidas a diferentes tratamentos foram plaqueadas em ágar nutriente, em condições assépticas, e incubadas por 7 dias a 37 ºC. Os resultados desta validação estão ilustrados na Figura 46.

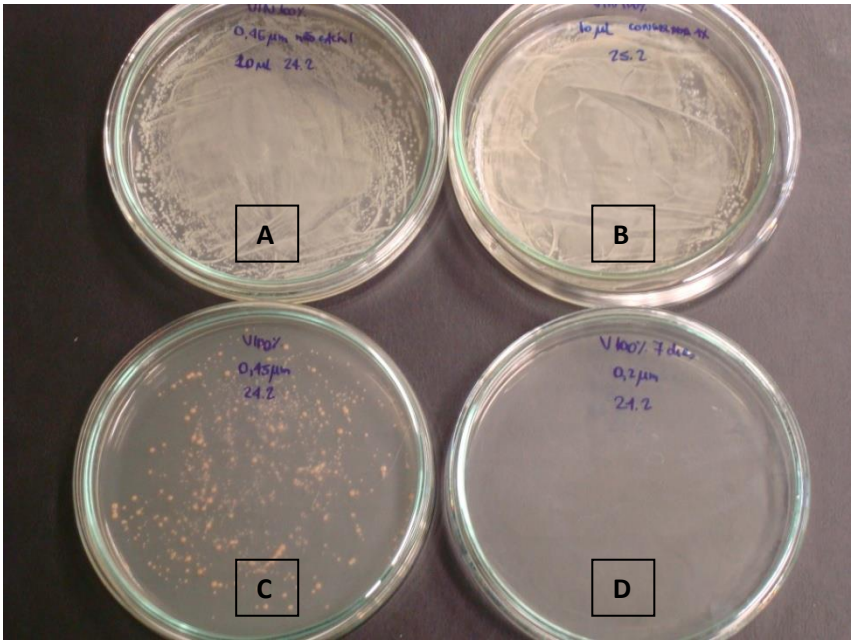

Figura 46 – Placas de Petri, contendo ágar nutriente, semeadas com vinhaça bruta (A), vinhaça congelada e descongelada por 4 vezes (B), vinhaça filtrada através de membrana com 0,45 µm (C) e 0,2 µm de poro (D).

De todos os tratamentos testados, filtração através de membrana estéril de 0,2 µm (Figura 46, D), em condições assépticas (capela de fluxo laminar com conjunto de filtração de vidro estéril), foi a única eficiente para esterilizar o efluente. Nesta condição, a placa permaneceu livre de colônias após o período de incubação. Placas de Petri contendo alíquotas de vinhaça bruta e vinhaça congelada e descongelada por quatro vezes (Figura 46, A e B) foram visivelmente semelhantes em termos de contaminação bacteriana (biomassa branca). Desta forma, os ciclos de congelamento adotado, visando à lise celular bacteriana, não foram eficientes para reduzir a contaminação por micro-organismos. Filtração através de membrana estéril de 0,45 µm, em condições assépticas, reduziu a contaminação bacteriana (biomassa rosa) em relação aos tratamentos A e B, mas não esterilizou o efluente (Figura 46, C). Portanto, centrifugação seguida de filtração através de membrana estéril de 0,2 µm de poro foram os métodos definidos para tratar vinhaça.

Definidos os protocolos de tratamento físico e esterilização da vinhaça, foram caracterizadas as principais variáveis físico-químicas do efluente, as quais estão descritas na Tabela 18.

Tabela 18 – Caracterização físico-química da vinhaça bruta e tratada (centrifugação a 11.000 rpm seguida de filtrações através de membrana de até 0,2 µm e ajuste de pH para 9,2).

Variáveis	Bruta	Tratada	% Remoção
pH	4,7	9,2	-
Condutividade (µS cm^{-1})	8380	-	-
Temperatura (°C)	60	-	-
Cor verdadeira (Pt-Co)	12250	18750	-
Turbidez (NTU)	2232[a]	17,4	99,2
Sólidos (g L^{-1})			
SST	8,12	0,42	94,8
SSI	1,95	0,03	98,4
SSV	6,17	0,39	93,7
Demandas de Oxigênio (mg L^{-1})			
DQO	39799,0	26328,00	33,8
DBO	12450,0	8900,00	28,5
Oxigênio dissolvido	0,0	0,0	
Nutrientes e metais (mg L^{-1})			
Carboidratos totais	-	6526,0	-
Carbono total (TC)	-	10429,9	-
Carbono inorgânico (CI)	-	1,87	-
Carbono orgânico total (COT)	-	10428,0	-
$P\text{-}PO_4$	47,9	3,3	93,2
P-Total	97,4	26,5	72,8
$N\text{-}NH_4$	60,0	42,8	28,6
NTK	562,4	314,1	44,1
K	4050,0	2930,0	27,7
Ca	1883,0	1665,0	11,6
Mg	282,75	253,8	10,3
Na	13,2	12,1	8,3
Fe	149,54	43,6	70,8
Zn	1,76	0,87	50,8
Al	80,1	6,10	92,4
Ba	2,35	1,11	52,8
Mn	6,61	6,19	6,4
Cu	1,17	1,17	0,0
Pb	0,40	0,38	5,0
Co	0,24	0,24	1,7
Ni	0,19	0,14	29,4
Cr	0,069	nd	100,0
Cd	0,045	0,038	15,6
Ácidos orgânicos (mg L^{-1})			
Ácido cítrico	b	878,9	-
Ácido málico	b	3442,1	-
Ácido succínico	b	1046,4	-
Ácido lático	b	3602,6	-
Ácido fórmico	b	nd	-
Ácido acético	b	1078,1	-
Ácido propiônico	b	2542,0	-
Ácido iso-butírico	b	2067,7	-
Ácido butírico	b	5036,6	-
Ácido iso-valérico	b	38,3	-
Ácido valérico	b	1032,0	-
Ácido capróico	b	405,8	-
Carboidratos e álcoois (mg L^{-1})			
Glicose	b	80,2	-
Frutose	b	1135,5	-
Metanol	b	43,85	-
Etanol	b	143,95	-
n-Butanol	b	nd	-

nd - não detectado; a - turbidez após sedimentação por 30 minutos em cone Imhoff; ; b – não mensurado

Os tratamentos físicos aplicados e o ajuste de pH para 9,2 reduziram os valores da série de sólidos, demandas de oxigênio, nutrientes e metais.

Tanto sólidos totais quanto sólidos inorgânicos e voláteis foram removidos, praticamente, em sua totalidade. Os sólidos totais quantificados pareceram estar associados aos açúcares e substâncias orgânicas coloidais da vinhaça, os quais ficaram adsorvidos na membrana de filtração. Observou-se que o enxague das membranas com água destilada e/ou sua incineração em mufla a 550 ºC (SSI) removeram quase totalmente essa fração de sólidos. Esta característica, em particular, foi essencial para definir-se a centrifugação como método de separação da biomassa de *Chlorella* cultivada na vinhaça. A interferência dos componentes orgânicos da vinhaça, retidos nas membranas de filtração, poderia superestimar os valores de sólidos obtidos nas culturas. Uma vez que a centrifugação, em baixas rotações (4000 rpm), minimiza o efeito destes componentes coloidais sobre a peletização da biomassa algal no tubo de centrífuga, ela foi adotada como parte do protocolo para quantificar sólidos totais, conforme descrito no item 4.4.2.

Com relação aos nutrientes e metais, removeu-se com maiores percentuais P-PO_4 (93,2%), P-total (72,8%), Fe (70,8%), Al (92,4%) e Cr (100%) e esta característica pode estar associada à precipitação observada durante o ajuste de pH (de 4,7 para 9,2). Removeu-se também cerca de 30% da DBO e DQO e esta redução embasou os dados de remoção dos demais componentes do efluente (sólidos orgânicos e inorgânicos, nutrientes e metais).

As formas iônicas de fósforo (P-PO_4^{3-}) e nitrogênio (N-NH_4^+) prontamente disponíveis para assimilação pelas microalgas tiveram, respectivamente, concentrações de apenas 3,3 mg L^{-1} e 42,8 mg L^{-1} na vinhaça tratada. Elas corresponderam, respectivamente, a 18% e 31% da concentração de fósforo e nitrogênio do meio WC modificado para a etapa de otimização. Deste modo, tais nutrientes poderiam ser limitantes ao crescimento de *Chlorella* na vinhaça. No entanto, P-Total e NTK na vinhaça tratada asseguraram, respectivamente, concentrações de fósforo e nitrogênio de 26,5 mg L^{-1} e 314,1 mg L^{-1}. Estas formas de N e P corresponderam, respectivamente, a 142% e 224% da utilizada na otimização (18,6 mg L^{-1} de P e 140 mg L^{-1} de N).

A relação N:P de N-NH_4 e P-PO_4 foi de 29:1 e a de NTK e P-Total foi de 26:1, ambas baseadas nas concentrações molares. Comparadas à relação N:P utilizada nos experimentos de otimização (Tabela 8), que foi de 17:1, é possível que fósforo seja limitante ao crescimento de *Chlorella* na vinhaça. Todavia, esta questão estará associada ao *luxury uptake* de fósforo, que modifica a interpretação do nutriente limitante e será abordada na discussão.

Dos metais analisados na vinhaça tratada, nove estão presentes no meio WC e ocorreram em concentrações muito acima das utilizadas na fase de otimização, exceto sódio. A elevada condutividade elétrica (8380 µS cm^{-1}) do efluente reforçou a presença de altas concentrações de íons. Os metais da vinhaça tratada, acompanhados de suas respectivas concentrações relativas, em relação ao meio WC padrão, foram: K (749), Ca (166), Mg (70), Na (0,5), Fe (67), Zn (173), Mn (124),

Cu (468) e Co (94). Tais concentrações de metais podem ser indesejadas para obtenção de parâmetros ótimos de crescimento, caso a cepa VIN01 tenha o mesmo perfil de crescimento daqueles obtidos nos experimentos de varredura (Figura 17), cuja concentração de micronutrientes 50 vezes acima do WC foi inibidora do crescimento. Cabe ressaltar que este experimento foi realizado com aumento isolado de micronutrientes. As interações químicas com outros compostos e a consequente disponibilidade desses íons para *Chlorella* certamente é diferente das interações que ocorrem na vinhaça, devido à sua composição diversa e complexa.

Dos ácidos orgânicos detectados e quantificados por HPLC na vinhaça tratada, seis merecem especial destaque, pois foram testados como fonte de carbono orgânico na etapa de varredura de fatores, na frente trófica (Figura 26).

Ácido cítrico, málico, lático e butírico ocorreram em concentrações 2,2, 8,6, 9,0 e 12,6 vezes maiores do que a concentração de 400 mg L^{-1}, testada experimentalmente e que não modificou o crescimento de VIN01. Contudo, como estes ácidos estiveram muito mais concentrados na vinhaça do que nos experimentos, é possível que eles sejam inibidores ou estimuladores do crescimento no efluente.

A concentração de ácido propiônico (2542 mg L^{-1}) foi 6,3 vezes maior do que a concentração de inibição testada experimentalmente na etapa de varredura (Figura 26, 400 mg L^{-1}). Esta pode ser uma característica desfavorável para o crescimento da cepa VIN01 em vinhaça. Por outro lado, a concentração de ácido acético na vinhaça tratada (1078,1 mg L^{-1}) esteve dentro das faixas ótimas testadas experimentalmente (Figura 27), que foram de 400 a 2000 mg L^{-1}. Dentre as fontes de carbono orgânico testadas e com exceção da glicose, este ácido foi o que mais se destacou como estimulador do crescimento da cepa VIN01, na etapa de varredura. Portanto, ele pode ser um componente químico essencial para aumentar o crescimento de *Chlorella* na vinhaça.

Referente aos carboidratos e álcoois, glicose, que foi a fonte de carbono orgânico com melhor desempenho dentre as testadas experimentalmente, foi detectada em concentração (80,2 mg L^{-1}) abaixo das faixas ótimas determinadas na etapa de varredura (Figura 20, 200 a 2000 mg L-1) e otimização (Tabela 8, 4000 mg L^{-1}). Sua condição limitante na vinhaça deve, portanto, direcionar *Chlorella* a utilizar outras fontes de carbono orgânico no cultivo mixotrófico. Frutose também foi detectada em concentração (1135,5 mg L^{-1}) abaixo da faixa ótima determinada experimentalmente (Figura 22, 2000 a 10000 mg L^{-1}). Por outro lado, a concentração de etanol na vinhaça (143,95 mg L^{-1}) esteve próxima à da concentração experimental ótima (200 mg L^{-1}) (Figura 24). Contudo, nestas condições, etanol não trouxe ganhos tão relevantes de μ_{max} (0,49 dia^{-1}) quanto glicose (1,81 dia^{-1}) e seu uso como fonte alternativa de carbono orgânico seria desfavorável para o crescimento de *Chorella*.

Após avaliação da caracterização da vinhaça, iniciou-se a etapa de investigação de suas propriedades espectrofotométricas para definir-se o comprimento de onda ideal a ser adotado para monitorar os experimentos em tubos de ensaio.

