



UNIVERSIDADE
ESTADUAL de LONDRINA

HELDER RODRIGUES DA SILVA

**PRODUÇÃO DE MICROALGA *Neochloris oleoabundans*
EM DIFERENTES SISTEMAS DE CULTIVO**

Londrina
2016

HELDER RODRIGUES DA SILVA

**PRODUÇÃO DE MICROALGA *Neochloris oleoabundans* EM
DIFERENTES SISTEMAS DE CULTIVO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Doutor em Agronomia.

Orientador: Prof. Dr. Cássio Egídio Cavenaghi Prete.

Coorientadora: Dra. Diva Souza Andrade.

Londrina
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Silva, Helder Rodrigues.

Produção de microalga *Neochloris oleoabundans* em diferentes sistemas de cultivo / Helder Rodrigues Silva. - Londrina, 2016.
112 f. : il.

Orientador: Dr. Cássio Egídio Cavenaghi Prete.

Coorientador: Dra. Diva Souza Andrade.

Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2016.
Inclui bibliografia.

1. Microalga - Teses. 2. Sistemas de Cultivo - Teses. 3. Fotobiorreator - Teses. 4. Métodos de Colheita - Teses. I. Prete, Dr. Cássio Egídio Cavenaghi . II. Andrade, Dra. Diva Souza. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. IV. Título.

HELDER RODRIGUES DA SILVA

**PRODUÇÃO DE MICROALGA *Neochloris oleoabundans*
EM DIFERENTES SISTEMAS DE CULTIVO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Doutor em Agronomia.

Aprovada em: 28 de abril de 2016

BANCA EXAMINADORA

Dra. Diva de Souza Andrade	Instituto Agronômico do Paraná
Prof. Dr. Adônis Moreira	Universidade Estadual de Londrina
Dr. Antônio Costa	Instituto Agronômico do Paraná
Prof. Dr. Ricardo Tadeu de Faria	Universidade Estadual de Londrina
Dr. Mateus Carvalho Basílio de Azevedo	Instituto Agronômico do Paraná
Dra. Michele Regina Lopes da Silva	Instituto Agronômico do Paraná
Prof. Dr. Claudemir Zucareli	Universidade Estadual de Londrina

Prof. Dr. Cássio Egídio Cavenaghi Prete
Orientador
Universidade Estadual de Londrina – UEL

DEDICO

À minha família.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo fortalecimento diário e pelas bênçãos em minha vida.

Aos meus pais, Mauricio e Madalena, e à minha avó Adileta, que dignamente me apresentaram a importância da família e o caminho da persistência e honestidade. À minha irmã Gisele. Ao meu filho, João Lucas, e à minha esposa, Raquel, pelo carinho, amor, amizade, apoio e compreensão.

À Universidade Estadual de Londrina - UEL, pelas oportunidades.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo.

Ao Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR), pela utilização da estrutura e pelo apoio financeiro na condução da parte experimental.

Ao meu orientador, Prof^o. Dr. Cássio Egídio Cavenaghi Prete, pela orientação, apoio, dedicação, amizade, paciência e valiosos ensinamentos que contribuíram para minha formação profissional e pessoal.

À minha co-orientadora, Dra. Diva Souza Andrade, pela orientação, pelos ensinamentos que contribuíram para minha formação profissional e pessoal, paciência, apoio, dedicação, mas, sobretudo por sua amizade.

Aos professores do Programa de Pós Graduação em Agronomia-PPGA- UEL, pelos conhecimentos e dedicação. Aos funcionários da Pós Graduação em Agronomia- PPGA-UEL, em especial, à Weda A. Westin e Uri A. Carneiro.

Aos integrantes da banca examinadora da Tese: Dr. Adônis Moreira, Dr. Mateus Carvalho Basílio de Azevedo, Dr. Ricardo Tadeu de Faria, Dr. Antônio Costa, e aos suplentes, Dra. Michele Regina Lopes da Silva, Dr. Claudemir Zucareli.

Aos colaboradores, técnicos e funcionários do Instituto Agrônomo do Paraná- IAPAR, ao Laboratório de Microbiologia do Solo - IAPAR, ao Laboratório de Solos- IAPAR, ao Laboratório de Fisiologia Vegetal - IAPAR e ao Laboratório de Microalgas- IAPAR pela colaboração.

Aos amigos José Leonardo Bruno, Freddy Zambrano Gavilanes, Antônio Candido Rosa, Jonathan Baum, Ms. Maria Aparecida Matos, Rafael Bruno Guayato Nomura, Guilherme Bruno, Ms. Ulisses Zonta, Victor Mello, Leticia Alano

Bertoldo, Ms. Giseli Milani Lovato, Francine Triana, Allisson Sanzovo, Ms. Kelly Góes, Tamires Quenupa, Dra. Maria Brígida dos Santos Scholz, Maria Isabel Florentino Ferreira pela amizade, atenção e disponibilidade em me ajudar sempre que necessário.

A todos amigos, colegas, familiares, professores, estudantes e funcionários, que tenham auxiliado de alguma forma na realização deste trabalho, para que houvesse êxito e cumprisse mais uma etapa em minha vida.

A todos, o meu muito Obrigado !

*Dos sonhos e ideais nascem novos
projetos e para concretizá-los ultrapassamos nossos limites*

SILVA, Helder Rodrigues. **Produção de microalga *Neochloris oleoabundans* em diferentes sistemas de cultivo**. 2016. 112. Tese de Doutorado em Agronomia – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

RESUMO

As microalgas representam um grupo bastante heterogêneo de microrganismos fotossintetizantes que apresentam ampla versatilidade metabólica, cuja biomassa contém múltiplos produtos de interesse biotecnológico, tais como; lipídios, proteínas e pigmentos. A forma de nutrição em meio de cultivo é uma possibilidade para melhorar a produtividade, sendo que a nutrição mixotrófica se apresenta como uma das alternativas. O objetivo deste trabalho foi cultivar a microalga *Neochloris oleoabundans* de forma autotrófica e mixotrófica em sistemas abertos e fechados para obtenção de produtos biotecnológicos. Os experimentos foram realizados no Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR) e na Universidade Estadual de Londrina (UEL). A estirpe de microalga utilizada foi a *Neochloris oleoabundans*. Os meios de cultura utilizados foram o BBM- *Bold Basal Medium* e o MH- meio hidropônico, ambos suplementados com extrato de levedura, estimulando a nutrição mixotrófica. Para o cultivo em maior escala foi utilizado fotobiorreatores tubulares construídos em polietileno de baixa densidade e tanques abertos. A colheita da microalga em meio de cultivo foi realizada por centrifugação e floculação, com posterior retirada de sobrenadante e obtenção da biomassa úmida, que foi seca em estufa ou liofilizada. Foram analisadas a produtividade e as características bioquímicas da biomassa produzida, avaliando a contagem celular, densidade óptica, pH, determinação da biomassa seca, teor de lipídios, proteínas, clorofila *a* e *b*, carotenoides totais e análise das características físico- química dos lipídios totais por ressonância magnética nuclear RMN de ^1H . As análises dos resultados foram realizadas pela metodologia de superfície de resposta, ANOVA, teste F e Tukey 5%. A produtividade de biomassa, teor de lipídios, teor de proteínas, clorofila *a*, *b* e carotenoide total da microalga *N. oleoabundans* foram influenciados pelos fatores abióticos em meio de cultivo, etapas de colheita e secagem da biomassa. Houve variações na produção de biomassa seca g L^{-1} de 0,05 a 5,0 g L^{-1} , no teor de lipídios foi de 4 a 35%, no teor de proteínas de 22 a 40%, nos teores de clorofila *a* foram de 0,15 a 26 mg L^{-1} , carotenoides totais de 0,2 a 8,7 mg L^{-1} . Na caracterização dos lipídios totais extraídos de *N. oleoabundans*, existe semelhança quando comparado com óleo de soja bruto. A otimização do meio de cultivo é uma estratégia para aumentar a produtividade de *N. oleoabundans*. A biomassa de *Neochloris oleoabundans* possui composição diversificada que pode ter diversas aplicações biotecnológicas desde biocombustíveis ao uso como biofertilizante ou bioestimulante na agricultura.

Palavras-chave: Microalga. Sistemas de Cultivo. Fotobiorreator. Métodos de Colheita.

SILVA, Helder Rodrigues. **Production of microalgae *Neochloris oleoabundans* in different culture systems**. 2016. 112. Doctoral Thesis in Agronomy – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

ABSTRACT

Microalgae are a very heterogeneous group of photosynthetic microorganisms that have wide metabolic versatility, whose biomass contains multiple products of biotechnological interest, such as; lipids, proteins and pigments. The form of nutrition in the culture medium is a possibility to improve productivity and mixotrophic nutrition is presented as an alternative. The aim of this study was to cultivate microalgae *Neochloris oleoabundans* of autotrophic and mixotrophic form in open systems and closed to obtain biotechnological products. The experiments were conducted in Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR) and on Universidade Estadual de Londrina (UEL). The microalgae strain used was *N. oleoabundans*. The culture media used were BBM- *Bold Basal Medium* and the MH- medium hydroponic, both supplemented with carbon sources, stimulating nutrition mixotrophic. For cultivation on a larger scale tubular photobioreactors used was constructed of low density polyethylene and open ponds. The harvest from the microalgae in the culture medium was carried out by centrifugation and flocculation, followed by removal of supernatant and obtaining the wet biomass, which was oven dried or lyophilized. Productivity and biochemical characteristics of the biomass produced were analyzed by evaluating the parameters cell count, optical density, pH, determination of dry biomass, lipid content, protein, chlorophyll a and b, carotenoids and analysis of chemical physical characteristics of total lipids resonance ^1H NMR nuclear magnetic. The analysis the results was performed by response surface methodology, ANOVA, F test, and Tukey 5% test. The productivity of biomass, lipid content, protein content, chlorophyll a, b and the total carotenoid from the microalgae *N. oleoabundans* was influenced by abiotic factors in the culture medium, harvesting and drying of biomass. In the experimental results, changes were observed in the production of dry biomass L^{-1} g 0.05 to 5.0 g L^{-1} in lipid content was 4 to 35%, the protein content 22 and 40%, in the chlorophyll a content were 0.15 to 26 mg L^{-1} carotenoids from 0.2 to 8.7 mg L^{-1} . In the characterization of total lipids extracted from *N. oleoabundans*, we observed some similarity when compared with crude soybean oil. The optimization of the culture medium is a strategy to increase the productivity of *N. oleoabundans*. The biomass has diversified composition with various biotechnological applications from biofuels for use as bio-fertilizer and bio-stimulant in agriculture.

Keywords: Microalgae. Cultivation Systems. Photobioreactor. Harvesting Methods.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 2.1-	Fotomicrografia óptica de células da microalga <i>N. oleoabundans</i> (UTEX LB 1185).....	17
Figura 2.2-	Forma de nutrição das microalgas, com destaque para as formas autotróficas, heterotróficas e mixotróficas.....	18
Figura 2.3-	Lagoa em pista para cultivo de microalgas.....	27
Figura 2.4-	Fotobiorreator tubular transparente para o cultivo de microalgas.	28
Figura 2.5-	Comparação de área de cultivo necessário para microalgas e plantas oleaginosas atenderem a demanda americana por petróleo.....	39
Figura 3.1-	Superfície de resposta para os resultados da análise de contagem de células em 10^7 células por mL^{-1} no 14° dia de cultivo, devido à variação do pH e NaNO_3	50
Figura 3.2-	Superfície de resposta para o teor de clorofila <i>a</i> (a) e porcentagem de clorofila <i>a</i> na biomassa (b), com doses NaNO_3 e diferentes ajustes do pH, no 14° dia de cultivo de <i>N. oleoabundans</i>	51
Figura 3.3-	Superfície de resposta para o teor de carotenoides totais ($\mu\text{g L}^{-1}$) (a) e a % de carotenoides na biomassa seca (b) da microalga <i>Neochloris oleoabundans</i> em diferentes pH e NaNO_3 no 14° dia de cultivo.	53
Figura 3.4-	Superfície de resposta para os resultados da análise de lipídios em % dos tratamentos experimentais com variação do pH e NaNO_3 no 14° dia de cultivo.....	55
Figura 3.5-	Espectros de RMN de ^1H , dos lipídios extraídos da biomassa de <i>N. oleoabundans</i> que foi cultivada com (a) $0,25 \text{ g L}^{-1}$ de NaNO_3 (Amostra 1) e (b) $2,5 \text{ g L}^{-1}$ de NaNO_3 (Amostra 2) em pH 9,0.....	56
Figura 4.1-	(a) Cultivo da microalga <i>Neochloris oleoabundans</i> para produção do inoculo inicial, (b) Tanques abertos para cultivo de microalgas em formato de raceway.	67
Figura 4.2-	Produção de biomassa seca em g L^{-1} da microalga <i>Neochloris oleoabundans</i> em tanques abertos com capacidade de 1.500 L (a) e 3.000 L (b) durante 9 dias.	70
Figura 4.3-	Densidade óptica de microalga <i>Neochloris oleoabundans</i> em meio de cultivo em tanques abertos com capacidade de 1.500 L (a) e 3.000 L (b).	71

Figura 4.4-	Correlação entre biomassa seca em g L^{-1} e a densidade óptica em 670 nm do cultivo da microalga <i>Neochloris oleoabundans</i> em tanques abertos com capacidade de 1.500 L (a) e 3.000L (b).	72
Figura 4.5-	Eficiência da colheita em % de acordo com os tratamentos centrifugação, floculação com Flonex, Tanfloc, amido de mandioca catiônico (A.M.C) e indução alcalina (pH induzido), CV%= 1,28.	73
Figura 5.1-	Superfície de resposta para variável resposta biomassa seca (g L^{-1}) da microalga <i>N. oleoabundans</i> (UTEX LB1185) no 5º (a), 10º (b) e 15º (c) dia de cultivo, em função das variáveis concentrações de extrato de levedura (g L^{-1}) e diluição do meio BBM %.	90
Figura 5.2-	Superfície de resposta para variável resposta densidade óptica em absorbância em 670 nm, da microalga <i>N. oleoabundans</i> (UTEX LB1185) no 15º dia de cultivo, em função das variáveis concentrações de extrato de levedura (g L^{-1}) e diluição do meio BBM %.	91
Figura 5.3-	Fotomicrografia óptica das células da microalga <i>Neochloris oleoabundans</i> , com 15 dias de cultivo em meio BBM suplementado com extrato de levedura a 11 g L^{-1} , utilizando um microscópio óptico marca ZEISS modelo AX10 na objetiva de 100X.	92
Figura 5.4-	Frascos contendo o cultivo de <i>N. oleoabundans</i> em meio BBM 100% por 15 dias, (a) sem adição de extrato de levedura e (b) com a suplementação de 11 g L^{-1} de extrato de levedura.	93
Figura 5.5-	Espectro de RMN de ^1H dos lipídios totais, extraídos da biomassa da microalga <i>Neochloris oleoabundans</i> cultivada em condições mixotróficas, por 15 dias em meio de cultivo BBM otimizado com $11,0 \text{ g L}^{-1}$ de extrato de levedura.	96

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 -	Comparação da produção de óleo por microalgas com cultivos de plantas oleaginosas.....	38
Tabela 3.1-	Densidade óptica em absorbância da microalga <i>N. oleoabundans</i> no 14º dia, em meio de cultivo <i>Bold Basal Medium</i> (BBM) com a variação do pH e NaNO ₃	47
Tabela 3.2-	Biomassa seca em mg L ⁻¹ da microalga <i>N. oleoabundans</i> no 14º dia, em meio de cultivo BBM com a variação do pH e NaNO ₃	49
Tabela 3.3-	Análise físico- química dos lipídios extraídos da biomassa de <i>N. oleoabundans</i> que foi cultivada com 0,25 g L ⁻¹ de NaNO ₃ (Amostra 1) e 2,5 g L ⁻¹ de NaNO ₃ (Amostra 2) em pH 9,0 e do óleo de soja bruto.	57
Tabela 4.1-	Porcentagem de lipídios da biomassa liofilizada, seca em estufa e úmida, de acordo com os métodos de colheita.	74
Tabela 4.2-	Composição química de macro e micronutrientes da biomassa seca da microalga <i>Neochloris oleoabundans</i> cultivada em sistema aberto.....	76
Tabela 5.1-	Níveis codificados e reais das variáveis independentes, concentração de extrato de levedura (X1) e a diluição do meio BBM % (X2).....	85
Tabela 5.2-	Quadro de ensaios do esquema em arranjo fatorial completo para duas variáveis independentes, concentração de extrato de levedura (X1) e diluição do meio BBM % (X2).....	86
Tabela 5.3-	Porcentagem de lipídios, N total e proteína total na biomassa seca, contagem de células (cel. mL ⁻¹), produção de biomassa seca (g L ⁻¹) e densidade óptica a 670 nm, teor de clorofila <i>a</i> , <i>b</i> e carotenoides totais em mg L ⁻¹ , no 15º dia de cultivo, com 11 g L ⁻¹ de extrato de levedura e BBM a 100%.	94
Tabela 5.4-	Análise físico- química dos lipídios totais extraídos da biomassa de <i>N. oleoabundans</i> produzida em cultivo suplementado com 11,0 g L ⁻¹ de extrato de levedura e BBM a 100%, comparados ao óleo de soja bruto.	96
Tabela 6.1-	Estimativa da produção em kg ha ⁻¹ de biomassa, óleo e proteína da microalga <i>N. oleoabundans</i> simulando o cultivo em tanque com profundidade de 0,4 m e a soja.	102

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1	MICROALGAS	15
2.2	CARACTERÍSTICAS DA ESPÉCIE <i>NEOCHLORIS OLEOABUNDANS</i>	17
2.3	FORMAS DE NUTRIÇÃO DE MICROALGAS	18
2.4	FATORES ABIÓTICOS QUE INFLUENCIAM NO CRESCIMENTO DAS MICROALGAS	20
2.4.1.1	Meio de Cultura	21
2.4.1.2	pH do meio de cultivo	22
2.4.1.3	Luminosidade	23
2.4.1.4	Temperatura	24
2.4.1.5	Agitação e aeração do cultivo	25
2.5	SISTEMAS DE CULTIVO DE MICROALGAS	25
2.5.1	Sistemas Abertos de Cultivo	26
2.5.2	Sistemas Fechados	27
2.5.3	Sistemas Híbridos de Cultivos de Microalgas	28
2.6	COLHEITA DAS MICROALGAS	29
2.7	PRINCIPAIS PRODUTOS E AS APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS DA BIOMASSA DE MICROALGAS	31
2.7.1	Pigmentos fotossintéticos	32
2.7.2	Proteínas e carboidratos	33
2.7.3	Lipídios na biomassa de microalgas	34
2.7.4	Bioestimulantes e biofertilizantes para agricultura	36
2.8	MICROALGAS E PLANTAS OLEAGINOSAS.....	37
3	ARTIGO A: NITRATO DE SÓDIO E pH NAS CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS E PRODUÇÃO DE BIOMASSA DA MICROALGA <i>Neochloris oleoabundans</i>	41
3.1	RESUMO	41
3.2	ABSTRACT	42
3.3	INTRODUÇÃO.....	43
3.4	MATERIAL E MÉTODOS.....	44
3.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47

3.6	CONCLUSÕES	58
3.7	REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS	59
4	ARTIGO B: MÉTODO DE COLHEITA E SECAGEM DA BIOMASSA DA MICROALGA <i>Neochloris oleoabundans</i> CULTIVADA EM TANQUES ABERTOS.....	63
4.1	RESUMO.....	63
4.2	ABSTRACT	64
4.3	INTRODUÇÃO.....	65
4.4	MATERIAL E MÉTODOS	67
4.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	70
4.6	CONCLUSÕES	77
4.7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78
5	ARTIGO C: OTIMIZAÇÃO DO MEIO DE CULTIVO MIXOTRÓFICO PARA PRODUÇÃO DE LIPÍDIOS, PROTEÍNAS E BIOMASSA DA <i>Neochloris oleoabundans</i>.....	81
5.1	RESUMO.....	81
5.2	ABSTRACT	82
5.3	INTRODUÇÃO.....	83
5.4	MATERIAL E MÉTODOS	85
5.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	89
5.6	CONCLUSÕES	97
5.7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	98
6	ANÁLISE COMPARATIVA DA PRODUTIVIDADE DE BIOMASSA, ÓLEO E PROTEÍNA DE <i>N. oleoabundans</i> COM A SOJA	101
7	CONCLUSÕES GERAIS	103
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	104

1 INTRODUÇÃO

Microalgas compreendem um grupo polifilético de microrganismos fotossintetizantes, composto por organismos eucariotos e procariotos, que possuem a capacidade de fixação de CO₂, o que resulta na geração de vários componentes em suas células, além de energia e oxigênio.

A biomassa de microalgas tem sido evidenciada em pesquisas científicas, principalmente pela produção de metabólitos, que podem ter diversas aplicações biotecnológicas, como matéria prima em diversas aplicações industriais: desde alimentação de peixes, alimentação humana, compostos nutracêuticos, indústria farmacêutica e biocombustíveis, principalmente biocombustíveis líquidos (como biodiesel e bioetanol). A crescente demanda por combustíveis, aliada a oscilações na cotação do petróleo e aos impactos ambientais gerados ao planeta nos últimos anos, tem intensificado a pesquisa por fontes alternativas de energia.

Atualmente, o homem explora em grandes proporções as fontes convencionais de energia, principalmente fundamentadas em fontes não renováveis, como os combustíveis fósseis, cujo esgotamento é previsível. As pesquisas têm buscado a produção de biocombustíveis sólidos, líquidos e gasosos, principalmente de segunda e terceira geração, como os oriundos de materiais lignocelulósicos, e a partir de microrganismos, como as microalgas, que possam substituir os derivados de petróleo, com intensa preocupação ambiental.

Os principais biocombustíveis líquidos produzidos são: bioetanol e biodiesel. O biodiesel é uma alternativa energética que pode substituir o óleo diesel, usado em motores diesel e ou estacionários. Vários óleos vegetais já foram testados na produção do biodiesel, tais como: canola, soja, pinhão-mansão, milho, girassol, mamona e algodão, entre outros, e cada um confere características específicas aos biocombustíveis. Entretanto, a matéria-prima principal predominante no Brasil é a soja. De acordo com este cenário, tornam-se de grande importância as pesquisas para obtenção de matérias primas oleaginosas, proteicas e com alto potencial para aplicações biotecnológicas, como as microalgas. Neste contexto, o objetivo desta pesquisa foi cultivar a microalga *Neochloris oleoabundans* de forma autotrófica e mixotrófica em sistemas abertos e fechados para obtenção de produtos biotecnológicos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 MICROALGAS

Os termos microalgas (algas com dimensões microscópicas) e macroalgas (com dimensões macroscópicas) designam organismos unicelulares e multicelulares, com hábitos planctônicos e bentônicos, porém, muito distantes entre si quanto à origem, composição química e morfologia (LOURENÇO, 2006).

As microalgas e macroalgas integram um universo de microrganismos fotossintetizantes aquático-terrestre ou marinho, geneticamente subdivido em eucarióticos (unicelulares, às vezes formando agregados maiores e pluricelulares) as eubactérias e arqueobactérias (procarióticas) (LOURENÇO, 2006; CHACÓN-LEE; GONZÁLEZ-MARIÑO, 2010).

O termo microalgas está dividido em dois grupos distintos, consoante a sua estrutura celular que inclui organismos com estrutura celular procariótica, com representantes nas divisões Cyanophyta (cianobactérias) e Prochlorophyta, com estrutura celular eucariótica, com representantes nas divisões Chlorophyta, Euglenophyta, Rhodophyta, Haptophyta (Prymnesiophyta) Heterokontophyta (Bacillariophyceae, Chrysophyceae, Xanthophyceae etc.), Cryptophyta e Dinophyta (HOEK, C., 1995; DERNER et al., 2006).

São consideradas um dos organismos mais antigos da Terra, existindo há aproximadamente 3,5 bilhões de anos e reconhecidas como os organismos que deram origem a todos os outros vegetais existentes e, possivelmente, foram as responsáveis pela produção e pelo acúmulo de O₂ na atmosfera primitiva, desempenhando, ainda hoje, papel importante na manutenção dos níveis desse gás (RAVEN, 2001).

Para a classificação das microalgas, são realizados uma série de fatores para descrição taxonômica. Os pigmentos fotossintéticos e as características presentes nas células de microalgas, como a natureza química dos produtos de reserva, a composição e estrutura da parede celular, a morfologia das organelas, a presença ou ausência de flagelos e a forma de divisão celular, apresentam um papel importante (HOEK, 1995). Dos organismos fotossintetizantes, as microalgas são

mais eficientes no uso do CO₂ do que as plantas superiores, podendo fixar grandes quantidades de CO₂ por unidade de área de terra (BROWN; ZEILER, 1993).

Estudos mostram que podem existir mais de 200.000 representantes incluídos no termo microalgas, mas o número total de espécies ainda é desconhecido. Essa diversidade também se reflete na composição bioquímica e, desta forma, as microalgas são fontes de vários produtos biotecnológicos (CHEN; SUTTLE, 1995; HÖFLE et al., 1999; EKPENYONG, 2000; GARCIA-PICHEL et al., 2001; DANG; LOVELL, 2002; BADGER; PRICE, 2003; BARSANTI; GUALTIERI, 2006; DEL CAMPO et al., 2007; CARON et al., 2009).

Comercialmente, são utilizadas várias espécies de microalgas para produção de biomassa, que pode ser utilizada como matéria prima na indústria alimentícia (SPOLAORE et al., 2006). Este mercado é bem desenvolvido em países como França, Estados Unidos, China e Tailândia, utilizando-a na produção de massas, pães, iogurtes e bebidas (PULZ; GROSS, 2004).

O uso de microalgas na alimentação humana remonta a tempos longínquos: onde antigas tribos africanas do Chade e índios Aztecas utilizavam sua biomassa para consumo como fonte de proteínas (DERNER et al., 2006). No entanto, a primeira comercialização de microalgas como fonte nutricional, realizou-se somente em 1960 no Japão (BOROWITZKA, 1999).

Devido ao alto teor de proteínas na biomassa (chegando próximo a 60 %) a microalga *Spirulina sp.* foi introduzida no mercado americano e em outros países. Atualmente, o comércio de produtos, gerados a base de biomassa de microalgas sofreu uma vasta expansão, de tal modo que, países como Brasil, Tailândia, França, México e Israel tornaram-se produtores de biomassa de microalgas (BOROWITZKA, 1999; GRIMA et al., 2003; RICHMOND, 2004; DERNER et al., 2006; SPOLAORE et al., 2006; AMBROSI et al., 2008).

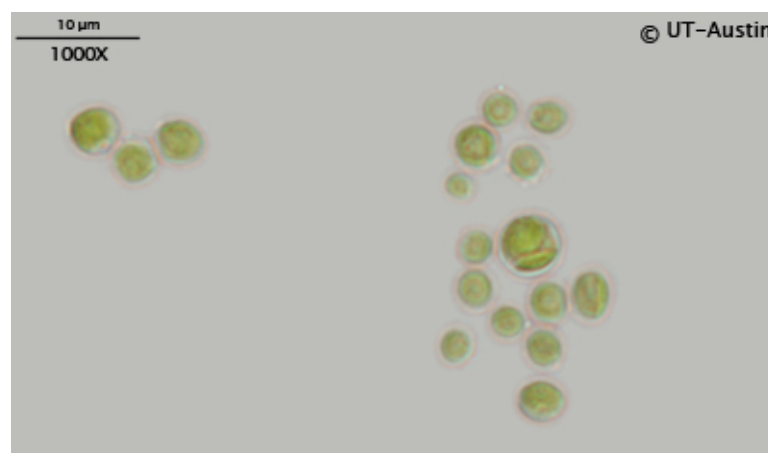
A biomassa das microalgas vem se destacando como uma promissora matéria prima para produção de biocombustíveis líquidos, principalmente o biodiesel e o bioquerosene (BROWN; ZEILER, 1993; XU et al., 2006; SCHENK et al., 2008; LEE et al., 2009; WANG et al., 2014; YOON et al., 2015; TANG et al., 2016). Esta proposta foi destacada pela primeira vez na década de 1940; e, em 1990 uma extensa pesquisa sobre este assunto foi desenvolvida nos Estados Unidos (SHEEHAN et al., 1998).

A biomassa de microalgas é evidenciada como uma fonte alternativa de lípidios e carboidratos obtidos por meio de culturas de plantas, tanto para a fabricação de biodiesel como para produção de bioetanol. Uma das vantagens da produção de biocombustíveis obtida através do cultivo de microalgas está associada à menor utilização de área para produzir uma quantidade equivalente ou maior de biocombustível, bem como a possibilidade e o aproveitamento de água salina para o cultivo (BROWN; ZEILER, 1993; FON SING et al., 2011).

2.2 CARACTERÍSTICAS DA ESPÉCIE *NEOCHLORIS OLEOABUNDANS*

A Chlorophyta *Neochloris oleoabundans* (syn. *Ettlia oleoabundans*) (sphaeropleales, Neochloridaceae) UTEX # 1185, foi isolada na Arábia Saudita, sendo considerada um microrganismo halotolerante (Figura 2.2). Portanto, esta clorofita possui uma alta tolerância à alcalinidade e à salinidade, sendo uma microalga oleaginosa que produz alto teor de lípidios em sua biomassa, mesmo sob condições mixotróficas de crescimento (GOUVEIA; OLIVEIRA, 2009; BALDISSEROTTO et al., 2014).

Figura 2.1- Fotomicrografia óptica de células da microalga *N. oleoabundans* (UTEX LB 1185).



Fonte: UTEX. <http://web.biosci.utexas.edu/utex/algaeDetail.aspx?algaeID=3623>

Dentre as microalgas ricas em lipídios destinadas à produção de biocombustíveis, a *Neochloris oleoabundans* ganhou atenção considerável desde os anos 1980, quando os primeiros estudos mostraram sua capacidade de acumular de

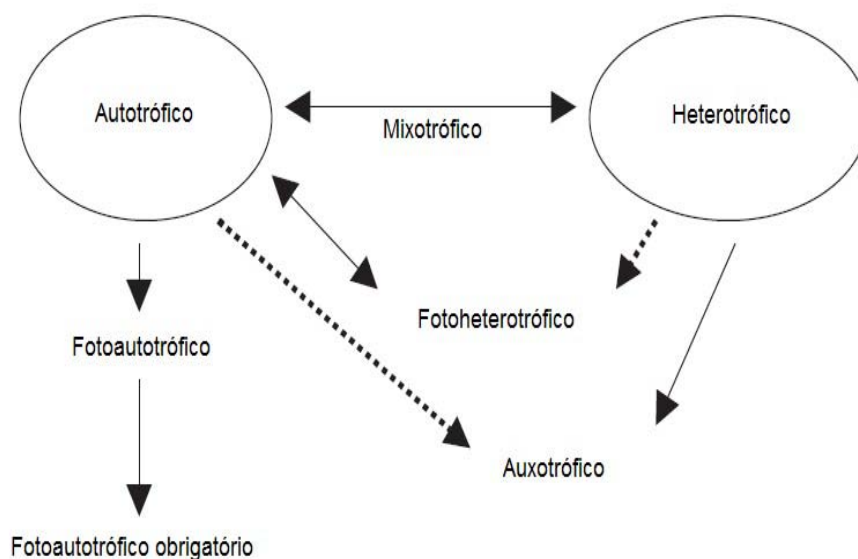
35 a 54% de lipídios, contendo até 80% em triacilglicerol (tags), quando cultivada em meio deficiente de nitrogênio (TORNABENE et al., 1983).

2.3 FORMAS DE NUTRIÇÃO DE MICROALGAS

Microalgas integram um grupo diversificado de microrganismos que possui ampla versatilidade metabólica. As formas de nutrição em cultivos podem variar de acordo com a espécie utilizada, destacando-se as espécies fotoautotróficas, heterotróficas e mixotróficas (SFORZA et al., 2010; MORALES-SANCHEZ et al., 2013; VENKATA SUBHASH et al., 2014).

De acordo com Richmond (2004), os organismos autotróficos obtêm energia pela absorção da luz e redução de CO₂ por oxidação do substrato, principalmente água, com a liberação de O₂. Organismos fotoautotróficos exigem apenas íons minerais inorgânicos, enquanto os fotoautótrofos obrigatórios são aqueles que não podem crescer no escuro. A maioria das microalgas pertence a estas categorias, embora muitas requeiram mínimas quantidades de vitaminas para o crescimento (Figura 2.3).

Figura 2.2- Forma de nutrição das microalgas, com destaque para as formas autotróficas, heterotróficas e mixotróficas.



Fonte: Adaptado de Richmond (2004).

O crescimento fotoautotrófico em cultivo de microalgas necessita principalmente de uma fonte de luz, que pode ser originada do sol ou de lâmpadas, e de CO₂. Comercialmente, este sistema de nutrição de microalgas é muito utilizado com aproveitamento da luz solar em tanques (raceway) (SPOLAORE et al., 2006; CHISTI, 2007; SIRISANSANEEYAKUL et al., 2011) ou em fotobiorreatores (CHISTI, 2007; GRIMA et al., 2009). Uma das vantagens do cultivo em fotobiorreatores é a menor taxa de contaminação, o que pode resultar em aumento da produtividade (RICHMOND, 2004; CHISTI, 2007).

No sistema de nutrição heterotrófico, os microrganismos utilizam compostos orgânicos produzidos por outros organismos para obter sua energia. Várias espécies de microalgas podem ser cultivadas exclusivamente em substratos orgânicos e esta opção tornou-se viável em sistemas de produção em biorreatores fechados para produção de biomassa e biocompostos (RICHMOND, 2004).

Organismos fotoheterotróficos necessitam de luz como fonte de energia para usar compostos orgânicos como nutrientes. Os compostos orgânicos também podem satisfazer as necessidades de energia das microalgas. Na auxotrofia as algas exigem apenas pequenas quantidades de compostos orgânicos, tais como vitaminas e aminoácidos (RICHMOND, 2004).

O crescimento mixotrófico é equivalente às formas de nutrição, à autotrofia e à heterotrofia simultaneamente, sendo os compostos orgânicos e o CO₂ necessários para o crescimento (RICHMOND, 2004). Nesta forma de nutrição, o C inorgânico oriundo do CO₂ é fixado por meio da fotossíntese, que é influenciada por condições de iluminação; enquanto os compostos orgânicos são assimilados através da respiração aeróbia, que é influenciado pela disponibilidade de carbono orgânico (HU et al., 2012).

Uma das vantagens do cultivo mixotrófico está relacionada à não dependência estritamente da fotossíntese. A luz não é um fator limitante absoluto para o crescimento de microalgas, uma vez que os compostos orgânicos podem ser utilizados para o crescimento de microalgas; portanto, a fotoinibição pode ser reduzida em culturas mixotróficas quando os níveis de iluminação estão baixos ou altos (ANDRADE; COSTA, 2007; ACIÉN FERNÁNDEZ et al., 2013).

O cultivo mixotrófico pode incrementar a taxa de crescimento, diminuir o ciclo de crescimento, reduzir a perda de biomassa em momentos sem

iluminação, pois a respiração celular pode aumentar a produtividade da biomassa. Além disso, o CO₂, liberado pelas microalgas através da respiração aeróbica, pode ser reutilizado para a fotossíntese em meio de cultivo, o que aumenta a produtividade de biomassa e lipídios quando comparado com as formas heterotróficas (ANDRADE; COSTA, 2007; PARK et al., 2012). A nutrição mixotrófica pode também influenciar na redução de custos de produção de biomassa lipídica, um fator extremamente benéfico para a produção de biodiesel de microalgas em grande escala (WANG et al., 2014).

2.4 FATORES ABIÓTICOS QUE INFLUENCIAM NO CRESCIMENTO DAS MICROALGAS

As microalgas possuem a capacidade adaptativa de modificar sua composição bioquímica e ajustar seu metabolismo e morfologia em resposta às condições ambientais (LEONARDI et al., 2011). Por exemplo, quando um cultivo é exposto a condições de estresse tais como alta intensidade de luz ou falta de nutrientes, uma das respostas na composição bioquímica das células pode ser a maior acumulação lipídios (MATA et al., 2010; POPOVICH et al., 2012).

Os fatores abióticos tais como o fotoperíodo, a temperatura, a velocidade de homogeneização do cultivo, o pH e a concentração inicial de nutrientes, têm sido descritos como as principais variáveis que influenciam o crescimento de microalgas (LEE, 2001; HARUN et al., 2010; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ et al., 2011).

Em ambiente natural ou em sistemas de produção de cultivos de microalgas, o crescimento de uma população é o resultado da interação entre fatores biológicos, químicos e físicos. Os fatores biológicos estão relacionados às taxas metabólicas da espécie cultivada, bem como a possível influência de organismos contaminantes. Quanto aos fatores físico-químicos que interferem no crescimento das microalgas são principalmente reportados estudos sobre pH, luz, temperatura, salinidade e disponibilidade de nutrientes (RICHMOND, 2004; RICHERT et al., 2005; MIAO; WU, 2007).

2.4.1.1 Meio de Cultura

Meios de cultura resultam da associação qualitativa e quantitativa de substâncias que fornecem os nutrientes necessários ao desenvolvimento do cultivo de microrganismos fora do seu meio natural. Esse meio deve suprir todas as necessidades nutritivas do microrganismo para a síntese do material celular e a produção de metabólitos de interesse industrial (COSTA; BARBOZA; MIYAZAWA; et al., 2014). Os meios de cultivo são fontes dos elementos constituintes dos organismos em cultivo, os quais são estimulados a crescer exatamente pelo oferecimento dos componentes presentes nos meios, podendo ser definido como o ambiente específico e finito que contém os nutrientes e elementos necessários para o desenvolvimento de vegetais, animais e microrganismos em cultivo (LOURENÇO, 2006).

O meio de cultivo influencia diretamente no crescimento celular, bem como na composição bioquímica da estirpe cultivada. Os elementos nutritivos mais importantes são (C), (N), (PO₄), (Mg), (K) e (Ca). Entretanto (Mn) e (Co) favorecem suas atividades vitais e as fontes de carbono podem ser utilizadas para favorecer o crescimento (RICHMOND, 2004).

Para alcançar o pleno desenvolvimento de um processo biotecnológico, devem-se cultivar células microbianas em meios de cultivo sintéticos (quimicamente definidos) e meios complexos. Normalmente, os meios sintéticos são utilizados em trabalhos experimentais em laboratório ou para o crescimento de seres autotróficos, já os meios complexos são aqueles que apresentam algum componente com composição variável, como extrato de leveduras, carne, plantas ou produtos da digestão proteica ou peptonas (TORTORA et al., 2006; COSTA; BARBOZA; MIYAZAWA; et al., 2014).

A fonte de (C) que contribui para o crescimento fotossintético e autotrófico das microalgas é o dióxido de carbono. No ar atmosférico somente 0,03% é CO₂. Desta forma, se faz necessária à adição de CO₂ em alguns sistemas de cultivo (LOURENÇO, 2006). Zeng et al. (2011) verificaram que a ação do homem é responsável pelo aumento da emissão de gases que provocam o efeito estufa e a fixação de gás carbônico pelo cultivo de microalgas é um dos métodos mais promissores para a redução desses gases.

A composição nutricional do meio de cultivo depende do microrganismo que está sendo cultivado, pois cada um possui vias metabólicas específicas para obtenção de energia e a produção de metabólitos. Portanto, a variedade de espécies e cepas e a diversidade de tipos de microrganismos podem determinar especificidades com relação às necessidades nutricionais (COSTA; BARBOZA; MIYAZAWA; et al., 2014).

2.4.1.2 pH do meio de cultivo

O pH é o principal fator na produção de microalgas e seu controle é essencial para que os componentes do meio de cultivo sejam absorvidos, influenciando a disponibilidade de vários elementos químicos. Determina a solubilidade de dióxido de carbono e minerais no meio e influencia direta ou indiretamente o metabolismo das algas (COSTA; BARBOZA; MIYAZAWA; et al., 2014).

O desenvolvimento de tecnologias sustentáveis para o cultivo em fotobiorreatores em escala piloto e industrial requer instrumentos de monitoramento e controle das variáveis, para apoiar o desenvolvimento de protocolos operacionais, alcançar o desempenho estável e a rastreabilidade do processo. Para isso, é necessário o conhecimento dos processos físico- químicos e biológicos da cultura (IFRIM et al., 2014).

A composição e a capacidade tamponante do meio, a quantidade de dióxido de carbono dissolvido, a temperatura e a atividade metabólica das células influenciam no pH de cultivo (BECKER et al., 1988). O aumento da densidade celular faz com que a atividade fotossintética reduza o teor de CO₂ em meio de cultivo aumentando, conseqüentemente, o pH. Esse aumento faz com que ocorra a formação de gás amônio a partir da dissociação do íon amônio que é tóxico para microalgas (COSTA; BARBOZA; MIYAZAWA; et al., 2014).

O crescimento de microalgas em cultivo envolve o consumo de CO₂ dissolvido no meio, aumentando o pH do sistema, que pode atingir níveis elevados, como 9,0 a 9,5, sendo tóxicos para muitas espécies; desta forma, são utilizados tampões nos meios de cultivo para proporcionar variações mais discretas de pH, dentro de níveis tolerados pelas espécies. Variações do pH em culturas de

microalgas também ocorrem devido ao consumo de substratos, à solubilização e à degradação de metabólitos produzidos (GRIMA et al., 1999).

Em grandes sistemas de produção de microalgas, são utilizadas outras técnicas para o controle do pH (devido ao custo do uso de tampões em grandes quantidades), como o bombeamento de ar natural ou enriquecido com CO₂. O enriquecimento com CO₂, além de auxiliar no controle do pH, contribui para estimular o crescimento de microalgas por ser fonte de carbono (LOURENÇO, 2006).

2.4.1.3 Luminosidade

De acordo com Raven et al. (2001) a faixa de aproveitamento da radiação luminosa para a fotossíntese acontece entre 400 e 700 nm. Esta faixa representa 50% da radiação solar, que proporciona intensidade de 800 a 1.000 W m² (CARIOCA; ARORA, 1984; RAVEN et al., 2001).

A produção de biomassa e a taxa de crescimento das culturas são influenciadas pela quantidade de energia luminosa recebida pelas células, que irá repercutir na quantidade de carbono fixado. A luz é essencial para o desenvolvimento das microalgas fotoautotróficas (COSTA; BARBOZA; MIYAZAWA; et al., 2014). O fotoperíodo é um fator de extrema importância em cultivos, principalmente os fotoautotróficos, pois a luz solar ou promovida por lâmpadas será fundamental para o ciclo fotossintético do microrganismo. Manter o nível de luz adequado durante todo o período do cultivo celular, ou utilizar de forma eficiente é um fator de extrema importância, expondo as células a pequenos períodos cíclicos de claro/escuro (RICHMOND, 2004).

As microalgas não fazem distinção entre luz natural e artificial, mas têm muita sensibilidade a altas intensidades luminosas, bem como a alterações do ciclo claro/escuro. A produtividade de culturas fotoautotróficas é limitada, principalmente devido ao fornecimento não homogêneo de luminosidade, o que gera uma baixa eficiência de conversão de energia no interior das culturas (GROBBELAAR, 2000; ROCHA et al., 2003).

Na parte superficial dos cultivos, a luminosidade é elevada, mas a absorção e a reflexão da luz resultam na diminuição da intensidade luminosa no

interior das culturas de modo a influenciar a produtividade. Alta intensidade de luz na parte superficial de cultivos pode causar a fotoinibição, diminuindo a eficiência fotossintética e a produção de biomassa (JANSSEN et al., 2000).

Em cultivos abertos, o sol é o fornecedor de luz para o cultivo e, no período noturno, a luz artificial adicional pode ser fornecida, a fim de obter melhor eficiência no aproveitamento dos nutrientes dentro do menor tempo; além disso, uma eficiente homogeneização do meio de cultivo é fundamental para manter as células em suspensão, em contato com a luz e com os nutrientes (SU et al., 2012). Este é um fator de grande importância nos sistemas produtivos de microalgas, pois influenciará na eficiência fotossintética da microalga em seu meio de cultivo, sendo esta a extensão e a eficácia pela qual a luz é convertida em energia química na estrutura celular, isto é, na produção, manutenção e armazenamento de produtos metabólicos (SIRISANSANEEYAKUL et al., 2011).

2.4.1.4 Temperatura

A temperatura é um fator de grande importância para todos os sistemas em cultivos de microalgas abertos ou fechados. Os efeitos deste fator sobre o cultivo de microalgas em escala laboratorial foram pesquisados por vários autores (MATA et al., 2010).

Esta variável influencia a composição, a taxa metabólica e o crescimento celular das microalgas. Cada estirpe possui uma faixa de temperatura ideal para o cultivo e o pleno desenvolvimento da cultura, em função do local em que a espécie foi isolada (COSTA; BARBOZA; MIYAZAWA; et al., 2014).

A faixa de temperatura ideal para o crescimento está situada entre 15 a 30 °C. As temperaturas mais baixas podem resultar em baixa atividade na cinética metabólica enquanto as mais elevadas podem dificultar o crescimento de microrganismo pelo estresse oxidativo (GRIMA et al., 2009). Microalgas podem suportar facilmente temperaturas de 15 °C abaixo, mas apenas de 2 a 4 °C acima de sua temperatura ideal, podendo este fator resultar na perda total da cultura. Um dos problemas que podem acontecer, principalmente em sistemas fechados, é o superaquecimento em dias quentes, quando a temperatura pode alcançar a faixa de 55 °C; nesse caso, sistemas de evaporação de água para o resfriamento poderão

ser utilizados para diminuir a temperatura para faixa de 20- 26 °C (MOHEIMANI, 2005).

2.4.1.5 Agitação e aeração do cultivo

A agitação e aeração são parâmetros de grande importância no cultivo de microalgas, responsáveis pela homogeneização e distribuição de células, calor, metabólitos e por facilitar a transferência de gases.

A aeração dos cultivos permite que as células fiquem suspensas no meio de cultivo, melhorando a eficiência de utilização da luz, favorecendo a troca de gases, impedindo a estratificação térmica, auxiliando na distribuição homogênea dos nutrientes, evitando o acúmulo de matéria orgânica no fundo do biorreator, reduzindo a foto-oxidação, fatores estes que influenciam na produtividade de biomassa (RICHMOND, 2004; COSTA; BARBOZA; MIYAZAWA; et al., 2014).

Níveis ideais de agitação e aeração devem ser investigados a fim de evitar o declínio na produtividade e favorecer a homogeneização do cultivo. Especialmente na produção em larga escala, são primordiais para promover a circulação rápida de células de microalgas do escuro para a zona de luz do biorreator. Mas altas velocidades e graus de turbulência (devido à mecânica de mistura ou bolhas de ar) em líquidos podem danificar microalgas, causando tensão e stress no cultivo (ERIKSEN, 2008).

2.5 SISTEMAS DE CULTIVO DE MICROALGAS

Os cultivos de microalgas em altas densidades e volumes começaram a ser desenvolvidos a partir de 1940, com domínio de técnicas para o isolamento e composição do meio de cultivo. Estes experimentos foram realizados de forma independente em países como Estados Unidos, Alemanha e Japão. Praticamente todos os estudos envolviam uma microalga bastante popular entre os pesquisadores, a *Chlorella*, por apresentar características rústicas e de fácil cultivo, sendo utilizados dois tipos básicos de sistemas: aberto em lagoas, e fechado, em fotobiorreatores (LOURENÇO, 2006). A maioria das microalgas cultivadas

comercialmente se desenvolve em ambientes seletivos, como alta alcalinidade, disponibilidade de nutrientes, alta salinidade (RICHMOND, 2004).

2.5.1 Sistemas Abertos de Cultivo

Os sistemas abertos de cultivo são classificados como extensas lagoas sem homogeneização, lagoas circulares com a presença de braço giratório, lagoa em pista agitada com pás giratórias e sistemas inclinados formando uma camada fina de espelho de meio de cultivo em forma de cascata. Existe uma variedade de sistemas abertos com desenhos diferentes variando em tamanho, material, tipo de construção, de agitação e inclinação, como verificado na Figura 2.4 (BOROWITZKA, 1999).

Essa forma de cultivo apresenta menores custos de construção e operação ao ser comparada com sistemas fechados de fotobiorreatores. Por essa razão, a maioria dos produtores utiliza esta forma, apesar de apresentar desvantagem quanto à contaminação por outros microrganismos no sistema.

A maioria dos sistemas abertos são homogeneizados – por exemplo com pás giratórias – pois o cultivo deve ser misturado movendo as microalgas da parte inferior do tanque para a parte superior, maximizando a quantidade de luz que as células recebem (RICHMOND, 2004).

Os sistemas de forma aberta operam em uma profundidade de 20 a 30 cm, pois a energia luminosa deve abranger toda massa celular disposta, no cultivo (CHISTI, 2007). A profundidade também pode ser uma limitação, pois se a pista ou lagoa apresentar uma deficiência de homogeneização do cultivo ou hidráulica, a superfície estará exposta a maiores intensidades luminosa, enquanto a parte inferior do cultivo não receberá a mesma intensidade luminosa, causando uma disparidade no cultivo (CHISTI, 2007).

Figura 2.3- Lagoa em pista para cultivo de microalgas.



Fonte: Ciência e Cultura. <http://cienciaecultura.bvs.br/pdf/cic/v60n2/a03v60n2.pdf>

2.5.2 Sistemas Fechados

São classificados como reatores em forma de torre, placa, tubos, sacos ou tanques de forma fechada. Construídos em vidro, tubos de Teflon transparente, ou tubos de PVC transparente, são organizados em retas paralelas ou helicoidalmente enrolados ao redor de um suporte central (TORZILLO et al., 1993).

O sistema na forma de torre consiste em cilindros verticais, geralmente construídos em acrílico ou fibra de vidro. Outro sistema bastante utilizado é composto por sacos plásticos transparentes (Figura 2.5), suportadas por estrutura de metal, podendo ser apoiados ou pendurados nessa estrutura (CHISTI, 2007).

Sistemas de fotobiorreatores fechados em forma de placas podem ser construídos com materiais que variam desde tanques de vidro e acrílico, até estruturas de metal que possuem uma camada fina de sacos plásticos ou painéis alveolares com divisórias internas (QIANG et al., 1998).

A circulação do meio de cultivo é realizada por injeção de ar por compressor. O controle de temperatura é feito por trocadores de calor ou resfriamento evaporativo por aspensão de água sobre a superfície do reator.

Alguns fotobiorreatores foram construídos em estufa, para controle de temperatura. Um dos primeiros grandes fotobiorreatores tubulares tinha os tubos flutuando em uma piscina grande para controle da temperatura (RICHMOND, 2004). Uma das vantagens dos sistemas de cultivo de microalgas em fotobiorreatores do tipo "fechado" é a capacidade de eliminar contaminação. No entanto, é impossível manter um grande sistema livre de contaminação. Uma das técnicas para esterilização dos fotobiorreatores é o uso de vapor de água, sendo possível, também utilizar a esterilização química (RICHMOND, 2004).

Figura 2.4- Fotobiorreator tubular transparente para o cultivo de microalgas.



Fonte: (SILVA et al., 2014)

2.5.3 Sistemas Híbridos de Cultivos de Microalgas

São sistemas de cultivo que utilizam a combinação de sistemas aberto e fechado, sendo que no fotobiorreator de sistema fechado ocorre a produção de inóculo inicial do cultivo com alta densidade de células que será disponibilizado para um sistema aberto. Este conceito tem sido empregado para produção de astaxantina (*Haematococcus pluvialis*) no Havaí, porém ainda apresenta altos custos de capital e operacional na para produção de biomassa microalgal (GROBBELAAR, 2000; OLAIZOLA, 2000).

2.6 COLHEITA DAS MICROALGAS

No geral, os sistemas e ambientes de cultivos das microalgas são aquosos, com nutrientes e aeração com O₂ e/ou CO₂ nas proporções adequadas para cada espécie ou estirpe. Um dos aspectos importantes no cultivo em grande escala é a concentração de células na etapa de retirada da biomassa do meio de cultura (SILVA, 2013).

Desde o início das pesquisas sobre cultivo de microalgas em larga escala, o custo mínimo estimado para o processo de colheita é de 20% a 30% do valor total do custo da produção (GRIMA et al., 2003). Esse alto custo da colheita e secagem apresenta grandes desafios para a utilização comercial das microalgas, principalmente para os cultivos destinados à produção de biocombustíveis (BOROWITZKA, 1992; FON SING et al., 2011).

A recuperação da biomassa de microalga representa um problema, pois as células tem tamanho relativamente pequeno, variando entre 2 e 30 µm de diâmetro. Outro problema é a taxa de diluição da cultura que, na maioria das vezes, está em torno de 0,5 kg de massa seca por m³ de cultivo, nos cultivos abertos em escala comercial. A colheita ou a separação da fração sólida do líquido pode ser executada por centrifugação, filtração e até por sedimentação. Todos esses procedimentos podem ser precedidos por uma etapa denominada de floculação (LOURENÇO, 2006).

A colheita de microalgas compreende a separação das fases sólido-líquido dos cultivos, sendo a parte sólida composta por células de microalgas e a parte líquida por H₂O e nutrientes remanescentes do cultivo. Pode ser realizada em uma ou mais etapas, envolvendo processos físicos, químicos ou biológicos e a etapa principal pode ser executada por centrifugação, filtração, flotação, sedimentação por gravidade, floculação e coagulação (SILVA et al., 2014).

Este é um campo de pesquisa que está em plena atividade, pois ainda não existe um método único de colheita, reconhecido como melhor ou mais adequado para todas as espécies de microalgas (RICHMOND, 2004). Para obter eficiência no processo de colheita, deve-se considerar alguns fatores: 1) morfologia celular, por exemplo: o formato (células esféricas, em cadeias ou filamentos), o tamanho (geralmente entre 2 a 30 µm), peso específico, carga de superfície

(geralmente negativo) (FON SING et al., 2011); II) forma de cultivo da microalga; III) método de colheita escolhido (filtração, centrifugação, floculação, sedimentação, etc.); IV) o custo e eficiência do processo; V) a aplicação final da biomassa (SILVA et al., 2014).

A centrifugação é um método de colheita prático e simples e pode ser realizado sem adição de produtos químicos, conservando as características originais da biomassa (LOURENÇO, 2006). No entanto em escala comercial, não se torna viável pelo alto gasto de energia para o funcionamento do sistema, pela dificuldade em processar grandes volumes de cultivo e pela necessidade de altos investimentos para a aquisição de equipamentos de grande porte.

O método de filtração é a operação em que se separa um sólido de um líquido mediante um meio poroso, que retém a fração sólida e deixa passar a fração líquida. O meio filtrante pode ser composto de papel, tecido ou outro sólido poroso, como cerâmica ou uma camada fina de areia. Os filtros podem apresentar diversas composições, como microfibras de vidro, acetato de estireno, celulose regenerada, etc., com diâmetros de 47 nm; 25 nm; 13 nm; etc. e tamanho dos poros 1,2 μm ; 0,7 μm ; 0,45 μm ; 0,22 μm etc. (LOURENÇO, 2006).

O custo do equipamento de filtração está relacionado com a área de filtração, e normalmente é desejável obter uma elevada velocidade global de filtração. O filtro mais apropriado para qualquer operação é aquele que engloba os requisitos de eficiência com mínimo de custo global (COULSON, 1965).

A filtração é uma técnica que permite determinar com exatidão o volume equivalente do cultivo com alta eficiência na separação da biomassa do meio de cultivo. Todavia, em cultivo de grande escala, a separação de grandes volumes de microalgas somente é viável se a espécie apresentar células grandes ou estrutura filamentosa, já que as células pequenas acarretam no entupimento rápido de quaisquer sistemas de filtração em grandes volumes (SILVA, 2013).

A floculação é um método de colheita mais conveniente dentre os métodos tradicionais, tais como centrifugação e filtração, pois permite o tratamento de grandes volumes de cultivo microalgal. Uma grande variedade de produtos químicos são estudados como agentes floculantes para microalgas (LEE et al., 1998).

A floculação consiste na remoção da capacidade das células se manterem em suspensão, ou na estimulação da agregação para formação de flocos que podem decantar ou flotar. Esta técnica é viável para recolher biomassa em qualquer sistema de cultivo aberto ou em fotobiorreatores fechados, e bastante adequada em sistemas de grande porte (LOURENÇO, 2006).

Métodos de floculação que estão sendo explorados incluem autofloculação (SHELEF et al., 1984; SUKENIK et al., 1988; YAHY et al., 1994), biofloculação com bactérias ou outras espécies de microalgas (EISENBERG et al., 1981; OH et al., 2001; LEE et al., 2009), floculação com polímeros orgânicos (MUYLEAERT et al., 2009; VANDAMME et al., 2010; SILVA, 2013; T LAM et al., 2014), floculação com produtos químicos (ŞIRIN et al., 2011; RAKESH et al., 2014; WAN et al., 2015), indução alcalina do pH (CHOI et al., 2011; VANDAMME et al., 2011).

As vantagens do método de floculação com polímeros orgânicos estão relacionadas ao baixo custo de operação e por não utilizar produtos químicos para concentrar a biomassa, o que evita a utilização de ânions à base de cloro ou sulfato (UDUMAN et al., 2011).

2.7 PRINCIPAIS PRODUTOS E AS APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS DA BIOMASSA DE MICROALGAS

A composição bioquímica das microalgas pode variar conforme o gênero, espécie ou a estirpe utilizada no cultivo. Dentre os componentes biotecnológicos produzidos pelas células de algas e microalgas estão incluídos os lipídios, proteínas, pigmentos, enzimas, carboidratos, esteróis e vitaminas (β -caroteno, tiamina, riboflavina, niacina, ácido pantoténico, piridoxina, biotina, ácido fólico) (ABED et al., 2009; FON SING et al., 2013; ANDRADE et al., 2014; KOLLER et al., 2014).

A biomassa de microalgas pode ser aplicada como matéria prima da produção de biocombustíveis (como biodiesel e bioetanol), indústria farmacêutica, alimentação humana e animal, biofertilizantes, entre outras atividades (ANDRADE et al., 2014; CHOJNACKA et al., 2012; ANDRADE et al., 2014; KOLLER et al., 2014;). Na aquicultura é utilizada para alimentação direta ou indireta de algumas espécies

de peixes, moluscos, crustáceos e de diversos organismos forrageiros de interesse econômico (DERNER et al., 2006).

2.7.1 Pigmentos fotossintéticos

As microalgas são microrganismos fotossintetizantes e possuem em suas células pigmentos fotossintéticos como as ficobilinas, clorofilas e carotenoides, sendo que as ficobilinas são do grupo das proteínas e os dois últimos do grupo dos lipídios (ANDRADE et al., 2014).

As ficobilinas ou ficobiliproteínas representam um grupo de proteínas coloridas presentes nas cianobactérias (microrganismo procarionte) e nos filo Rhodophytas e Glaucophytas (microrganismos eucariontes). Sua importância metabólica está relacionada à capacidade de captar energia solar nas regiões visíveis do espectro, em que a clorofila possui baixa absorção, e transferir sua energia para clorofila, sendo os principais pigmentos acessórios das algas vermelhas e de algumas cianobactérias (ANDRADE et al., 2014).

As clorofilas são pigmentos encontradas no reino vegetal, em algas e em algumas bactérias fotossintéticas de ambiente aquático. São pigmentos em abundância, sendo produzidos bilhões de toneladas de clorofila por ano na terra e nos oceanos (ANDRADE et al., 2014).

As clorofilas são essenciais para o processo de fotossíntese, que converte energia da radiação solar em energia química, e são moléculas sintetizadas constantemente e destruídas (foto-oxidação) em presença de luz, apresentando maior velocidade de decomposição quando em condições de alta intensidade luminosa. Não só a concentração total de clorofila, mas também a proporção entre os diversos tipos de clorofila, mudam em função da intensidade luminosa. De maneira geral, a proporção entre clorofila *a* e *b* tende a diminuir com a redução da intensidade luminosa (KRAMER; KOZLOWSKI, 1979; ANDRADE et al., 2014).

Os carotenóides são um grande grupo de pigmentos presentes na natureza responsáveis pelas cores do amarelo ao vermelho, identificados em organismos fotossintetizantes e não fotossintetizantes, plantas superiores, algas e microalgas, fungos, bactérias e em alguns animais (UENOJO et al., 2007). Nas microalgas são uma classe de pigmentos fotossintéticos, além da clorofila. Por

exemplo, luteína, zeaxantina, beta-caroteno e astaxantina representam os principais carotenóides observados em plantas (TANG et al., 2016).

Os pigmentos de microalgas são utilizados comercialmente como corantes alimentícios, antioxidantes e suplementos nutricionais (UENOJO et al., 2007; ANDRADE et al., 2014).

2.7.2 Proteínas e carboidratos

Com crescimento populacional mundial, intensificaram-se, no início dos anos 1950, estudos para utilizar fontes proteicas a partir da biomassa de microalgas (BECKER, 2004). O valor proteico da biomassa de microalgas é alto, podendo variar de 28% a 71% e foi descrito por diversos autores, utilizando diferentes espécies, ressaltando a importância da utilização destes microrganismos como fonte proteica (BECKER, 2004).

A maioria dos produtos de microalgas como fonte proteica tem sido comercializada apenas na forma de cápsulas. A produção destes produtos de biomassa algal tem crescido no Brasil (ANDRADE et al., 2014). A possibilidade da exploração destes componentes da biomassa de microalgas na industrialização agrega valores para maximização da utilização da estrutura física e do conhecimento. No Estado do Paraná, produtos da biomassa de alguns tipos de microalgas como, por exemplo, *Chlorella sp.* e *Spirulina (Arthospira sp.)*, são comercializadas na forma de pó seco em cápsulas ou comprimidos como suplementos proteicos/carboidratos ou pigmentos (clorofila) (ANDRADE et al., 2014).