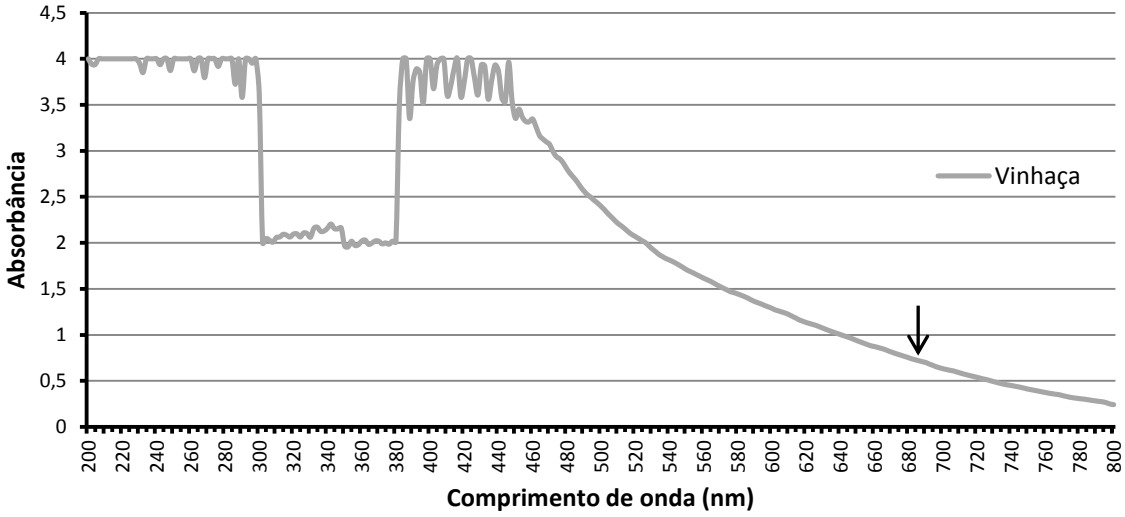

Figura 47 – Varredura espectrofotométrica da vinhaça tratada (0,2 µm). Seta aponta para comprimento de onda adotado (683 nm) para monitorar o crescimento da cepa VIN01.

A varredura espectrofotométrica (Figura 47) indicou que não houve picos na região de absorção da clorofila *a* (683 nm), que foi a utilizada nas demais etapas da pesquisa. Por isso, este comprimento de onda também foi adotado para monitorar o crescimento de *Chlorella* em vinhaça, nos experimentos em tubos de ensaio.

5.3.2. Experimento fatorial para otimizar a cepa VIN01 ao cultivo em vinhaça

Devido à coloração marrom-escura da vinhaça, que minimiza a penetração de luz para processos mixotróficos, e também à elevada concentração de nutrientes e metais, que poderiam ser letais para *Chlorella*, realizou-se experimento com delineamento fatorial para definir os melhores níveis de luz e concentração de vinhaça à cepa VIN01. Os fatores e suas respectivas faixas bem como os parâmetros de crescimento obtidos estão descritos na Tabela 19.

Tabela 19 – Matriz do delineamento fatorial contendo fatores e níveis testados e respostas das variáveis dependentes μ_{max}, Tg e biomassa (n=3 para μ_{max} e Tg) da cepa VIN01 cultivada em vinhaça.

Experimento	Concentração de vinhaça (%)	Luz (µmol fótons m^{-2} s^{-1})	μ_{max} (dia^{-1})	Tg (dias)	Biomassa (mg L^{-1})*
1	50	300	0,42 ± 0,03	1,66 ± 0,12	585
2	50	500	0,85 ± 0,07	0,82 ± 0,06	675
3	75	300	0,57 ± 0,1	1,23 ± 0,23	1120
4	75	500	0,60 ± 0,18	1,23 ± 0,34	1080
5	100	300	0,79 ± 0,04	0,88 ± 0,05	1090
6	100	500	1,06 ± 0,38	0,71 ± 0,22	1260

*calculada a partir de amostra composta obtida a partir das triplicatas de cada experimento.

Concentração de 100% de vinhaça combinada à luz de 500 µmol fótons m^{-2} s^{-1} (Tabela 19, Experimento 6) foram as condições em que se obtiveram maiores μ_{max} e biomassa e menor Tg, dentre os níveis testados. Além disso, a concentração de 50% pareceu ter sido limitante ao crescimento, com as menores concentrações de sólidos suspensos totais (SST).

O experimento foi avaliado com ANOVA, para a variável dependente μ_{max}, cujos resultados estão dispostos na Tabela 20.

Tabela 20 – Análise de variância (ANOVA) do planejamento fatorial para otimização do cultivo de VIN01 em vinhaça.

Fonte	SQ	gl	QM	F	p
Regressão	9,2033	1	9,2033	282,4727	0,010
Concentração	0,394853	2	0,1974	6,0595	0,015
Luz	0,261486	1	0,2615	8,0257	0,015
Concentração x luz	0,125167	2	0,0626	1,9209	0,189
Erro	0,390975	12	0,0326		

De acordo com a ANOVA, os fatores concentração e luz tiveram efeito significativo na μ_{max} ($p<0,05$) e não houve efeito de interação entre concentração e luz ($p=0,189$).

O aumento de luz de 300 para 500 µmol fótons m^{-2} s^{-1} aumentou significativamente μ_{max} (Tukey, $p<0,05$) bem como o aumento da concentração de vinhaça de 50% ou 75% para 100% (Tukey, $p<0,05$). Não houve diferença significativa de μ_{max} com a variação de concentrações entre 50% e 75% (Tukey, $p=0,88$).

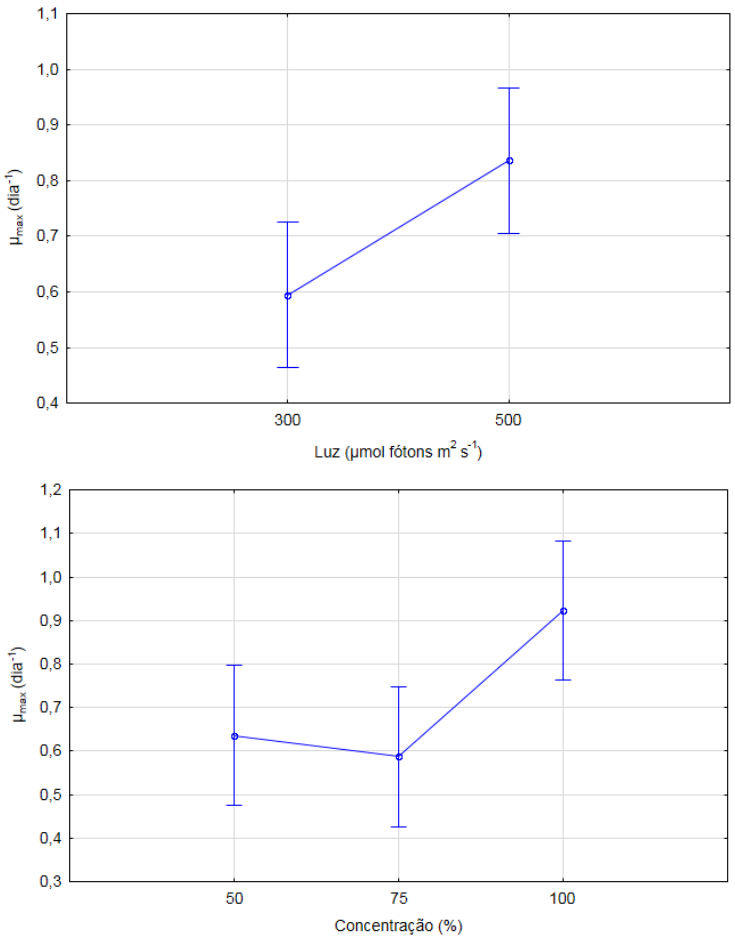

Figura 48 – Efeitos isolados dos fatores luz e concentração de vinhaça sobre μ_{max} da cepa VIN01 cultivada em vinhaça.

Diante dos resultados obtidos no experimento fatorial, *a condição otimizada em vinhaça para a cepa VIN01 foi definida para temperatura de 37 ºC e intensidade luminosa de 500 µmol fótons m^{-2} s^{-1} visando à produção de biomassa.*

5.3.3. Cultivo em média escala (8L)

Após otimização das culturas em tubos de ensaios, nos experimentos de DCCR e fatoriais, as condições de cultivo controle, otimizada e em vinhaça foram definidas, fixadas e reproduzidas em frascos de cultivo de 9L contendo 8L de cultura aerada axênica.

Nas Figura 49,Figura 50 e 51 estão representadas as curvas de crescimento do cultivo fototrófico das cepas VIN01, C203 e FAZ5-10 e o comportamento das variáveis monitoradas ao longo do período.

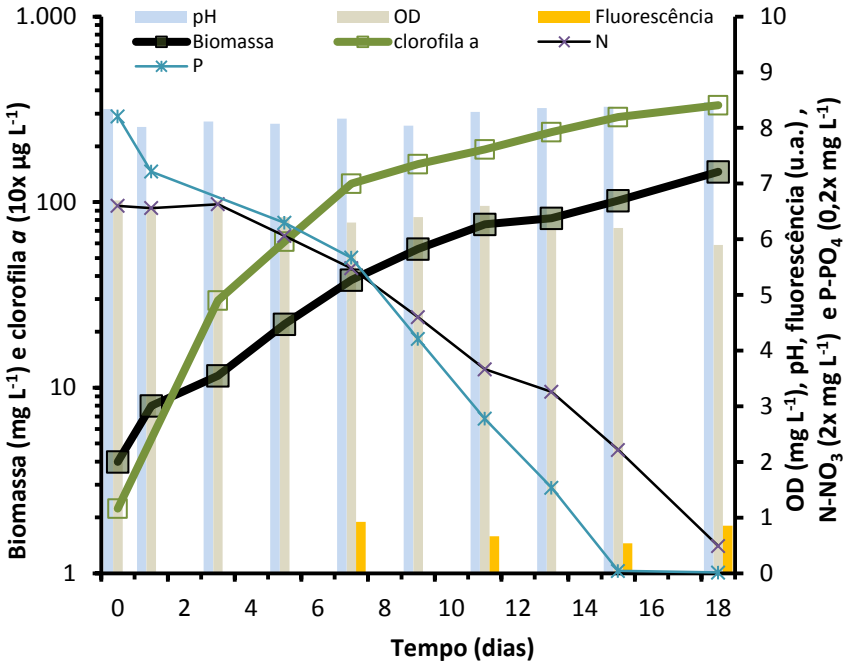

Figura 49 – Curva de crescimento da cepa **VIN01**, na condição "**fototrófica**", acompanhada das variáveis físico-químicas da fluorescência para lipídeos neutros monitoradas ao longo do cultivo.

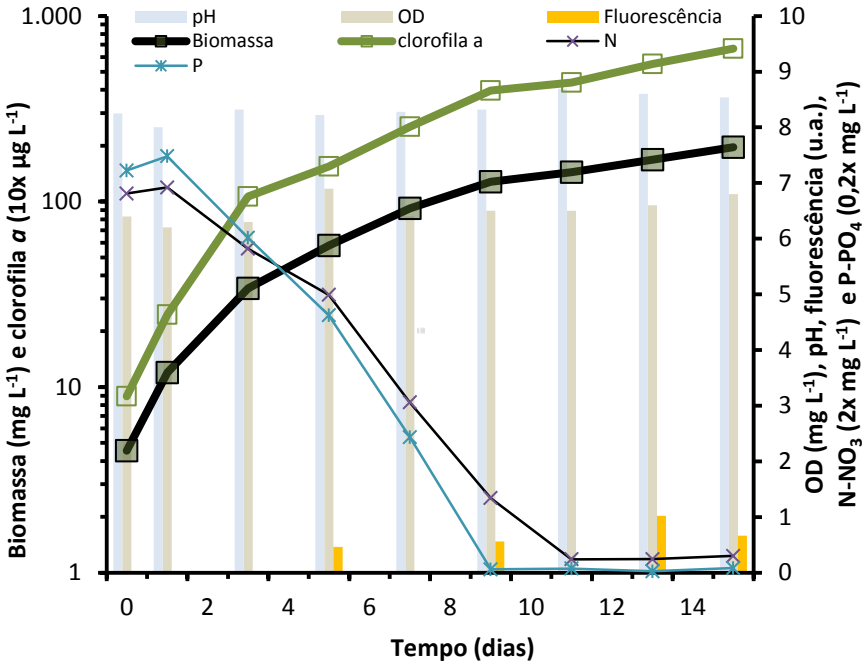

Figura 50 - Curva de crescimento da cepa **C203**, na condição "**fototrófica**", acompanhada das variáveis físico-químicas e da fluorescência para lipídeos neutros monitoradas ao longo do cultivo.

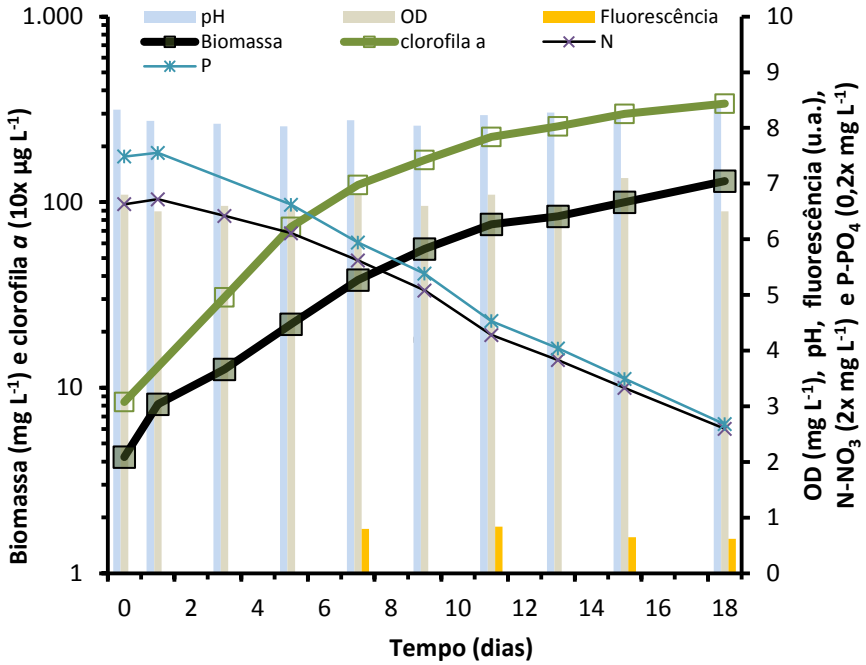

Figura 51 - Curva de crescimento da cepa **FAZ5-10**, na condição "**fototrófica**", acompanhada das variáveis físico-químicas e da fluorescência para lipídeos neutros monitoradas ao longo do cultivo.