A microalga *Spirulina (Arthospira)* é classificada como GRAS (Generally Recognized as Safe) pelo FDA (Food and Drug Administration), o que garante seu uso como alimento sem riscos à saúde. Entretanto, o produto deve ter registro e fiscalização pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) ou no MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento) (ANDRADE; COSTA, 2008).

O teor de carboidratos em microalgas pode variar significativamente de 5 a 80% e consiste em monossacarídeos solúveis ou dissacarídeos (geralmente produtos intermédios), carboidratos poliméricos para o armazenamento de energia,

polissacarídeos estruturais, como envelope celular, e polissacarídeos extracelulares (TANG et al., 2016).

A ausência de lignina e teor elevado de polissacáridos estruturais na biomassa de microalgas evidenciam matéria-prima potencialmente atrativa para produção de biocombustíveis. O amido é o substrato mais vantajoso, por não exigir pré-tratamento oneroso e ser facilmente processado utilizando a infraestrutura existente para produção de bioetanol, que é desenvolvida para conversão de amidos provenientes de plantas terrestres (por exemplo, o milho). No entanto, a produtividade de carboidratos e, particularmente, amido deve ser melhorada, a fim de tornar a produção de biocombustíveis oriundo de microalgas economicamente eficiente e sustentável (TANG et al., 2016).

2.7.3 Lipídios na biomassa de microalgas

O conteúdo de lipídios da biomassa microalgal pode variar entre 1 a 40% do peso seco e, em certas condições de cultivo, pode alcançar até 75% (CHISTI, 2007; MATA et al., 2010). Todas as células vegetais e as células de microalgas apresentam lipídios na sua composição. Os lipídios representam um grupo muito diversificado de compostos que possuem importantes funções biológicas, como na formação de componentes estrutural das membranas celulares, servindo como fonte de energia e de armazenamento e participação nas vias metabólicas (RICHMOND, 2004; TORTORA et al., 2006).

Além do interesse para produção de biocombustíveis as cadeias longas de ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) de ômega-3, são valiosos lipídios produzidos a partir de microalgas, estes não podem ser sintetizados por plantas superiores ou animais e são amplamente utilizados como suplementos nutricionais. O EPA – ácido eicosapentaenoico – e DHA – ácido docosaexaenoico – têm atraído muita atenção devido às suas bioatividades, sendo que a produção de DHA a partir de microalgas já foi explorada comercialmente (SPOLAORE et al., 2006; TANG et al., 2016).

A extração de óleos da biomassa das microalgas para a produção de biodiesel pode ser realizada utilizando misturas de solventes orgânicos na biomassa seca de microalgas, ou a extração direta de óleos a partir da biomassa

úmida (CHEN et al., 2012).

As condições de armazenamento da biomassa é um dos fatores que podem degradar os lipídios presentes na biomassa e ocorrer a liberação de ácidos orgânicos voláteis ou a formação de ácidos graxos livres (FOREE; MCCARTY, 1970; ALENCAR et al., 2010). Os autores Chen et al. (2012) concluíram que a composição dos lipídios é modificada durante o armazenamento de biomassa úmida de microalgas, e que altas quantidades de ácidos graxos livres são produzidas pela hidrólise dos triacilgliceróis, em temperaturas acima do congelamento.

Os óleos extraídos da biomassa de microalgas são caracterizados por possuir um alto teor de ácidos graxos livres que podem chegar até 85 % dos lipídios totais, dependendo da estirpe de microalga cultivada e das condições de cultivo (ZHU et al., 2008; KROHN et al., 2011; CHEN et al., 2012). O alto teor de ácidos graxos livres nos lipídios da biomassa microalgas é um tema muito importante, que deve ser abordado quando se considera produção de biodiesel a partir da biomassa de microalgas (KROHN et al., 2011).

Os efeitos citotóxicos da presença de ácidos graxos livres nas células de microalgas foi estudado por Wu et al. (2006). Esses autores concluíram que ácidos graxos livres podem danificar principalmente a membrana plasmática das células de microalgas em meio de cultivo, pois causam uma alteração na permeabilidade da membrana e a dissociação de ficobilinas dos tilacóides, promovendo efeitos severos à membrana plasmática, que causam a ruptura das células (WU et al., 2006).

Os lipídios extraídos da biomassa de microalgas que possuem um alto teor de ácidos graxos livres, são impróprios para a síntese de biodiesel, quando transesterificados com catalisadores básicos, pois o alto teor em ácidos graxos livres diminui a atividade catalítica devido à saponificação. Uma alternativa para superar esta limitação, é a utilização de duas etapas no processo de tratamento do óleo bruto, que envolve a reação de esterificação de lipídios de microalgas com alto teor de ácidos graxos livres com metanol, a fim de converter ácidos graxos livres em éster metílico de ácido graxo, seguido da transesterificação (DONG et al., 2013).

Quando o nível de ácidos graxos livres em óleos é superior a 5%, a saponificação vai inibir a separação dos ésteres de metilo e de glicerol, o que causa a formação de uma emulsão durante a lavagem com água. Portanto, é necessário

converter os ácidos graxos livres em ésteres metílicos (HUANG et al., 2010).

A proposta de duas etapas para a conversão catalítica também foi proposta por Chen et al. (2012), e possui um alto potencial para a produção de biodiesel a partir de óleo de microalgas rico em ácido graxo livre. Após procedimentos de esterificação-transesterificação otimizadas, a taxa de conversão de triacilgliceróis e ácidos graxos livres em ésteres metílicos atingiu 100%.

Ácidos graxos livres e substâncias derivadas da oxidação de ácidos graxos insaturados, são os metabólitos com efeitos inibidores sobre as células de microalgas, que influenciam na produção de biomassa em meio de cultivo. A microalga *Neochloris oleoabundans* foi cultivada em meio de cultivo re-utilizado de forma autotrófica e mixotrófica, em ambas as formas de cultivos foi descrito a presença de ácidos graxos livres em meio de cultivo que pode ter influenciado no metabolismo desta microalga, afetando diretamente em sua produtividade (SABIA et al., 2015).

2.7.4 Bioestimulantes e biofertilizantes para agricultura

Nos últimos anos, há uma crescente demanda por extratos e biofertilizantes ecológicos. O extrato de algas é um composto que contém hormônios de plantas, aminoácidos, ácidos graxos e elementos de traços, que pode ser utilizado para o controle do crescimento de plantas e o desenvolvimento de resistência a patógenos (CHOJNACKA et al., 2012).

A literatura evidência resultados significativos da aplicação da biomassa ou extrato de algas no crescimento de vegetais, frutas e cereais (CHOJNACKA et al., 2012), podendo ser utilizados no tratamento de sementes, como biofertilizantes do solo, ou para aplicação foliar durante o cultivo e floração. Este material estimula a germinação de sementes, crescimento e produção de diferentes culturas (HONG et al., 2007; KHAN et al., 2009; CHAIKINA et al., 2015).

O extrato de algas e microalgas foi utilizado como biofertilizante em várias culturas como cenoura (KASEKER et al., 2014), alface (FAHEED; FATTAH, 2008), couve (SILVA et al., 2012), arroz (ANAND et al., 2015), feijoeiro (MÓGOR et al., 2008), batata (BETTONI et al., 2008), maracujazeiro (OLIVEIRA et al., 2011), soja (CHAIKINA et al., 2015) e influenciou positivamente na maioria dos trabalhos,

indicando aumento do crescimento e da produção da cultura. Chaikina et al. (2015), estudaram o efeito de extratos de algas no crescimento radicular em plântulas de soja, e concluíram que o extrato de algas, em baixas concentrações, estimula o crescimento das raízes da soja, chegando a 13% de aumento de raízes, quando comparado com o controle sem aplicação de extrato.

2.8 MICROALGAS E PLANTAS OLEAGINOSAS

As microalgas podem ser consideradas as formas mais primitivas das plantas (CHACÓN-LEE; GONZÁLEZ-MARIÑO, 2010). Por apresentar conversões mais eficientes de energia solar, são capazes de produzir 30 vezes o valor de óleo por unidade de área de terra se comparadas com plantas oleaginosas terrestres e armazenar moléculas de lipídios e hidratos de carbono que representam a matéria prima para produção de vários biocombustíveis (SHEEHAN, J. et al., 1998; KIGHTLINGER et al., 2014; KIM et al., 2014; YOON et al., 2015).

A produção de biocombustíveis a partir de microalgas apresenta como vantagens a alta produtividade de biomassa e de óleo e a ocupação de menor área de cultivo quando comparada a plantas oleaginosas (COSTA; BARBOZA; GOMES; et al., 2014).

Além disso, são produtoras de biocombustíveis de terceira geração, sendo estes obtidos por meio do cultivo de microrganismos, diferenciando-se dos biocombustíveis de primeira geração obtidos por culturas de plantas, principalmente, oleaginosas e sacaríneas, e dos biocombustíveis de segunda geração, obtidos com o aproveitamento de resíduos lignocelulósicos. Os de terceira geração apresentam uma grande vantagem sobre os biocombustíveis de primeira e segunda geração principalmente com relação ao uso de terra (BRENNAN; OWENDE, 2010).

A composição bioquímica das células de microalgas é diversificada em relação ao conteúdo de carboidratos, proteínas, lipídios, etc., variando de acordo com a espécie, com o meio de cultura utilizado e com os fatores relacionados ao ambiente do cultivo (XU et al., 2006).

O alto teor de lipídios de algumas espécies de microalgas como: *Neochloris oleoabundans* (29-65%), *Nannochloropsis oculata* (22.7-29.7%), *Pavlova lutheri* (35.5%), *Scenedesmus obliquus* (11-55%), *Botryococcus braunii* (25-75%)

(MATA et al., 2010), desperta grande atenção para pesquisas que buscam a produção de biodiesel (CHANDRA et al., 2014).

Em comparação com plantas oleaginosas, as microalgas podem alcançar maior produtividade de lipídios (Tabela 2.1). A produção de óleo de soja (MATA et al., 2010), é de 636 L ha⁻¹ de óleo ano, (Tabela 2.1), o que corresponde a 562 Kg biodiesel/ha⁻¹ ano. Quando comparada esta produção de óleo e biodiesel com uma microalga de baixo teor de lipídios na biomassa, o rendimento obtido com o cultivo desta microalga é 92 vezes superior em produção de óleo e biodiesel.

Tabela 2.1 - Comparação da produção de óleo por microalgas com cultivos de plantas oleaginosas.

Espécies Oleaginosas	Teor de óleo (%)	Rendimento de óleo (L óleo/ha ano ⁻¹)	Produtividade em Biodiesel (kg biodiesel/ha ano ⁻¹)
Milho (<i>Zea mays</i> L.)	44	172	152
Soja (<i>Glycine max</i> L.)	18	636	562
Pinhão manso (<i>Jatropha curcas</i> L.)	28	741	656
Camelina (<i>Camelina sativa</i> L.)	42	915	809
Canola (<i>Brassica napus</i> L.)	41	974	862
Girassol (<i>Helianthus annuus</i> L.)	40	1.070	946
Mamona (<i>Ricinus communis</i>)	48	1.307	1.156
Dendê (<i>Elaeis guineensis</i>)	36	5.366	4.747
Microalga (baixo teor de óleo)	30	58.700	51.927
Microalga (médio teor de óleo)	50	97.800	86.515
Microalga (alto teor de óleo)	70	136.900	121.104

Fonte: (MATA et al., 2010).

De acordo Chisti (2007), a produção de óleo de soja é de 447 L ha⁻¹. Quando comparado com o cultivo de microalgas com teor de lipídios de 30% na biomassa em fotobiorreatores, a produção alcançada pode ser de 58.700 L ha⁻¹, 131 vezes superior de soja; se comparada com uma microalga com um teor de 70% de óleo na biomassa, este rendimento é de 136.900 L ha⁻¹, rendimento 306 vezes superior.

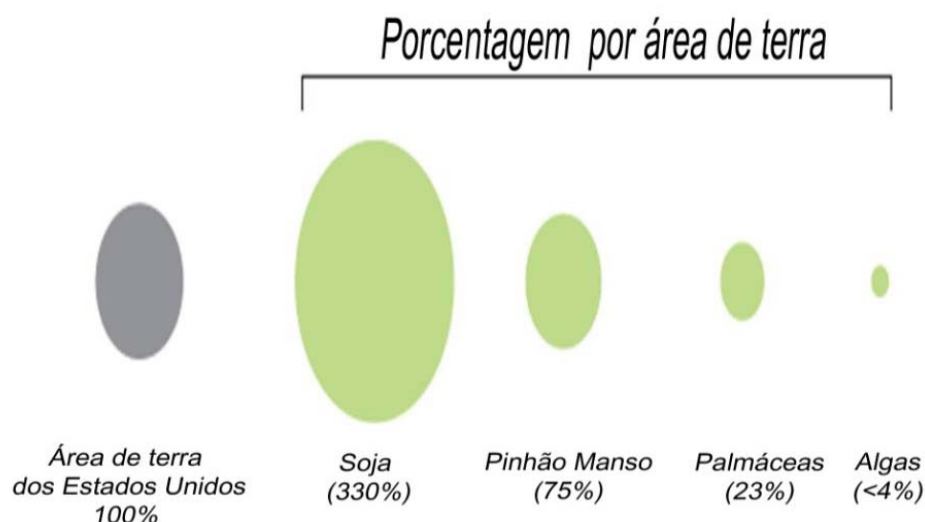
Biocombustíveis podem ser produzidos por várias fontes, mas, quando comparadas com a produção obtida por microalgas, a estimativa do uso de área por unidade de produção é alta (GEORGIANNA; MAYFIELD, 2012).

Estes autores fizeram uma estimativa de produção e comparação entre as principais culturas oleaginosas e o cultivo de microalgas. Com o cultivo de microalgas em uma área de 30 milhões de hectares é possível produzir biocombustível em uma estimativa de 40 mil litros por hectare/ano, o suficiente para substituir os 1.200 bilhões de litros de petróleo utilizados pelo Estados Unidos (GEORGIANNA; MAYFIELD, 2012).

Os Estados Unidos consomem 25% do petróleo do mundo. A área de terra necessária para substituir todo o petróleo nacional e importado pode ser visualizado na Figura 2.5, como uma porcentagem em relação à sua área de terra. A estimativa de área necessária para algas é significativamente menor quando comparada com qualquer outra fonte de biomassa.

Para suprir toda demanda americana, substituindo o diesel oriundo do petróleo por biodiesel, seria necessário o plantio de 330% da área agricultável dos Estados Unidos com a soja; no caso do pinhão manso, seria necessário o plantio de 75% da área americana; palmáceas 23%; e com microalgas, a demanda seria menor que 4 % da área dos Estados Unidos Figura 2.5.

Figura 2.5- Comparação de área de cultivo necessário para microalgas e plantas oleaginosas atenderem a demanda americana por petróleo.



Fonte: (GEORGIANNA; MAYFIELD, 2012)

De acordo com a Resolução n. 7, de 19/03/2008, da Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP), o biodiesel (B100) é um “combustível composto de alquilésteres de ácidos graxos de cadeia longa, derivados de óleos vegetais ou de gorduras animais”. Considerando também a Lei n. 11.097, de 13/01/2005, o biodiesel é definido como um combustível para motores a combustão interna com ignição por compressão, renovável e biodegradável, derivado de óleos vegetais ou de gorduras animais, que possa substituir parcial ou totalmente o óleo diesel de origem fóssil (BRASIL, 2008).

Em 2014, o biodiesel produzido no Brasil, foi de 3,41 milhões de m³, o que representa um aumento de 17,2% do disponibilizado no mercado interno, já que a produção em 2013 foi de 2,91 milhões de m³. A principal matéria-prima utilizada em sua produção foi a soja, representando 69,2% do total, seguido de sebo bovino (17,0%). O percentual de B100 adicionado compulsoriamente ao diesel mineral cresceu para 6%, a partir de julho, e para 7%, em novembro de 2014 (BRASIL, 2015).

A soja é uma cultura de maior relevância econômica no cenário agrícola mundial, utilizada na agroindústria, indústria química e alimentícia. As sementes de soja contêm 38% proteína e cerca de 18% óleo (HARTMAN et al., 2011). No Brasil, a produção estimada para a safra 2014/2015 foi de 96,2 milhões de toneladas (Mt), com exportação de 49,12 Mt, ocupando lugar de destaque entre os maiores produtores do grão, com área de produção de 31,9 milhões de hectares (ha) (CONAB, 2015).

3 ARTIGO A: NITRATO DE SÓDIO E pH NAS CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS E PRODUÇÃO DE BIOMASSA DA MICROALGA *Neochloris oleoabundans*

3.1 RESUMO

A manipulação da concentração de NaNO_3 e do pH em meio de cultivo é uma estratégia visando o aumento da produtividade de biomassa de microalgas. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da concentração de NaNO_3 e do pH na densidade óptica, produção de biomassa, nos teores de pigmentos e lipídios da microalga *Neochloris oleoabundans*. A estirpe de *N. oleoabundans* (UTEX1185) foi cultivada em meio BBM (Bold Basal Medium), em câmara de crescimento com temperatura e luminosidade controladas. O experimento foi conduzido em esquema fatorial completo para dois fatores: NaNO_3 em g L^{-1} (0,25; 1,12 e 2,5) e pH (5,0; 7,0 e 9,0), resultando em nove tratamentos em triplicatas. As análises de densidade óptica foram realizadas a cada 48 h. Os teores de lipídios e pigmentos, biomassa seca e contagem de células foram determinados ao final do cultivo no 14º dia. De acordo com a análise de metodologia de superfície de resposta as variáveis NaNO_3 e pH foram significativas, tanto para a produção de biomassa seca, contagem de células, densidade óptica, teor de pigmentos e lipídios. Esses resultados indicam que, variações na concentração de NaNO_3 e pH do meio no cultivo BBM aumenta a produção de lipídios, pigmentos e biomassa seca da *Neochloris oleoabundans*, bem como altera o perfil de lipídios totais.

PALAVRAS-CHAVE: Carotenoide total. Clorofila a. Lipídio total. Perfil de lipídios.

SODIUM NITRATE AND pH IN BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS AND BIOMASS PRODUCTION OF MICROALGAE *Neochloris oleoabundans*

3.2 ABSTRACT

Change in the composition of nutrients in the culture medium is a strategy for increasing microalgae biomass productivity. The aim of this study was to evaluate the effects of NaNO₃ concentration and pH on optical density, biomass production, the levels of pigments and lipids from microalgae *Neochloris oleoabundans*. The strain of *N. oleoabundans* (UTEX1185) was cultured in BBM (Bold Basal Medium) in growth chamber with temperature and light controlled. The experiment was conducted in full factorial design for two factors: NaNO₃ in g L⁻¹ (0.25, 1.12 and 2.5) and pH (5.0, 7.0 and 9.0), resulting in nine treatments with three replicates. Analyzes of optical density from the medium culture were performed every 48 h. The levels of lipids and pigments, dry biomass and cell counts were determined on the 14th day of culture. According to the response surface methodology analyses the variables NaNO₃ and pH were significant for dry biomass production, cells count, optical density, pigments and total lipids. These results indicate that for *N. oleoabundans* variations in N concentration and pH in the culture medium (BBM) increases the production not only of dry biomass but also of lipids, pigments in the cell and also change the lipid profile.

KEYWORDS: Total carotenoid. Chlorophyll *a*. Total lipid. Lipid profile.

3.3 INTRODUÇÃO

A espécie *Neochloris oleoabundans* possui de 35-54% de lipídios da biomassa seca, sendo esta recomendada para produção de biocombustíveis líquidos (CHISTI, 2007). As microalgas tem se destacado como matéria prima potencial para produção de biodiesel (GEORGIANNA; MAYFIELD, 2012; PARK et al., 2012; WAN et al., 2015) e biometano (CHISTI, 2007; PARK et al., 2012).

A estimulação da biossíntese de compostos através da manipulação das condições de cultivo, controlando as variáveis que influenciam no processo de crescimento da biomassa microalgal é uma das alternativas quando se busca reduzir os custos de produção (MULITERNO et al., 2005). O pH é uma variável essencial no cultivo de microalgas, influência na disponibilidade de vários elementos químicos e na absorção dos nutrientes do meio de cultivo pelas células microalgais (LOURENÇO, 2006; PAWLOWSKI et al., 2014).

Depois do C, o N é o nutriente mais importante, pois contribui para o aumento da produção de biomassa, porque é um elemento básico na formação das proteínas, ácidos nucléicos e pigmentos fotossintetizantes e o teor pode variar de 1% a 10% na biomassa, na forma orgânica e inorgânica, e ser assimilado do meio de cultivo na forma amoniacal (NH_3 e NH_4) ou nítrica (NO_3) (CAI et al., 2013). A melhor fonte de N para o cultivo da microalga *Neochloris oleoabundans* é o nitrato de sódio (NaNO_3), quando comparado com ureia e bicarbonato de amônio (LI et al., 2008). O NaNO_3 tem sido utilizado como fonte de N em diversos meios de cultivo para crescimento de microalgas.

Segundo Richmond (2004), as concentrações de NaNO_3 para cultivar microalgas podem chegar até 10 vezes, quando comparadas suas composições, por exemplo, com o meio Bold Basal medium (BBM) que contém $0,25 \text{ g L}^{-1}$, Modified Allen's $1,5 \text{ g L}^{-1}$, Zarrouk $2,5 \text{ g L}^{-1}$, BG11 $1,5 \text{ g L}^{-1}$. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da concentração de N na forma de nitrato de sódio e do pH no cultivo da microalga *N. oleoabundans* e seus efeitos na produção e características bioquímicas da sua biomassa.

3.4 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Instituto Agronômico do Paraná-IAPAR, no Laboratório de Microbiologia do Solo, Londrina, Paraná. A microalga utilizada foi a Chlorophyta *Neochloris oleoabundans* (syn. *Ettlia oleoabundans*) (*sphaeropleales*, *Neochloridaceae*), isolada na Arábia Saudita. Esta microalga é considerada como microrganismo halotolerante com forte tolerância a salinidade e a alcalinidade do meio de cultivo, e possui alto teor de lípidios em sua biomassa (GOUVEIA; OLIVEIRA, 2009; BALDISSEROTTO et al., 2014).

O meio de cultivo utilizado foi o BBM- *Bold Basal Medium* (BOLD, 1949) conforme descrito por Silva et al. (2016). O cultivo foi realizado em frascos de 2 L, em câmara de crescimento, com fotoperíodo de 12 h com temperatura controlada de $28,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$, na fase luminosa, e $22,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$, na fase escura, por 14 dias. A densidade de fluxo de fótons da radiação fotossinteticamente ativa (PAR - photosynthetically active radiation) foi de $100 \pm 20 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (porômetro Licor INC modelo LI-1600) utilizando-se quatro lâmpadas fluorescentes tubulares (65 W) dispostas paralelamente na parte superior do recipiente.

O cultivo foi inoculado a 10% v/v com um cultivo de *N. oleoabundans* com as seguintes características: densidade óptica de 1,57, número de células $6,83 \cdot 10^7 \text{ mL}^{-1}$. Todos os procedimentos analíticos foram conduzidos em câmara de fluxo laminar (Veco, modelo Bioseg-12), para evitar contaminações.

O experimento foi realizado em esquema fatorial completo com os dois fatores em três níveis, com três repetições; sendo estes NaNO_3 (0,25, 1,12 e $2,5 \text{ g L}^{-1}$) e pH (5,0; 7,0 e 9,0). A análise dos resultados foi feita no programa estatístico STATISTICA 7.0 (STATSOFT, 2007) de acordo com a metodologia de superfície de resposta e teste Tukey a 5 % para comparação de médias (FERREIRA, 2011).

O pH do meio de cultivo foi medido diariamente, utilizando pH-metro de marca Metrohm modelo 827 pH lab., quando necessário foi realizado o ajuste de acordo com os tratamentos definidos, com hidróxido de potássio (KOH) ou ácido clorídrico (HCl).

Amostras foram coletadas no 14º dia de cultivo, para determinação da densidade óptica, em 670 nm em espectrofotômetro UV-visível (Genesys 10UV),

da biomassa seca, da contagem de células, do teor de pigmentos (clorofila *a* e carotenoides) e do teor de lipídios e a caracterização físico química do lipídio total.

Para determinação da biomassa nos diferentes meios de cultivos, foi coletada uma fração de 50 mL de cada tratamento experimental. Esta amostra foi centrifugada a 10.000 *g* por 15 min em uma centrífuga refrigerada (JOUAN modelo BR4) com temperatura controlada a 25,0°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet formado foi seco em estufa (FANEM, modelo 315 SE) a 60°C e posterior pesagem dos tubos falcon para determinação do peso seco da biomassa.

A contagem de células foi realizada em câmara de Neubauer no 14º dia de cultivo, utilizando um microscópio óptico Nikon model (Eclipse E200), com objetiva de 40X, totalizando um aumento visual de 400X.

A determinação do teor de pigmentos foi realizada de acordo com o método de Lorenzen (1967). Foram coletados 3 mL do cultivo de cada tratamento e padronizando-se para 0,1 de absorbância em espectrofotômetro a 670 nm, obtendo-se o fator de diluição de cada tratamento. Uma alíquota de 3 mL do conteúdo diluído foi centrifugada em tubos tipo Falcon por 10 min a 9.228 *g* com temperatura controlada a 25,0°C (Model Z383 126 HERMLE K). O sobrenadante foi descartado e o pellet formado permaneceu em ultrafreezer a -86° C (Freeztec, modelo ftv342), por 24 h, para rompimento das células. Todas as etapas seguintes foram realizadas em um ambiente sem luz.

Para determinação dos pigmentos as amostras foram descongeladas, maceradas com bastão de vidro e adicionado 3 mL de acetona a 90%, ressuspendendo o pellet com auxílio do vórtex (Daigger, modelo- Genie 2). Os tubos permaneceram por 1 h a 4°C em refrigerador, agitando a cada 15-20 min. As amostras foram centrifugadas, por 10 min a 9.228 *g*. Foi realizada a leitura no espectrofotômetro nos comprimentos de onda: 480 nm; 510 nm; 665 nm e 750 nm. Foram adicionados 20 µL de HCl 1 mol L⁻¹ nas amostras e agitadas e após um minuto, foi realizada a leitura da absorbância nos comprimentos de onda (665 e 750 nm).

Com os resultados obtidos foram calculados o teores de clorofila *a* (LORENZEN, 1967) e carotenoides (PARSONS; STRICKLAND, 1963) com as seguintes fórmulas.

$$\text{Clorofila } a: [F^* [(A_{665} - A_{750}) - (A_{665ac} - A_{750ac})] * v] / V \times C$$

$$\text{Carotenoides totais: } [7,6 \cdot A_{480} - (3,0 \cdot A_{750}) - (1,49 \cdot A_{510}) - (2,0 \cdot A_{750})] \cdot v / (V \cdot C)$$

Onde: clorofila *a*: mg m⁻³; carotenoides totais: µg L⁻¹; F: 26,73 (fator resultante das informações do coeficiente da absorção de luz pela clorofila e seu comportamento após a solubilização e a extração com acetona 90%); *v*: volume de acetona utilizado na extração (mL); *V*: volume de amostra centrifugada (L); *C*: Caminho óptico (1cm); A₆₆₅: absorbância 665 nm; A₇₅₀: absorbância em 750 nm; A_{665ac}: absorbância em 665 nm após adicionar ácido clorídrico; A_{750ac}: absorbância em 750 nm após adicionar ácido clorídrico; A₄₈₀: absorbância em 480 nm; A₅₁₀: absorbância em 510 nm; A₇₅₀: absorbância em 750 nm.

No 14º dia de cultivo, 1,5 L de cultivo de cada frasco foi centrifugado a 4.075 *g* por 10 min. (Model Z383 126 HERMLE K) com temperatura controlada a 25,0°C e a biomassa foi liofilizada em equipamento LIOBRAZ modelo L101, para posterior extração dos lipídios totais e caracterização físico química dos lipídios totais.

A análise de lipídios foi realizada de acordo com Bligh e Dyer (1959) e Ryckebosch et al. (2012), onde os lipídios totais foram extraídos a partir de 50 mg de biomassa liofilizada, na proporção de 1:1:0,6 (clorofórmio, metanol e água) e a determinação foi realizada por gravimetria.

As análises de espectroscopia de ressonância magnética nuclear-RMN de ¹H foram efetuadas nos tratamentos com concentração de NaNO₃ 0,25 e 2,5 em pH 9,0, pois estes tratamentos apresentaram maior percentual de lipídios totais na biomassa.

Os espectros de ressonância magnética nuclear foram obtidos em um equipamento marca Bruker modelo Avance III, com sonda BBI de 5 mm, em solvente clorofórmio deuterado, a temperatura de 303 K. Os experimentos de ¹H foram realizados em 400,13 MHz e de ¹³C em 100,62 MHz, segundo a configuração padrão das sequências de pulso descritas por Braun e Cols (2000). Os espectros obtidos pela análise de RMN de ¹H figura 3.5, foram analisados de acordo com Carneiro et al. (2005).

3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise estatística dos valores da densidade óptica em 670 nm, foi significativa para as duas variáveis estudadas, NaNO_3 g L^{-1} e pH e para a interação entre os dois fatores; a falta de ajuste experimental não foi significativo.

O maior valor de densidade óptica ocorreu nos tratamentos com pH ajustado para 9,0, em todas as concentrações estudadas de NaNO_3 0,25; 1,12 e 2,5. Em pH 9,0 os tratamentos com a concentração de NaNO_3 de 1,12 e 0,25 g L^{-1} não obtiveram diferenças significativas. Nos tratamentos com pH ajustado a 7,0 não ocorreram diferenças significativas entre as concentrações de NaNO_3 (0,25; 1,12 e 2,5). Os tratamentos com concentração de NaNO_3 1,12 e 2,5 não se diferiram em pH 5,0 (Tabela 3.1), evidenciando a influência do pH e da concentração do NaNO_3 na densidade óptica da microalga *Neochloris oleoabundans*.

Em trabalho com a *Nannochloropsis salina* Bartley et al. (2014) descreveu que os melhores resultados para a maior densidade de células em meio de cultivo ficou entre o pH 8 e 9, com o pH ajustado nesses valores é possível aumentar a produtividade e reduzir a contaminação por outros microrganismos.

Tabela 3.1- Densidade óptica em absorbância da microalga *N. oleoabundans* no 14^o dia, em meio de cultivo *Bold Basal Medium* (BBM) com a variação do pH e NaNO_3 .