No cultivo fototrófico, as cepas chegaram à fase estacionária em tempo que variou de 15 (C203, Figura 50) a 18 dias (VIN01, e C203) e este período assemelhou-se ao das culturas fototróficas realizadas nos tubos de ensaio (item 5.2.1). As curvas de crescimento construídas em função de biomassa e clorofila *a* tiveram perfil semelhante, indicando que ambas são boas estimadoras do crescimento das microalgas. A biomassa final obtida no cultivo de cada cepa foi de 146 mg L^{-1} (VIN01), 196 mg L^{-1} (C203) e 130 mg L^{-1} (FAZ5-10).

Nas três culturas não houve variações marcantes tanto de pH quanto de OD, os quais mantiveram valores médios de 8,2 e 6,5 mg L^{-1}, respectivamente.

Fluorescência para lipídeos neutros também não apresentou variações relevantes em nenhuma das culturas e manteve valor médio de 0,75 (VIN01), 0,68 (C203) e 0,73 u.a. (FAZ5-10).

Nitrogênio e fósforo foram mais assimilados por VIN01 e C203, quando comparados à assimilação pela cepa FAZ5-10, em cuja cultura as concentrações de nitrogênio e fósforo não foram limitantes até o último dia do cultivo (dia 18). Nas culturas das cepas VIN01 e C203, nitrogênio tornou-se limitante nos dias 18 e 11, respectivamente. No caso do fósforo, a limitação ocorreu nos dias 15 e 9. Estes resultados indicam que a demanda por nutrientes pelas cepas VIN01 e C203 foi maior do que da cepa FAZ5-10 e esteve diretamente relacionada com maiores μ_{max} e produção final de biomassa, conforme dados da Tabela 21

Nas Figura 52,Figura 53, e Figura 54 estão representadas as curvas de crescimento do cultivo mixotrófico otimizado das cepas VIN01, C203 e FAZ5-10 e o comportamento das variáveis monitoradas ao longo do período.

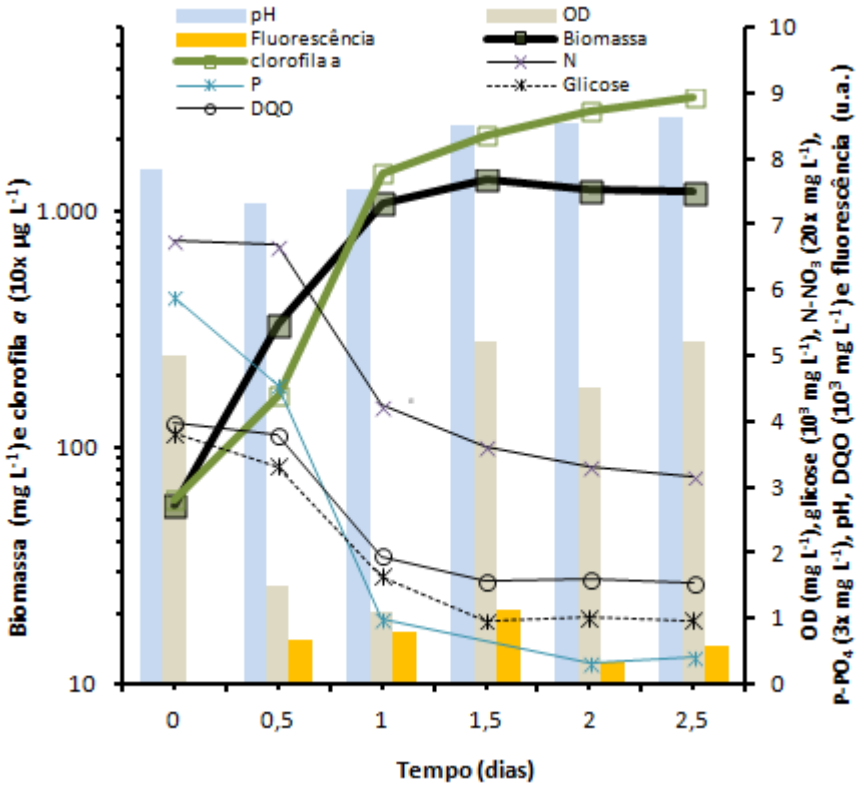

Figura 52 - Curva de crescimento da cepa **VIN01**, na condição "**mixotrófica otimizada**", acompanhada das variáveis físico-químicas e da fluorescência para lipídeos neutros monitoradas ao longo do cultivo.

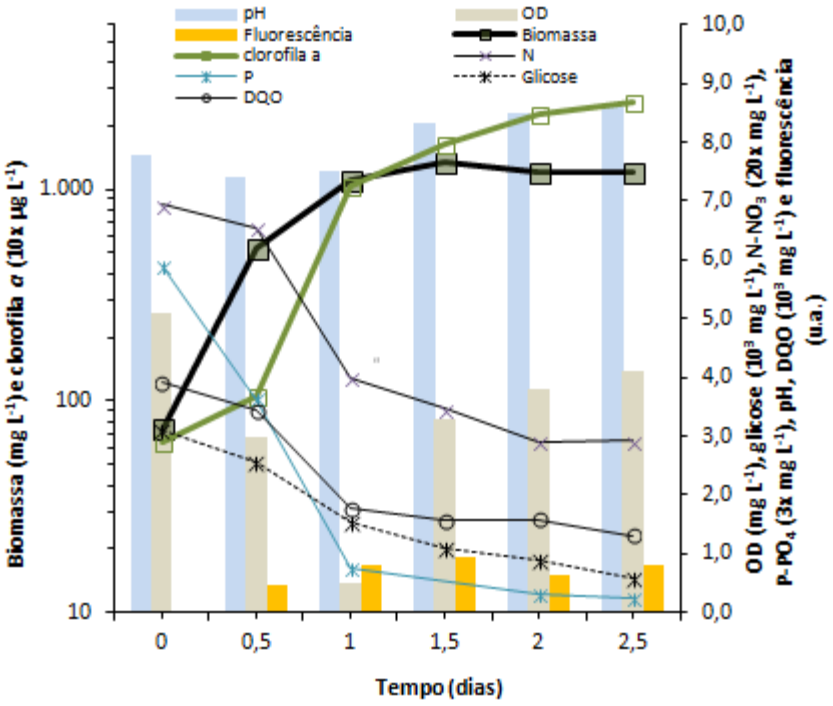

Figura 53 - Curva de crescimento da cepa **C203**, na condição "**mixotrófica otimizada**", acompanhada das variáveis físico-químicas monitoradas ao longo do cultivo.

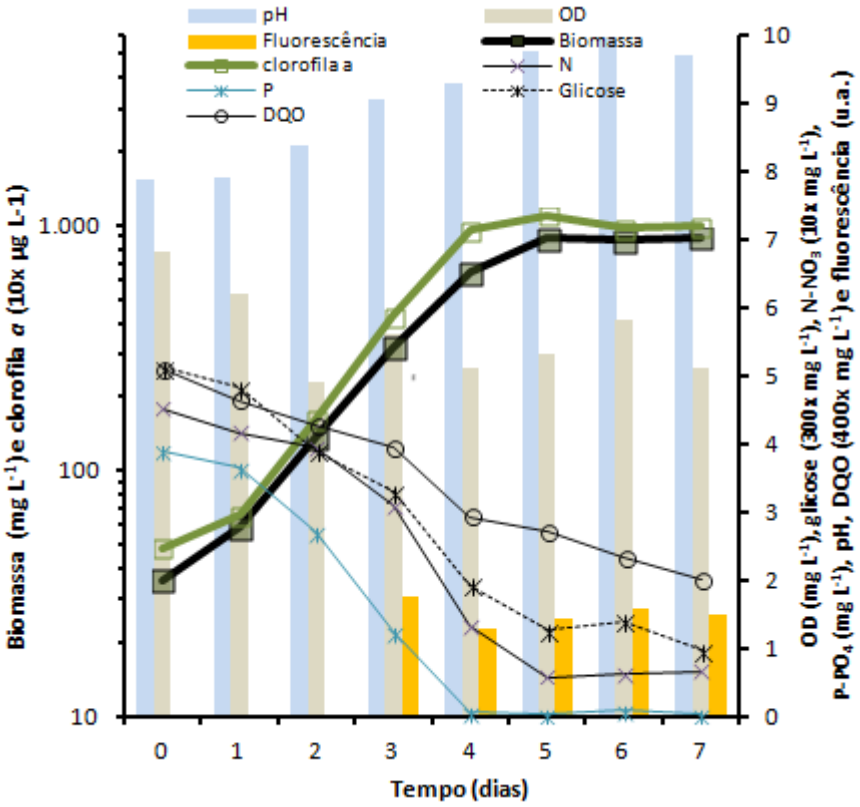

Figura 54 - Curva de crescimento da cepa **FAZ5-10**, na condição "**mixotrófico otimizada**", acompanhada das variáveis físico-químicas e da fluorescência para lipídeos neutros monitoradas ao longo do cultivo.

No cultivo mixotrófico otimizado, as culturas das cepas VIN01 e C203 chegaram à fase estacionária em tempo de 1,5 dia, que foi 12 vezes menor em relação ao da cultura fototrófica de VIN01 e 10 vezes menor em relação ao da cultura fototrófica de C203. FAZ5-10 teve tempo de cultivo de 5 dias até a fase estacionária, que foi 3,6 vezes menor em relação ao da cultura fototrófica. As curvas de crescimento construídas em função de biomassa e clorofila *a* tiveram perfil semelhante, indicando que ambas são boas estimadoras do crescimento na condição mixotrófica adotada. A biomassa final obtida no cultivo de cada cepa foi de 1205 mg L^{-1} (VIN01), 1212 mg L^{-1} (C203) e 893 mg L^{-1} (FAZ5-10) e equivalem a aumento de 8,3, 6,2 e 6,9 vezes, respectivamente e em relação ao cultivo fototrófico. Houve, portanto, otimização não somente da biomassa final produzida como também do tempo de cultivo necessário para produzir a biomassa, o que implica em aumento de produtividade das culturas,conforme descrito na Tabela 21.

Nas três culturas, o pH tendeu ao aumento do início ao final do cultivo, sendo mais marcante na cultura da cepa FAZ5-10 (pH 7,88 a 9,71) do que nas culturas das cepas VIN01 (pH 7,85 a 8,63) e C203 (pH 7,80 a 8,62). Esta característica pode estar associada ao aumento da atividade fotossintética pela cepa FAZ5-10, seja pela maior intensidade de luz aplicada em seu cultivo, seja pela fisiologia da cepa, que foi isolada de ambiente aquático com elevada penetração de luz. Também é possível que a respiração heterotrófica intensa nas outras culturas tenha gerado concentrações de CO_2 suficientes para manter o pH em níveis mais baixos devido à acidificação do meio pelo gás.

OD reduziu drasticamente do dia 0 ao dia 1 nas culturas de VIN01 (de 5,0 para 1,1 mg L^{-1}) e C203 (de 5,1 para 0,5 mg L^{-1}), indicando elevada atividade heterotrófica no período. A ele, associou-se assimilação de 76% (VIN01) e 62%(C203) da glicose total consumida ao longo do cultivo, que foi de 2843 mg L^{-1} (VIN01) e 2513 mg L-1 (C203). Após o dia 1, que coincide com o final da fase exponencial e início da estacionária, a concentração de OD aumentou para níveis médios de 5 mg L^{-1} (VIN01) e 4 mg L^{-1} (C203). Por outro lado, na cultura da cepa FAZ5-10 tanto a redução de OD quanto o consumo de glicose foram bem menos acentuados, apontando para atividade heterotrófica menor, em relação às outras cepas. OD decaiu de 6,8 mg L^{-1} (dia 0) para média de 5,3 mg L^{-1} do dia 2 até o final do experimento e o consumo final da glicose foi de 1244 mg L^{-1}. Da mesma forma que atividade fotossintética parece ter predominado na cultura de FAZ5-10, o metabolismo heterotrófico marcante das cepas VIN01 e C203 pode estar relacionado ao seu ambiente de origem.

A curva de DQO removida pelas três culturas teve perfil semelhante às curvas de consumo de glicose e nutrientes e remoção final de 2427 mg L^{-1} (VIN01), 2619 mg L^{-1} (C203) e 1230 mg L^{-1} (FAZ5-10). Nitrogênio e fósforo, respectivamente, decaíram expressivamente do dia 0 ao dia 1 nas culturas de VIN01 (de 135 para 84 mg L^{-1} e de 17,67 para 2,96 mg L^{-1}) e C203 (de 138,6 para 79,9 mg L^{-1} e de 17,67 para 2,23 mg L^{-1}) e especialmente o fósforo atingiu reduzidas concentrações do dia 2 até o final

do cultivo. Na cultura da cepa FAZ5-10, o fósforo tornou-se limitante a partir do dia 4, que marcou o início da fase estacionária. Comparada à assimilação de nitrogênio, conforme dados da Tabela 21, a de fósforo foi elevada e manteve percentual de remoção acima de 92%, o que pode ter tornado o nutriente limitante pra as três culturas.

A fluorescência para lipídeos neutros teve seus maiores valores no dia 1,5 de cultivo das culturas VIN01 (1,12 u.a.) e C203 (0,94 u.a), que foi marcado pelo início da fase estacionária. Caso a colheita ocorresse nesse ponto, além de ganhos de produtividade pela redução do tempo de cultivo, provavelmente a biomassa teria maiores teores de lipídeos. Na cultura da cepa FAZ5-10, a fluorescência manteve-se relativamente constante e teve valor final de 1,50 u.a., que foi expressivamente menor do que a obtida por cultura otimizada em tubos de cultura (Figura 44; 6,2 u.a). Esta característica pode estar diretamente relacionada à menor penetração de luz nos fotobiorreatores, quando comparada aos tubos de cultura, visto que luz foi o fator que estimulou acúmulo de lipídeos neutros no experimento fatorial. E por fim, de maneira análoga a das culturas de VIN01 e C203, FAZ5-10 poderia ser colhida no dia 5 de cultivo, quando entrou na fase estacionária, para otimizar sua produtividade.

Na Figura 55, está representada a curva de crescimento da cepa VIN01, no cultivo otimizado em vinhaça, e o comportamento das variáveis monitoradas ao longo do período.