NaNO_3 g L^{-1}	pH		
	5,0	7,0	9,0
0,25	0,18 Cb	0,23 Ba	0,34 Aab
1,12	0,22 Ba	0,23 Ba	0,36 Aa
2,50	0,23 Ba	0,25 Ba	0,32 Ab

Coefficiente de variação (CV)%= 4.84

(1) Médias seguidas pela letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

A análise estatística dos valores da biomassa seca mg L^{-1} no 14^o dia de cultivo indicou efeito significativo das duas variáveis estudadas, NaNO_3 g L^{-1} e pH e a interação entre os dois fatores; a falta de ajuste experimental não foi significativa. Os tratamentos em que o pH foi ajustado para 9,0 foram significativamente melhores

para a produção de biomassa, quando comparados com os tratamentos com pH ajustado para 7,0 e 5,0, se diferenciando em todas as concentrações de NaNO_3 (0,25; 1,12 e 2,5) (Tabela 3.2).

Em pH 5,0 não ocorreram diferenças significativas entre os tratamentos 1,12 e 2,5, sendo estes os melhores para produção de biomassa quando comparados com a concentração de NaNO_3 a $0,25 \text{ g L}^{-1}$. Nos tratamentos com pH ajustado para 7,0 não ocorreram diferenças significativas entre as concentrações de NaNO_3 (0,25; 1,12 e 2,5) (Tabela 3.2).

A presença e ausência de NaNO_3 foi estudada em água do mar enriquecida com meio Guillard (1973) para avaliar o potencial da microalga *N. oleoabundans*. A produção de biomassa seca (PBS) e teor de proteínas foram maiores na presença de NaNO_3 (POPOVICH et al., 2012). Os autores Gouveia e Oliveira (2009), também observaram que nos cultivos da microalga *N. oleoabundans* com a adição de nitrato ocorreu maior PBS. A alcalinização do meio de cultivo pode ser uma estratégia para incrementar a PBS de algumas espécies de microalgas. A clorofila *C. Ellipsoidea* foi cultivada em meio MBL, com temperatura controlada de $28 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ e diferente pH – 4; 6; 7,5 (controle), 8, 9, 10 e 11 por 10 dias. A PBS foi favorecida pela alcalinização, pois os pH 9, 10 e 11 obtiveram 131,3; 146,7; e 136,9% do valor do controle (KHALIL et al., 2010).

A microalga *N. oleoabundans* foi cultivada em meio BBM modificado com 8,82 mMol de nitrato de sódio e 0,91 mM de sulfato de magnésio. A PBS foi de 6 g L^{-1} em 18 dias, quando as condições de cultivo foram pH 7,5, temperatura de 25°C , intensidade luminosa de $270 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, em fotobioreator airlift, com injeção de CO_2 (PRUVOST et al., 2009). Sun et al. (2014) avaliaram a produção de biomassa seca da microalga *Neochloris oleoabundans HK-129*, cultivada em meio Basal SE em fotobiorreatores, a produção de $1,6 \text{ g L}^{-1}$ foi alcançada em 6 dias de cultivo. A concentração ideal de NaNO_3 foi de $0,5 \text{ g L}^{-1}$, e doses superiores a esta influenciaram negativamente a produção de biomassa seca neste mesmo período analisado.

De acordo com Li et al. (2008), em cultivo da microalga *N. oleoabundans*, a máxima produção de biomassa em seu experimento foi de $3,2 \text{ g L}^{-1}$ em 5 dias de cultivo utilizando o meio SE com 10 mmol de nitrato de sódio, com

temperatura em torno de $30 \pm 2^\circ\text{C}$ e intensidade luminosa contínua de $360 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, com enriquecimento de CO_2 no meio de cultivo.

Tabela 3.2- Biomassa seca em mg L^{-1} da microalga *N. oleoabundans* no 14º dia, em meio de cultivo BBM com a variação do pH e NaNO_3 .

NaNO_3 g L^{-1}	pH		
	5,0	7,0	9,0
0,25	62,1 Ba	59,4 Ba	99,2 Aa
1,12	56,1 Bab	51,9 Ba	85,3 Ab
2,50	47,3 Bb	54,5 Ba	103,3 Aa

(CV) %= 7,02

(1) Médias seguidas pela letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

Nos resultados da contagem de células em 14 dias de cultivo ocorreu efeito significativo das variáveis analisadas, na concentração de NaNO_3 e do pH e na interação entre os dois fatores; a falta de ajuste experimental não foi significativa, e o coeficiente de determinação ($R^2 = 0,89$).

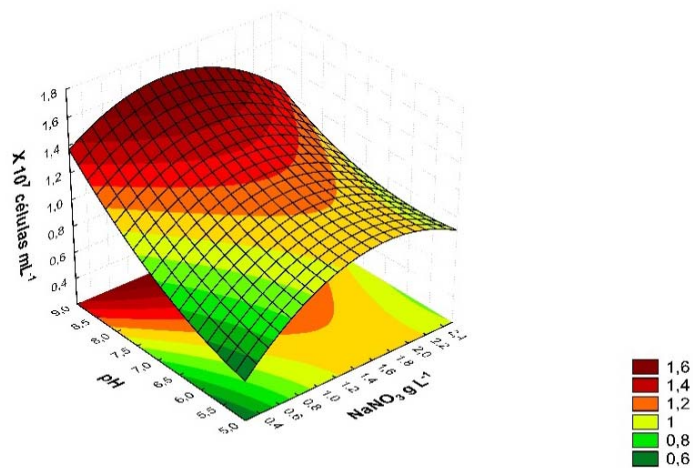
A equação que descreve a superfície de resposta obtida foi:

$$\hat{z} = 0,654 + 1,186x - 0,258x^2 - 0,241y + 0,033y^2 - 0,059xy.$$

Onde \hat{z} = número de células (10^7 mL^{-1}); x = concentração de NaNO_3 ; y = pH.

Os resultados evidenciam aumento no número de células em pH 9,0 em função da concentração de NaNO_3 , alcançando alta densidade, com máximo de $1,6 \cdot 10^7$ células mL^{-1} na concentração de 1,12 e pH 9,0 (Figura 3.1). Giovanardi et al. (2012) cultivaram a microalga *Neochloris oleoabundans* em meio de cultivo ES obtendo uma concentração de $8 \cdot 10^6$ cel. mL^{-1} em 14 dias de cultivo.

Figura 3.1- Superfície de resposta para os resultados da análise de contagem de células em 10^7 células por mL^{-1} no 14º dia de cultivo, devido à variação do pH e NaNO_3 .



Os teores de clorofila *a* tiveram efeito significativo para as duas variáveis estudadas, NaNO_3 g L^{-1} e pH, falta de ajuste experimental não foi significativo, e o coeficiente de determinação ($R^2=0,88$).

A equação que descreve a superfície de resposta (Figura 2.2a) foi:

$$\hat{z} = -850 + 818x - 220x^2 + 179y - 1,96y^2 + 15,5xy$$

Onde \hat{z} = clorofila mg m^3 ; x = concentração NaNO_3 , y = pH

O maior valor de clorofila *a* foi 1.675 mg m^3 com o pH ajustado para 9,0 e concentração de NaNO_3 de $2,5 \text{ g L}^{-1}$. A menor média obtida foi de 186 mg m^3 , com pH ajustado para 5,0 e $0,25 \text{ g L}^{-1}$ de NaNO_3 , (Figura 3.2a).

A clorofila é considerada como um reservatório de N celular, quando este elemento não está disponível no meio de cultivo, devido ao seu alto teor de N. A diminuição do teor de clorofila é descrito como uma resposta geral a privação de N em meio de cultivo em cultivos de clorófitas (LI et al., 2008; PRUVOST et al., 2009; SOLOVCHENKO et al., 2011; ÖRDÖG et al., 2012).

O aumento do teor de NaNO_3 no meio de cultivo se obteve maiores concentrações de clorofila *a* e carotenoides. Esta relação também foi observada por (URRETA et al., 2014), ao avaliar o efeito de doses de KNO_3 nas concentrações de 3,0 a 9,0 mmol, da intensidade luminosa e suplementação de C no cultivo da microalga *Neochloris oleoabundans* em meio *Bold Basal Medium*. Esses autores

observaram maiores quantidades de carotenoides em relação ao teor de clorofila, utilizando $400 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de radiação luminosa e fornecimento de CO_2 em seus cultivos. Fato este não verificado no presente trabalho.

Na superfície de resposta obtida para a porcentagem de clorofila *a* na biomassa seca produzida (Figura 3.2b), a menor porcentagem foi $0.30 \pm 0.03\%$, obtida no tratamento com pH 5,0 e concentração de NaNO_3 de $0,25 \text{ g L}^{-1}$, e as menores médias para densidade óptica e contagem de células no 14º dia de cultivo (Tabela 3.1 e Figura 3.1).

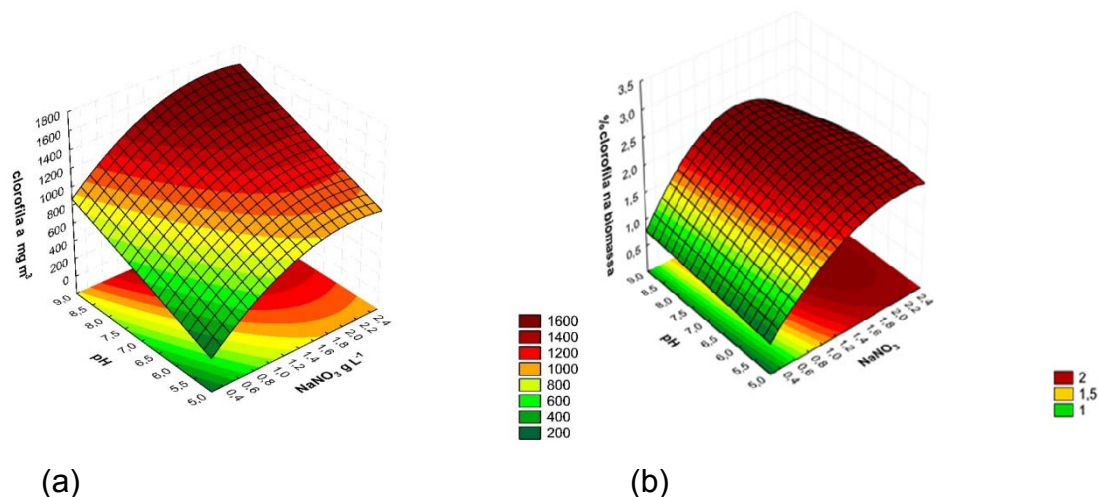
A análise estatística dos resultados para porcentagem de clorofila *a* na biomassa seca, possui efeito significativo para as duas variáveis estudadas, $\text{NaNO}_3 \text{ g L}^{-1}$ e pH, e a interação entre os dois fatores foi significativa, a falta de ajuste experimental foi não significativa, e o coeficiente de determinação ($R^2=0,93$).

A equação que descreve a superfície de resposta foi:

$$\hat{z} = 0,18 + 0,48x - 0,19x^2 - 0,0002y^2 + 0,23xy - 0,007x^2y^2.$$

onde: \hat{z} = % de clorofila, x = concentração de NaNO_3 , y = pH

Figura 3.2- Superfície de resposta para o teor de clorofila *a* (a) e porcentagem de clorofila *a* na biomassa (b), com doses NaNO_3 e diferentes ajustes do pH, no 14º dia de cultivo de *N. oleoabundans*.



No caso dos carotenoides totais ocorreu efeito significativo para as duas variáveis estudadas, $\text{NaNO}_3 \text{ g L}^{-1}$ e pH e falta de ajuste experimental não foi significativo, e o coeficiente de determinação ($R^2=0,95$). Sendo o máximo de produção estimada de carotenoides totais de $500 \mu\text{g L}^{-1}$ (Figura 3.3a).

A equação que descreve a superfície de resposta foi:

$$\hat{z} = 80,85 + 42,21x + 31,56x^2 + 0,60y + 1,23y^2.$$

Onde: \hat{z} = teor de carotenoides, x = concentração de NaNO_3 , y = pH

Castro et al. (2013) cultivaram a microalga *N. oleoabundans* em reatores de vidro, contendo 1L de meio Bold basal medium modificado, suplementado com $0,3 \text{ g L}^{-1}$ e KNO_3 , com intensidade luminosa de $400 \mu\text{mol}$ fótons, com agitação contínua e fornecimento de CO_2 , observaram em seus experimentos 2,9 % de carotenoide na biomassa seca, sendo este 3,2 vezes superior quando comparados aos resultados obtidos (Figura 3.3b).

Os resultados neste estudo demonstram que a microalga *N. oleoabundans* pode ser considerada como uma fonte de carotenóides naturais. Mas pesquisas estão sendo conduzidas para estudar as características morfológicas e fisiológicas com relação ao acúmulo de carotenóides e o efeito das condições de crescimento na produção de carotenóides (CASTRO-PUYANA et al., 2013).

A análise estatística dos resultados para porcentagem de carotenoides totais na biomassa seca possui efeito significativo para as duas variáveis estudadas, $\text{NaNO}_3 \text{ g L}^{-1}$ e pH, e a interação entre os dois fatores foi significativa, a falta de ajuste experimental não foi significativa, e o coeficiente de determinação ($R^2 = 0,94$).

A equação que descreve a superfície de resposta foi:

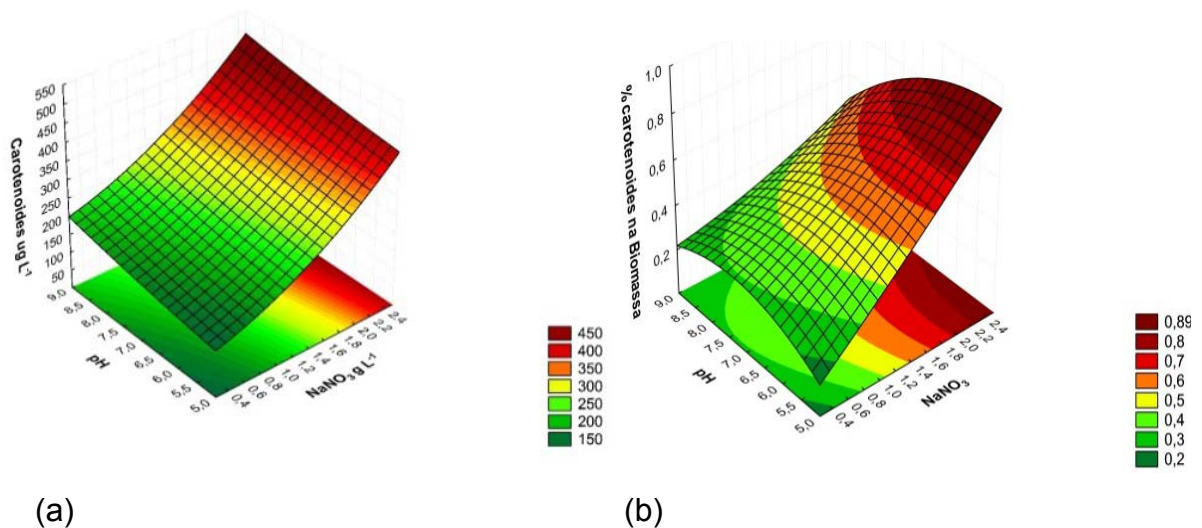
$$\hat{z} = -1,34 + 0,60x + 0,41y - 0,02y^2 - 0,06xy + 0,002x^2y.$$

Onde: \hat{z} = % de carotenoides, x = concentração de NaNO_3 , y = pH

Relacionando a produção de carotenoides $\mu\text{g L}^{-1}$ com a biomassa seca g L^{-1} , as maiores porcentagens ocorreram nos tratamentos com $2,5 \text{ g L}^{-1}$ de NaNO_3 e pH 5,0 ($0,91 \pm 0,01$ %) e no tratamento com $2,5 \text{ g L}^{-1}$ de NaNO_3 e pH 7,0 ($0,81 \pm 0,09$ %) (Figura 3.3b).

A relação inversa entre os teores de carotenoides e clorofila *a*, onde os valores de clorofila *a* foram superiores ao valor de carotenoides no cultivo da microalga *Neochloris oleoabundans* (PRUVOST et al., 2009) demonstram que em todos os seus experimentos, que valores de pigmentos abaixo de 0,5% da biomassa comprometem o crescimento da microalga.

Figura 3.3- Superfície de resposta para o teor de carotenoides totais ($\mu\text{g L}^{-1}$) (a) e a % de carotenoides na biomassa seca (b) da microalga *Neochloris oleoabundans* em diferentes pH e NaNO_3 no 14º dia de cultivo.



No 14º dia de cultivo, a análise estatística dos valores da análise de lipídios indicou efeito significativo para, NaNO_3 g L^{-1} e pH. A interação entre os dois fatores foi significativa, a falta de ajuste experimental não foi significativa, e o coeficiente de determinação ($R^2=0,96$).

A equação que descreve a superfície de resposta obtida foi

$$\hat{z} = -39,00 + 4,22x + 12,11x^2 + 16,70y - 0,86y^2 - 0,40xy^2 - 4,07x^2y + 0,43x^2y^2.$$

Onde: \hat{z} = teor de lipídios, x = concentração de NaNO_3 , y = pH

De acordo com a análise do teor de lipídios, verificou-se que o maior valor foi de 36% na biomassa de *N. oleoabundans* obtida nos tratamentos com pH ajustado para 9,0 e a concentração de NaNO_3 de 0,25 e 2,5 g L^{-1} , com uma produção de lipídios de 35,7 mg L^{-1} e 37,1 mg L^{-1} , respectivamente, em 14 dias de cultivo (Figura 3.4). Na concentração de 1,25 g L^{-1} de NaNO_3 ocorreu uma menor porcentagem de lipídios mesmo em pH 9,0, com 22% de lipídios na biomassa, mas nesta concentração Silva et al. (2014) descreveram uma alta concentração de proteínas evidenciando que ocorre relação inversa entre a porcentagem de proteínas e lipídios (Figura 3.4). O teor de lipídios da microalga *Neochloris oleoabundans* pode variar entre 35- 54% do peso seco de células, de acordo com a

composição do meio de cultivo e a concentração de nitrogênio disponível (TORNABENE et al., 1983).

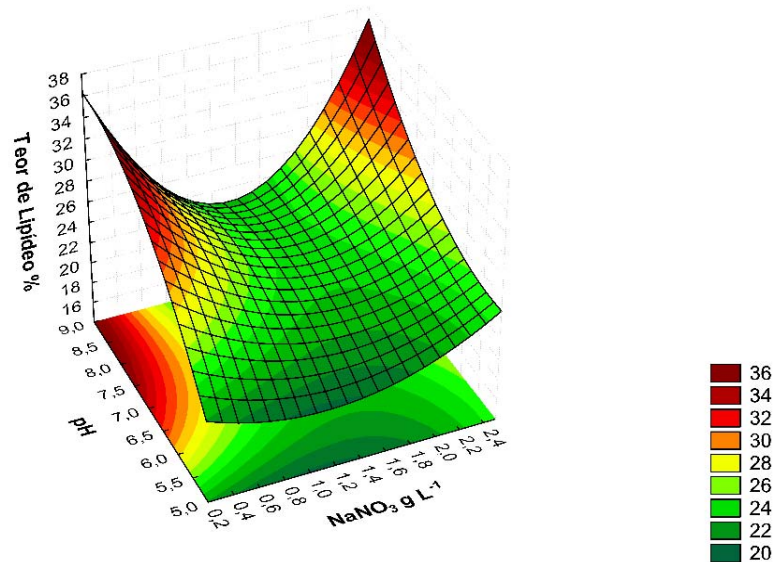
O teor de lipídios foi influenciado, principalmente, pelo pH e pela concentração da fonte de NO_3^- no meio de cultivo, nas microalgas *Scenedesmus* sp. e *Coelastrella* sp. Após o consumo do NO_3^- pelas células e o esgotamento deste nutriente no meio de cultura, combinado com o pH elevado ocorreu a maior acumulação de triacilglicerol, especialmente em sistemas tamponados (GARDNER et al., 2011).

A microalga *N. oleoabundans* foi cultivada em meio Bristol, nas temperaturas de 26 e 30 °C, por 18 dias, com e sem suplementação de nitrato. A produção de lipídios foi maior em 26 °C com adição de nitrato, 38,8 mg L⁻¹ dia⁻¹, e menor em 26 °C sem adição de nitrato, 10,7 mg L⁻¹ dia (GOUVEIA et al., 2009).

O teor de lipídios da microalga *N. oleoabundans* HK-129 é influenciado pela concentração de NaNO_3 em meio de cultivo, principalmente, a falta desse nutriente no final do período de cultivo, podendo incrementar o teor de lipídios na biomassa (SUN et al., 2014). Esses autores cultivaram a microalga em meio Basal Se e atingiram um porcentual de 27% de lipídios na biomassa seca.

Gouveia e Oliveira (2009) cultivaram *Neochloris oleoabundans* (UTEX # 1185, USA), durante 4 meses, e avaliaram a densidade óptica, biomassa seca e teor de lipídios. Foram realizadas várias colheitas neste período de cultivo e a produção máxima da microalga *N. oleoabundans* foi de 2 g L⁻¹ de biomassa, a produção diária foi de 0,09 g L⁻¹ dia e 29% de lipídios na biomassa.

Figura 3.4- Superfície de resposta para os resultados da análise de lipídios em % dos tratamentos experimentais com variação do pH e NaNO_3 no 14º dia de cultivo.



Os espectros de RMN de ^1H podem ser visualizados na figura 3.5. A análise físico-química do extrato lipídico de microalgas, nos tratamentos com o pH do meio de cultivo ajustado para 9,0 e a concentração de NaNO_3 de $0,25 \text{ g L}^{-1}$ (amostra 1) e no tratamento com pH do meio de cultivo ajustado para 9,0 e a concentração de NaNO_3 de $2,5 \text{ g L}^{-1}$ (amostra 2) são apresentados na Tabela 3.3. Nestes resultados é possível visualizar que na amostra 2 o peso molecular dos ácidos graxos é semelhante ao óleo de soja bruto (REDA et al., 2010), já na amostra 1 o valor foi superior (Tabela 3.3).

O índice de saponificação é definido como o número de miligramas de (KOH) necessário para saponificar um grama de óleo ou gordura, foi possível verificar semelhança dos tratamentos estudados quando comparados com óleo de soja bruto (REDA et al., 2010)

O índice de Iodo reflete o grau de insaturação das amostras, os valores obtidos nos tratamentos 3 ($0,25$ de NaNO_3 e pH 9,0) e 9 ($2,5$ de NaNO_3 e pH 9,0), foram de 172,2 e 153,9 respectivamente, foram superiores a 118,5 do óleo de soja (REDA et al., 2010) (Tabela 3.3). Quanto maior o índice de Iodo, maior é o grau de insaturação, ou seja, um aumento do número de ligações duplas entre os ácidos graxos. Este índice evidencia a quantidade de iodo em gramas que é consumida por

100 g de amostra sob determinada condição (KUMAR et al., 2012). Quanto maior for o índice de insaturação em óleos vegetais, como em ácidos graxos monoinsaturados e poliinsaturados, maior é a tendência a alterações oxidativas. O grau de insaturação do óleo tem sido considerado como um dos fatores mais importantes na caracterização físico química de óleos, devido à distinta reatividade dos ácidos graxos insaturados, como resultado das alterações químicas ocorre o aumento dos ácidos graxos livres, compostos carbonílicos, produtos de alto peso molecular, diminuição das instaurações, entre outras (CORSINI et al., 2008).

O lipídio obtido da biomassa da microalga *Neochloris oleoabundans* possui algumas características físico- químicas semelhantes ao óleo de soja bruto. É necessário o pré- tratamento deste lipídio para ser utilizado para produção de biodiesel ou para outras finalidades.

Figura 3.5- Espectros de RMN de ^1H , dos lipídios extraídos da biomassa de *N. oleoabundans* que foi cultivada com (a) $0,25 \text{ g L}^{-1}$ de NaNO_3 (Amostra 1) e (b) $2,5 \text{ g L}^{-1}$ de NaNO_3 (Amostra 2) em pH 9,0.

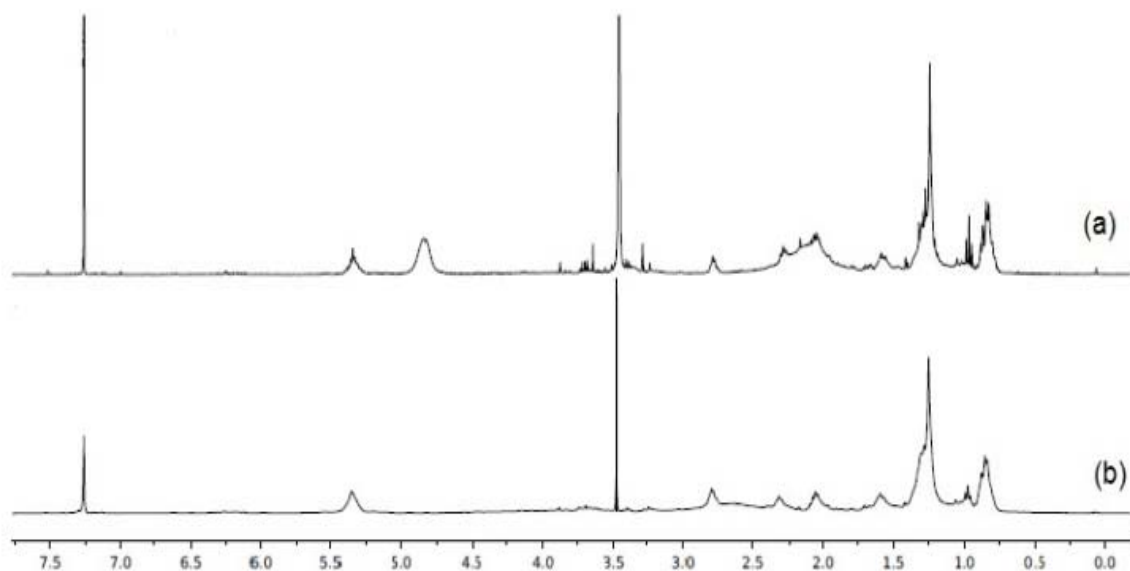


Tabela 3.3- Análise físico- química dos lipídios extraídos da biomassa de *N. oleoabundans* que foi cultivada com 0,25 g L⁻¹ de NaNO₃ (Amostra 1) e 2,5 g L⁻¹ de NaNO₃ (Amostra 2) em pH 9,0 e do óleo de soja bruto.

Variáveis	Óleo de soja Bruto**	Amostra 1*	Amostra 2*
MW- peso molecular	870,2	896,6	875,1
Índice de iodo	118,5	172,2	153,9
Índice de saponificação	195	187,0	192,1
Índice de Acidez livre	1,5	0,7	0,9

*valores calculados a partir dos dados de RMN de ¹H dos espectros integrados de acordo com (CARNEIRO et al., 2005).

** Resultados publicados por (REDA et al., 2010)

3.6 CONCLUSÕES

Em todas as concentrações de NaNO_3 , há maior produção de biomassa seca da microalga *N. oleoabundans* ocorreu onde o pH do meio de cultivo foi ajustado para 9,0.

A maior produção de pigmentos ocorreu no meio de cultivo com $2,5 \text{ g L}^{-1}$ de NaNO_3 . A concentração de NaNO_3 afeta o crescimento da microalga *N. oleoabundans*, produzindo maior teor de lipídeos onde o pH do meio de cultivo foi ajustado para 9.0.

Os lipídios extraídos da biomassa seca da *N. oleoabundans* têm características físico- químicas que o tornam passível de substituir o óleo de soja na produção de biocombustíveis.

3.7 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS

BALDISSEROTTO, C.; GIOVANARDI, M.; FERRONI, L. ; PANCALDI, S. Growth, morphology and photosynthetic responses of *Neochloris oleoabundans* during cultivation in a mixotrophic brackish medium and subsequent starvation. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.36, n.2, p.461-472, 2014.

BARTLEY, M. L.; BOEING, W. J.; DUNGAN, B. N.; HOLGUIN, F. O. ; SCHAUB, T. pH effects on growth and lipid accumulation of the biofuel microalgae *Nannochloropsis salina* and invading organisms. **Journal of Applied Phycology**, v.26, n.3, p.1431-1437, 2014.

BLIGH, E. G. ; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v.37, n.8, p.911-917, 1959.

BOLD, H. C. The morphology of *Chlamydomonas chlamydogama* sp. nov. Bul. **Bull Torrey Botanical Club**, p.76- 101, 1949.

BRAUN, S.; KALINOWSKI, H.-O. ; BERGER, S. 150 and More Basic NMR Experiments: A Practical Course Weinheim, Germany: Wiley–VCH. 2000. 129 p.

CAI, T.; PARK, S. Y. ; LI, Y. B. Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: Status and prospects. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, v.19, p.360-369, 2013.

CARNEIRO, P. I. B.; REDA, S. Y. ; CARNEIRO, E. B. B. ¹H NMR Characterization of Seed Oils from Rangpur Lime (*Citrus limonia*) and “Sicilian” Lemon (*Citrus limon*). **Annals of Magnetic Resonance**, v.4, p.64-68, 2005.

CASTRO-PUYANA, M.; HERRERO, M.; URRETA, I.; MENDIOLA, J.; CIFUENTES, A.; IBÁÑEZ, E. ; SUÁREZ-ALVAREZ, S. Optimization of clean extraction methods to isolate carotenoids from the microalga *Neochloris oleoabundans* and subsequent chemical characterization using liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.405, n.13, p.4607-4616, 2013.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, v.25, n.3, p.294-306, 2007.

CORSINI, M. D. S.; JORGE, N.; MIGUEL, A. M. R. D. O. ; VICENTE, E. Perfil de ácidos graxos e avaliação da alteração em óleos de fritura. **Química Nova**, v.31, p.956-961, 2008.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia (UFLA)**, v. 35, n.6, p. 1039-1042, 2011.

GARDNER, R.; PETERS, P.; PEYTON, B. ; COOKSEY, K. Medium pH and nitrate concentration effects on accumulation of triacylglycerol in two members of the *chlorophyta*. **Journal of Applied Phycology**, v.23, n.6, p.1005-1016, 2011.

GEORGIANNA, D. R. ; MAYFIELD, S. P. Exploiting diversity and synthetic biology for the production of algal biofuels. **Nature**, v.488, n.7411, p.329-335, 2012.

GIOVANARDI, M.; FERRONI, L.; BALDISSEROTTO, C.; TEDESCHI, P.; MAIETTI, A.; PANTALEONI, L. ; PANCALDI, S. Morphophysiological analyses of *Neochloris oleoabundans* (Chlorophyta) grown mixotrophically in a carbon-rich waste product. **Protoplasma**, p.250:161–174, 2012.

GOUVEIA, L.; MARQUES, A.; DA SILVA, T. ; REIS, A. *Neochloris oleoabundans* UTEX #1185: a suitable renewable lipid source for biofuel production. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v.36, n.6, p.821-826, 2009.

GOUVEIA, L. ; OLIVEIRA, A. C. Microalgae as a raw material for biofuels production. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v.36, n.2, p.269-274, 2009.

KHALIL, Z.; ASKER, M.; EL-SAYED, S. ; KOBBA, I. Effect of pH on growth and biochemical responses of *Dunaliella bardawil* and *Chlorella ellipsoidea*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.26, n.7, p.1225-1231, 2010.

KUMAR, R.; BANSAL, V.; PATEL, M. B. ; SARPAL, A. S. 1H Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Determination of the Iodine Value in Biodiesel Produced from Algal and Vegetable Oils. **Energy & Fuels**, v.26, n.11, p.7005-7008, 2012.

LI, Y.; HORSMAN, M.; WANG, B.; WU, N. ; LAN, C. Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochloris oleoabundans*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.81, n.4, p.629-636, 2008.

LORENZEN, C. J. Determination of chlorophyll and phaeophytin: spectrophotometric equations. **Limnology and Oceanography**, v.12, p.343-346, 1967.

LOURENÇO, S. O. Cultivo de microalgas marinhas- princípios e aplicações **Rima**, 2006.

MULITERNO, A.; MOSELE, P. C.; COSTA, J. A. V.; HEMKEMEIER, M.; BERTOLIN, T. E. ; COLLA, L. M. Cultivo mixotrófico da microalga *Spirulina platensis* em batelada alimentada. **Ciência e Agrotecnologia, Lavras**, v.29, 2005.

ÖRDÖG, V.; STIRK, W.; BÁLINT, P.; VAN STADEN, J. ; LOVÁSZ, C. Changes in lipid, protein and pigment concentrations in nitrogen-stressed *Chlorella minutissima* cultures. **Journal of Applied Phycology**, v.24, n.4, p.907-914, 2012.

PARK, K. C.; WHITNEY, C.; MCNICHOL, J. C.; DICKINSON, K. E.; MACQUARRIE, S.; SKRUPSKI, B. P.; ZOU, J. T.; WILSON, K. E.; O'LEARY, S. J. B. ; MCGINN, P. J. Mixotrophic and photoautotrophic cultivation of 14 microalgae isolates from Saskatchewan, Canada: potential applications for wastewater remediation for biofuel production. **Journal of Applied Phycology**, v.24, n.3, p.339-348, 2012.

PARSONS, T. R. ; STRICKLAND, J. D. H. Discussion of spectrophotometric determination of marine plant pigments, with revised equations for ascertaining chlorophylls and carotenoids. **Journal of Marine Research**, v.21, n.3, p.155-163, 1963.

PAWLOWSKI, A.; MENDOZA, J. L.; GUZMÁN, J. L.; BERENGUEL, M.; ACIÉN, F. G. ; DORMIDO, S. Effective utilization of flue gases in raceway reactor with event-based pH control for microalgae culture. **Bioresource Technology**, v.170, n.0, p.1-9, 2014.

POPOVICH, C. A.; DAMIANI, C.; CONSTENLA, D.; MARTÍNEZ, A. M.; FREIJE, H.; GIOVANARDI, M.; PANCALDI, S. ; LEONARDI, P. I. *Neochloris oleoabundans* grown in enriched natural seawater for biodiesel feedstock: Evaluation of its growth and biochemical composition. **Bioresource Technology**, v.114, n.0, p.287-293, 2012.

PRUVOST, J.; VAN VOOREN, G.; COGNE, G. ; LEGRAND, J. Investigation of biomass and lipids production with *Neochloris oleoabundans* in photobioreactor. **Bioresource Technology**, v.100, n.23, p.5988-5995, 2009.

REDA, S. Y.; COSTA, B. J.; FREITAS, R. J. S. D.; VILLALBA, J. C. ; ANAISSI, F. J. Avaliação Termoanalítica do Isobutirato Acetato de Sacarose como Antioxidante em Biodiesel. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v.31, n.2, p.157-164, 2010.

RICHMOND, A. Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phyecology. **Blackwell Science Ltd**, 2004.

RYCKEBOSCH, E.; MUYLAERT, K. ; FOUBERT, I. Optimization of an Analytical Procedure for Extraction of Lipids from Microalgae. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v.89, n.2, p.189-198, 2012.

SILVA, H. R.; PRETE, C. E. C.; ZAMBRANO, F.; MELLO, V. H.; TISCHER, C. A. ; ANDRADE, D. S. Combining glucose and sodium acetate improves the growth of *Neochloris oleoabundans* under mixotrophic conditions. **AMB Express**, v.6, n.1, p.1-11, 2016.

SOLOVCHENKO, A. E.; CHIVKUNOVA, O. B. ; MASLOVA, I. P. Pigment composition, optical properties, and resistance to photodamage of the microalga *Haematococcus pluvialis* cultivated under high light. **Russian Journal of Plant Physiology**, v.58, n.1, p.9-17, 2011.

STATSOFT, I. Statistica (data analysis software system), version 7. 2007.

SUN, X.; CAO, Y.; XU, H.; LIU, Y.; SUN, J.; QIAO, D. ; CAO, Y. Effect of nitrogen-starvation, light intensity and iron on triacylglyceride/carbohydrate production and fatty acid profile of *Neochloris oleoabundans* HK-129 by a two-stage process. **Bioresource Technology**, v.155, p.204-212, 2014.

TORNABENE, T. G.; HOLZER, G.; LIEN, S. ; BURRIS, N. Lipid composition of the nitrogen starved green alga *Neochloris oleoabundans*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.5, n.6, p.435-440, 1983.

URRETA, I.; IKARAN, Z.; JANICES, I.; IBAÑEZ, E.; CASTRO-PUYANA, M.; CASTAÑÓN, S. ; SUÁREZ-ALVAREZ, S. Revalorization of *Neochloris oleoabundans* biomass as source of biodiesel by concurrent production of lipids and carotenoids. **Algal Research**, v.5, p.16-22, 2014.

WAN, C.; ALAM, M. A.; ZHAO, X.-Q.; ZHANG, X.-Y.; GUO, S.-L.; HO, S.-H.; CHANG, J.-S. ; BAI, F.-W. Current progress and future prospect of microalgal biomass harvest using various flocculation technologies. **Bioresource Technology**, v.184, n.0, p.251-257, 2015.

4 ARTIGO B: MÉTODO DE COLHEITA E SECAGEM DA BIOMASSA DA MICROALGA *Neochloris oleoabundans* CULTIVADA EM TANQUES ABERTOS

4.1 RESUMO

As microalgas fazem parte de um grupo de microrganismos que produzem biomassa com alto valor biotecnológico. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos dos métodos de colheita e secagem da biomassa no teor de lipídios da microalga *Neochloris oleoabundans* cultivada em tanque aberto. O cultivo da microalga *N. oleoabundans* (UTEX#1185) foi conduzido por nove dias, em tanques com capacidade 1.500 L e 3.000 L. O meio de cultivo foi preparado com sais hidropônicos e suplementado com levedura. O experimento seguiu arranjo fatorial 3x5, sendo o fator A os métodos de colheita (centrifugação, floculação com FLONEX®, floculação com TANFLOC SL®, Indução a pH 11,0 e floculação com amido de mandioca catiônico®) e fator B (secagem da biomassa em estufa a 60°, liofilização, e extração de lipídios na biomassa úmida). A extração dos lípidios totais foi realizada pelo método descrito por Bligh Dyer. A densidade óptica média dos cultivos foi de 1,28 e a produção de biomassa seca de 0,65 g L⁻¹ e pH de 7,19 em 9 dias de cultivo. Tanto para as formas de secagem quanto para as formas de colheita foram observadas diferenças significativas para a porcentagem de lipídios totais na biomassa. O maior percentual de lipídios extraídos foi observado na biomassa liofilizada e na seca em estufa. Na biomassa úmida os maiores percentuais de lipídios foram extraídos com o método de centrifugação e floculação com FLONEX® e TANFLOC SL®. Os menores valores de lipídios totais foram obtidos da biomassa colhida com a indução alcalina do pH. O método de extração diretamente na biomassa úmida apresentou os menores percentuais de lipídios. Conclui-se que, os métodos de colheita e de preparo da biomassa da *N. oleoabundans* influenciam a quantidade do lipídio total extraído.

Palavras-chave: Amido de mandioca catiônico. Floculação. Liofilização. Óleo.

HARVESTING METHOD AND DRYING THE BIOMASS OF MICROALGAE *Neochloris oleoabundans* GROWN IN OPEN PONDS

4.2 ABSTRACT

Microalgae are part of one the most prominent group of microorganisms producing biomass with high biotechnological value. The aim of this study was to evaluate the effect of the methods of harvesting and drying of biomass in the lipid content of microalgae *Neochloris oleoabundans* cultivated in open tanks. The cultivation of microalgae *N. oleoabundans* (UTEX # 1185) was conducted for nine days in tanks with 1,500 L and with 3,000 L. The medium was prepared with hydroponic salts supplemented with yeast extract. The experiment was a factorial 3x5, with the factor A the harvesting methods (centrifugation, flocculation with FLONEX®, flocculation with TANFLOC SL®, induction at pH 11.0 and flocculation with cationic starch of cassava®) and factor B (biomass drying in an oven at 70°, lyophilization, and extraction of lipids in the wet biomass). The extraction of the total was performed by the method described by Bligh Dyer. The average optical density of the cultures was 1.28 and the biomass dry weight of 0.65 g L⁻¹ and pH 7.19 in nine days of cultivation. Both forms of drying and for ways to harvest significant differences were observed to the percentage of the total lipids in the biomass. The higher percentage of extracted lipids was observed in the lyophilized biomass and oven dried. In wet biomass the highest percentages of lipids were extracted with the method of centrifugation and flocculation with FLONEX® and TANFLOC®. The lowest values were obtained for total lipid in the harvested biomass Induction alkaline pH. The extraction of lipid directly on wet biomass had the lowest percentage of lipid extraction. In conclusion, the methods of harvest and preparation of biomass produced by microalgae *N. oleoabundans* alter the amount of total lipid.

Keywords: Cationic starch of cassava. Flocculation. Lyophilization. Oil.

4.3 INTRODUÇÃO

Microalgas são microrganismos fotossintéticos, pertencentes a um grupo polifilético, onde estão incluídos microrganismos com estrutura procarionte e eucarionte (DERNER et al., 2006). A composição química das microalgas apresenta diversidade com relação ao conteúdo de carboidratos, proteínas, lipídios, pigmentos, variando de acordo com a espécie, com o meio de cultura, e com os fatores relacionados ao ambiente do cultivo (XU et al., 2006). A biomassa das microalgas possui diversas aplicações, como a produção de compostos bioativos e química fina, suplementos alimentares, na indústria farmacêutica e na produção de biocombustível (RICHMOND, 2004).

Neochloris oleoabundans é uma microalga conhecida por sua grande capacidade de acumular lipídios em sua biomassa (PRUVOST et al., 2009), podendo representar até 54% do seu peso seco (TORNABENE et al., 1983), o que a torna de grande interesse para a produção de biocombustíveis (BALDISSEROTTO et al., 2014). Atualmente, estão disponíveis várias possibilidades nos sistemas e processos de cultivo, onde o cultivo em tanques abertos apresenta grande potencial para uma produção em grande escala (FON SING et al., 2013).

Os sistemas de cultivos de microalgas em tanques abertos nos formatos denominados “raceways” são utilizados desde 1950, a fim de se produzir biomassa em maior escala, pois proporcionam a produção de grandes quantidades e viabilidade nos cultivos, pois possuem baixos custos quando comparados com foto biorreatores fechados (PAWLOWSKI et al., 2014)

Existem vários projetos sobre os sistemas em “raceway”, entretanto, esses sistemas apresentam características comuns quanto ao funcionamento e fatores a serem obedecidos visando à produção de biomassa (PAWLOWSKI et al., 2014).

O cultivo de microalgas apresenta importantes vantagens sobre outras plantas oleaginosas e sacaríneas, destinadas a produção de biocombustíveis, principalmente ao tempo de cultivo, além de apresentarem tolerância a fatores extremos (BORGES et al., 2007).

Apesar dessas vantagens, a coleta, separação e secagem de microalgas a partir de seu meio de cultivo, ainda são consideradas de difícil

execução e de alto custo, sendo estas etapas, responsáveis por aproximadamente 20 a 30% dos custos da produção de biomassa (FRANCO et al., 2013), o que pode comprometer sua produção em escala industrial (VANDAMME et al., 2011).

A colheita da biomassa de microalgas em meio de cultivo pode ser realizada por sedimentação, centrifugação, filtração, floculação ou uma combinação de flotação com floculação (WANG et al., 2008). Já a secagem pode ser realizada em estufa, por liofilização, ou mesmo por secagem ao sol (SILVA et al., 2011).

Apesar dessa ampla variedade de metodologias disponíveis para o processamento da biomassa microalgal, são poucos os estudos visando à identificação da melhor forma. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência dos métodos de colheita e secagem no teor de lipídios da biomassa da microalga *Neochloris oleoabundans* cultivada em tanque aberto.

4.4 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Instituto Agronômico do Paraná- IAPAR, no município de Londrina-PR (lat. 23°08'47"S, long. 51°19'1"W, 640 m a.s.l.). Foi utilizada a estirpe de microalga *Neochloris oleoabundans* (UTEX#1185), mantida na Coleção de microalgas do Instituto Agronômico do Paraná - IAPAR. O meio de cultivo foi preparado com sais hidropônicos (MAP- 0,19 g L⁻¹, CaCl₂- 0,025 g L⁻¹, KNO₃- 0,12 g L⁻¹, MgSO₄- 0,075 g L⁻¹, solução de micronutrientes Yara Vita[®] (11,6% de K₂O, 1,28% de S, 0,86% de Mg, 2,1% de B, 0,36% de Cu, 2,66% de Fe, 2,48% de Mn, 0,036% de Mo e 3,38% de Zn)- 0,03 g L⁻¹, enriquecido com extrato de levedura Nutribom[®] a 0,2%).

O inóculo foi preparado em sacos plásticos com capacidade de 100L, foi utilizado o meio de cultivo hidropônico, em casa de vegetação (Figura 4.1a), com as seguintes características: densidade óptica de 0,41 e biomassa seca de 0,09 g L⁻¹ e pH de 6,35. O cultivo foi realizado em duplicata, em tanques abertos com capacidade 1.500 e 3.000 L com 40 cm de profundidade (Figura 4.1b) sob agitação por bombas submersas. O cultivo foi inoculado a 10 % (v/v) e avaliado por 9 dias.

Figura 4.1- (a) Cultivo da microalga *Neochloris oleoabundans* para produção do inóculo inicial, (b) Tanques abertos para cultivo de microalgas em formato de raceway.



(a)



(b)

A determinação da biomassa seca foi realizada diariamente, durante 9 dias. Para isso, uma fração de 40 mL foi coletada e centrifugada a 11,536 g por 10 minutos, a 25,0 °C (Modelo Z383 126 HERMLE K). O pellet formado foi seco em estufa a 60 °C até a obtenção de peso constante. A análise de densidade óptica foi realizada em 670 nm em espectrofotômetro UV- visível (Genesys 10UV).

O cultivo foi fracionado em caixas plásticas com capacidade de 500 L aos 9 dias e adicionado o floculante de acordo com os tratamentos experimentais. Foram utilizados os floculantes Tanfloc SL (polímero orgânico catiônico) a 0,1 g L⁻¹ e tempo de floculação e sedimentação de 2 h, Flonex 4350 (polímero policatiônico) 0,1 g L⁻¹ tempo de floculação e sedimentação de 2 h, indução alcalina do pH (11,0) tempo de floculação e sedimentação de 12 h, amido de mandioca catiônico (Halocat 200 ou HT200) 0,3 g L⁻¹ tempo de floculação e sedimentação de 12 h e o método de centrifugação a 4075 g por 15 min.

Após a floculação o sobrenadante foi retirado e a biomassa úmida foi colhida, e parte foi encaminhada para secagem, liofilização e mantida a 4 °C em geladeira.

A eficiência de colheita em porcentagem foi determinada por meio da densidade óptica (OD) a 670 nm em espectrofotômetro UV-visível (Genesys 10UV) e calculada pela seguinte equação (BUELNA et al., 1990) com quatro repetições:

$$\text{Eficiência da colheita (\%)} = (1 - A/B) \times 100;$$

Onde: A= OD₆₇₀ do sobrenadante (amostra); B= OD₆₇₀ do cultivo

Nos resultados foram aplicados os testes estatísticos, testes de homocedasticidade de variâncias (teste de Hartley) e de normalidade (Shapiro-wilk), aplicados antes da análise de variância (ANOVA) e do teste de Tukey a 5% de probabilidade, para determinação do método mais eficiente de colheita.

Na biomassa colhida foi realizado um esquema fatorial 3X5 onde as variáveis independentes foram: (A) métodos de colheita da biomassa em meio de cultivo (centrifugação, floculação com Flonex[®], floculação com TANFLOC SL[®], indução alcalina do pH 11,5 e floculação com amido de mandioca catiônico) e (B) método de secagem da biomassa (estufa a 60°, liofilização, biomassa úmida). Em

resposta a estes fatores foi utilizada a variável dependente, a porcentagem de lipídios na biomassa.

Os métodos de secagem utilizados foram liofilização (Liofilizador Liobras L101) e secagem em estufa ventilada a 60 ° C. Após a secagem a biomassa foi macerada em cadinho de porcelana. Os tratamentos com extração de lipídios na biomassa úmida não foram macerados.

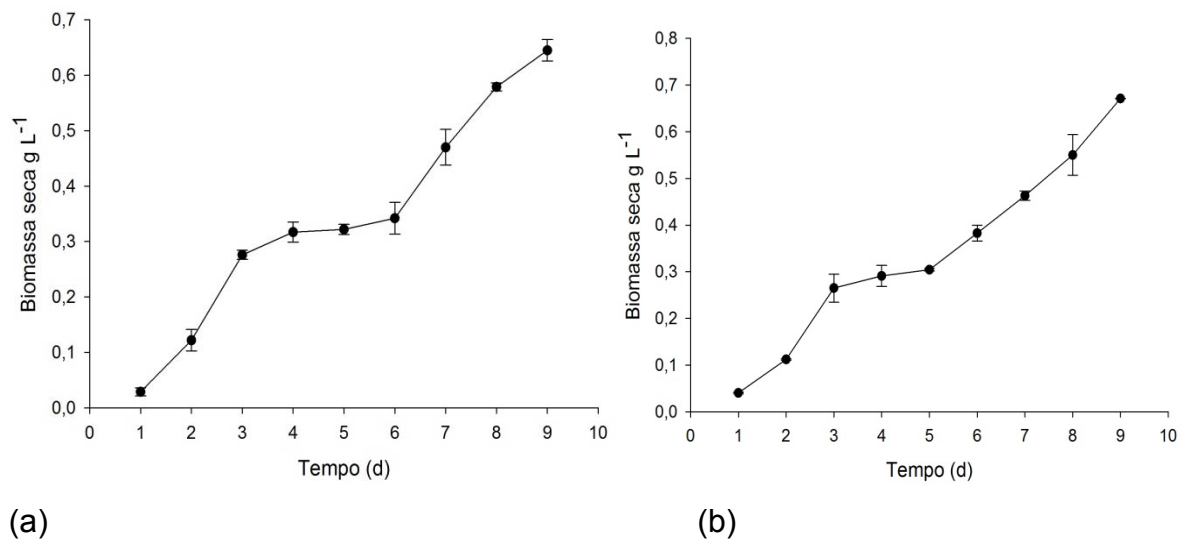
A extração dos lipídios totais ocorreu com uma amostra de 100 mg de biomassa seca, o método utilizado foi o (BLIGH; DYER, 1959) adaptado por (RYCKEBOSCH et al., 2012). Os lipídios foram extraídos com clorofórmio, metanol e água na proporção de 1: 1: 0,6, em triplicata. Para a extração de lipídios na biomassa úmida foi considerado o teor de umidade presente nas amostras estudadas.

Foi realizada a extração de lipídios utilizando o solvente n-hexano em dois aparelhos Soxhlet com capacidade de 1 L (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008), a extração ocorreu em 700 g de biomassa colhida com o floculante TANFLOC SL[®], seca em estufa a 60°. Após a extração dos lipídios da biomassa, foi determinado os teores totais de N, C, P, K, Ca, Mg, S, B, Cu, Zn, Mn. O N total foi determinado pelo método Microkjedahl, por digestão com H₂SO₄ e determinação por espectrofotometria. O carbono foi determinado por Walkey-Black. Os demais nutrientes a digestão da amostra foi com nitricoperclórico e determinação por espectrofotometria e os valores expressos em g kg⁻¹ e mg kg⁻¹ (SILVA, 2009).

4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A produção de biomassa seca g L^{-1} nos tanques abertos com capacidade de 1.500 e 3.000 L estão apresentados na Figura 4.2. O máximo da produção estimada de biomassa seca nos tanques com capacidade de 1.500 L a média foi de $0,645 \text{ g L}^{-1}$ com desvio padrão de $0,019$ no 9º dia de cultivo, a menor média foi obtida no 1º dia de cultivo foi de $0,04 \pm 0,001 \text{ g L}^{-1}$ (Figura 4.2a). Nos tanques com capacidade de 3.000 L, a maior produção de biomassa seca em g L^{-1} ocorreu no 9º dia de cultivo com valor de $0,67 \pm 0,0003 \text{ g L}^{-1}$, e o menor valor foi observado no 1º dia de cultivo com valor de $0,04 \pm 0,001 \text{ g L}^{-1}$ (Figura 4.2b).

Figura 4.2- Produção de biomassa seca em g L^{-1} da microalga *Neochloris oleoabundans* em tanques abertos com capacidade de 1.500 L (a) e 3.000 L (b) durante 9 dias.

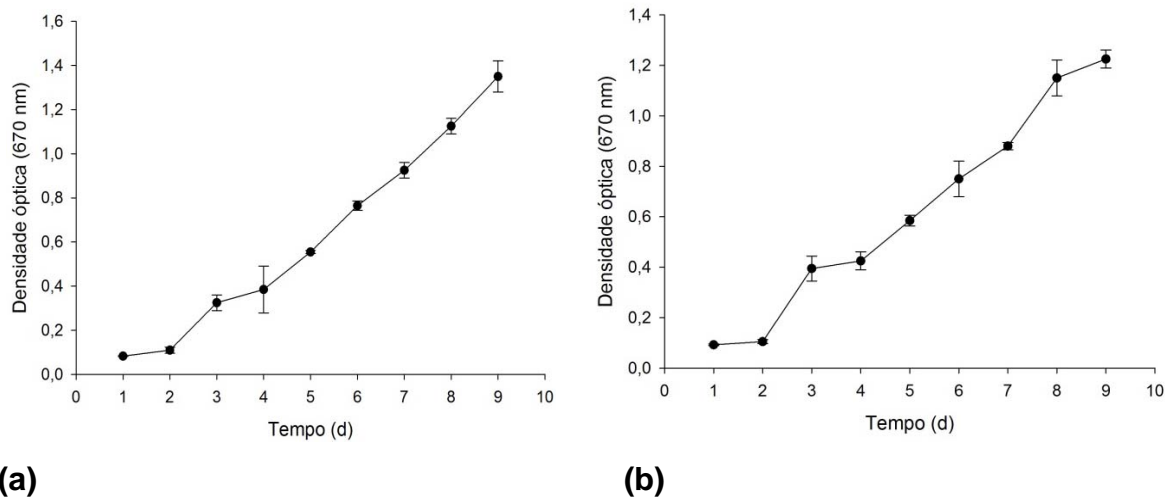


Murray et al. (2011) cultivaram a microalga *Neochloris oleoabundans* em sistema aberto, utilizando meio BG11 suplementado com CO_2 , a produção de biomassa em seus tratamentos foi de 400 mg L^{-1} em 10 dias de cultivo. SILVA et al. (2009) cultivaram de modo semicontínuo a microalga *Neochloris oleoabundans* em tanque aberto em meio Bristol, por 59 dias. A produção de biomassa no 9º dia de cultivo foi de $0,26 \text{ g L}^{-1}$ com um teor de lipídios de 10,8%. A máxima produção de biomassa ocorreu no 21º dia com $2,8 \text{ g L}^{-1}$ com 11% de teor de lipídios. Desta forma

os resultados obtidos corroboram aos dados da literatura na produção de biomassa da microalga *Neochloris oleoabundans* em tanque aberto em 9 dias de cultivo.

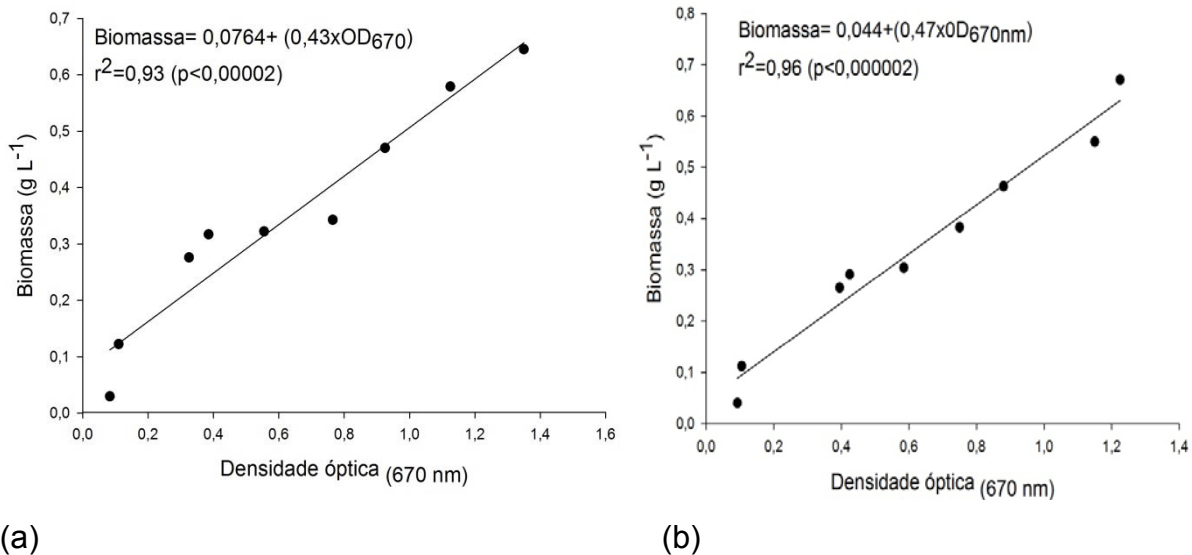
Os resultados da análise de densidade óptica podem ser visualizados na Figura 4.3. Nos tanques abertos com capacidade de 1.500 L, o maior valor obtido foi de $1,35 \pm 0,07$ de absorvância no 9º dia de cultivo e o menor valor foi obtido no 1º dia de cultivo com valor de $0,08 \pm 0,0014$ de absorvância (Figura 4.3a). Nos tanques abertos com capacidade de 3.000 L o maior valor foi obtido no 9º dia de cultivo com valor de $1,22 \pm 0,03$ absorvância e o menor valor obtido no 1º dia de cultivo com valor de $0,09 \pm 0,003$ Figura 4.3 (b).

Figura 4.3- Densidade óptica de microalga *Neochloris oleoabundans* em meio de cultivo em tanques abertos com capacidade de 1.500 L (a) e 3.000 L (b).



Foi realizada a correlação entre a produção de biomassa e a densidade óptica durante os nove dias de cultivo, assim foi obtida a seguinte equação para os resultados dos tanques abertos com capacidade de 1.500 L, $Biomassa = 0,0764 + (0,43 \cdot DO)$, com $R^2 = 0,93$, evidenciando a correlação entre as duas variáveis analisadas Figura 4.4 (a). Para os resultados nos tanques abertos com capacidade de 3.000 L foi obtida a seguinte: $Biomassa = 0,044 + (0,47 \cdot OD)$, $R^2 = 0,96$, evidenciando correlação entre as variáveis Figura 4.4 (b).

Figura 4.4- Correlação entre biomassa seca em g L^{-1} e a densidade óptica em 670 nm do cultivo da microalga *Neochloris oleoabundans* em tanques abertos com capacidade de 1.500 L (a) e 3.000L (b).



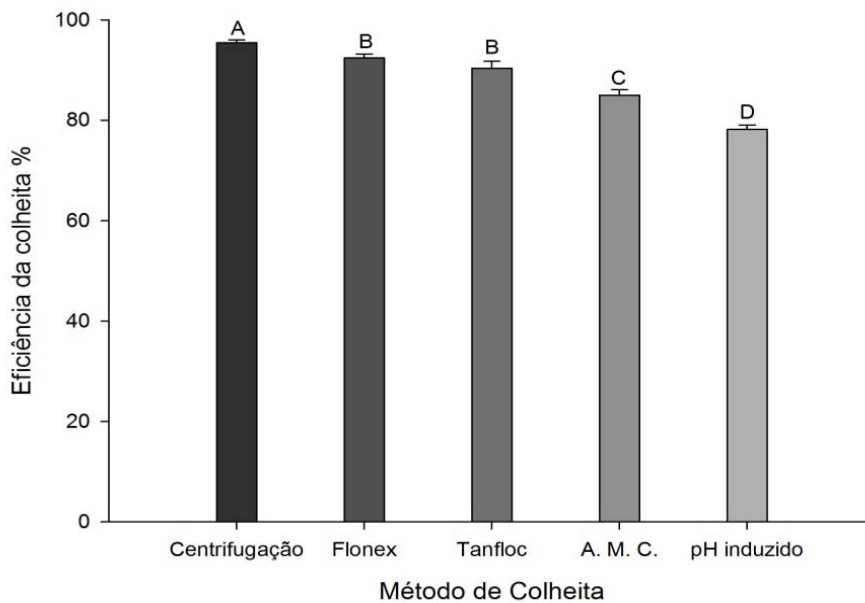
Avaliando eficiência de colheita em porcentagem ocorreu diferença significativa entre os tratamentos avaliados. O teste de Shapiro Wilk indicou normalidade dos resíduos, pois não foram significativos a 5 % ($p=0,62$). O teste de Hartley indicou a homocedasticidade de variância, pois o valor de FMAX= 1,28 foi inferior ao valor tabelado.

A centrifugação foi o método mais eficiente de colheita da microalga *N. oleoabundans* em meio de cultivo chegando a 95%. A floculação com Flonex e Tanfloc não diferiram entre si, e foi acima de 90% (Figura 4.5). A floculação é o processo de colheita de biomassa em meio de cultivo, que permite a aplicação em grande escala, com baixos custos de energia (KNUCKEY et al., 2006). Bilanovic et al. (1988) utilizaram polímeros catiônicos como floculante e a eficiência de floculação foi acima de 90% para as microalgas *Isochrysis galbana*, *Chlorella stimatophora*.

A eficiência do método de colheita por floculação com amido de mandioca catiônico foi de 85% e por indução alcalina do pH foi de 78% (Figura 4.5). Os métodos de colheita de microalgas utilizando floculantes orgânicos apresentam vantagens em relação aos floculantes inorgânicos, pois estes materiais são biodegradáveis e muitas vezes são utilizados em baixas concentrações (SINGH et

al., 2000; VANDAMME et al., 2010). Vandamme et al. (2010) utilizaram amido catiônico para flocular microalgas de água doce em meio de cultivo e obtiveram eficiência de acima de 80%. Estes dados corroboram os resultados obtidos cuja eficiência alcançada foi de 85% utilizando amido de mandioca catiônico. Richmond (2004) descreve que a eficiência de floculação é, em média, de 80% utilizando indução alcalina do pH entre 11 e 12. Vandamme et al. (2011), floculando microalgas de água doce, obtiveram resultados de eficiência de floculação acima de 75%, induzindo o pH a 11.