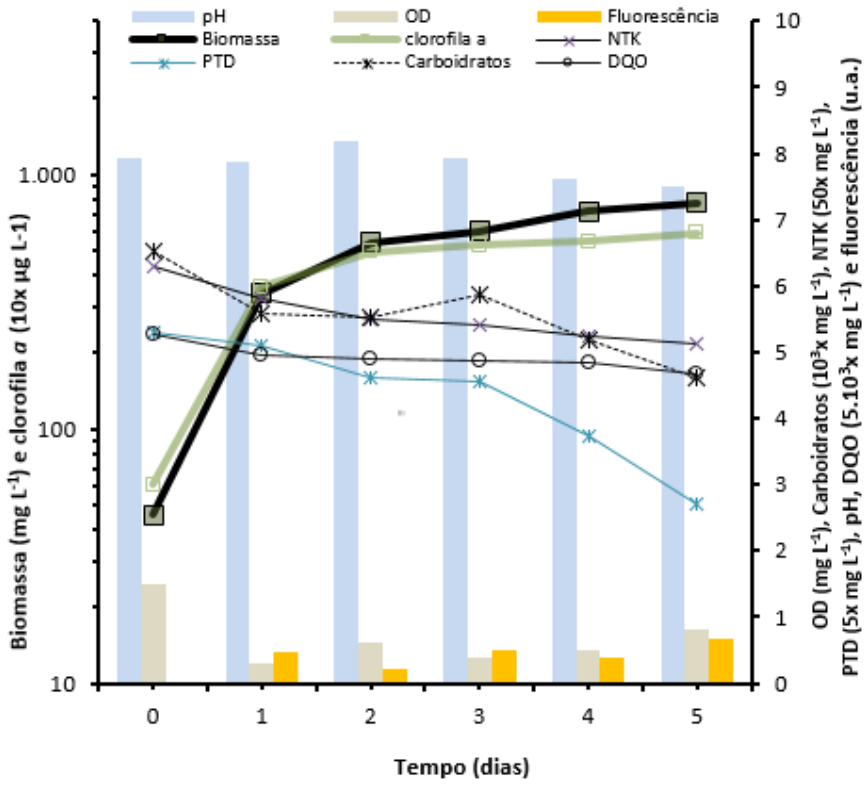

Figura 55 - Curva de crescimento da cepa **VIN01**, na condição "**otimizada em vinhaça**", acompanhada das variáveis físico-químicas e da fluorescência para lipídeos neutros monitoradas ao longo do cultivo.

O cultivo da cepa VIN01 na condição otimizada em vinhaça chegou à fase estacionária em 3 dias, período 6 vezes menor do que a condição fototrófica (Figura 49) e 2 vezes maior do que a condição mixotrófica otimizada (Figura 54). A produção final de biomassa foi de 772 mg L^{-1} , 5,3 vezes maior em relação à biomassa obtida no cultivo fototrófico e 1,6 vezes menor do que a biomassa obtida no cultivo mixotrófico otimizado. Houve, portanto, otimização em relação ao cultivo fototrófico, porém a cultura não teve produtividade tão alta quanto o cultivo mixotrófico otimizado, conforme dados da Tabela 21. Também houve boa compatibilidade entre as curvas de crescimento traçadas a partir da biomassa (Sólidos Suspensos Totais) e da clorofila *a*, mesmo com contaminação bacteriana detectada microscopicamente a partir do dia 2 do cultivo.

Durante a cultura, o pH médio foi de 7,8 e se manteve estável enquanto OD iniciou com concentração de 1,5 mg L^{-1}, reduziu no dia 1 para 0,3 mg L^{-1} e manteve concentração média de 0,6 mg L^{-1} até o final do cultivo. Da mesma forma que no cultivo mixotrófico otimizado, a cepa VIN01 teve intensa respiração devido ao metabolismo heterotrófico, mantendo as concentrações de OD em níveis muito baixos e assimilando o total de 1918 mg L^{-1} de carboidratos. Além disso, a DQO removida foi a maior verificada dentre todas as formas de cultivo e reduziu em 3030 mg L^{-1}, indicando que houve provável assimilação de outros compostos orgânicos (tais como ácido orgânicos), além dos carboidratos, e que o metabolismo heterotrófico pode ter sido a via preferencial de crescimento.

Outra informação que reforça esta inferência é o percentual de clorofila *a*/biomassa dos experimentos (Tabela 21). Enquanto no cultivo fototrófico e mixotrófico de VIN01 o percentual se manteve entre 2,3 a 2,5%, no cultivo otimizado em vinhaça o percentual reduziu para 0,8% de clorofila *a* na biomassa. Esta redução pode estar relacionada à característica típica de culturas heterotróficas, nas quais predominam células com pouca clorofila a ou até mesmo aclorofiladas. Já que a coloração marrom da vinhaça é uma barreira física para penetração adequada de luz, é possível que a cultura tenha direcionado seu metabolismo para heterotrofia como estratégia de adaptação ao meio.

Com relação aos nutrientes, P-Total teve remoção final de 13 mg L^{-1} e reduziu acentuadamente do dia 3 ao dia 5 (70% da remoção total), quando a cultura já estava na fase estacionária. Esta característica de assimilação para fins de estocagem celular que não é utilizada para crescimento é conhecida como *luxury uptake* e pode ter importantes aplicações no processo de tratamento de águas residuárias utilizando microalgas. Um indício físico de que a estocagem ocorreu esteve no percentual de cinzas da biomassa da cultura em vinhaça, que foi a maior encontrada (10,3%) dentre todas as condições de cultivo (2,9 a 8,7%). Além disso, a concentração total de fósforo removido foi cerca de 4 vezes maior do que a concentração de íons $P\text{-}PO_4^{3-}$ disponível na vinhaça

(Tabela 18, 3,3 mg L^{-1}), indicando possível atividade de *Chlorella* degradar e assimilar fósforo derivado de moléculas de polifosfato e fosfato orgânico presentes na vinhaça.

NTK teve remoção final de 57,2 mg L^{-1} e ocorreu acima da concentração de íons $N\text{-}NH_4^+$ (Tabela 18, 42,8 mg L^{-1}), também evidenciando possível atividade de *Chlorella* degradar e assimilar nitrogênio derivado de moléculas orgânicas na vinhaça, tais como aminoácidos.

A fluorescência de lipídeos neutros atingiu seu menor valor no dia 2 (0,22 u.a.), no ínicio da fase estacionária, e seu maior valor no dia 5 (0,68 u.a.), quando o cultivo foi finalizado.

Os principais parâmetros da 3ª etapa da pesquisa estão na Tabela 21, que traz consigo produtividades de biomassa e lipídeos das culturas fototróficas, mixotróficas otimizadas e otimizada em vinhaça.

Todas as culturas tiveram ótimos ajustes do seu crescimento ao modelo de Gompertz, com R^2 variando de 0,97 a 0,99 e $p<0,01$ de acordo com a ANOVA. VIN01 teve, na condição otimizada, a maior μ_{max} (5,75 dia^{-1}) e menor Tg (0,12 dias) dentre todas as cepas e condições de cultivo. Todas as velocidades do cultivo otimizado ficaram acima das observadas nos experimentos de otimização, em tubos de ensaio. Provavelmente, esta característica de crescimento está associada à modificação dos inóculos entre as etapas 2 e 3, uma vez que nos experimentos em tubos de ensaio (etapa 2), o inóculo utilizado teve origem fototrófica, pois ainda não estavam identificadas suas condições ótimas de crescimento. Na etapa 3, o inóculo já cresceu na condição tida como ótima para as cepas e foi este inóculo mixotrófico otimizado que iniciou as culturas de 8L.

Associadas aos melhores parâmetros de crescimento, as produtividades de biomassa e lipídeos totais da cultura mixotrófica otimizada de VIN01 foram as que mais aumentaram, quando comparadas às demais cepas e seus respectivos controles. O aumento relativo da produtividade de biomassa (482,3 mg L^{-1} dia^{-1}) e lipídeos totais (73,2 mg L^{-1} dia^{-1}) pela cepa VIN01, em relação à sua cultura fototrófica, foi de 59 e 51 vezes, respectivamente. A cepa C203 teve produtividades de biomassa (485,0 mg L^{-1} dia^{-1}) e lipídeos totais (67,0 mg L^{-1}) muito próximas às da cepa VIN01, porém o seu cultivo foi menos otimizado, em relação à cultura fototrófica, e obteve ganhos relativos de produtividade de 37 e 23 vezes para biomassa e lipídeos, respectivamente.

Tabela 21 – Compilação dos principais parâmetros de crescimento, do perfil bioquímico da biomassa e sua produção e produtividades e da remoção de nutrientes pelas culturas das cepas VIN01, C203 e FAZ-10 nas condições fototrófica, mixotrófica otimizada e em vinhaça (8 L de cultura aerada).

Parâmetros	Fototrófico			Mixotrófico Otimizado			Vinhaça
	VIN01	**C203**	**FAZ5-10**	**VIN01**	**C203**	**FAZ5-10**	**VIN01**
μ_{max} (dia^{-1})	0,31	0,53	0,31	5,75	5,48	1,02	2,54
Tg (dias)	2,23	1,30	2,24	0,12	0,13	0,68	0,27
Modelo de Gompertz							
R^2	0,995	0,973	0,992	0,999	0,999	0,995	0,981
p	$5,5x10^{-8}$	$2,0\ x10^{-7}$	$4,6x10^{-10}$	$9,1x10^{-7}$	$9,1x10^{-7}$	$5,5x10^{-8}$	$1,6x10^{-4}$
Tempo de cultivo (dias)	18	15	18	2,5	2,5	7,0	5,0
Perfil Bioquímico							
biomassa (mg L^{-1})	146,0	196,0	130,0	1205,7	1212,4	893,4	772,0
proteínas (%) (mg L^{-1})	34,4 50,3	33,3 65,2	36,1 46,9	29,9 360,4	37,2 450,7	19,0 170,1	37,1 286,6
carboidratos (%) (mg L^{-1})	20,8 30,3	28,0 54,9	17,7 23,0	21,4 258,6	17,8 215,9	50,5 451,5	18,5 142,8
lipídeos (%) (mg L^{-1})	17,8 26,0	22,2 43,6	19,4 25,2	15,2 183,0	13,8 167,5	23,6 210,4	12,1 93,5
clorofila *a*(%) (mg L^{-1})	2,3 3,3	3,4 6,7	2,6 3,4	2,5 30,0	2,1 25,8	1,1 10,0	0,8 5,9
cinzas (%) (mg L^{-1})	4,5 6,6	4,0 7,9	4,2 5,4	8,7 105,1	8,5 103,5	2,9 25,6	10,3 79,7
Produtividades							
biomassa (relativa[A])(mg L^{-1} dia^{-1})	8,1	13,1	7,2	59[A] 482,3	37[A] 485,0	18[A] 127,6	19[A] 154,4
lipídeos totais (relativo[A])(mg L^{-1} dia^{-1})	1,4	2,9	1,4	51[A] 73,2	23[A] 67,0	21[A] 30,1	13[A] 18,7
Remoção de N (%) (mg L^{-1})	92,6 12,2	95,6 13,0	60,0 8,1	53,0 71,6	57,9 80,2	85,5 38,6	18,2 57,2
Remoção de P (%) (mg L^{-1})	100 1,6	95,5 1,4	63,6 1,0	92,9 16,4	95,8 16,9	99,3 3,9	48,9 13,0
Remoção de Glicose (%) (mg L^{-1})	- -	- -	- -	74,5 2843	81,3 2513	81,1 1244	29,4[B] 1918[B]
Remoção de DQO (%) (mg L^{-1})	- -	- -	- -	61,1 2427	66,6 2619	60,5 1230	11,5 3030
Remoção de COT (%) (mg L^{-1})	- -	- -	- -	74,5 1136	81,3 1004	81,1 496,9	7,5 778
Relação COT:N:P no meio (mM)	- -	- -	- -	222:17:1	222:17:1	444:20:1	1018:26:1[C]
Relação COT:N:P assimilado (mM)	- -	- -	- -	179:10:1	153:10:1	333:22:1	155:10:1[C]

A - concentração relativa à produtividade obtida no cultivo fototrófico, B - na vinhaça, refere-se aos carboidratos totais e não somente à glicose, C-calculado em função de PT e NTK

A cultura da cepa VIN01 em vinhaça teve produtividades de biomassa (154,4 mg L^{-1} dia^{-1}) e lipídeos totais (18,7 mg L-1 dia^{-1}) menores do que em seu cultivo otimizado (3,1 e 3,9 vezes, respectivamente), mas aumentou a produtividade, em relação ao cultivo fototrófico, em 19 e 13 vezes para biomassa e lipídeos totais, respectivamente. O dia de colheita foi decisivo para reduzir as produtividades globais desta cultura, visto que a cultura entrou na fase estacionária no dia 2 da cultura e o experimento encerrou-se no dia 5.

Embora tenha menores produtividades de biomassa (127,6 mg L^{-1} dia^{-1}) e lipídeos totais (30,1 mg L^{-1} dia^{-}1) em relação às outras cepas, o perfil bioquímico que mais se destacou para produção de biocombustíveis foi o da cepa FAZ5-10. Na condição otimizada, mais de 50% da sua biomassa foi de carboidratos e 23,6% de lipídeos, caracterizando-a como cepa oleaginosa nestas condições de cultivo. Além do mais, sua elevada concentração de carboidratos a torna potencialmente aplicável a processos de produção de etanol de microalgas, via fermentação de amido, que é o polissacarídeo de reserva energética de *Chorella*.

É interessante ressaltar que a fluorescência para lipídeos neutros de FAZ5-10 aumentou expressivamente em resposta ao aumento de luz nos experimentos de otimização (Etapa 2) e, desta forma, a cepa parece alternar entre estocagem de amido ou óleos, a depender das condições de cultivo.