Figura 4.5- Eficiência da colheita em % de acordo com os tratamentos centrifugação, floculação com Flonex, Tanfloc, amido de mandioca catiônico (A.M.C) e indução alcalina (pH induzido), CV%= 1,28.



O teor de lipídios na biomassa foi influenciado pelos fatores, a colheita da biomassa em meio de cultivo como o pré-tratamento da biomassa úmida e a interação entre os fatores foi significativa. Na biomassa centrifugada ou floculada com Flonex, o maior percentual de lipídios foi observado onde ocorreu a secagem em estufa, diferindo da liofilização ou extração direta na biomassa úmida (Tabela 4.1). Quando a biomassa foi floculada, com Tanfloc SL ou amido de mandioca catiônico, o maior porcentual foi observado quando a secagem ocorreu em estufa ou

foi liofilizada. Na biomassa floculada por indução alcalina do pH, o maior percentual de lipídios foi observado na biomassa liofilizada, seguido da secagem em estufa.

Em todos os tratamentos de colheita da biomassa o menor percentual foi observado na extração direta na biomassa úmida. Considerando a biomassa liofilizada, o melhor tratamento para obter o melhor percentual de extração de lipídios, foi observado na colheita por centrifugação ou floculação com Tanfloc SL ou Flonex (Tabela 4.1). Nos tratamentos em que a biomassa foi seca em estufa, as melhores formas de colheita, foram a centrifugação ou a floculação com Flonex, diferindo dos demais tratamentos. Com a extração de lipídios direto na biomassa úmida o melhor método de colheita foi o de centrifugação. Em todas as formas de pré-tratamento da biomassa, o menor percentual de lipídios extraído foi encontrado com a indução alcalina do pH (Tabela 4.1).

Tabela 4.1- Porcentagem de lipídios da biomassa liofilizada, seca em estufa e úmida, de acordo com os métodos de colheita.

	% de lipídios				
	Método de Colheita				
Pré- Tratamento	Controle**	Flonex	Tanfloc SL	pH induzido	A.M.C*
Liofilizado ***	23,40 Ab	22,07 BCb	22,45 ABa	18,94 Da	21,16 Ca
Seco estufa ***	24,55 Aa	23,92 Aa	22,32 Ba	14,19 Db	20,33 Ca
Biomassa úmida	9,10 Ac	7,82 Bc	6,07 Cb	4,20 Dc	6,30 Cb

Coefficiente de variação (CV)%= 3,14

*A.M.C- Amido de mandioca Catiônico

** Controle- centrifugação

*** Amostras maceradas antes da extração de lipídios

(1) Médias seguidas pela letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Floculantes orgânicos possuem vantagens com relação a outros floculantes químicos principalmente por não ser tóxico, não corrosivo e seguro para manuseio. Outras vantagens é ser biodegradável e possuir propriedades importantes de adsorção, habilidade floculante e polieletrólítica, adicionalmente pode ser recuperada em diversas aplicações (KUMAR, 2000).

A concentração do floculante pode influenciar no teor de lipídios, visto que dependendo da solubilidade do floculante em cultivo, este pode sedimentar

e aderir a biomassa coletada. O processo de colheita nos cultivos de microalgas é um fator importante e influencia o custo e a qualidade dos produtos finais (LEE et al., 1998).

Borges et al. (2011) analisaram o efeito dos flocculantes no teor e composição de ácidos graxos da biomassa de *Nannochloropsis oculata* e *Thalassiosira weissflogii*. Os flocculantes usados foram Magnafloc®, Flopam® e o controle sem flocculante. As amostras de biomassa foram ultrassonicadas antes da extração dos lipídios, e nos resultados evidenciaram que o teor de lipídios não foi diferente independente dos flocculantes utilizados, em ambas espécies.

Anthony et al. (2013) avaliaram o efeito dos métodos de colheita utilizando sulfato de alumínio, amido de milho catiônico, amido de batata catiônico e o método de centrifugação sobre o teor de lipídios da biomassa úmida de *S. obliquus* e concluíram que o método de colheita mais eficiente para a extração de ésteres metílicos de ácidos graxos foi à centrifugação, mas que uma alta produção de biodiesel foi evidenciada quando se utiliza amido catiônico em relação à colheita com sulfato de alumínio. WU et al. (2015) realizaram a flocculação da microalga *Scenedesmus sp.* e *Scenedesmus obliquus* com quitosana, poliacrilamida, $Al_2(SO_4)_3$, NaOH e HNO_3 , constataram que estes métodos de colheita não afetam significativamente o teor de lipídios na biomassa liofilizada.

Florentino de Souza Silva et al. (2014) analisaram o efeito do pré-tratamento da biomassa de microalgas, e concluíram que ocorrem diferença significativa entre os tratamentos aplicados (liofilização e ultra-som, liofilização e microondas, autoclave e liofilização e eletroflotação por corrente alternada e liofilização) e com o rompimento celular pode-se aumentar a eficiência de extração de lipídios totais.

Os macro e micronutrientes na biomassa seca da microalga *Neochloris oleoabundans*, cultivada em tanque aberto em meio de hidropônico suplementado com extrato de levedura, após a extração dos lipídios são apresentados Tabela 4.2. De acordo com estes resultados evidencia-se o potencial do uso desta biomassa para formulação de ração animal, extração de compostos de interesse biotecnológico e também o uso como biofertilizantes ou bioestimulantes para agricultura, pois apresenta altos teores de nutrientes.

Tabela 4.2- Composição química de macro e micronutrientes da biomassa seca da microalga *Neochloris oleoabundans* cultivada em sistema aberto.

N	P	K	Ca	Mg	S	C	Cu	Zn	B	Mn
.....g kg ⁻¹mg kg ⁻¹			
71,7	28,6	15,1	20,7	5,7	6,3	465,2	299,9	1108,2	193,8	1051,7

4.6 CONCLUSÕES

Os métodos de colheita da biomassa em meio de cultivo e a secagem da microalga *Neochloris oleoabundans* influenciam na porcentagem de lipídios totais na biomassa. Após a colheita da microalga *N. oleoabundans*, é necessário o pré- tratamento da biomassa, pois a eficiência de extração de lipídios em biomassa úmida é inferior.

Na biomassa liofilizada, os teores de lipídios totais são semelhantes quando utilizado os métodos de colheita por centrifugação ou floculação com os floculantes Tanfloc ou Flonex.

Com a secagem da biomassa em estufa, os maiores teores de lipídios totais, se destacam quando o método de colheita foi a centrifugação ou floculação com Flonex.

Quando a biomassa é centrifugada ou floculada com Flonex, o maior teor de lipídios totais foi evidenciado na biomassa seca em estufa. Já na biomassa floculada com Tanfloc, o teor de lipídios é semelhante para secagem em estufa ou liofilização.

A biomassa de *N. oleoabundans* após a extração de lipídios apresenta alto teor de macro e micronutrientes.

4.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANTHONY, R. J.; ELLIS, J. T.; SATHISH, A.; RAHMAN, A.; MILLER, C. D. ; SIMS, R. C. Effect of coagulant/flocculants on bioproducts from microalgae. **Bioresource Technology**, v.149, p.65-70, 2013.

BALDISSEROTTO, C.; GIOVANARDI, M.; FERRONI, L. ; PANCALDI, S. Growth, morphology and photosynthetic responses of *Neochloris oleoabundans* during cultivation in a mixotrophic brackish medium and subsequent starvation. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.36, n.2, p.461-472, 2014.

BILANOVIC, D.; SHELEF, G. ; SUKENIK, A. Flocculation of microalgae with cationic polymers - Effects of medium salinity. **Biomass**, v.17, n.1, p.65-76, 1988.

BLIGH, E. G. ; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v.37, n.8, p.911-917, 1959.

BORGES, L.; MORÓN-VILLARREYES, J. A.; D'OCA, M. G. M. ; ABREU, P. C. Effects of flocculants on lipid extraction and fatty acid composition of the microalgae *Nannochloropsis oculata* and *Thalassiosira weissflogii*. **Biomass and Bioenergy**, v.35, n.10, p.4449-4454, 2011.

BORGES, L. D. V.; FARIA, B. M. D.; ODEBRECHT, C. ; ABREU, P. C. O. V. D. Potencial de absorção de carbono por espécies de microalgas usadas na aquicultura: primeiros passos para o desenvolvimento de um “mecanismo de desenvolvimento limpo”. **Atlântica**, v.29, n.1, p.35-46, 2007.

BUELNA, G.; BHATTARAL, K. K.; NOUE, J. D. L. ; TAIGANIDES, E. P. Evaluation of various flocculants for the recovery of algal biomass growth on pig-waste. **Biological Wastes**, p. 31: 211-222, 1990.

DA SILVA CARDOSO, A.; VIEIRA, G. E. G. ; MARQUES, A. K. O uso de microalgas para a obtenção de biocombustíveis. **Revista Brasileira de Biociências**, v.9, n.4, p.542, 2011.

DA SILVA, T.; REIS, A.; MEDEIROS, R.; OLIVEIRA, A. ; GOUVEIA, L. Oil Production Towards Biofuel from Autotrophic Microalgae Semicontinuous Cultivations Monitorized by Flow Cytometry. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.159, n.2, p.568-578, 2009.

DERNER, R. B.; OHSE, S.; VILLELA, M.; CARVALHO, S. M. D. ; FETT, R. Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural**, v.36, p.1959-1967, 2006.

FLORENTINO DE SOUZA SILVA, A. P.; COSTA, M. C.; COLZI LOPES, A.; FARES ABDALA NETO, E.; CARRHÁ LEITÃO, R.; MOTA, C. R. ; BEZERRA DOS SANTOS, A. Comparison of pretreatment methods for total lipids extraction from mixed microalgae. **Renewable Energy**, v.63, n.0, p.762-766, 2014.

FON SING, S.; ISDEPSKY, A.; BOROWITZKA, M. ; MOHEIMANI, N. Production of biofuels from microalgae. **Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change**, v.18, n.1, p.47-72, 2013.

FRANCO, A. L. C.; LÔBO, I. P.; CRUZ, R. S. D.; TEIXEIRA, C. M. L. L.; ALMEIDA NETO, J. A. D. ; MENEZES, R. S. Biodiesel de microalgas: avanços e desafios. **Química Nova**, v.36, p.437-448, 2013.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. **São Paulo: Instituto Adolfo Lutz**, p.1020, 2008.

KNUCKEY, R. M.; BROWN, M. R.; ROBERT, R. ; FRAMPTON, D. M. F. Production of microalgal concentrates by flocculation and their assessment as aquaculture feeds. **Aquacultural Engineering**, v.35, n.3, p.300-313, 2006.

KUMAR, M. V. V. A review of chitin and chitosan applications **Reactive & functional polymers**, v.46, p.1-27. 2000.

LEE, S. J.; KIM, S. B.; KWON, G. S.; YOON, B. D. ; OH, H. M. Effects of harvesting method and growth stage on the flocculation of the green alga *Botryococcus braunii*. **Letters in Applied Microbiology**, v.27, n.1, p.14-18, 1998.

MURRAY, K.; HEALY, F.; MCCORD, R. ; SHIELDS, J. Biomass production and nutrient uptake by *Neochloris oleoabundans* in an open trough system. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.90, n.1, p.89-95, 2011.

PAWLOWSKI, A.; MENDOZA, J. L.; GUZMÁN, J. L.; BERENGUEL, M.; ACIÉN, F. G. ; DORMIDO, S. Effective utilization of flue gases in raceway reactor with event-based pH control for microalgae culture. **Bioresource Technology**, v.170, n.0, p.1-9, 2014.

PRUVOST, J.; VAN VOOREN, G.; COGNE, G. ; LEGRAND, J. Investigation of biomass and lipids production with *Neochloris oleoabundans* in photobioreactor. **Bioresource technology**, v.100, n.23, p.5988-5995, 2009.

RICHMOND, A. Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology. **Blackwell Science Ltd**, 2004.

RYCKEBOSCH, E.; MUYLAERT, K. ; FOUBERT, I. Optimization of an Analytical Procedure for Extraction of Lipids from Microalgae. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v.89, n.2, p.189-198, 2012.

SILVA, F. C. D. Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária- Embrapa Solos**, p.627, 2009.

SINGH R, T. T., KARMAKAR G, RATH S, KARMAKAR N, PANDEY S, ; KANNAN K, J. S., LAN N. Novel biodegradable flocculants based on polysaccharides. **CURRENT SCIENCE**, v.VOL. 78, p.798–803, 2000.

TORNABENE, T.; HOLZER, G.; LIEN, S. ; BURRIS, N. Lipid composition of the nitrogen starved green alga *Neochloris oleoabundans*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.5, n.6, p.435-440, 1983.

VANDAMME, D.; FOUBERT, I.; FRAEYE, I.; MEESSCHAERT, B. ; MUYLAERT, K. Flocculation of *Chlorella vulgaris* induced by high pH: role of magnesium and calcium and practical implications. **Bioresource Technology**, n.0, 2011.

VANDAMME, D.; FOUBERT, I.; MEESSCHAERT, B. ; MUYLAERT, K. Flocculation of microalgae using cationic starch. **Journal of Applied Phycology**, v.22, n.4, p.525-530, 2010.

VANDAMME, D.; PONTES, S. C. V.; GOIRIS, K.; FOUBERT, I.; PINOY, L. J. J. ; MUYLAERT, K. Evaluation of electrocoagulation–flocculation for harvesting marine and freshwater microalgae. **Biotechnology and bioengineering**, v.108, n.10, p.2320-2329, 2011.

WANG, B.; LI, Y.; WU, N. ; LAN, C. Q. CO₂ bio-mitigation using microalgae. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.79, n.5, p.707-718, 2008.

WU, J.; LIU, J.; LIN, L.; ZHANG, C.; LI, A.; ZHU, Y. ; ZHANG, Y. Evaluation of several flocculants for flocculating microalgae. **Bioresource Technology**, v.197, p.495-501, 2015.

XU, H.; MIAO, X. ; WU, Q. High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. **Journal of Biotechnology**, v.126, n.4, p.499-507, 2006.

5 ARTIGO C: OTIMIZAÇÃO DO MEIO DE CULTIVO MIXOTRÓFICO PARA PRODUÇÃO DE LIPÍDIOS, PROTEÍNAS E BIOMASSA DA *Neochloris oleoabundans*

5.1 RESUMO

A biomassa de microalgas apresenta grande potencial como matéria prima para produção de biocombustíveis renováveis e uma das alternativas para aumentar sua produtividade é a forma de nutrição mixotrófica. Assim, os objetivos deste trabalho foram otimizar o meio de cultivo mixotrófico para o crescimento da microalga *Neochloris oleoabundans* e caracterizar os produtos da biomassa obtida deste meio BBM (*Bold Basal Medium*) otimizado pela suplementação com extrato de levedura. O experimento foi orientado em esquema fatorial completo composto por dois fatores e três níveis, com três repetições. Os fatores estudados foram diluição do meio BBM (20, 60 e 100%), e as doses de extrato de levedura (1,0; 6,0 e 11,0 g L⁻¹). O fator diluição do meio BBM não apresentou diferenças significativas. A maior produção de biomassa seca foi de 5 g L⁻¹ e a densidade óptica de 8,0 a 670 nm, em meio BBM suplementado com 11 g L⁻¹ de extrato de levedura. Os teores de clorofilas *a* e *b* e carotenoides total foram de 25,9±0,4 mg L⁻¹; 6,78±0,6 mg L⁻¹ e 8,45±0,21 mg L⁻¹, respectivamente. O teor de lipídios na biomassa foi de 35% e o N total de 4,6%. De acordo com a caracterização física química por RMN de ¹H foram calculados o peso molecular, índice de iodo e índice de saponificação dos lipídios totais e observou-se semelhança quando comparado ao óleo de soja bruto. A microalga *Neochloris oleoabundans* apresenta maior produtividade de biomassa no meio de cultivo otimizado com extrato de levedura e o possui alto teor de lipídios na biomassa com características físico química semelhante ao óleo de soja bruto, podendo assim ser matéria prima para produção de biocombustíveis ou outras aplicações biotecnológicas.

Palavras-chave: Bold Basal Médio. Extrato de levedura. Microalgas. Chlorophyta. RMN.

OPTIMIZATION OF THE CULTURE MEDIUM MIXOTROPHIC FOR THE PRODUCTION OF LIPIDS, PROTEINS AND BIOMASS *Neochloris oleoabundans*

5.2 ABSTRACT

The biomass of microalgae has great potential as a feedstock for production of renewable biofuels, one of the alternatives to increase productivity is the form of nutrition mixotrophic. The objectives of this study were to optimize a medium of mixotrophic cultivation for the growth of microalgae *Neochloris oleoabundans* and characterization biomass products obtained this medium BBM (*Bold Basal Medium*) optimized by supplementation with yeast extract. The experiment was oriented schema full factorial comprised two factors and three levels with three replications. The factors studied were dilution medium BBM (20, 60 e 100%) and yeast extract doses (1.0; 6.0 e 11.0 g L⁻¹). The dilution factor of BBM medium no significant differences. The largest production of dry biomass was 5 g L⁻¹ and optical density 8.0 the 670 nm in medium BBM supplemented with 11 g L⁻¹ yeast extract. The content of chlorophyll *a* and *b* and the total carotenoid were 25.9±0.4 mg L⁻¹; 6.78±0.6 mg L⁻¹ and 8.45±0.21 mg L⁻¹, respectively. The lipid content in biomass was 35% and N total of 4,6%. According to the physical chemical characterization by 1H NMR were calculated molecular weight, iodine value and saponification value of the total lipid and similarly observed when compared to crude soybean oil. The microalgae *Neochloris oleoabundans* has higher biomass productivity in the optimized medium with yeast extract and has a high lipid content in biomass with physicochemical characteristics similar to crude soybean oil, and thus can be the raw material for the production of biofuels or other applications biotechnological.

Keywords: Bold Basal Medium. Yeast extract. Microalgae. Chlorophyta. NMR.

5.3 INTRODUÇÃO

As microalgas são produtoras de biomassa que apresentam grande potencial para produção de biocombustíveis renováveis. Esses, por sua vez, são fontes promissoras de energia que poderão garantir o abastecimento de combustíveis líquidos no futuro (CERÓN-GARCÍA et al., 2013).

As microalgas de interesse para a produção de biocombustíveis integram um universo de microrganismos fotossintetizantes aquáticos ou terrestres, geneticamente subdivido em eucarióticos (unicelulares ou pluricelulares) e procarióticos (Eubactérias e Arqueobactérias) (CHACÓN-LEE; GONZÁLEZ-MARIÑO, 2010). Estes microrganismos crescem rapidamente e vivem em condições adversas devido à sua estrutura celular simples (MATA et al., 2010). Representam uma grande variedade de espécies que vivem em vários ambientes (RICHMOND, 2004), que podem se desenvolver de forma autotrófica, heterotrófica ou mixotrófica.

O crescimento mixotrófico é equivalente às formas de nutrição, à autotrofia e a heterotrofia simultaneamente, em que ambos os compostos orgânicos e de CO₂ são necessários para o crescimento. Embora muitas espécies de microalgas são mixotróficas, mas nem todas possuem esta capacidade de crescimento.

A microalga *Neochloris oleoabundans* pertence à classe *Chlorophyceae* e família *Chlorococcaceae* presente em ambientes de água doce, tamanho de 2 a 5 µm. Em determinadas condições de cultivo, por apresentar um teor de lipídios em torno de 57%, torna-se uma espécie com alto potencial para produção de biodiesel e bioquerosene (GOUVEIA; OLIVEIRA, 2009), possui a capacidade de crescimento mixotrófico (RICHMOND, 2004; GIOVANARDI et al., 2012).

A composição bioquímica das células de microalgas é diversificada em relação ao conteúdo de carboidratos, proteínas, lipídios, etc. Atualmente esses produtos biotecnológicos têm despertado grande interesse das indústrias alimentícias, nutracêutica, farmacêutica, produção de bioenergia entre outras (SPOLAORE et al., 2006; XU et al., 2006).

Os sistemas de produção das microalgas são realizados em diversos modelos de biorreatores e tanques, utilizando diferentes fontes de radiação

e nutrientes. No entanto, nestes sistemas ainda existem dificuldades em seu desenvolvimento, pois economicamente a biomassa final produzida apresenta preços elevados. Em comparação aos preços do diesel de petróleo, o custo estimado de produção de biodiesel de microalgas é em torno de US \$ 9-25 por galão, em tanques abertos, e de US \$ 15-40, em fotobiorreatores, nos Estados Unidos (AMARO et al., 2011).

Uma opção para aumentar a produção de biomassa de microalgas e reduzir os custos é o uso de uma fonte de N e C orgânico com disponibilidade no mercado, por exemplo, o extrato de levedura. Esse composto é um suplemento nutricional muito utilizado em laboratórios para enriquecimento de meios de cultura para microrganismos. É um produto que fornece aminoácidos, vitaminas, nitrogênio e carbono, produzido pela autólise (digestão de células pelas suas próprias enzimas), hidrólise e plasmólise do microrganismo *Saccharomyces cerevisiae*. O custo do extrato de levedura em grau analítico pode variar de US \$ 150,0 a US \$ 350,0 por kg (Sigma Aldrich), mas também pode ser obtido como coproduto da produção de bioetanol e cerveja (KIGHTLINGER et al., 2014), e na região do norte do Paraná, pode ser adquirido por aproximadamente US \$ 7,20 por kg.

O objetivo deste trabalho foi avaliar e otimizar diferentes concentrações de extrato de levedura e a diluição do meio BBM no crescimento da microalga *Neochloris oleoabundans* e caracterizar a biomassa produzida.

5.4 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Instituto Agronômico do Paraná- IAPAR, localizado no município de Londrina-PR (lat. 23°08'47"S, long. 51°19'1"W, 640 m a.s.l.). A microalga utilizada foi a *Neochloris oleoabundans* (UTEX- LB 1185). O meio de cultivo utilizado foi o BBM- *Bold Basal Medium* (BOLD, 1949) conforme descrito por Silva et al. (2016). O meio BBM foi suplementado com diferentes doses de extrato de levedura (marca comercial KASVI, modelo- KG25, é um autolizado desidratado de *Saccharomyces cerevisiae*) e o pH foi ajustado para 9,0 com uma solução de KOH 0,1 M, e autoclavado a 121° C e 1,5 ATM por 30 min.

O cultivo foi conduzido em câmara de crescimento com fotoperíodo de 12 h e temperatura controlada de 28,0 ± 2,0°C, na fase luminosa, e 22,0 ± 2,0°C, na fase escura. A densidade de fluxo de fótons da radiação fotossinteticamente ativa (*PAR - photosynthetically active radiation*) foi de 100 ± 20 µE m⁻² s⁻¹ (porômetro Licor INC modelo LI-1600), utilizando quatro lâmpadas fluorescentes tubulares (65 W cada) dispostas paralelamente na parte superior dos recipientes de cultivo. Os experimentos foram conduzidos em frascos, com 250 mL de cultivo, inoculados com um cultivo da microalga *N. oleoabundans* com as seguintes características: densidade óptica a 670 nm de 0,29, biomassa seca 0,07 g L⁻¹ contagem de células, 1,38 10⁷ e pH 8,81, na concentração de 10 % v/v.

Os efeitos da concentração do extrato de levedura (X1) e da porcentagem de diluição do meio BBM (X2) foram estudados através de um planejamento fatorial 2³, contendo 3 pontos centrais, totalizando 9 tratamentos, em triplicata (Tabelas 5.1 e 5.2).

Tabela 5.1- Níveis codificados e reais das variáveis independentes, concentração de extrato de levedura (X1) e a diluição do meio BBM % (X2).

Variáveis Independentes	Níveis codificados e reais das variáveis independentes		
	-1	0	1
(X1) Extrato de levedura g L ⁻¹	1	6	11
(X2) % meio BBM	20	60	100

Tabela 5.2- Quadro de ensaios do esquema em arranjo fatorial completo para duas variáveis independentes, concentração de extrato de levedura (X1) e diluição do meio BBM % (X2).

Tratamento*	Extrato de levedura g L ⁻¹	% meio BBM
1	-1 (1)	-1 (20)
2	-1 (1)	0 (60)
3	-1 (1)	1 (100)
4	0 (6)	-1 (20)
5	0 (6)	0 (60)
6	0 (6)	1 (100)
7	1 (11)	-1 (20)
8	1 (11)	0 (60)
9	1 (11)	1 (100)

*Todos os tratamentos foram realizados com 3 repetições

Como respostas a este planejamento, as variáveis dependentes foram a densidade óptica (Y1) e a produção de biomassa seca g L⁻¹(Y2).

Foram avaliados a densidade óptica 670 nm e a biomassa seca g L⁻¹ no 5º, 10º e 15º dia de cultivo. Após a análise em esquema fatorial dos tratamentos experimentais (concentração de extrato de levedura g L⁻¹ e a diluição do meio BBM%), a concentração ideal de extrato de levedura foi 11 g L⁻¹ e o BBM a 100%, e o pH ajustado para 9,0 com KOH, e autoclavado a 121º C, 1,5 ATM por 30 min.

Para a validação da concentração ideal do meio BBM suplementado com extrato de levedura, foi conduzido um cultivo da microalga *Neochloris oleoabundans*, em frasco de vidro, contendo 900 mL de cultivo, em triplicata, que foi inoculado a 10 % v/v, com um inóculo que apresentava as seguintes características: contagem de células 4,1 10⁷ cel mL⁻¹, biomassa seca 0,87 g L⁻¹, densidade óptica a 670 nm 1,30 e pH 8,82. O ambiente de cultivo foi o mesmo descrito anteriormente; o período de cultivo foi de 15 dias. Foram analisados a densidade óptica 670 nm, a biomassa seca g L⁻¹, o pH, a contagem de células, os teores de clorofila a, b e carotenoides totais, a % N total, a conversão do N total em proteínas, o teor lipídios totais e a caracterização físico- química do lipídio total.

As análises da densidade óptica foram realizadas em espectrofotômetro UV-visível a 670 nm (Genesys 10UV). Para a análise do pH foi utilizado um pHmetro de marca Metrohm modelo 827 pH lab. A contagem de células

foi realizada em microscópio óptico ZEISS modelo AX10, em câmara de Neubauer, na objetiva de 40X e a fotomicrografia óptica das células da microalga *Neochloris oleoabundans* na objetiva de 100X.

Para determinação da biomassa seca em $g L^{-1}$ nos cultivos, foram coletadas amostras no 5º, 10º e 15º dias de cultivo e na validação do ponto ótimo com 15 dias de cultivo. Uma fração de 40 mL foi coletada e centrifugada a 11,536 g por 10 minutos, a 25,0 °C (Model Z383 126 HERMLE K). O sobrenadante foi descartado e o pellet formado foi seco em estufa a 50 °C e quantificado a massa seca. O restante do cultivo foi centrifugado por 15 minutos em 4,075 g, a 25,0 °C (Model Z383 126 HERMLE K). O sobrenadante foi descartado e o pellet formado foi seco em estufa a 50 °C para posteriores análises.

Para análise de clorofila *a*, *b* e carotenoides, 10 mL de cada amostra foi centrifugado a 11,536 g por 10 minutos, a 25,0 °C (HERMLE modelo Z383 K), o sobrenadante foi descartado e o pellet formado nos tubos do tipo Falcon de 15 mL, foram recobertos com folha de alumínio e congelados a uma temperatura de -80°C em ultrafreezer, para o rompimento de células por 24 h. As amostras foram descongeladas à temperatura ambiente, em seguida adicionou-se 10 mL de acetona a 80% em cada tubo (v/v), após ter adicionado o solvente os tubos foram condicionados a 4°C por 24 horas para extração completa, as amostras foram centrifugadas a 11,536 g durante 10 minutos. Foi retirado o sobrenadante e realizada a leitura das absorbâncias, em espectrofotômetro UV-VIS cuvette de quartzo, nos diferentes comprimentos de onda 663 nm (A_{663}), 646 nm (A_{646}), 470 nm (A_{470}), a acetona a 80% foi utilizada como branco (WELBURN, 1994).

A concentração da clorofila *a*, *b* e carotenoides totais foi determinada com base nas seguintes equações (WELBURN, 1994):

$$\text{Clorofila } a \text{ (CA)} = 12,21 \cdot A_{663} - 2,81 \cdot A_{646}$$

$$\text{Clorofila } b \text{ (CB)} = 20,13 \cdot A_{646} - 5,03 \cdot A_{663}$$

$$\text{Carotenoides} = (1000 \cdot A_{470} - 3,27 \cdot CA - 104 \cdot CB) / 198$$

A quantificação do teor de lipídios foi realizada de acordo com a metodologia de Bligh Dyer (1959) adaptado por Ryckebosch et al. (2012) a partir de 100 mg de biomassa seca, e extraído na proporção de 1:1:0,6 (clorofórmio, metanol e água) em triplicata.

Na biomassa seca foi realizada a extração de N total pelo método de Kjeldahl (BREMNER, 1965), e a partir deste resultado foi calculado o teor de proteínas, utilizando os fatores de conversão de 4,92 e 6,25 (LOURENÇO et al., 2002; OHSE et al., 2009).

Para a caracterização físico- química dos lipídios totais foi realizada a análise de ressonância magnética nuclear- RMN de ^1H , no Laboratório Multiusuário de Espectroscopia da Universidade Estadual de Londrina- SPEC, Londrina, Brasil. A extração dos lipídios totais foi realizada, pelo método descrito por Bligh and Dyer (1959) modificado por Ryckebosch et al. (2012). A amostra de lipídio foi dissolvida no solvente CDCl_3 e analisada, usando o espectrômetro de RMN Bruker Avance III 400 MHz equipado com uma sonda (BBI) de detecção inversa (broadband) de 5 mm a temperatura de 303K. Os experimentos de RMN de ^1H foram realizados a 400.13 MHz com a sequência de pulso descrita por Braun et al. (2000). Os espectros obtidos pela análise de RMN de H^1 foram analisados de acordo com Carneiro et al. (CARNEIRO et al., 2005).

5.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A variável concentração de extrato de levedura foi significativa ($p < 0,05$), e a variável diluição do meio BBM % não foi significativa. No 5º, 10º e 15º dia de cultivo, a máxima produção de biomassa seca foi de 2,1, 3,5 e 5,0 g L⁻¹ respectivamente (Figura 5.1), os coeficientes de determinação obtidos foram de $R^2 = 0,93$, referente à equação da figura 5.1a, $R^2 = 0,96$ referente a equação da figura 5.1b e $R^2 = 0,95$ referente a equação da figura 5.1c.

Nas análises de variância foram obtidos os valores do *Lack of fit*, $p = 0,51$ para os resultados do 5º dia, $p = 0,32$ nos resultados do 10º dia, $p = 0,62$ nos resultados do 15º dia, todos os valores não foram significativos, indicando que o modelo pode ser utilizado para fins preditivos, confirmando a validade do modelo (TOVAR et al., 2010).