Para efeito de comparações, foram registradas fotomicrografias da cultura de VIN01 em vinhaça (Figura 56), que registrou biomassa com um dos menores percentuais de carboidratos (18,5%) e o menor percentual de lipídeos totais (12,1%), e fotomicrografias da cultura otimizada de FAZ5-10 (Figura 57), que revelaram sua elevada capacidade de estocar substâncias de reserva (amido e lipídeos neutros). Esta cepa será usada como modelo de perfil bioquímico desejado, visando ao melhoramento da produção de lipídeos das culturas de VIN01 em vinhaça e/ou meio sintético.

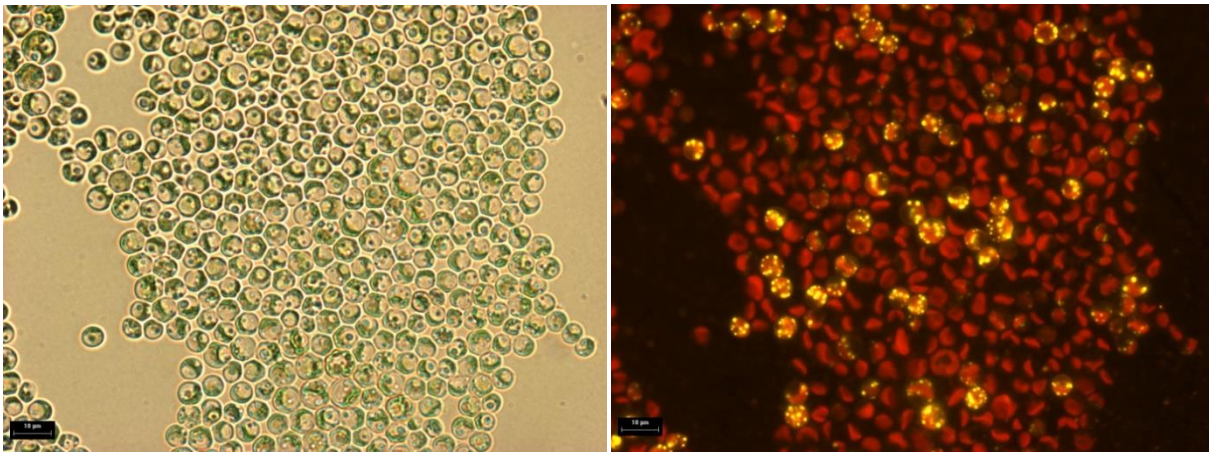

Figura 56 – Fotomicrografias da cepa VIN01 na fase estacionária do cultivo em vinhaça. (A) Microscopia de luz de suspensão celular com coloração de lugol indicando ausência de grânulos de amido. (B) Microscopia de fluorescência de suspensão celular corada com Vermelho do Nilo evidenciando vesículas de lipídeos neutros (amarelo). Organelas vermelhas são cloroplastos. Aumento de 400x. Escala de 10 µm.

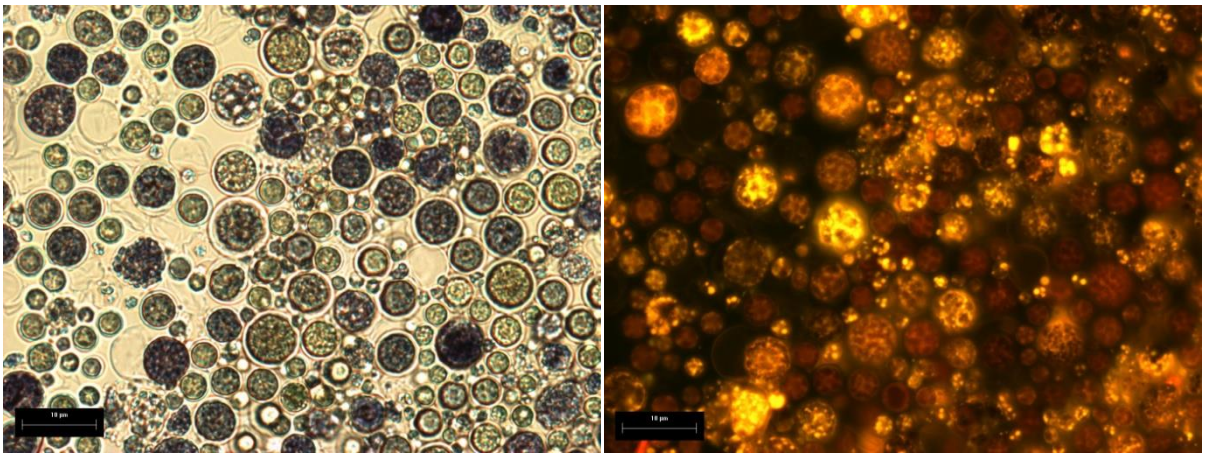

Figura 57 – Fotomicrografias da cepa FAZ5-10 na fase estacionária do cultivo mixotrófico otimizado. (A) Microscopia de luz de suspensão celular corada com lugol evidenciando células com grânulos de amido (roxo). (B) Microscopia de fluorescência de suspensão celular corada com Vermelho do Nilo evidenciando vesículas de lipídeos neutros (amarelo). Organelas vermelhas são cloroplastos. Aumento de 800x. Escala de 20 µm.

Relativo ao perfil de ácidos graxos obtidos da fração lipídica neutra (triglicerídeos), houve predominância de síntese de ácido palmítico, oleico, linoleico, α-linolênico e hexadecatetranóico (Tabela 22). As proporções destes ácidos variaram entre culturas fototróficas e mixotróficas otimizadas, indicando que o metabolismo da cultura pode modificar a estrutura química dos ácidos graxos sintetizados. Houve picos cromatográficos não identificados na cultura otimizada em vinhaça com elevado percentual (41,2%), que podem ser de ácidos graxos não identificados ou de interferentes na amostra.

Tabela 22 – Perfil de ácidos graxos obtidos da fração lipídica da biomassa

Ácido graxo (%)/Forma de cultivo		Fototrófico			Mixotrófico Otimizado			Vinhaça
		VIN01	C203	FAZ5-10	VIN01	C203	FAZ5-10	VIN01
C8:0	ácido caprílico	0,5	nd	0,3	0,7	1,4	nd	nd
C14:0	ácido mirístico	0,3	nd	0,4	0,4	0,6	0,3	0,5
C16:0	ácido palmítico	21,8	13,5	23,2	25,8	27,9	18,9	19,7
C16:1n9	ácido palmitoleico	1,2	1,3	1,4	2,1	1,5	2,6	2,7
C16:1n7	ácido palmitoleico	1,8	1,2	0,8	1,1	1,3	0,6	1,5
C16:2n4	acido hexadecadienóico	4,7	4,6	2,3	3,2	3,4	0,3	1,1
C16:3n3	acido hexadecatrienóico	4,4	5,9	6,9	12,6	9,9	1,8	3
C16:4n3	acido hexadecatetranóico	13,1	20,6	6,6	3,2	3,6	0,7	0,8
C16:4n6	-	0,5	0,3	nd	nd	0,3	4,3	0,6
C18:0	ácido esteárico	4,6	2,1	5,3	6,1	7,3	3,4	5,9
C18:1n9	ácido oleico	4,4	3,1	12,8	4,2	2,4	39,4	6,9
C18:1n7	acido cis-vacênico	4,1	3,1	3,7	2,4	1,8	2	3,2
C18:2n6	ácido linoleico	10	11,3	22,4	27,1	22,1	13	10,3
C18:3n3	ácido α-linolênico	19,8	28,3	9,8	5,1	6,2	6,2	1,4
C18:4n3	ácido estearidônico	0,3	0,5	0,6	0,5	0,6	0,5	0,5
C19:1n8	-	0,8	0,6	0,7	1,1	1,6	2,1	0,7
outros		7,6	3,6	3	4,4	8,2	3,6	41,2

nd – não detectado

Para finalizar a interpretação dos resultados, foi desenhada tabela de produtividades reais e estimadas (Tabela 23), caso a colheita de *Chlorella*, nas condições otimizadas, fosse feita no dia em que as culturas entraram na fase estacionária. Esta tabela foi pensada devido às observações gráficas (Figura 52, Figura 53,Figura 54 e Figura 55) de que o dia final de cultivo foi relativamente tardio e poderia ser antecipado. Também foi inserida na tabela a estimativa de produtividade das culturas, em gramas por m^2 por dia, num sistema de lagoas de alta taxa hipotético com 30 cm de lâmina de água (300 L por m^2). Os lipídeos totais foram mantidos nos mesmos valores para efeito de comparação.

Tabela 23 – Produção e produtividades de biomassa e lipídeos experimentais e estimadas, usando-se ajuste do tempo de colheita pela análise gráfica das culturas de 8L. Cálculo para lagoas de alta taxa hipotéticas considerando sistema com 30 cm de lâmina de água (300 L por m^2) e com condições de cultivo semelhantes aos laboratoriais.

Parâmetros	VIN01 otimizada	C203 otimizada	FAZ5-10 otimizada	VIN01 em vinhaça
Experimental				
Tempo de cultivo (dias)	2,5	2,5	7	5
Biomassa (mg L^{-1})	1206	1212	893	772
Lipídeos totais (mg L^{-1})	183	168	210	94
Produtividades (mg L^{-1} dia^{-1})				
Biomassa	482	485	128	154
Lipídeos totais	73	67	30	19
Estimado				
Tempo de cultivo (dias)	1,5	1,5	5	2
Biomassa (mg L^{-1})	1365	1339	889	538
Lipídeos totais[A] (mg L^{-1})	183	168	210	94
Produtividades (mg L^{-1} dia^{-1})				
Biomassa	910	893	178	269
Lipídeos totais	122	112	42	47
Lagoas de alta taxa				
Produtividades (g m^{-2} dia^{-1})				
Biomassa	273	268	53	81
Lipídeos totais	37	34	13	14

A – valores fixados aos experimentais para efeito de comparação

Com os devidos ajustes do tempo de colheita, a cultura otimizada da cepa VIN01 permaneceu em destaque dentre as demais e teve os maiores valores de produtividade de biomassa e lipídeos totais com aumento de 88,8% (de 482 para 910 mg L^{-1} dia^{-1}) e 67,1% (de 73 para 122 mg L^{-1} dia^{-1}), respectivamente. Ao longo da discussão, alguns desses dados serão utilizados para verificar a eficiência do processo de otimização a que se chegou.

6. DISCUSSÃO

Microalgas. Um grupo polifilético de micro-organismos fotossintetizantes, com espécies estimadas entre 1 a 10 milhões. A diversidade bioquímica do grupo é a base para explorar seu potencial biotecnológico e aplicações industriais (METTING JR., 1996).

Na última década, pesquisas com microalgas tem tido crescimento marcante devido às aplicações variadas destes micro-organismos na indústria alimentar, cosmética, farmacêutica e de biocombustíveis (DERNER, 2006; PIGNOLET et al., 2013).

Uma das formas de explorar a diversidade metabólica das microalgas é isolá-las de ambientes aquáticos variados para garantir a presença de vias metabólicas que, no ambiente, são utilizadas como estratégia de adaptação aos estressores naturais (ELLIOTT et al., 2012).

A estratégia de utilizar amostras de variados ambientes e aclimatá-las à vinhaça, na primeira etapa desta pesquisa, evidenciou que *Chlorella* é um gênero flexível, robusto e tolerante a elevadas concentrações de nutrientes e carbono orgânico. Ele não só tornou-se o gênero dominante na maior parte das amostras aclimatadas, comprovando seu potencial competitivo, como também cresceu mais nesses ambientes do que no meio de cultura padrão, evidenciando sua flexibilidade para assimilar e fixar com maior eficiência nutrientes disponíveis no substrato.

A capacidade do gênero *Chlorella* em adaptar-se a ambientes eutróficos, hipereutróficos e ricos em matéria orgânica foi utilizada por Reynolds et al. (2002) e Padisák, Crossetti e Nasseli-Flores (2009) para alocar o gênero em grupos funcionais específicos destes ambientes. Por isso, é comum encontrá-lo em abundância em sistemas de lagoas de estabilização (GRANADO, 2004; MIWA, 2007; CASALI, 2008; WOERTZ et al. 2009).

Desta forma, aclimatação de amostras aos efluentes aliada à consulta de grupos funcionais propostos por Reynolds et al. (2002) e Padisák, Crossetti e Nasseli-Flores (2009) poderiam ser utilizados como norteadores para se chegar aos grupos desejados de microalgas com o fim de tratar águas residuárias e ainda agregar produção de biomassa para fins comerciais.

Incorporada à característica de assimilação de nutrientes e compostos orgânicos, Pignolet et al. (2013) reforça que, se definido um *ranking* de microalgas para fins de produção de lipídeos em escala industrial, *Chlorella* seria uma das quatro deste ranking devido aos percentuais de lipídeos os quais pode acumular.

Portanto, *Chlorella* tem duas características cruciais que a tornam potencial candidata ao desenvolvimento de sistemas de cultivo baseados no conceito de biorrefinarias: assimilar concentrações relevantes de nutrientes provenientes de resíduos e originar biomassa oleaginosa para produção de biodiesel. O desafio das futuras pesquisas é, portanto, viabilizar tais sistemas de

cultivo. E tais pesquisas tem origem na seleção de cepas potencialmente oleaginosas isoladas de variedade de ambientes.

No protocolo executado para selecionar cepas oleaginosas de *Chlorella* spp., a indução da via heterotrófica foi a que mais se destacou dentre as testadas nesta pesquisa. Culturas fototróficas e heterotróficas de *Chlorella protothecoides* aumentaram seu percentual de lipídeos de 14,5% para 55% (MIAO; WU, 2006) e de 15,8% para 42,1% (LIU et al., 2011), que condiz com o aumento de fluorescência detectado nas culturas heterotróficas na etapa de seleção (Figura 13). As cepas selecionadas como potencialmente oleaginosas aumentaram seus índices de fluorescência em 3,3 (VIN01), 2,2 (C203) e 7,1 vezes (FAZ5-10) em relação ao controle. Deste modo, a indução da heterotrofia cumpriu com o objetivo de detectar assimilação de carbono orgânico e estocagem de sua energia na forma de lipídeos neutros. O método pode, portanto, ser utilizado como ferramenta para detectar cepas oleaginosas que cresçam bem em substratos contendo compostos orgânicos, tais como águas residuárias.