A partir do coeficiente de determinação e da análise de ajuste do modelo foram obtidas as superfícies de respostas, que são representadas pelas equações:

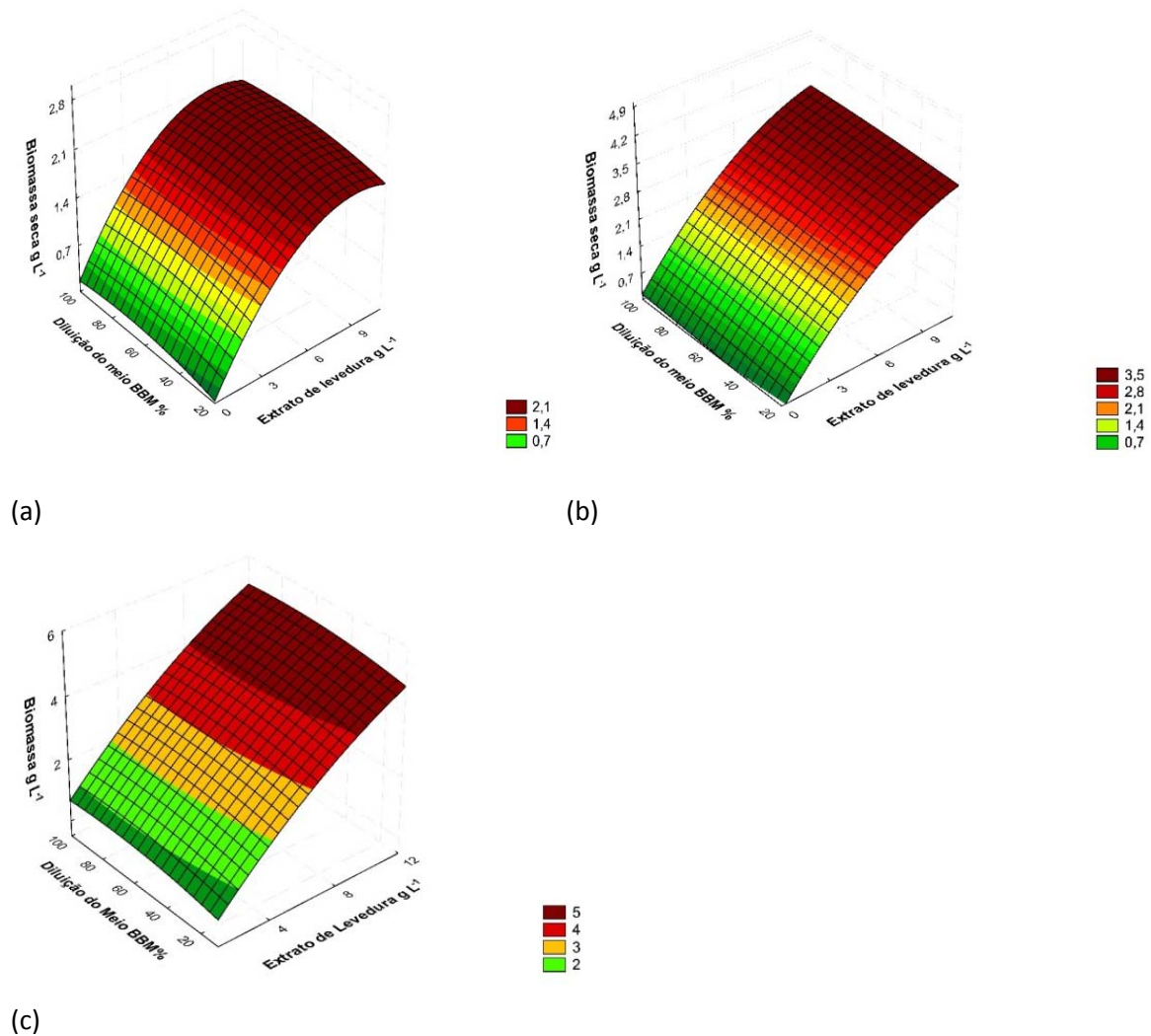
$$\text{Figura 5.1a, } \hat{z} = -0,132 + 0,419x - 0,023x^2 + 0,009y - 0,00006y^2$$

$$\text{Figura 5.1b, } \hat{z} = -0,225 + 0,531x - 0,019x^2 + 0,005y - 0,00002y^2$$

$$\text{Figura 5.1c, } \hat{z} = -0,332 + 0,590x - 0,014x^2 + 0,012y - 0,00008y^2$$

Onde: \hat{z} = produção de biomassa seca g L⁻¹ no 5º (5.1a), 10º (5.1b), 15º (5.1c) dias de cultivo, x = concentração de extrato de levedura, y = diluição do meio BBM%.

Figura 5.1- Superfície de resposta para variável resposta biomassa seca (g L^{-1}) da microalga *N. oleoabundans* (UTEX LB1185) no 5º (a), 10º (b) e 15º (c) dia de cultivo, em função das variáveis concentrações de extrato de levedura (g L^{-1}) e diluição do meio BBM %.



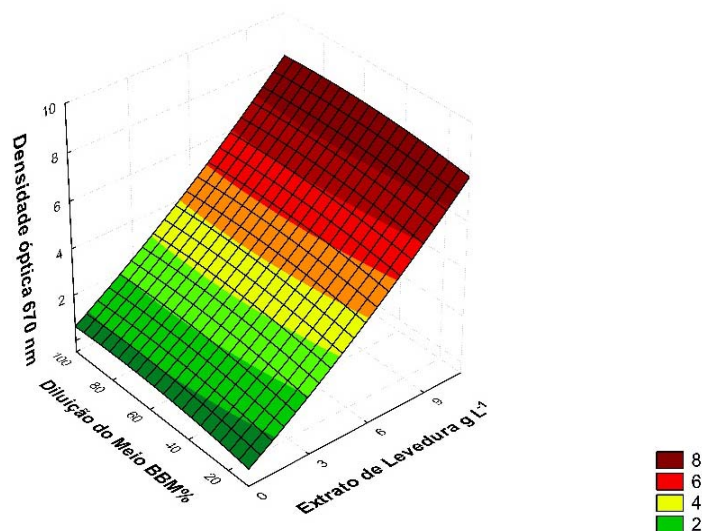
A maior produção de biomassa seca foi obtida com 15 dias de cultivo. Os valores da densidade óptica neste período estão apresentados na Figura 5.2, onde observa-se que a variável concentração de extrato de levedura foi significativa e a variável diluição do meio BBM % não foi significativa. O coeficiente de determinação obtido foi de $R^2 = 0,98$, o valor do Lack of fit $p = 0,26$, valor não significativo, indicando que o modelo pode ser utilizado para fins preditivos, confirmando a validade do modelo.

A partir do coeficiente de determinação e da análise de ajuste do modelo foi obtida a superfície de resposta para os valores da densidade óptica, representada pela equação:

$$\hat{z} = 0,098 + 0,557x + 0,01x^2 + 0,015y - 0,0001y^2$$

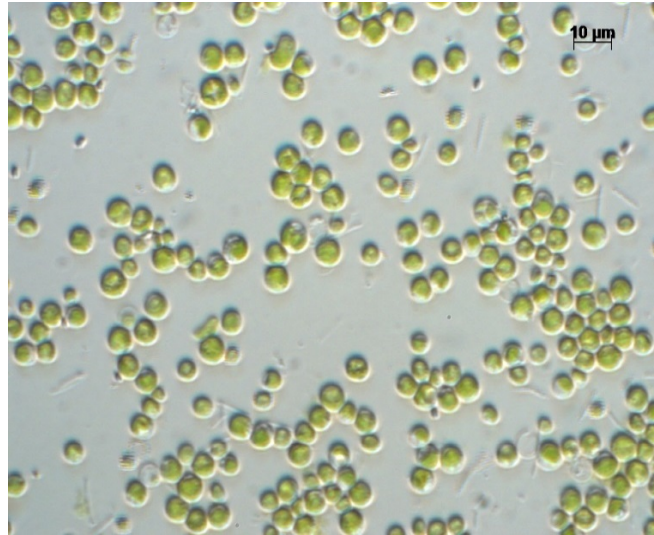
Onde: \hat{z} = valores da densidade óptica, x = concentração de extrato de levedura, y = diluição do meio BBM%.

Figura 5.2- Superfície de resposta para variável resposta densidade óptica em absorbância em 670 nm, da microalga *N. oleoabundans* (UTEX LB1185) no 15º dia de cultivo, em função das variáveis concentrações de extrato de levedura (g L^{-1}) e diluição do meio BBM %.



A produção de biomassa seca e a densidade óptica foi influenciada pela variável concentração de extrato de levedura, onde o aumento da concentração foi possível verificar o incremento da produtividade da *Neochloris oleoabundans* em meio de cultivo Figuras 5.1, 5.2, 5.3 e 5.4.

Figura 5.3- Fotomicrografia óptica das células da microalga *Neochloris oleoabundans*, com 15 dias de cultivo em meio BBM suplementado com extrato de levedura a 11 g L^{-1} , utilizando um microscópio óptico marca ZEISS modelo AX10 na objetiva de 100X.

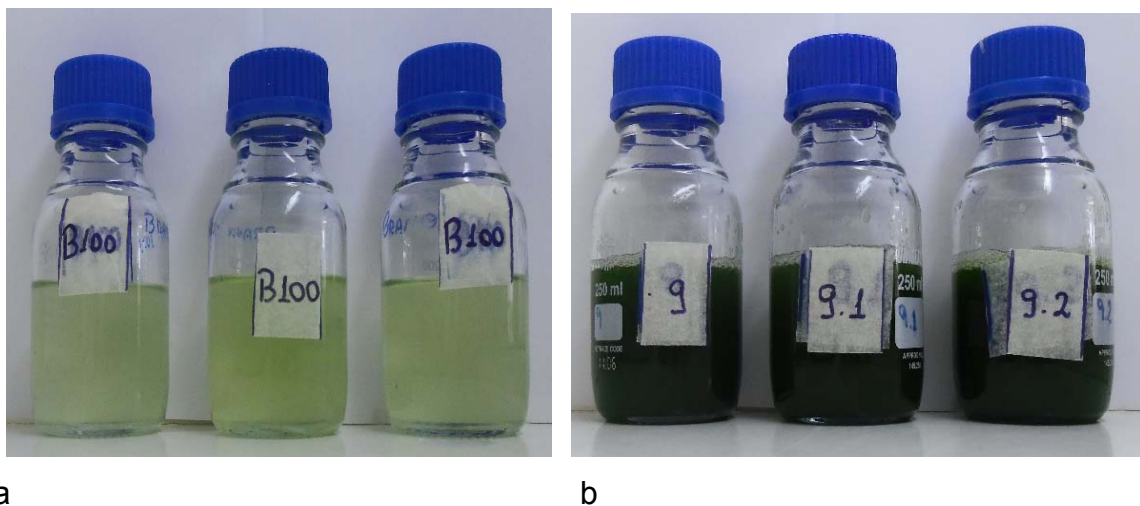


A produção de biomassa seca da microalga *Neochloris oleoabundans* pode variar de $0,5$ a $3,5 \text{ g L}^{-1}$ quando cultivada em meio sintéticos de água doce (Li et al., 2008; Gouveia e Oliveira, 2009; Gouveia et al., 2009; Pruvost et al., 2009). Neste trabalho de otimização, a maior produtividade, foi alcançada no 15º dia de cultivo com uma produção de $5,0 \text{ g L}^{-1}$, a concentração ideal de extrato de levedura foi de $11,0 \text{ g L}^{-1}$ e a diluição do meio BBM% ocorreu variações entre 20% a 100% alcançando uma produção média de biomassa seca de $4,9 \text{ g L}^{-1}$ (Figura 5.1 e 5.2). Dessa forma, se comprova que a nutrição mixotrófica possibilita maior produção de biomassa com a utilização de uma fonte de carbono.

A Chlorophyta *Chlorella sp.* TISTR 8990 foi cultivada em meio nutritivo contendo $0,3 \text{ g L}^{-1}$ extrato de levedura, $1,7 \text{ g L}^{-1}$, KH_2PO_4 , $1,7 \text{ g L}^{-1}$ MgSO_4 , $1,0 \text{ mg L}^{-1}$, FeSO_4 , $0,9 \text{ mg L}^{-1}$ MnCl_2 , e pH 7.0 e a maior produção de biomassa foi de $2,2 \text{ g L}^{-1}$ (CHOI; LEE, 2015). Na cultura em batelada de *Neochloris oleoabundans* sob condições autotróficas e utilizando gases resultantes da combustão de gás natural liquefeito em meio TAP C modificado, a produção de biomassa é de $0,6$ a $1,0 \text{ g L}^{-1}$ (YOON et al., 2015). A biomassa produzida de $1,6 \text{ g L}^{-1}$ em seis dias de cultivo com $0,5 \text{ g L}^{-1}$ de NaNO_3 cultivada de forma foto autotrófica em fotobiorreator de vidro (PBR) com capacidade de 5 L contendo 3.5 L de meio SE, enriquecido com

4% CO₂, pH 7,0 e intensidade de luz de 100 Imol m² s com fotoperíodo de 16:8 h luz: escuro a 25 ± 2°C e agitação de 300 rpm (SUN et al., 2014). A microalga *Neochloris oleoabundans* foi cultivada por 12 dias com água do mar enriquecido com NaNO₃ (3,5 mM), K₂HPO₄ (0,117mM), extrato de solo e solução de micronutrientes alcançando uma produção máxima de 1,48 g L⁻¹ (POPOVICH et al., 2012). Os resultados obtidos corroboram os resultados da literatura sobre a produção de biomassa da Chlorophyta *Neochloris oleoabundans* com meio sintético enriquecido com fontes de carbono.

Figura 5.4- Frascos contendo o cultivo de *N. oleoabundans* em meio BBM 100% por 15 dias, (a) sem adição de extrato de levedura e (b) com a suplementação de 11 g L⁻¹ de extrato de levedura.



No experimento para validação da concentração ideal de extrato de levedura (11 g L⁻¹) e BBM a 100%, com 15 dias de cultivo da microalga *N. oleoabundans*, a produção de biomassa seca foi de 4,96 g L⁻¹, a densidade óptica foi de 7,86 e a contagem de células foi de 1,10 (0,12) 10⁸ (Tabela 5.3), esses resultados validam a etapa experimental, que evidencia a melhor concentração de extrato de levedura e a diluição do meio BBM% (Tabela 5.3).

O teor de lipídios totais extraído da biomassa seca *N. oleoabundans* foi de 35,3% (Tabela 5.3). O teor de lipídios na biomassa dessa microalga é descrito na literatura em uma faixa entre de 27 a 56% (LI et al., 2008; GOUVEIA et al., 2009; GOUVEIA; OLIVEIRA, 2009; PRUVOST et al., 2009).

O teor de N total da biomassa seca foi de 4,65%, obtido este valor foi calculado o teor de proteínas 22,89% utilizando o fator de conversão 4,92 e 30,25% utilizando o fator 6,25 (Tabela 5.3), estes resultados foram similares ao obtido com o cultivo da *N. oleoabundans* em uma cultura em *Bold's Basal Medium* com adição de extrato de solo e com 29% de proteína (GATENBY et al., 2003).

Após 15 dias de cultivo o pH foi de 8,24 e os teores de clorofila *a* e *b* e carotenoides totais foi de 25,9±0,4 mg L⁻¹; 6,78±0,6 mg L⁻¹; 8,45±0,21 mg L⁻¹, respectivamente (Tabela 5.3).

Tabela 5.3- Porcentagem de lipídios, N total e proteína total na biomassa seca, contagem de células (cel. mL⁻¹), produção de biomassa seca (g L⁻¹) e densidade óptica a 670 nm, teor de clorofila *a*, *b* e carotenoides totais em mg L⁻¹, no 15º dia de cultivo, com 11 g L⁻¹ de extrato de levedura e BBM a 100%.

Características	Médias (SD)
Lipídios na biomassa (%)	35,30 (0,19)
N total na biomassa (%)	4,65 (0,002)
Proteínas na biomassa ^a (%)	30,25 (0,013)
Proteínas na biomassa ^b (%)	22,89 (0,009)
Contagem de células (cel. mL ⁻¹)	1,10 (0,12). 10 ⁸
Produção de biomassa seca g L ⁻¹	4,96 (0,19)
Densidade óptica 670 nm	7,86 (0,06)
pH do meio de cultivo aos 15 dias	8,24 (0,02)
Clorofila <i>a</i> (mg L ⁻¹)	25,90 (0,4)
Clorofila <i>b</i> (mg L ⁻¹)	6,78 (0,6)
Carotenoides totais (mg L ⁻¹)	8,45 (0,21)

Os resultados são média de 3 repetições ± desvio padrão (SD), ^{A, b} calculado com o fator de conversão de 6,25 e 4,92 respectivamente.

O espectro obtido pela análise de RMN de ¹H é apresentado na Figura 5.5. A caracterização físico- química dos lipídios totais por RMN de ¹H extraído da biomassa da microalga *N. oleoabundans* cultivada em condições mixotróficas, por 15 dias em meio de cultivo BBM 100% otimizado com 11 g L⁻¹ de extrato de levedura está apresentada na Tabela 5.4. As características físico-químicas do óleo de soja bruto utilizando a análise de RMN de ¹H foram descrito por

REDA et al. (2010). O peso molecular do óleo de soja bruto possui um valor de 870,2, índice de iodo de 118,5, e índice de saponificação de 195. Os valores obtidos na análise dos lipídios totais extraídos da biomassa de *Neochloris oleoabundans* correspondem a peso molecular de 869,0, índice de iodo 113,3 e índice de saponificação de 193, valores semelhantes ao óleo de soja bruto.

O índice de saponificação compreende ao número de miligramas de (KOH) necessário para saponificar um grama de óleo ou gordura, os lipídios extraídos da biomassa obtida do cultivo mixotrófico com 11 g L⁻¹ de extrato de levedura é semelhante ao índice de saponificação a do óleo de soja bruto (REDA et al., 2010).

O índice de iodo é uma variável que indica o grau de insaturação dos óleos e combustíveis, que expressa a sua tendência para oxidar. Este índice indica o número de duplas ligações em uma amostra, que compreende a quantidade de iodo em gramas que é consumida por 100 g de amostra sob a determinada condição, quanto maior o índice de iodo, maior é o grau de insaturação, ou seja, um aumento do número de ligações duplas entre os ácidos graxos (KUMAR et al., 2012). A taxa de auto-oxidação de compostos graxos insaturados depende do número e posição das duplas ligações. O óleo obtido da biomassa de algas contém uma elevada quantidade de ácidos graxos poli-insaturados (PUFA), em comparação a óleos extraídos de plantas oleaginosas. Este fator diminuiu a estabilidade à oxidação de biodiesel produzido por óleos extraídos da biomassa de microalgas (KUMAR et al., 2012). O teor de água, presença de oxigênio, peróxidos, hidroperóxidos e metais são fatores que favorecem a oxidação de óleos e biocombustíveis. A estabilidade oxidativa está relacionada ao tempo que a amostra não sofre oxidação, mantendo as suas propriedades físico- químicas em longos períodos de estocagem. Essa análise é de grande importância, uma vez que indicam alterações na sua composição das propriedades de acidez, densidade, viscosidade, teor de ésteres e índice de peróxido (KNOTHE et al., 2006).

Figura 5.5- Espectro de RMN de ^1H dos lipídios totais, extraídos da biomassa da microalga *Neochloris oleoabundans* cultivada em condições mixotróficas, por 15 dias em meio de cultivo BBM otimizado com $11,0 \text{ g L}^{-1}$ de extrato de levedura.

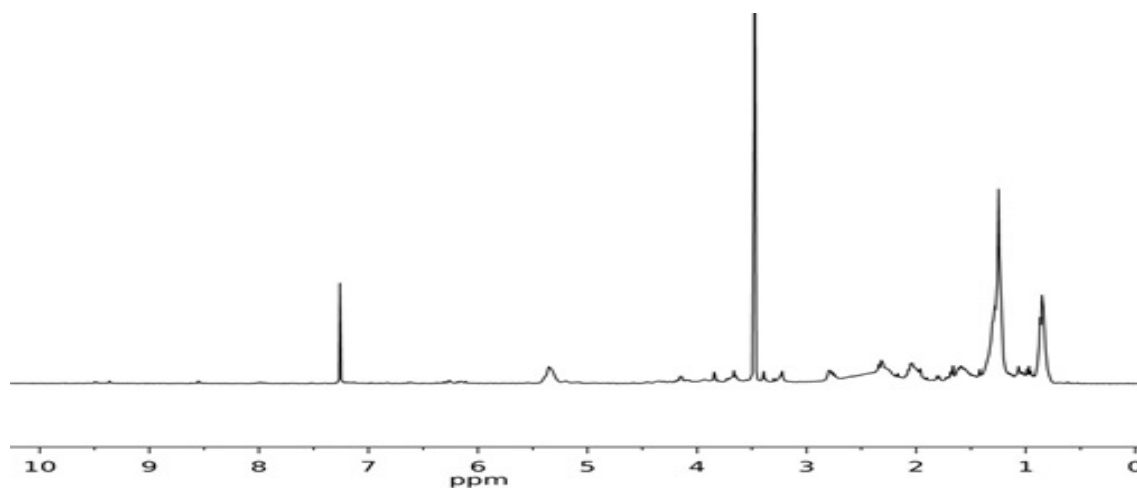


Tabela 5.4- Análise físico- química dos lipídios totais extraídos da biomassa de *N. oleoabundans* produzida em cultivo suplementado com $11,0 \text{ g L}^{-1}$ de extrato de levedura e BBM a 100%, comparados ao óleo de soja bruto.

Parâmetros	Óleo de soja Bruto**	Lipídio total da microalga <i>N. oleoabundans</i> *
MW- peso molecular	870,2	869,0
Índice de iodo	118,5	113,3
Índice de saponificação	195,0	193,0
Índice de acidez livre	1,5	1,4

*valores calculados a partir dos dados de RMN de ^1H dos espectros integrados.

** Resultados publicados por (REDA et al., 2010)

5.6 CONCLUSÕES

O cultivo mixotrófico com a concentração otimizada de extrato de levedura aumenta a produtividade da microalga *N. oleoabundans*.

O meio de cultivo BBM pode ser diluído quando enriquecido com extrato de levedura, que não influencia na produção de *N. oleoabundans*.

A biomassa produzida em meio de cultura suplementada com extrato de levedura possui alto teor de lipídios, com característica físico- química semelhante ao óleo de soja bruto, podendo assim ser matéria prima para produção de biocombustíveis.

5.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMARO, H. M.; GUEDES, A. C. ; MALCATA, F. X. Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel. **Applied Energy**, v.88, n.10, p.3402-3410, 2011.
- BALDISSEROTTO, C.; GIOVANARDI, M.; FERRONI, L. ; PANCALDI, S. Growth, morphology and photosynthetic responses of *Neochloris oleoabundans* during cultivation in a mixotrophic brackish medium and subsequent starvation. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.36, n.2, p.461-472, 2014.
- BLIGH, E. G. ; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v.37, n.8, p.911-917, 1959.
- BOLD, H. C. The morphology of *Chlamydomonas chlamydogama* sp. nov. Bul. **Bull Torrey Botanical Club**, p.76- 101, 1949.
- BRAUN, S.; KALINOWSKI, H.-O. ; BERGER, S. 150 and More Basic NMR Experiments: A Practical Course Weinheim, Germany: Wiley–VCH. 2000. 129 p.
- BREMNER, J. M. Total nitrogen in: Black, C.A. Methods of soil analysis. **American Society of Agronomy**. p.1149-1178, 1965.
- CARNEIRO, P. I. B.; REDA, S. Y. ; CARNEIRO, E. B. B. 1H NMR Characterization of Seed Oils from Rangpur Lime (*Citrus limonia*) and “Sicilian” Lemon (*Citrus limon*). **Annals of Magnetic Resonance**, v.4, p.64-68, 2005.
- CERÓN-GARCÍA, M. C.; MACÍAS-SÁNCHEZ, M. D.; SÁNCHEZ-MIRÓN, A.; GARCÍA-CAMACHO, F. ; MOLINA-GRIMA, E. A process for biodiesel production involving the heterotrophic fermentation of *Chlorella protothecoides* with glycerol as the carbon source. **Applied Energy**, v.103, n.0, p.341-349, 2013.
- CHACÓN-LEE, T. L. ; GONZÁLEZ-MARIÑO, G. E. Microalgae for “Healthy” Foods—Possibilities and Challenges. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety** v.9, n.6, p.655-675, 2010.
- CHOI, W. Y. ; LEE, H. Y. Effective production of bioenergy from marine *Chlorella* sp. by high-pressure homogenization. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, p.1-9, 2015.
- GATENBY, C.; ORCUTT, D.; KREEGER, D.; PARKER, B.; JONES, V. ; NEVES, R. Biochemical composition of three algal species proposed as food for captive freshwater mussels. **Journal of Applied Phycology**, v.15, n.1, p.1-11, 2003.
- GIOVANARDI, M.; FERRONI, L.; BALDISSEROTTO, C.; TEDESCHI, P.; MAIETTI, A.; PANTALEONI, L. ; PANCALDI, S. Morphophysiological analyses of *Neochloris oleoabundans* (*Chlorophyta*) grown mixotrophically in a carbon-rich waste product. **Protoplasma**, p.250:161–174, 2012.

GOUVEIA, L.; MARQUES, A.; DE SILVA, T. ; REIS, A. *Neochloris oleoabundans* UTEX #1185: a suitable renewable lipid source for biofuel production. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.36, p.821 - 826, 2009.

GOUVEIA, L. ; OLIVEIRA, A. C. Microalgae as a raw material for biofuels production. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.36, n.2, p.269-274, 2009.

KIGHTLINGER, W.; CHEN, K.; POURMIR, A.; CRUNKLETON, D. W.; PRICE, G. L. ; JOHANNES, T. W. Production and characterization of algae extract from *Chlamydomonas reinhardtii*. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.17, n.1, p.14-18, 2014.

KNOTHE, G.; KRAHL, J.; GERPEN, J. V. ; RAMOS, L. P. E. Manual de Biodiesel. São Paulo: Edgard Blucher. 2006

KUMAR, R.; BANSAL, V.; PATEL, M. B. ; SARPAL, A. S. ¹H Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Determination of the Iodine Value in Biodiesel Produced from Algal and Vegetable Oils. **Energy & Fuels**, v.26, n.11, p.7005-7008, 2012.

LI, Y.; HORSMAN, M.; WANG, B.; WU, N. ; LAN, C. Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochloris oleoabundans*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.81, n.4, p.629-636, 2008.

LOURENÇO, S. O.; BARBARINO, E.; DE-PAULA, J. C.; PEREIRA, L. O. D. S. ; MARQUEZ, U. M. L. Amino acid composition, protein content and calculation of nitrogen-to-protein conversion factors for 19 tropical seaweeds. **Phycological Research**, v.50(3), p.233-241, 2002.

MATA, T. M.; MARTINS, A. A. ; CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. **Renewable Sustainable Energy Reviews.**, v.14, n.1, p.217-232, 2010.

OHSE, S.; DERNER, R. B.; OZÓRIO, R. Á.; BRAGA, M. V. D. C.; CUNHA, P.; LAMARCA, C. P. ; SANTOS, M. E. D. Produção de biomassa e teores de carbono, hidrogênio, nitrogênio e proteína em microalgas. **Ciência Rural**, v.39, p.1760-1767, 2009.

POPOVICH, C. A.; DAMIANI, C.; CONSTENLA, D.; MARTÍNEZ, A. M.; FREIJE, H.; GIOVANARDI, M.; PANCALDI, S. ; LEONARDI, P. I. *Neochloris oleoabundans* grown in enriched natural seawater for biodiesel feedstock: Evaluation of its growth and biochemical composition. **Bioresource Technology**, v.114, n.0, p.287-293, 2012.

PRUVOST, J.; VAN VOOREN, G.; COGNE, G. ; LEGRAND, J. Investigation of biomass and lipids production with *Neochloris oleoabundans* in photobioreactor. **Bioresource Technology**, v.100, n.23, p.5988-5995, 2009.

REDA, S. Y.; COSTA, B. J.; FREITAS, R. J. S. D.; VILLALBA, J. C. ; ANAISSI, F. J. Avaliação Termoanalítica do Isobutirato Acetato de Sacarose como Antioxidante em Biodiesel. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v.31, n.2, p.157-164, 2010.

RICHMOND, A. Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology. **Blackwell Science Ltd**, 2004.

RYCKEBOSCH, E.; MUYLAERT, K. ; FOUBERT, I. Optimization of an Analytical Procedure for Extraction of Lipids from Microalgae. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v.89, n.2, p.189-198, 2012.

SILVA, H. R.; PRETE, C. E. C.; ZAMBRANO, F.; MELLO, V. H.; TISCHER, C. A. ; ANDRADE, D. S. Combining glucose and sodium acetate improves the growth of *Neochloris oleoabundans* under mixotrophic conditions. **AMB Express**, v.6, n.1, p.1-11, 2016.

SPOLAORE, P.; JOANNIS-CASSAN, C.; DURAN, E. ; ISAMBERT, A. Commercial applications of microalgae. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.101, n.2, p.87-96, 2006.

SUN, X.; CAO, Y.; XU, H.; LIU, Y.; SUN, J.; QIAO, D. ; CAO, Y. Effect of nitrogen-starvation, light intensity and iron on triacylglyceride/carbohydrate production and fatty acid profile of *Neochloris oleoabundans* HK-129 by a two-stage process. **Bioresource Technology**, v.155, p.204-212, 2014.

TOVAR, L. P.; MACIEL, M. R. W.; PINTO, G. M. F.; MACIEL, R. ; GOMES, D. R. Factorial design applied to concentrate bioactive component of *Cymbopogon citratus* essential oil using short path distillation. **Chemical Engineering Research & Design**, v.88, n.2A, p.239-244, 2010.

WANG, J.; YANG, H. ; WANG, F. Mixotrophic Cultivation of Microalgae for Biodiesel Production: Status and Prospects. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.172, n.7, p.3307-3329, 2014.

WELBURN, A. R. The spectral determination of Chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometer of different resolution. **Plant Physiology**, v.144, p.307–313 1994.

XU, H.; MIAO, X. L. ; WU, Q. Y. High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. **Journal of Biotechnology**, v.126, n.4, p.499-507, 2006.

YOON, S. Y.; HONG, M. E.; CHANG, W. S. ; SIM, S. J. Enhanced biodiesel production in *Neochloris oleoabundans* by a semi-continuous process in two stage photobioreactors. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v.38, n.7, p.1415-1421, 2015.

6 ANÁLISE COMPARATIVA DA PRODUTIVIDADE DE BIOMASSA, ÓLEO E PROTEÍNA DE *N. oleoabundans* COM A SOJA

A estimativa de produtividade em kg ha⁻¹ de biomassa, lipídeos e proteínas de *N. oleoabundans* e a comparação com a soja [*Glycine max (L.) Merrill*] foi realizada considerando os resultados experimentais obtidos neste trabalho.