Por outro lado, das 31 cepas investigadas, apenas HOR02 aumentou sua fluorescência em resposta à limitação de nitrogênio. O provável insucesso desta via de indução de acúmulo de lipídeos esteve relacionado à concentração de 7 mg L^{-1} (500 µM) de $N\text{-}NO_3$ adotada, que não foi limitante o suficiente para gerar estresse no crescimento. Cha et al. (2011) aumentaram o percentual de lipídeos de *C. vulgaris* e *C. sorokiniana* utilizando concentrações de $N\text{-}NO_3$ na faixa entre 180 e 660 µM. A recomendação, portanto, é que concentrações mais baixas de nitrogênio sejam utilizadas na etapa de *screening*, cujo objetivo principal não é acumular biomassa, mas constatar atividade de vias metabólicas envolvidas na síntese e acúmulo de lipídeos neutros.

Elliott et al. (2012) adotaram a limitação biológica de nutrientes totais (devido à assimilação) por dez semanas para induzir acúmulo de lipídeos em 360 cepas de microalgas, as quais estão depositadas em coleção criada para aplicações na área de bioenergia.

Para fins de produtividade de biomassa oleaginosa, a proposta de pesquisas mais recentes é a de dividir o processo de cultivo em duas etapas (SU et al., 2011, MOHAN; DEVI, 2012; DEVI; SWAMY; MOHAN, 2013). A primeira, centrada na produção de biomassa e a segunda, centrada na aplicação de estresse (limitação de nitrogênio, enxofre, carbono, salinidade e outros) para acúmulo de lipídeos nas células. Este procedimento tem sido adotado pelo fato do agente estressor prejudicar a síntese de elementos estruturais celulares e, consequentemente, divisão celular, velocidade de crescimento específica e biomassa final da cultura. Esta questão será abordada mais à frente, quando os resultados da modelagem forem integrados a este tema.

A varredura por fatores químicos, tróficos e físicos revelou a importância marcante da frente trófica na otimização dos parâmetros de crescimento das cepas de *Chlorella* investigadas. Em relação

ao cultivo fototrófico, culturas mixotróficas e heterotróficas de VIN01 e C203 aumentaram em até 7 (de 0,31 para 2,16 dia^{-1}) e 8,7 vezes (de 0,31 para 2,71 dia^{-1}) sua μ_{max}, embora no último caso a concentração de glicose (Figura 21, 0,2 g L^{-1}) tenha sido limitante para a amplitude de crescimento. Estas informações abrem margem para a discussão de dois pontos importantes acerca do metabolismo mixotrófico, que foi o que mais se destacou nesta pesquisa.

O primeiro ponto está situado na pesquisa de Bhatnagar et al. (2011), que evidenciaram que a biomassa no cultivo mixotrófico é mais do que a soma da biomassa dos cultivos fototrófico e heterotrófico separados. Por isso, os autores sugerem que, no cultivo mixotrófico, fotoautotrofia e quimioheterotrofia ocorrem simultaneamente e sinergicamente. O ambiente rico em CO_2, derivado de intensa atividade respiratória heterotrófica da microalga, impulsionaria a atividade da enzima RuBisCO, elevando a incorporação do CO_2 ao ciclo de Calvin pela via fototrófica.

O sinergismo entre metabolismo fototrófico de microalgas (produção de O_2 e consumo de CO_2) e heterotrófico de bactérias (produção de CO_2 e consumo de O_2) é um dos principais processos biológicos descritos em lagoas facultativas para tratamento de águas residuárias (BECKER, 1994; MEETING JR, 1996). No entanto, sob a ótica da mixotrofia, é possível que cepas de *Chlorella*, tal como C203, isolada de lagoa facultativa, sejam consumidoras efetivas do próprio O_2 produzido pela fotossíntese, devido à assimilação intensa de fontes orgânicas de carbono pela via heterotrófica. Ela seria utilizada como estratégia de sobrevivência num ambiente em que a penetração de luz é limitada pelo excesso de biomassa em suspensão.

Portanto, a mixotrofia poderia ser uma tática metabólica para maximizar o crescimento de microalgas e minimizar o crescimento bacteriano aeróbio devido à escassez de O_2. Esta limitação realmente pode acontecer, tal como ocorreu na terceira etapa desta pesquisa, nos fotobiorreatores com cultivo mixotrófico otimizado (Figura 52 e Figura 53) e aponta para o metabolismo diferenciado das cepas em estudo.

VIN01 e C203, isoladas de ambientes hipereutróficos, ricos em matéria orgânica e com baixa penetração de luz, tem metabolismo preferencial heterotrófico, como ficou constatado nas etapas de varredura dos fatores e cultivo nos fotobiorreatores de 8L. Por outro lado, FAZ5-10, que cresce mais lentamente e com processos fotossintéticos predominantes, foi isolada de ambiente oligotrófico, com baixa turbidez e elevada penetração de luz.

Ainda com relação à mixotrofia, o segundo ponto a ser discutido refere-se às concentrações ideais de glicose utilizadas nos experimentos. Na concentração de 0,2 g L^{-1} de glicose, em que ocorreram as maiores μ_{max} do cultivo mixotrófico e heterotrófico, glicose parece ter sido limitante ao crescimento, pois reduziu os patamares das curvas (Figura 20 e Figura 21).

O problema da limitação poderia ser resolvido adotando-se um sistema de batelada alimentada, em que dosagens sucessivas de 0,2 g L^{-1} de glicose seriam adicionadas no decorrer do cultivo para otimizar μ_{max} sem limitar o crescimento da cultura. Esta estratégia poderia ser válida tanto para fatores da frente trófica que tiveram μ_{max} e outros parâmetros melhorados em concentrações limitantes, quanto para fatores da frente química. Culturas contendo fontes de nitrogênio ($N\text{-}NO_3$ e $N\text{-}NH_4$) em concentrações limitantes de 100 µM também tiveram maiores μ_{max} do que as não limitantes (Figura 15 e Figura 16) e, se dosadas continuamente em sistemas de batelada alimentada, poderiam maximizar μ_{max} e biomassa.

Além dos parâmetros de crescimento, o sistema de cultivo em batelada alimentada também aumenta a produção de lipídeos, segundo Cheirsilp e Torpee (2012). Os pesquisadores verificaram que culturas de *Chlorella* tiveram produtividade de lipídeos elevada de 58,8 para 112,4 mg L^{-1}, quando 2 g L^{-1} de glicose foram adicionados a cada dois dias acompanhados de incrementos de luz de 3000 lux (~40 µmol fótons m^{-2} s^{-1}). E ao dosar a quantidade de nutrientes que a cultura recebe para crescer otimizada, é possível ter maior controle dos nutrientes disponíveis no meio e, desta forma, gerar estresse no final do crescimento exponencial para induzir acúmulo de lipídeos.

Dos fatores tróficos testados, ácido acético também melhorou significativamente os parâmetros de crescimento das cepas VIN01 e C203, de modo análogo à glicose. Este ácido é utilizado como fonte de carbono orgânico em diversas plantas de cultivo de algas, principalmente naquelas em que *Chlorella* é cultivada e comercializada como suplemento alimentar (BECKER, 1994).

A otimização do cultivo com acetato ocorre porque *Chlorella* é capaz de assimilar este composto orgânico pelo ciclo do glioxilato (GOULDING & MERRET, 1966 apud GOULDING & MERRET, 1967) que converte acetato a acetil-coA, molécula precursora de diversos metabólitos, no ciclo do ácido cítrico mitocondrial, e também de ácidos graxos (BELLOU; AGGELIS, 2012). Devido ao aumento de produtividades de biomassa oleaginosa das culturas com acetato, pesquisadores tem sugerido que o cultivo de *Chlorella* para biodiesel poderia ser integrado à produção fermentativa de biohidrogênio, que tem como resíduo efluente rico em acetato (HEREDIA-ARROYO; WEI; HU, 2010, MOHAN; DEVI, 2012). Esta linha de pesquisa será promissora para as cepas VIN01 e C203, que tiveram parâmetros de crescimento expressivamente melhorados quando cultivadas em ácido acético.

Nesta pesquisa, os parâmetros de crescimento foram significativamente melhorados tanto pelo uso isolado da glicose, em culturas mixotróficas, quanto pelo uso combinado dos fatores físicos "luz" e "temperatura" à mixotrofia, por meio de delineamento composto central rotacional (DCCR) e análise de superfície de resposta. As maiores otimizações de μ_{max} das culturas (VIN01 e C203) ocorreram em níveis de temperatura de 37 a 41 ºC e intensidade luminosa de 170 a 220 µmol fótons

m^{-2} s^{-1}, a depender da cepa. Nos experimentos de varredura também ficou constatado que as três cepas investigadas melhoraram seus parâmetros de crescimento em temperaturas de até 40 ºC.

Este caráter termofílico das cepas está muito próximo aos limites descritos por Kessler (1985), que encontrou tolerância máxima de temperatura na faixa de 38 a 42 ºC para *C. sorokiniana*. Ao investigar 72 cepas de 13 espécies de *Chlorella*, o autor concluiu que o limite de tolerância de cada espécie é espécie-específica para o gênero *Chlorella* e somente *C. sorokiniana* é termofílica. Esta informação sugere que as cepas investigadas nesta pesquisa sejam da espécie *C. sorokiniana* e a identificação com técnicas de biologia molecular poderá corroborar ou não a afirmação do autor.

O modelo preditivo gerado, além de otimizar o cultivo mixotrófico em condições termofílicas, também apontou para características acerca do acúmulo de lipídeos neutros nas culturas otimizadas.

Verificou-se que culturas crescendo em condições de maior μ_{max} acumularam menos lipídeos neutros (Figura 33, Figura 34,Figura 37 e Figura 38), inferindo-se que o metabolismo de divisão celular ocorreu dissociado do metabolismo de síntese e acúmulo de lipídeos neutros. Por isso, não aconteceu acúmulo de biomassa e lipídeos neutros concomitantemente, nas condições de luz e temperatura avaliadas. Esta informação vem ao encontro de recentes pesquisas, cuja proposta é adotar sistemas bifásicos de cultivo, em que a produção de lipídeos neutros somente é estimulada após alcançada produção desejável de biomassa (SU et al., 2011, MOHAN; DEVI, 2012; DEVI; SWAMY; MOHAN, 2013).

O modelo preditivo obtido nesta pesquisa sugere que a otimização da produção de lipídeos neutros ocorra deslocada para faixas de temperatura médias em torno de 25 ºC (Figura 34, Figura 38 e Figura 42), que são justamente faixas de temperatura que proporcionam menores μ_{max}. Converti et al. (2009) também conseguiram maiores percentual (14,71%) e produtividade (20,22 mg L^{-1} d^{-1}) de lipídeos em temperatura de 25 ºC, quando comparada às temperaturas de 30, 35 e 38 ºC, em culturas de *C. vulgaris*. No entanto, os pesquisadores não registraram mudanças de μ com a variação da temperatura. Tan e Johns (1991) cultivaram *C. saccarophilla* heterotroficamente (2,5 g L^{-1} de glicose) e conseguiram maiores percentuais de lipídeos na temperatura de 20 ºC (46,7%), quando comparada às temperaturas de 15 ºC (36,5%) e 30 ºC (23,4%). Portanto, a faixa de temperatura à qual o modelo aponta corrobora com as encontradas em pesquisas já realizadas.

Desta forma, caso os resultados previstos pelo modelo se confirmem para águas residuárias, a produção de biomassa oleaginosa em vinhaça poderia ser favorecida ao aproveitar as temperaturas quentes com que o efluente é emitido para otimizar o crescimento e, num segundo estágio, poderia ser resfriada naturalmente, até temperatura ambiente, para induzir acúmulo de lipídeos na biomassa. Tal estratégia poderia ser adaptada em plantas industriais que tenham processos de emissão similares, com alternância de temperaturas.

Ao simular as condições otimizadas em tubos de ensaios (etapa 2) nos fotobiorreatores com 8L de cultura aerada (etapa 3), verificou-se que os parâmetros de crescimento das três cepas foram otimizados com o escalonamento. Enquanto as μ_{max} médias dos cultivos otimizados em tubos de ensaio foram de 3,34 dia^{-1} (VIN01), 3,58 dia^{-1} (C203) e 0,85 dia^{-1} (FAZ5-10), nos cultivos otimizados em fotobiorreatores aerados de 8L as μ_{max} foram de 5,75 dia^{-1} (VIN01), 5,48 dia^{-1} (C203) e 1,02 dia^{-1} (FAZ5-10). Devido à intensa atividade heterotrófica das cepas VIN01 e C203, comprovadas por medidas de OD de até 0,5 mg L^{-1}, é possível que a aeração tenha melhorado as trocas gasosas do meio e favorecido o metabolismo mixotrófico, aumentando a μ_{max} das respectivas culturas. Como na cepa FAZ5-10 a heterotrofia não é tão marcante quanto a das demais cepas (consumo de OD menor), o aumento da μ_{max} não foi tão relevante porque, provavelmente, nos tubos de ensaio OD não se tornou limitante para FAZ5-10.

Chojnacka e Marquez-Rocha (2004) compararam as relações dos metabolismos fototrófico, mixotrófico e heterotrófico e propuseram mudanças de pH na cultura em função de cada metabolismo que são, respectivamente, aumento (pela liberação de OH^- da fotossíntese), redução (pela liberação de CO_2 da respiração) e estabilização (pela compensação entre os dois metabolismos). O aumento de pH proeminente (de 7,88 a 9,71) no cultivo mixotrófico da cepa FAZ5-10 (Figura 54), associado a menores reduções do OD, evidenciou, desta forma, que a cepa teve atividade fototrófica predominante. Por outro lado, a variação de pH (de 7,8 a 8,6) das culturas das cepas VIN01 e C203 foi menos marcante e, associado às medidas de OD e de assimilação de COT (Tabela 21), comprovaram que o metabolismo heterotrófico nestas cepas é muito mais acentuado do que nas culturas de FAZ5-10. Deste modo, OD pode ser utilizado como parâmetro complementar, além do pH, para monitorar processos tróficos predominantes nas culturas de microalgas.

Outro ponto associado às maiores μ_{max} obtidas nos fotobiorreatores de 8L pode estar ligado ao uso de inóculos aclimatados às condições otimizadas. Como os experimentos para calibrar o modelo preditivo tiveram inóculos provenientes de cultivo fototrófico, os parâmetros de crescimento podem ter sido subestimados na etapa 2. Desta forma, os modelos preditivos gerados poderiam ser revalidados com experimentos em que os inóculos já sejam mixotróficos e aclimatados às condições ideais para melhores crescimentos.

O cultivo otimizado em vinhaça conseguiu superar o desafio de se trabalhar com vinhaça concentrada para o cultivo de *Chlorella*. Oliveira (1988), Öztürk e Demir (2001) tiveram diminuição do crescimento de *Chlorella* cultivada em concentrações acima de 10% do efluente, que foi a concentração limite para crescimento de amostras ambientais aclimatadas na etapa 1 deste projeto. Portanto, a cepa VIN01, isolada da própria vinhaça, tem características peculiares de adaptação a um

ambiente agressivo, principalmente no que diz respeito às elevadas concentrações de metais da vinhaça, muitas delas letais.

Apesar de superado este desafio, o cultivo otimizado em vinhaça da cepa VIN01 teve menor produtividade de biomassa, quando comparado ao seu cultivo mixotrófico otimizado (Tabela 24), e algumas hipóteses foram traçadas para explicar esta redução.

Baseando-se no perfil dos nutrientes da vinhaça, uma das hipóteses para explicar a diminuição da produtividade da cultura está associada à limitação de nitrogênio assimilável por *Chlorella* sp.. Está afirmação foi pautada baseando-se no *luxury uptake* do fósforo durante a fase estacionária da cultura. O fenômeno de *luxury uptake*, ou assimilação para fins de estocagem celular, designa a habilidade de algumas espécies assimilarem nutrientes em elevadas velocidades mesmo quando já pararam de crescer e está relacionado com recursos de adaptação e competição da microalga (SOMMER, 1985).

Se fósforo fosse limitante, este evento não seria observado na fase estacionária, uma vez que ele só ocorre se houver excesso do nutriente no meio. Deste modo, parece possível afirmar que a cultura entrou na fase estacionária devido à limitação de nitrogênio e, uma vez cessado o crescimento, fósforo continuou sendo assimilado como estoque celular por *luxury uptake*. Os demais macro e micronutrientes ocorrem em concentrações extremamente elevadas e dificilmente teriam induzido a fase estacionária, exceto por toxicidade para a cultura de VIN01.

Conectada às característica nutricionais, também houve redução marcante da relação entre clorofila *a*/biomassa, que foi de 2,5% no cultivo mixotrófico otimizado e de 0,8% no cultivo em vinhaça, indicando diminuição de 68% em relação ao cultivo mixotrófico otimizado. A redução da clorofila *a* pode ser indício de limitação de nitrogênio na cultura. Todavia, ela também pode estar associada ao caráter escuro da vinhaça, que direcionaria a cultura à via heterotrófica. Bhatnagar et al.(2011) reportaram reduções na clorofila *a* de até 95% na cultura heterotrófica, quando comparada à cultura fototrófica. Os autores relatam que esse evento acontece porque as culturas não podem utilizar luz para crescer e, como assimilam variadas formas de carbono orgânico como fonte de energia, há diminuição da síntese de clorofila *a* para fotossíntese.

Tais hipóteses poderão ser confirmadas em experimentos com incorporação de nitrogênio à vinhaça e o concomitante monitoramento de assimilação e crescimento da cultura.

O cultivo otimizado em vinhaça da cepa VIN01 aumentou produtividade de biomassa (de 8,1 para 154,4 mg L^{-1} dia^{-1}) e lipídeos (de 1,4 para 18,7 mg L^{-1} dia^{-1}) em relação à sua cultura fototrófica. Além disso, *Chlorella* removeu da vinhaça 57,2 mg L^{-1} de nitrogênio, 13,0 mg L^{-1} de fósforo, 3030 mg L^{-1} de DQO e 778 mg L^{-1} de COT, demonstrando sua capacidade de remover matéria orgânica e mineral do efluente e produzir biomassa pela via mixotrófica. Constatou-se, desta forma, que o

crescimento mixotrófico de *Chlorella* em vinhaça é viável e ainda poderá ser otimizado para aumentar as produtividades de biomassa e lipídeos.

No perfil de ácidos graxos da fração de triglicerídeos (Tabela 22) predominaram ácido palmítico (C16:0), hexadecatrienóico (C16:3n3), esteárico (C18:0), oleico (C:18:1n9) e linoleico (C18:2n6). No cultivo mixotrófico otimizado da cepa VIN01, 68,3% dos ácidos graxos (palmítico, esteárico, oleico, linoleico, linolênico) corresponderam às frações que estão presentes em óleos vegetais de palma e soja e, por isso, são adequados à fabricação de biodiesel (SYDNEY et al., 2011). A caracterização dos ácidos graxos do cultivo otimizado em vinhaça também revelou maiores percentuais de ácido palmítico, esteárico, oleico e linoleico (42,8%). Todavia, 41,2% da área do cromatograma ocorreu em picos não identificados por padrões. A análise precisará ser revista para identificação desses picos e correta caracterização da amostra.

Como o método de extração utilizado contabiliza as frações totais de lipídeos, futuras pesquisas adotarão métodos de separação cromatográfica para adequada quantificação do percentual de lipídeos neutros em relação aos lipídeos totais, visto que os lipídeos neutros, constituídos em sua maior parte por triglicerídeos, são a molécula alvo para produção de biodiesel.

Dentre as três cepas investigadas, o cultivo mixotrófico otimizado de VIN01 foi o que mais se destacou em termos de ganhos de produtividade de biomassa (de 8,1 para 482,3 mg L^{-1} dia^{-1}) e lipídeos totais (de 1,4 para 73,2 mg L^{-1} dia^{-1}), quando comparadas ao seu cultivo fototrófico. Assim, confirmou-se a otimização do cultivo mixotrófico de VIN01 e suas produtividades foram comparadas às encontrados na literatura, conforme Tabela 24.

A cultura de VIN01 teve produtividades de biomassa e lipídeos próximas (dados reais) ou maiores (dados estimados) do que pesquisas com *Chlorella* em batelada, confirmando ganhos reais com a otimização do seu cultivo. Pesquisas como as de Zheng et al. (2013) e Xiong et al. (2008), com elevadas produtividades de biomassa e óleo, seriam pouco prováveis de serem concretizadas sob a ótica do tratamento de águas residuárias, uma vez que estes ganhos são obtidos mediante alimentação sequencial (a cada 20 horas) do sistema com concentrações muito elevadas de glicose (>20 g L^{-1}) e demais nutrientes.

Tabela 24 - Produtividades de biomassa e lipídeos da cepa VIN01 no cultivo mixotrófico otimizado, no cultivo otimizado em vinhaça e por espécies diversas de *Chlorella* de outras pesquisas.

	Chlorella	**Forma de cultivo**	**Condição**	**Produtividade de biomassa (mg L^{-1} d^{-1})**	**Produtividade de lipídeos (mg L^{-1} d^{-1})**	**Referência**
1	VIN01	B	M	482	73	Pesquisa atual (meio WC)
2	VIN01	B	M	910[A]	122[A]	Pesquisa atual (meio WC)
3	VIN01	B	M	154	19	Pesquisa atual (vinhaça)
4	VIN01	B	M	269[A]	47[A]	Pesquisa atual (vinhaça)
5	*C. sorokiniana*	*	*	97	18	Griffiths & Harrison (2009)
6	*C. vulgaris*	B	M	1602	250	Heredia-Arroyo et al. (2010)
7	*C. vulgaris*	B	H	250	76	Heredia-Arroyo et al. (2010)
8	*C. vulgaris*	B	M	254	54	Liang, Sarkany e Cui (2009)
9	*C. vulgaris*	B	H	151	35	Liang, Sarkany e Cui (2009)
11	*Chlorella* sp.	B	M	376	59	Cheirsilp e Torpee (2012)
10	*Chlorella* sp.	BA	M	448	112	Cheirsilp e Torpee (2012)
12	*C. vulgaris*	SC	M	346	145	Feng, Li e Zhang (2011)
13	*C. sorokiniana*	BA	H	10840	4200	Zheng et al. (2013)
14	*C. protothecoides*	BA	H	7360	3702	Xiong et al. (2008)

*compilação da literatura baseada em diversos tipos de cultivo; A - Valores estimados caso a colheita fosse no início da estacionária; B - Batelada; BA - Batelada Alimentada; SC - Semi-contínuo, M - Mixotrófico; H – Heterotrófico

Muitas das pesquisas conseguiram maiores produtividades de lipídeos porque eles ocorreram em porcentagens acima de 20% (em relação à biomassa seca), que seria o teor sugerido de óleos para que a microalga seja considerada oleaginosa (RATLEDGE; COHEN, 2008). Das cepas investigadas, somente FAZ5-10 obteve percentual de lipídeos acima de 20% na condição otimizada e ela será utilizada como modelo em estudos de otimização do acúmulo de óleos.

Desta forma, o desafio das próximas pesquisas será o de segmentar o cultivo em duas etapas para aumentar o percentual de óleo na biomassa e, consequentemente, sua produtividade. Além disso, a otimização da biomassa poderá ser melhorada com a mudança do cultivo de batelada para batelada alimentada, visando à otimização dos parâmetros de crescimento e ao cultivo sem limitação de nutrientes para aumentar concentrações finais de biomassa oleaginosa.

7. CONCLUSÕES

A aclimatação de amostras de ambientes variados à vinhaça confirmou a flexibilidade metabólica de cepas de *Chlorella* spp. ao substrato eutrófico e rico em matéria orgânica. O gênero se destacou dentre os presentes nas amostras, ao crescer com maior rapidez e dominar as culturas aclimatadas, confirmando seu potencial de aplicação em processos de cultivo atrelados ao tratamento de águas residuárias.

A indução de síntese e acúmulo de triglicerídeos pela via heterotrófica detectou cepas com elevados índices de fluorescência para lipídeos neutros, devido à assimilação de carbono orgânico e estocagem de energia sob a forma de lipídeos. As cepas de *Chlorella* VIN01, C203 e FAZ5-10 foram selecionadas como potencialmente oleaginosas por apresentarem maiores valores de fluorescência (média de 5 u.a.) detectados dentre as 31 cepas isoladas.

A frente trófica destacou-se, dentre as três frentes de varredura investigadas, por promover melhorias expressivas nos parâmetros de crescimento das três cepas estudadas. O cultivo mixotrófico utilizando glicose e ácido acético foram os mais promissores, dentre os testados, para otimizar o cultivo de *Chlorella* spp.

Com a combinação da mixotrofia (glicose) e fatores físicos (luz e temperatura), otimizou-se o cultivo das cepas de *Chlorella* selecionadas. Os pontos ótimos previstos pelo modelo preditivo e análise de superfície de resposta foram adequadamente validados e serviram como referência para definir as características do cultivo em média escala e para nortear futuras pesquisas acerca do acúmulo de óleos.

As condições otimizadas em fotobiorreatores aerados (8L) aumentaram a produtividade de biomassa da cultura mixotrófica otimizada (VIN01) em 59 vezes (de 8,1 para 482,3 mg L^{-1} dia^{-1}) e a produtividade de lipídeos em 51 vezes (de 1,4 para 73,2 mg L^{-1} dia^{-1}), em relação à sua cultura fototrófica. Desta forma, confirmou-se a otimização do cultivo de VIN01, pela via mixotrófica.

O cultivo otimizado em vinhaça, da cepa VIN01, aumentou sua produtividade de biomassa em 19 vezes (de 8,1 para 154,4 mg L^{-1} dia^{-1}) e lipídeos em 13 vezes (de 1,4 para 18,7 mg L^{-1} dia^{-1}) em relação à sua cultura fototrófica, evidenciando que vinhaça tem componentes orgânicos e minerais favoráveis ao crescimento mixotrófico de *Chlorella*.

Chlorella assimilou da vinhaça 57,2 mg L^{-1} de nitrogênio, 13,0 mg L^{-1} de fósforo, 3030 mg L^{-1} de DQO e 778 mg L^{-1} de COT, demonstrando sua dupla capacidade de remover matéria orgânica e mineral do efluente e produzir biomassa. Estas são características necessárias ao desenvolvimento de novos processos de cultivo de microalgas voltados para produção de biomassa com valor comercial atrelado ao tratamento de resíduos.

Espera-se que as informações geradas possam aperfeiçoar o cultivo de microalgas oleaginosas em vinhaça de usinas de bioethanol e agregar conhecimento ao desenvolvimento da tecnologia de biocombustíveis de terceira geração.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABELIOVICH, A.; WEISMAN, D. Role of heterotrophic nutrition in growth of the alga *Scenedesmus obliquus* in high-rate oxidation ponds. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 35, p. 32-37, 1978.

ANDERSEN, R.A. Diversity of eukaryotic algae. **Biodiversity and Conservation**, v. 1, p. 267-292, 1992

ANDERSEN, R. A. Algal culturing Techniques. London: Elsevier Academic, 2005, 578 p.

APHA – American Public Health Association. **Standard Methods for the examination of water and wastewater**. 19th edition. Baltimore: Port City, 2005. 1268 p.

BHATNAGAR, A. et al. Renewable biomass production by mixotrophic algae in the presence of various carbon sources and wastewaters. **Applied Energy**, v. 88, p. 3425–3431, 2011.

BECKER, E. W. **Microalgae**: biotechnology and microbiology. Cambridge: Cambridge University, 1994. 293 p.

BELLOU, S.; AGGELIS; G. Biochemical activities in Chlorella sp. and Nannochloropsis salina during lipid and sugar synthesis in a lab-scale open pond simulating reactor. **Journal of Biotechnology**, v. 164, p. 318–329, 2012.