Os cálculos foram estimados com referência na produção em sistema aberto, em tanque com as seguintes dimensões: profundidade de 0,4 m, largura de 100 m e comprimento de 100 m, com capacidade de 4.000 m³ de meio de cultivo por ha⁻¹.

O ciclo da soja é realizado em torno de 120 dias dependendo da cultivar utilizada e da época de semeadura. A biomassa em grãos, produzida ao final deste ciclo, é de 3.000 Kg ha⁻¹ em média (EMBRAPA, 2015). Os teores de óleo e proteína são de 20 e 40% respectivamente (BRUNO et al., 2015). Assim a produção de óleo é de 600 kg ha⁻¹ e 1.200 kg ha⁻¹ de proteína (Tabela 6.1).

A produção de biomassa obtida nos resultados experimentais do artigo 1 (sistema de cultivo 1), foi de 0,1 g L⁻¹ em 14 dias de cultivo, com teor de lipídeos de 36% e proteínas de 37%. Caso seja alcançada neste sistema aberto de cultivo, a produção de biomassa é de 3.400 Kg ha⁻¹. A produção de óleo 1.224 kg ha⁻¹ (duas vezes superior à produção de óleo de soja) e 1.258 kg ha⁻¹ de proteína (Tabela 6.1).

No artigo 2 (sistema de cultivo 2), a produção de biomassa foi de 0,65 g L⁻¹ em 9 dias de cultivo, teor de lipídeos de 24,5% e proteínas de 45%. As estimativas de produtividade nas condições citadas são: 34.600 kg ha⁻¹ de biomassa (11 vezes superior à soja), a produção de óleo 8.477 kg ha⁻¹ (14 vezes superior à soja) e proteínas 15.570 kg ha⁻¹ (12,9 vezes superior à soja) (Tabela 6.1).

No artigo “Combining glucose and sodium acetate improves the growth of *Neochloris oleoabundans* under mixotrophic conditions” (sistema de cultivo 3), publicado da revista AMB Express em janeiro de 2016 (SILVA et al., 2016) a produção de biomassa foi de 1,75 g L⁻¹ em 10 dias de cultivo, com teor de lipídios de 34,7% e proteínas de 30,5%. As estimativas de produtividade nas condições citadas são: 84.000 Kg ha⁻¹ de biomassa (28 vezes superior à soja), 29.148 kg ha⁻¹ de óleo (48,5 vezes superior à soja) e 25.620 kg ha⁻¹ de proteína (21 vezes superior à soja)

(Tabela 6.1).

No artigo 3 (sistema de cultivo 4), a produção de biomassa obtida foi de 5.0 g L⁻¹ em 15 dias, com teor de lipídios de 35,3% e proteínas de 30,3% (Tabela 6.1). As estimativas de produtividade nas condições citadas são: 160.000 Kg ha⁻¹ de biomassa (53 vezes superior à soja), 56.480 Kg ha⁻¹ de óleo (94 vezes superior à soja) 48.400 Kg ha⁻¹ de proteínas (40 vezes superior à soja) (Tabela 6.1).

Tabela 6.1- Estimativa da produção em kg ha⁻¹ de biomassa, óleo e proteína da microalga *N. oleoabundans* simulando o cultivo em tanque com profundidade de 0,4 m e a soja.

	Soja (Grãos)	<i>N. oleoabundans</i> (Biomassa)			
		Sistema de cultivo			
		1	2	3	4
Óleo (%)	*20,0	36,0	24,5	34,7	35,3
Proteína (%)	*40,0	37,0	45,0	30,5	30,3
Produção (Kg ha ⁻¹)	**3.000	3.400	34.600	84.000	160.000
Óleo (kg ha ⁻¹)	600	1.224	8.477	29.148	56.480
Proteína (kg ha ⁻¹)	1.200	1.258	15.570	25.620	48.400

*Bruno et al.(2015); **Embrapa (2015).

7 CONCLUSÕES GERAIS

As microalgas apresentam grande potencial para produção de biomassa que possui composição diversificada de metabólitos em suas células. A produção em sistemas de cultivos em grande escala, deve ser cada vez mais explorada, para geração de produtos biotecnológicos e renováveis.

As etapas de isolamento, sistemas de cultivo, colheita, pré-tratamento da biomassa e extração de metabólitos; devem ser pesquisadas e otimizadas de acordo com a espécie de microalga produzida, buscando alcançar alta eficiência e produtividade.

Variações na concentração de NaNO_3 e pH do meio de cultivo possibilitam maior crescimento da microalga *N. oleoabundans* e assim maior produção de biomassa seca e de lipídios totais. A alcalinização do meio de cultivo com pH ajustado para 9.0 pode-se obter maiores valores de biomassa seca, densidade óptica, número de células e maiores porcentagens de lipídios na biomassa.

O cultivo mixotrófico com concentração otimizada de extrato de levedura; glicose e acetato de sódio, aumenta a produtividade da microalga *N. oleoabundans*.

Os métodos de colheita da biomassa e secagem da microalga *Neochloris oleoabundans* influenciam na porcentagem de lipídios totais.

A biomassa de *N. oleoabundans* possui alto teor de lipídios com características físico- químicas semelhante ao óleo de soja bruto, podendo assim ser matéria prima para produção de biocombustíveis ou outras aplicações biotecnológicas.

A microalga *N. oleoabundans* apresenta maior produtividade em comparação com o uso da soja para produção de biomassa, óleo e proteína.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

'T LAM, G. P.; VERMUË, M. H.; OLIVIERI, G.; VAN DEN BROEK, L. A. M.; BARBOSA, M. J.; EPPINK, M. H. M.; WIJFFELS, R. H. ; KLEINEGRIS, D. M. M. Cationic polymers for successful flocculation of marine microalgae. **Bioresource Technology**, v.169, n.0, p.804-807, 2014.

ABED, R. M. M.; DOBRETSOV, S. ; SUDESH, K. Applications of cyanobacteria in biotechnology. **Journal of Applied Microbiology**, v.106, n.1, p.1-12, 2009.

ACIÉN FERNÁNDEZ, F. G.; FERNÁNDEZ SEVILLA, J. M. ; MOLINA GRIMA, E. Photobioreactors for the production of microalgae. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v.12, n.2, p.131-151, 2013.

ALENCAR, E. R. D.; FARONI, L. R. D.; PETERNELLI, L. A.; SILVA, M. T. C. D. ; COSTA, A. R. Influence of soybean storage conditions on crude oil quality. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.14, p.303-308, 2010.

ALVES, B. R.; BODDEY, R. ; URQUIAGA, S. The success of BNF in soybean in Brazil. **Plant and Soil**, v.252, n.1, p.1-9, 2003.

AMBROSI, M. A.; REINEHR, C. O.; BERTOLIN, T. E.; COSTA, J. A. V. ; COLLA, L. M. Propriedades de saúde de *Spirulina sp.* **Revista de Ciências Farmacêuticas. Básica e Aplicada**, v.29, n.2, p.109-117, 2008.

ANDRADE, D. S.; FILHO, A. C.; GUEDES, C. L. B.; LIMA, F. A. F.; MACHINESKI, G. S.; MATOS, M. A. ; SILVA, H. R. Principais produtos da biomassa algal e suas aplicações biotecnológicas. In: ANDRADE, D. S. e FILHO, A. C. (Ed.). **Potencialidades e desafios do cultivo**. Londrina: IAPAR, v.1, 2014. p.265-286.

ANDRADE, M. D. R. ; COSTA, J. A. V. Cultivo da microalga *Spirulina platensis* em fontes alternativas de nutrientes. **Ciência e Agrotecnologia**, v.32, p.1551-1556, 2008.

ANDRADE, M. R. ; COSTA, J. A. V. Mixotrophic cultivation of microalga *Spirulina platensis* using molasses as organic substrate. **Aquaculture**, v.264, n.1-4, p.130-134, 2007.

BADGER, M. R. ; PRICE, G. D. CO₂ concentrating mechanisms in cyanobacteria: molecular components, their diversity and evolution. **Journal of Experimental Botany**, v.54, n.383, p.609-622, 2003.

BALDISSEROTTO, C.; GIOVANARDI, M.; FERRONI, L. ; PANCALDI, S. Growth, morphology and photosynthetic responses of *Neochloris oleoabundans* during cultivation in a mixotrophic brackish medium and subsequent starvation. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.36, n.2, p.461-472, 2014.

BARSANTI, L. ; GUALTIERI, P. Algae: anatomy, biochemistry and biotechnology. New York: CRC Press Taylor & Francis group. 2006. 301 p.

BECKER, W. Microalgae in human and animal nutrition. In: RICHMOND, A. (Ed.). **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**, 2004. p.312-351.

BOROWITZKA, M. A. Algal biotechnology products and processes - Matching science and economics. **Journal of Applied Phycology**, v.4, n.3, p.267-279, 1992.

_____. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. **Journal of Biotechnology**, v.70, n.1-3, p.313-321, 1999.

BRASIL. Balanço Energético Nacional. **Ministério de Minas e Energias**, p.244, 2008.

_____. BALANÇO ENERGÉTICO NACIONAL. **Empresa de Pesquisa Energética-EPE**, p.292 p., 2015.

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, n.2, p.557-577, 2010.

BROWN, L. M. ; ZEILER, K. G. Aquatic biomass and carbon-dioxide trapping. **Energy Conversion and Management**, v.34, n.9-11, p.1005-1013, 1993.

BRUNO, J. L.; SILVA, H. R. D.; JUNIOR, F. L. M. ; PRETE, C. E. C. Acúmulo de óleo em sementes de soja cultivadas in vitro e in vivo. **SEMINA: Ciências Agrárias**, v.36, n.5, 2015.

CARIOCA, J. O. B. ; ARORA, H. L. Biomassa: Fundamentos e Aplicações Tecnológicas. **Fortaleza: Edição UFC**, p.644 pg., 1984.

CARON, D. A.; COUNTWAY, P. D.; SAVAI, P.; GAST, R. J.; SCHNETZER, A.; MOORTHY, S. D.; DENNETT, M. R.; MORAN, D. M. ; JONES, A. C. Defining DNA-Based Operational Taxonomic Units for Microbial-Eukaryote Ecology. **Applied and Environmental Microbiology**, v.75, n.18, p.5797-5808, 2009.

CHACÓN-LEE, T. L. ; GONZÁLEZ-MARIÑO, G. E. Microalgae for “Healthy” Foods—Possibilities and Challenges. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety** v.9, n.6, p.655-675, 2010.

CHANDRA, R.; ROHIT, M. V.; SWAMY, Y. V. ; VENKATA MOHAN, S. Regulatory function of organic carbon supplementation on biodiesel production during growth and nutrient stress phases of mixotrophic microalgae cultivation. **Bioresource Technology**, v.165, n.0, p.279-287, 2014.

CHEN, F. ; SUTTLE, C. A. Amplification of DNA polymerase gene fragments from viruses infecting microalgae. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, n.4, p.1274-8, 1995.

CHEN, L.; LIU, T.; ZHANG, W.; CHEN, X. ; WANG, J. Biodiesel production from algae oil high in free fatty acids by two-step catalytic conversion. **Bioresource Technology**, v.111, p.208-214, 2012.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, v.25, n.3, p.294-306, 2007.

CHOI, J.; KINNEY, K. A.; KATZ, L. E. ; CHEN, E. pH-induced flocculation process for harvesting microalgae from water. **Abstracts of Papers of the American Chemical Society**, v.241, 2011.

CONAB. Acompanhamento da safra brasileira: grãos, décimo primeiro levantamento. **Conab**, v.2, p.107, 2015.

COSTA, A.; BARBOZA, G. M. C.; GOMES, D. R. ; GATTI, I. C. A. Potencialidades e limitações do uso de resíduos agroindustriais no cultivo de microalgas para produção de biodiesel. Produção de biomassa e coprodutos. ANDRADE, D. S. e FILHO, A. C. Londrina: IAPAR, 2014.

COSTA, A.; BARBOZA, G. M. C.; MIYAZAWA, M.; GOMES, P. C. ; GATTI, I. C. A. Ambiente de crescimento de microalgas. In: ANDRADE, D. S. e FILHO, A. C. (Ed.). **Potencialidade e desafios do cultivo**. Londrina: IAPAR, v.1, 2014. p.143-172.

COULSON, J. M. R., J. F. Tecnologia Química. **Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian**, v.3, p.746, 1965.

DANG, H. ; LOVELL, C. R. Numerical Dominance and Phylotype Diversity of Marine Rhodobacter Species during Early Colonization of Submerged Surfaces in Coastal Marine Waters as Determined by 16S Ribosomal DNA Sequence Analysis and Fluorescence In Situ Hybridization. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, n.2, p.496-504, 2002.

DEL CAMPO, J.; GARCÍA-GONZÁLEZ, M. ; GUERRERO, M. Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current state and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.74, n.6, p.1163-1174, 2007.

DERNER, R. B.; OHSE, S.; VILLELA, M.; CARVALHO, S. M. D. ; FETT, R. Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural, Santa Maria**, v.36, p.1959-1967, 2006.

DONG, T.; WANG, J.; MIAO, C.; ZHENG, Y. ; CHEN, S. Two-step in situ biodiesel production from microalgae with high free fatty acid content. **Bioresource Technology**, v.136, p.8-15, 2013.

EISENBERG, D. M.; KOOPMAN, B.; BENEMANN, J. R. ; OSWALD, W. J. Algal bioflocculation and energy-conservation in microbial sewage ponds **Biotechnology and Bioengineering**, p.429-448, 1981.

EMBRAPA. **SOJA**. 2015. Disponível em: <https://www.embrapa.br/soja/cultivos/soja1>. Acesso em: 20/04/2016.

EKPENYONG, E. Algal biomass and pigment diversity in typical tropical fish ponds **Tropical Ecology** v.41, n.1, p.89-94, 2000.

ERIKSEN, N. The technology of microalgal culturing. **Biotechnology Letters**, v.30, n.9, p.1525 - 1536, 2008.

FON SING, S.; ISDEPSKY, A.; BOROWITZKA, M. ; MOHEIMANI, N. Production of biofuels from microalgae. **Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change**, p.1-26, 2011.

FOREE, E. G. ; MCCARTY, P. L. Anaerobic decomposition of algae. **Environmental Science & Technology**, v.4, n.10, p.842-849, 1970.

GARCIA-PICHEL, F.; LÓPEZ-CORTÉS, A. ; NÜBEL, U. Phylogenetic and Morphological Diversity of Cyanobacteria in Soil Desert Crusts from the Colorado Plateau. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, n.4, p.1902-1910, 2001.

GEORGIANNA, D. R. ; MAYFIELD, S. P. Exploiting diversity and synthetic biology for the production of algal biofuels. **Nature**, v.488, n.7411, p.329-335, 2012.

GOLDSMITH, P. Economics of soybean production, marketing, and utilization.: In L. A. Johnson, P. J. White, & R. Galloway (Eds.), *Soybeans: Chemistry, production, processing, and utilization*. Urbana: AOCS. 2008

GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, C.; RIAÑO-IRAZÁBAL, B.; MOLINUEVO-SALCES, B.; BLANCO, S. ; GARCÍA-GONZÁLEZ, M. Effect of operational conditions on the degradation of organic matter and development of microalgae–bacteria consortia when treating swine slurry. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.90, n.3, p.1147-1153, 2011.

GOUVEIA, L. ; OLIVEIRA, A. C. Microalgae as a raw material for biofuels production. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.36, n.2, p.269-274, 2009.

GRIMA, E. M.; BELARBI, E. H.; FERNANDEZ, F. G. A.; MEDINA, A. R. ; CHISTI, Y. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. **Biotechnology Advances**, v.20, n.7-8, p.491-515, 2003.

GRIMA, E. M.; FERNÁNDEZ SEVILLA, J. M.; ACIÉN FERNÁNDEZ, F. G. ; FLICKINGER, M. C. Microalgae, Mass Culture Methods. In: (Ed.). **Encyclopedia of Industrial Biotechnology**: John Wiley & Sons, Inc., 2009.

GROBBELAAR, J. U. Physiological and technological considerations for optimising mass algal cultures. **Journal of Applied Phycology**, v.12, n.3-5, p.201-206, 2000.

HARTMAN, G.; WEST, E. ; HERMAN, T. Crops that feed the World 2. Soybean—worldwide production, use, and constraints caused by pathogens and pests. **Food Security**, v.3, n.1, p.5-17, 2011.

HARUN, R.; SINGH, M.; FORDE, G. M. ; DANQUAH, M. K. Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.14, n.3, p.1037-1047, 2010.

HOEK, V. D. C. Algae: an introduction to phycology. **London: Cambridge University**, p.623, 1995.

HÖFLE, M. G.; HAAS, H. ; DOMINIK, K. Seasonal Dynamics of Bacterioplankton Community Structure in a Eutrophic Lake as Determined by 5S rRNA Analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, n.7, p.3164-3174, 1999.

HU, B.; MIN, M.; ZHOU, W.; LI, Y.; MOHR, M.; CHENG, Y.; LEI, H.; LIU, Y.; LIN, X.; CHEN, P. ; RUAN, R. Influence of Exogenous CO₂ on Biomass and Lipid Accumulation of Microalgae *Auxenochlorella protothecoides* Cultivated in Concentrated Municipal Wastewater. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.166, n.7, p.1661-1673, 2012.

HUANG, G.; CHEN, F.; WEI, D.; ZHANG, X. ; CHEN, G. Biodiesel production by microalgal biotechnology. **Applied Energy**, v.87, n.1, p.38-46, 2010.

IFRIM, G. A.; TITICA, M.; COGNE, G.; BOILLEREAUX, L.; LEGRAND, J. ; CARAMAN, S. Dynamic pH model for autotrophic growth of microalgae in photobioreactor: A tool for monitoring and control purposes. **AIChE Journal**, v.60, n.2, p.585-599, 2014.

JANSSEN, M.; DE BRESSER, L.; BAIJENS, T.; TRAMPER, J.; MUR, L.; SNEL, J. H. ; WIJFFELS, R. Scale-up aspects of photobioreactors: effects of mixing-induced light/dark cycles. **Journal of Applied Phycology**, v.12, n.3-5, p.225-237, 2000.

KIGHTLINGER, W.; CHEN, K.; POURMIR, A.; CRUNKLETON, D. W.; PRICE, G. L. ; JOHANNES, T. W. Production and characterization of algae extract from *Chlamydomonas reinhardtii*. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.17, n.1, p.14-18, 2014.

KIM, K. H.; CHOI, I. S.; KIM, H. M.; WI, S. G. ; BAE, H.-J. Bioethanol production from the nutrient stress-induced microalga *Chlorella vulgaris* by enzymatic hydrolysis and immobilized yeast fermentation. **Bioresource Technology**, v.153, n.0, p.47-54, 2014.

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

KRAMER, T. ; KOZLOWSKI, T. Physiology of woody plants. New York. 1979

KROHN, B. J.; MCNEFF, C. V.; YAN, B. ; NOWLAN, D. Production of algae-based biodiesel using the continuous catalytic Mcgyan® process. **Bioresource Technology**, v.102, n.1, p.94-100, 2011.

LEE, A. K.; LEWIS, D. M. ; ASHMAN, P. J. Microbial flocculation, a potentially low-cost harvesting technique for marine microalgae for the production of biodiesel. **Journal of Applied Phycology**, v.21, n.5, p.559-567, 2009.

LEE, S. J.; KIM, S. B.; KWON, G. S.; YOON, B. D. ; OH, H. M. Effects of harvesting method and growth stage on the flocculation of the green alga *Botryococcus braunii*. **Letters in Applied Microbiology**, v.27, n.1, p.14-18, 1998.

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

LEONARDI, P. I.; POPOVICH, C. A. ; DAMIANI, M. C. Feedstocks for Second-Generation Biodiesel: Microalgae's Biology and Oil Composition. 2011 (Economic Effects of Biofuel Production)

LOURENÇO, S. O. Cultivo de microalgas marinhas- princípios e aplicações **Rima**, 2006.

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.

MIAO, X. ; WU, Q. Study on preparation of biodiesel from microalgal oil. **Taiyangneng Xuebao/Acta Energiae Solaris Sinica**, v.28, n.2, p.219-222, 2007.

MOHEIMANI, N. R. Doctor. Murdoch University 2005. 225 p.

MORALES-SANCHEZ, D.; TINOCO-VALENCIA, R.; KYNDT, J. ; MARTINEZ, A. Heterotrophic growth of *Neochloris oleoabundans* using glucose as a carbon source. **Biotechnology for Biofuels**, v.6, n.1, p.100, 2013.

MUYLAERT, K.; VANDAMME, D.; MEESSCHAERT, B. ; FOUBERT, I. Flocculation of microalgae using cationic starch. **Phycologia**, v.48, n.4, p.63-63, 2009.

OH, H. M.; LEE, S. J.; PARK, M. H.; KIM, H. S.; KIM, H. C.; YOON, J. H.; KWON, G. S. ; YOON, B. D. Harvesting of *Chlorella vulgaris* using a bioflocculant from *Paenibacillus sp* AM49. **Biotechnology Letters**, v.23, n.15, p.1229-1234, 2001.

OLAIZOLA, M. Commercial production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* using 25,000-liter outdoor photobioreactors. **Journal of Applied Phycology**, v.12, n.3-5, p.499-506, 2000.

PARK, K. C.; WHITNEY, C.; MCNICHOL, J. C.; DICKINSON, K. E.; MACQUARRIE, S.; SKRUPSKI, B. P.; ZOU, J. T.; WILSON, K. E.; O'LEARY, S. J. B. ; MCGINN, P. J. Mixotrophic and photoautotrophic cultivation of 14 microalgae isolates from Saskatchewan, Canada: potential applications for wastewater remediation for biofuel production. **Journal of Applied Phycology**, v.24, n.3, p.339-348, 2012.

POPOVICH, C. A.; DAMIANI, C.; CONSTENLA, D.; MARTÍNEZ, A. M.; FREIJE, H.; GIOVANARDI, M.; PANCALDI, S. ; LEONARDI, P. I. *Neochloris oleoabundans*

grown in enriched natural seawater for biodiesel feedstock: Evaluation of its growth and biochemical composition. **Bioresource Technology**, v.114, n.0, p.287-293, 2012.

PULZ, O. ; GROSS, W. Valuable products from biotechnology of microalgae. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.65, p.635-648, 2004.

QIANG, H.; FAIMAN, D. ; RICHMOND, A. Optimal tilt angles of enclosed reactors for growing photoautotrophic microorganisms outdoors. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v.85, n.2, p.230-236, 1998.

RAKESH, S.; SAXENA, S.; DHAR, D. W.; PRASANNA, R. ; SAXENA, A. K. Comparative evaluation of inorganic and organic amendments for their flocculation efficiency of selected microalgae. **Journal of Applied Phycology**, v.26, n.1, p.399-406, 2014.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F. ; EICHHORN, S. E. *Biologia Vegetal*. Rio de Janeiro: Trad. J.E.Kraus. Editora Guanabara Koogan, v.6a. ed. 2001

RICHERT, L.; GOLUBIC, S.; GUÉDÈS, R.; RATISKOL, J.; PAYRI, C. ; GUEZENNEC, J. Characterization of Exopolysaccharides Produced by Cyanobacteria Isolated from Polynesian Microbial Mats. **Current Microbiology**, v.51, n.6, p.379-384, 2005.

RICHMOND, A. *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*. **Blackwell Science Ltd**, 2004.

ROCHA, J. M. S.; GARCIA, J. E. C. ; HENRIQUES, M. H. F. Growth aspects of the marine microalga *Nannochloropsis gaditana*. **Biomolecular Engineering**, v.20, p.237-242, 2003.

SABIA, A.; BALDISSEROTTO, C.; BIONDI, S.; MARCHESINI, R.; TEDESCHI, P.; MAIETTI, A.; GIOVANARDI, M.; FERRONI, L. ; PANCALDI, S. Re-cultivation of *Neochloris oleoabundans* in exhausted autotrophic and mixotrophic media: the potential role of polyamines and free fatty acids. **Applied Microbiology and Biotechnology**, p.1-13, 2015.

SCHENK, P.; THOMAS-HALL, S.; STEPHENS, E.; MARX, U.; MUSSGNUM, J.; POSTEN, C.; KRUSE, O. ; HANKAMER, B. Second Generation Biofuels: High-Efficiency Microalgae for Biodiesel Production. **BioEnergy Research**, v.1, n.1, p.20-43, 2008.

SFORZA, E.; BERTUCCO, A.; MOROSINOTTO, T. ; GIACOMETTI, G. M. Vegetal oil from microalgae: mixotrophic growth in view of large-scale production. **Journal of Biotechnology**, v.150, Supplement, n.0, p.16, 2010.

SHEEHAN, J.; DUNAHAY, T.; BENEMANN, J. ; ROESSLER, P. Look Back at the U.S. Department of Energy's Aquatic Species Program: Biodiesel from Algae; Close-Out Report. p.Medium: ED; Size: 325 pages. 1998. (NREL/TP-580-24190; TRN: US200420%%272)

SHELEF, G.; SUKENIK, A. ; GREEN, M. Microalgal harvesting and processing: a literature review. . US Department of Energy. Golden Colorado., p.1–65. 1984

SILVA, H. R. Aplicação de métodos para concentração da biomassa de microalgas cultivadas em meio líquido. **Dissertação de Mestrado da Universidade Estadual de Londrina- PR**, 2013.

SILVA, H. R.; ANDRADE, D. S.; FILHO, A. C. ; GUEDES, C. L. B. Colheita e Conservação da Biomassa de Microalgas. In: ANDRADE, D. S. e FILHO, A. C. (Ed.). **Potencialidades e desafios de do cultivo**. Londrina-Pr, v.01, 2014. p.213-255.

SILVA, H. R.; GUEDES, C. L. B. ; ANDRADE, D. S. Fotobiorreator tubular e vertical em polietileno de baixa densidade (PEBD) para cultivo de microalgas. **BR 10.2014.021567.0**, 2014.

ŞIRIN, S.; TROBAJO, R.; IBANEZ, C. ; SALVADÓ, J. Harvesting the microalgae *Phaeodactylum tricornutum* with polyaluminum chloride, aluminium sulphate, chitosan and alkalinity-induced flocculation. **Journal of Applied Phycology**, p.1-14, 2011.

SIRISANSANEEYAKUL, S.; SINGHASUWAN, S.; CHORIT, W.; PHOOPAT, N.; GARCIA, J. ; CHISTI, Y. Photoautotrophic Production of Lipids by Some *Chlorella* Strains. **Marine Biotechnology**, v.13, n.5, p.928-941, 2011.

SPOLAORE, P.; JOANNIS-CASSAN, C.; DURAN, E. ; ISAMBERT, A. Commercial applications of microalgae. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.101, n.2, p.87-96, 2006.

SU, Y.; MENNERICH, A. ; URBAN, B. Coupled nutrient removal and biomass production with mixed algal culture: Impact of biotic and abiotic factors. **Bioresource Technology**, v.118, p.469-476, 2012.

SUKENIK, A.; BILANOVIC, D. ; SHELEF, G. Flocculation of microalgae in brackish and sea waters. **Biomass and Bioenergy**, v.15, p.187–199, 1988.

TANG, Y. T.; ROSENBERG, J. N.; BOHUTSKYI, P.; YU, G.; BETENBAUGH, M. J. ; WANG, F. Microalgae as a Feedstock for Biofuel Precursors and Value-Added Products: Green Fuels and Golden Opportunities. **BioResources**, v.11, n.1, 2016.

TORNABENE, T. G.; HOLZER, G.; LIEN, S. ; BURRIS, N. Lipid composition of the nitrogen starved green alga *Neochloris oleoabundans*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.5, n.6, p.435-440, 1983.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R. ; CASE, A. L. Microbiologia. Porto Alegre: Artmed. 2006

TORZILLO, G.; CARLOZZI, P.; PUSHPARAJ, B.; MONTAINI, E. ; MATERASSI, R. A 2-plane tubular photobioreactor for outdoor culture of *spirulina*. **Biotechnology and Bioengineering**, v.42, n.7, p.891-898, 1993.

UENOJO, M.; MARÓSTICA JUNIOR, M. R. ; PASTORE, G. M. Carotenóides: propriedades, aplicações e biotransformação para formação de compostos de aroma. **Química Nova**, v.30, p.616-622, 2007.

VANDAMME, D.; FOUBERT, I.; FRAEYE, I.; MEESSCHAERT, B. ; MUYLAERT, K. Flocculation of *Chlorella vulgaris* induced by high pH: role of magnesium and calcium and practical implications. **Bioresource Technology**, n.0, 2011.

VANDAMME, D.; FOUBERT, I.; MEESSCHAERT, B. ; MUYLAERT, K. Flocculation of microalgae using cationic starch. **Journal of Applied Phycology**, v.22, n.4, p.525-530, 2010.

VENKATA SUBHASH, G.; ROHIT, M. V.; DEVI, M. P.; SWAMY, Y. V. ; VENKATA MOHAN, S. Temperature induced stress influence on biodiesel productivity during mixotrophic microalgae cultivation with wastewater. **Bioresource Technology**, v.169, n.0, p.789-793, 2014.

WAN, C.; ALAM, M. A.; ZHAO, X.-Q.; ZHANG, X.-Y.; GUO, S.-L.; HO, S.-H.; CHANG, J.-S. ; BAI, F.-W. Current progress and future prospect of microalgal biomass harvest using various flocculation technologies. **Bioresource Technology**, v.184, n.0, p.251-257, 2015.

WANG, J.; YANG, H. ; WANG, F. Mixotrophic Cultivation of Microalgae for Biodiesel Production: Status and Prospects. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.172, n.7, p.3307-3329, 2014.

WU, J.-T.; CHIANG, Y.-R.; HUANG, W.-Y. ; JANE, W.-N. Cytotoxic effects of free fatty acids on phytoplankton algae and cyanobacteria. **Aquatic Toxicology**, v.80, n.4, p.338-345, 2006.

XU, H.; MIAO, X. L. ; WU, Q. Y. High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. **Journal of Biotechnology**, v.126, n.4, p.499-507, 2006.

YAHY, H.; ELMALEH, S. ; COMA, J. Algal flocculation-sedimentation by pH increase in a continuous reactor. **Water Science and Technology**, v.30, p.259–267, 1994.

YOON, S. Y.; HONG, M. E.; CHANG, W. S. ; SIM, S. J. Enhanced biodiesel production in *Neochloris oleoabundans* by a semi-continuous process in two stage photobioreactors. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v.38, n.7, p.1415-1421, 2015.

ZAHRAN, H. H. Rhizobium-Legume Symbiosis and Nitrogen Fixation under Severe Conditions and in an Arid Climate. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.63, n.4, p.968-989, 1999.

ZENG, X.; DANQUAH, M. K.; CHEN, X. D. ; LU, Y. Microalgae bioengineering: From CO₂ fixation to biofuel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.15, n.6, p.3252-3260, 2011.