BELTRÃO, M. I. **Cultivo de algas clorofíceas (*Ankistrodesmus densus*, *Chlorela vulgaris*, e *Scenedesmus bijugatus*) em resíduos líquidos de indústria de suco de laranja concentrado**. 120 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Engenharia Ambiental) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1992.

BISSINGER, V. GAEDKE, U.; KAMJUNKE, N. Inorganic carbon limitation and mixotrophic growth in *Chlamydomonas* from an acidic mining lake. **Protist**, v. 156, p. 63-75, 2005.

BRASIL. Plano Nacional de Agroenergia: 2006-2011. Brasília, DF, 2005. 118 p.

BRASIL. O Futuro da Indústria: Biodiesel. Série Política Industrial, Tecnológica e de Comércio Exterior – 14. Brasília, DF, 2006. 145 p.

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

CARDOZO, K. H. M. et al. Metabolites from algae with economical impact. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part C, v. 146, p. 60–78, 2007.

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

CHA, T. S. et al. Differential regulation of fatty acid biosynthesis in two *Chlorella* species in response to nitrate treatments and the potential of binary blending microalgae oils for biodiesel application. **Bioresource Technology**, v.102, p. 10633–10640, 2011.

CHEIRSILP, B.; TORPEE, S. 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, 2012.

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

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

CHOJNACKA, K; MARQUEZ-ROCHA; F. J. Kinetic and Stoichiometric relationships of the energy and carbon metabolism in the culture of microalgae. Biotechnology, v. 3, p.21-34, 2004.

CHRISTIE, W. W. **Gas Chromatography and Lipids**: A Practical Guide. Dundee: The Oily Press, 1989, 307p.

CLARENS, A. F et al. Environmental life cycle comparison of algae to other bioenergy feedstocks. **Environmental Science Technology**, v. 44, p. 1813-1819, 2010.

COHEN, Z. et al. The role of triacylglycerol as a reservoir of polyunsaturated fatty acids for the rapid production of chloroplastic lipids. **Biochemical Society Transactions.** v. 28, 6, p. 740-743, 2000.

CONVERTI, A. et al. Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. **Chemical Engineering and Processing**, v.48, p. 1146–1151, 2009.

CRAGGS, R. J. et al. Wastewater nutrient removal by marine microalgae grow on a corrugated raceway. **Water Research**, v. 31, p. 1701–1707, 1997.

de-BASHAN, L. E. et al. *Chlorella sorokiniana* UTEX 2805, a heat and intense, sunlight-tolerant microalga with potential for removing ammonium from wastewater. **Bioresource Technology**, v.99, p. 4980-4989, 2008.

DERNER, R. B. et al. Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural, Santa Maria**, v. 36, n. 6, p.1959-1967, 2006.

DEVI, M. P.; SUBHASH, G. V.; MOHAN, S. V. 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, 2012.

DEVI, M. P.; SWAMY, Y. V.; MOHAN, V. Nutritional mode influences lipid accumulation in microalgae with the function of carbon sequestration and nutrient supplementation. **Bioresource Technology**, v.142, p. 278–286, 2013.

DUBOIS, M. et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n.3, p. 350-356, 1958.

DURRENT, T. P.; BENNING, C.; OHLROGGE, J. Plant triacylglycerols as feedstocks for the production of biofuels. **The Plant Journal,** v. 54, p. 593–607, 2008.

ELLIOT, L. G. Establishment of a bioenergy-focused microalgal culture collection. **Algal Research**, v. 1, p. 102–113, 2012.

FENG, Y.; LI, C.; ZHANG, D. Lipid production of *Chlorella vulgaris* cultured in artificial wastewater medium. Bioresource Technology, v.102, p.101–105, 2011.

FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G. H. S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **Journal of Biological Chemistry**, v. 226, p. 497–509, 1957.

GOULDING, K. H.; MERRET, M. J. The Photo-assimilation of Acetate by *Pyrobotrys (Chzamydobotrys) stellata*. **Journal of General Microbiology**, v.48, p. 127-136, 1967.

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

GRIFFITHS, M.; HARRISON, S. T. L. Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. Journal of Applied Phycology, v. 21, p. 493–507, 2009.

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

HEREDIA-ARROYO, T.; WEI, W.; HU, B. Oil Accumulation via Heterotrophic/Mixotrophic *Chlorella protothecoides.* **Applied Biochemistry and Biotechnology,** v. 162, p. 1978–1995, 2010.

HOEK, C.V.D; MANN, D. G.; JAHNS, H. M. **Algae**: an introduction to phycology. Cambridge: Cambridge University, 1995. 637 p.

HOSHAW, R. W.; ROSOWSKI, J. R. Isolation and purification – Methods for microscopic algae. In: STEIN, J. R. (Ed). **Handbook of phycological methods**: culture methods and growth measurements. Cambridge: Cambridge University, 1973. p. 53-67.

HU, Q. et al. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. **The Plant Journal**, v. 54, p. 621–639, 2008.

HUANG, G.; CHEN, F.; WEI, D.; ZHANG, X.; CHEN, G. Biodiesel production by microalgal biotechnology. **Applied Energy**, v. 87, p. 36-46, 2010.

ILLMAN, A. M; SCRAGG, A. H.; SHALES, S. W. Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium. **Enzyme and Microbial Technology,** v. 27, p. 631–635, 2000.

KESSLER, E. Upper Limits of Temperature for Growth in *Chlorella* (Chlorophyceae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 151, p. 67-71, 1985.

LANZOTI, C. R. **Uma análise emergética de tendências do setor sucroalcooleiro**. 95 f. Dissertação (Mestrado em Planejamento de Sistemas Energéticos) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Mecânica, Campinas, 2000.

LARDON, L. et al. Life-cycle assessment of biodiesel production from microalgae. **Environmental Science and Technology**, v. 43, p. 6475-6481, 2009.

LI, Q; DU, W.; LIU, D. Perspectives of microbial oils for biodiesel production. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 80, p. 749–756, 2008.

LI, X.; XU, H.; WU, Q. Large-scale biodiesel production from microalga *Chlorella protothecoides* through heterotrophic cultivation in bioreactors. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 98, n. 4, p. 764-771, 2007.

LIANG, Y.; SARKANY, N.; CUI, Y. Biomass and lipid productivities of Chlorella vulgaris under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. **Biotechnology Letters**, v. 31, p. 1043–1049, 2009.

LIU, J. et al. Differential lipid and fatty acid profiles of photoautotrophic and heterotrophic *Chlorella zofingiensis*: Assessment of algal oils for biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 106–110, 2011.

LOURENÇO et al. Distribution of intracellular nitrogen in marine microalgae: Calculation of new nitrogen-to-protein conversion factors. European Journal of Phycology, v. 39, p. 17-32, 2007.

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

MENG, X. et al. Biodiesel production from oleaginous microorganisms. **Renewable Energy**, v. 34, p. 1–5, 2009.

METTING JR., F. B. Biodiversity and application of microalgae. Journal of Industrial Microbiology, v.17, p. 477-489, 1996.

MIAO, X; WU, Q. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. **Bioresource Technology**, v.97, n.6, p. 841-849, 2006.

MILLER, R. et al. Changes in transcript abundance in *Chlamydomonas reinhardtii* following nitrogen deprivation predict diversion of metabolism. **Plant Physiology**, v. 154, p. 1737-1752, 2010.

MIWA, A. C. P. **Avaliação do sistema de funcionamento do esgoto de Cajati, Vale do Ribeira do Iguape (SP), em diferentes épocas do ano**. 194 f. Tese (Doutorado em Engenharia Hidráulica e Saneamento) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.

MOHAN, S. V.; DEVI, M. P. Fatty acid rich effluent from acidogenic biohydrogen reactor as substrate for lipid accumulation in heterotrophic microalgae with simultaneous treatment. **Bioresource Technology, v.** 123, p. 627–635, 2012.

MUJTABA, G. et al. Lipid production by *Chlorella vulgaris* after a shift from nutrient-rich to nitrogen starvation conditions. **Bioresource Technology**, v. 123, p. 279-283, 2012.

NEDERLANDSE NORM (1981). *Norm 6520*: water spectrophotometric determination of chlorophyll *a* content. Delft: ***NEN***.

NUSH, E. A. Comparison of different methods for chlorophyll and phaepigment. **Arch. Hydrobiol. Bech. Sttutgart**, v.14, p. 14-36, 1980.

NITAYAVARDHANA, S.; KHANAL, S. K. Innovative biorefinery concept for sugar-based ethanol industries: Production of protein-rich fungal biomass on vinasse as an aquaculture feed ingredient. **Bioresource Technology,** v. 101, p. 9078–9085, 2010.

OLIVEIRA, H. T. **Utilização de vinhaça como meio de cultura para *Chlorella vulgaris* (CCAP-211/11b)**. 146 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais) - Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1988.

ÓRPEZ, R. et al. Growth of the microalga *Botryococcus braunii* in secondarily treated sewage. **Desalination**, v.246, p. 625-630, 2009.

OSWALD, W. J. Microalgae and waste-water treatment. In: BOROWITZKA, M.A.; BOROWITZKA, L.J. (Eds). **Micro-algal biotecnology**. Cambridge: Cambridge University, 1988. p.305-328.

ÖZTÜRK, L.; DEMIR, Y. The effects of vinasse on some growth parameters of algae. **Frenesius Environmental Bulletin**, v. 10, p. 766-771, 2001.

PADISÁK, J.; CROSSETTI, L. O.; NASSELI-FLORES, L. Use and misuse in the application of the phytoplankton functional classification: a critical review with updates. **Hydrobiologia**, v. 621, p. 1–19, 2009.

PIGNOLET et al. Highly valuable microalgae: Biochemical and topological aspects. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 40, p. 781-796, 2013.

PITTMAN, J. K.; DEAN, A. P.; OSUNDEKO, O. The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources. Bioresourse Technology, v. 102, p. 17-25, 2011.

PENTEADO, M. A. T.; ADORNO, J.; ZAIAT, M. Simple and accurate method for determination of fatty acids, alcohols and carbohydrates by HPLC with UV/DAD and RID detectors. In: **38th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques**, Los Angeles, USA, junho de 2012.

RAJA, R. et al. A perspective on the biotechnological potential of microalgae. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 34, p. 77–88, 2008.

RATLEDGE, C.; COHEN, Z. Microbial and algal oils: Do they have a future for biodiesel or as commodity oils? **Lipid Technology**, v. 20, p.155-160, 2008.

REYNOLDS, C. S. Functional morphology and the adaptive strategies of freshwater phytoplankton. In: SANDGREN, C.D. (ed). **Growth and reproductive strategies of freshwater phytoplankton**. Cambridge: Cambridge University, 1988. p. 388-433.

REYNOLDS, C. S., et. al. Towards a functional classification of the freshwater phytoplankton. **Journal of Plankton Research**, v. 24, p. 417–428, 2002.

RICHMOND, A. *Spirulina*. In: BOROWITZKA, M.A.; BOROWITZKA, L.J. (Eds). **Micro-algal biotecnology**. Cambridge: Cambridge University, 1988. p.85-121.

RIGANO, V. D. M. et al. The physiologican significance of light and dark NH_4^+ metabolism in *Chlorella sorokiniana.* **Phytochemistry,** v. 47, p.177-181, 1998.

RITTMANN, B. E. Opportunities for renewable bioenergy using microorganisms. **Biotechnology Bioengineering**, v. 100, p. 203-212, 2008.

SANT'ANNA, C. L. et al. **Manual ilustrado para identificação e contagem de cianobactérias planctônicas de águas continentais brasileiras**. Rio de Janeiro: Interciência, 2006. 58 p.

SOMMER, U. Comparison between steady state and non-steady state competition: Experiments with natural phytoplankton. **Limnology and Oceanography**, v. 30, p.335-346, 1985.

STEIN, J.R. **Handbook of phycological methods:** culture methods and growth measurements. Cambridge: Cambridge University, 1973, 472 p.

SU, C. H. et al. Factors affecting lipid accumulation by *Nannochloropsis oculata* in a two-stage cultivation process. **Journal of Applied Phycoly**, v. 23, p.903–908, 2011.

SYDNEY, E. B. Screening of microalgae with potential for biodiesel production and nutrient removal from treated domestic sewage. **Applied Energy**, v. 88, p.3291-3294, 2011.

TAN, C. K.; JOHNS, M. R. Fatty acid production by heterotrophic *Chlorella saccharophila*. Hydrobiologia, v. 215, p. 13-19, 1991.

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

UTERMÖHL, H. Zur Vervollkomnung der quantitativen phytoplankton methodik. **Internationale Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie Mitteilungen**, v. 9, p. 1-38, 1958.

VALDERRAMA, L. T.; DEL CAMPO, C. M.; RODRIGUEZ, C. M.; BASHAN, L. E.; BASHAN, Y. Treatment of recalcitrant wastewater from ethanol and citric acid production using the microalga *Chlorella vulgaris* and the macrophyte *Lemna minuscule.* **Water Research**, v. 36, p. 4185-4192, 2002.

XIONG, W. et al. High-density fermentation of microalga *Chlorella protothecoides* in bioreactor for microbio-diesel production. Applied Microbiology and Biotechnoly, v.78, p. 29–36, 2008.

YOO, C. et al. Selection of microalgae for lipid production under high levels carbon dioxide. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 571-574, 2010.

WANG, B. et al. CO_2 bio-mitigation using microalgae. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 79, p.707–718, 2008.

WANG, L.; LI, Y.; CHEN, P.; ZHU, J.; RUAN, R. R. Anaerobic digested dairy manure as a nutrient supplement for cultivation of oil-rich green microalgae Chlorella sp. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 2623-2628, 2010.

WOERTZ, I. et al. Algae grown on dairy and municipal wastewater for simultaneous nutrient removal and lipid production for biofuel feedstock. **Journal of Environmental Engineering**, v. 135, p. 1115-1122, 2009.

ZWIETERING, M. H. et al. Modeling of the bacterial growth curve. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, p. 1875-1881, 1990.

ZHENG, Y. et al. High-density fed-batch culture of a thermotolerant microalga *Chlorella sorokiniana* for biofuel production. **Applied Energy**, v. 108, p. 281–287, 2013.