

THAIS MORAES DE EUCLIDES

**SELEÇÃO E OTIMIZAÇÃO DE MEIOS DE CULTURA PARA O
CULTIVO DE MICROALGAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Botânica, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2013

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV

T

E86s
2013

Euclides, Thais Moraes de, 1979-

Seleção e otimização de meios de cultura para o cultivo de
microalgas / Thais Moraes de Euclides. – Viçosa, MG, 2013.
x, 89 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Márcio Arêdes Martins.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Microalga - Cultura e meios de cultura. 2. Otimização
combinatória. 3. *Scenedesmus*. 4. *Chlorella*. 5. Biodiesel.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia
Vegetal. Programa de Pós-Graduação em Botânica. II. Título.

CDD 22. ed. 579.8

THAIS MORAES DE EUCLIDES

**SELEÇÃO E OTIMIZAÇÃO DE MEIOS DE CULTURA PARA O
CULTIVO DE MICROALGAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Botânica, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 12 de abril de 2013.

Adriano Nunes Nesi
(Coorientador)

Wagner Luiz Araújo

Márcio Arêdes Martins
(Orientador)

**Dedico este trabalho
à Professora Rosane Maria de Aguiar Euclides (*in memoriam*).**

AGRADECIMENTOS

À Professora Rosane Maria de Aguiar Euclides (*in memoriam*), uma pessoa tão especial que era capaz de mudar uma vida simplesmente por estar nela. Minha eterna gratidão e saudade.

Aos meus pais, por mais uma vez fazerem do meu sonho seu objetivo, se manterem do meu lado incondicionalmente e me incentivarem a seguir em frente mesmo diante de todas as dificuldades.

Ao meu irmão e família, pela presença e compreensão.

Ao Thiago, sempre companheiro, com uma dose extra de paciência e compreensão, durante um caminho difícil.

Aos meus tios e primos, que mais uma vez permaneceram comigo em mais dois anos de Viçosa, me apoiando, aconselhando e incentivando.

Aos professores Márcio Arêdes Martins e Adriano Nunes Nesi, pela orientação e confiança.

Aos professores Caetano Marciano de Souza, Moacil Alves de Souza, Ney Sussumo Sakiyama, José Geraldo Barbosa e Paulo Roberto Cecon, pelo apoio no decorrer deste mestrado.

Aos meus colegas do laboratório CFDBIO, sempre presentes. Ao Jimmy Soares pelos ensinamentos e paciência, mesmo quando esta faltou. À querida estagiária Mariana dos Santos Alves Mendes, sempre disposta a aprender e a ajudar na realização dos experimentos.

Ao amigo Rogério Mauro Gomide que contribuiu direta e indiretamente para realização deste trabalho, os meus sinceros agradecimentos.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV), aos Departamentos de Biologia Vegetal e Engenharia Agrícola, e à Petrobrás pela concessão da bolsa de estudos o que tornou possível a realização de mais este sonho.

BIOGRAFIA

Thais Moraes Euclides, filha de Raul Ubirajara Euclides e Maria Ângela de Moraes Euclides, nasceu em 09 de julho de 1979, na cidade de Viçosa, Minas Gerais.

Graduou-se como Engenheira Agrônoma em 2010, pela Universidade Federal de Viçosa - UFV.

Em março de 2011, iniciou no programa de pós-graduação (Mestrado) em Botânica na Universidade Federal de Viçosa, concentrando seus estudos na área Produção de Biodiesel a partir de microalgas, concluindo-o em abril de 2013.

SUMÁRIO

RESUMO.....	iv
ABSTRACT.....	ix
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
1.1. REFERÊNCIAS CONFERIR TODA A BIBLIOGRAFIA	4
2. ARTIGO I: EFEITO DE DIFERENTES MEIOS DE CULTURA E ADIÇÕES DE CO ₂ NO CULTIVO DE <i>Scenedesmus</i> sp. BR003 e <i>Chlorella</i> sp. BR019.	7
2.1. INTRODUÇÃO	9
2.2. MATERIAL E MÉTODOS	10
2.2.1. Espécies utilizadas e produção de inóculos	10
2.2.2. Condições de cultivo.....	11
2.2.3. Determinação de massa seca livre de cinzas.....	12
2.2.4. Determinação de proteínas hidrossolúveis totais	12
2.2.5. Determinação de carboidratos neutros totais	13
2.2.6. Determinação de lipídios	14
2.2.7. Determinação da concentração de N no meio de cultura.....	15
2.2.8. Determinação da concentração de fosfato no meio de cultura.....	16
2.2.9. Análises estatísticas.....	16
2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	16
2.3.1. Escolha dos meios de cultura e determinação do meio controle.....	16
2.3.2. Teores de lipídios para diferentes meios de cultura no cultivo de <i>Scenedesmus</i> sp. BR003 e <i>Chlorella</i> sp. BR019	18
2.3.3. Efeito de diferentes meios de cultura sintéticos e da adição de CO ₂ no cultivo de <i>Scenedesmus</i> sp. BR003 e <i>Chlorella</i> sp. BR019.....	21
2.3.4. Custos relacionados com o cultivo das cepas <i>Scenedesmus</i> sp. BR003 e <i>Chlorella</i> sp. BR019 em diferentes meios de cultura sintéticos e com diferentes adições de CO ₂	28
2.3.5. Resposta da cepa <i>Chlorella</i> sp. BR019 ao meio de cultura sintético Illman suplementado com 5% de CO ₂	33
2.3.6. Massa Seca.....	34
2.3.7. Carboidratos e Lipídeos.....	37
2.4. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES PARA EXPERIMENTOS FUTUROS	42
2.5. REFERÊNCIAS	44
3. ARTIGO II: OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOMASSA E LIPÍDIOS NO CULTIVO DE <i>Scenedesmus</i> sp. BR003.....	49
3.1. INTRODUÇÃO	51
3.2. MATERIAL E MÉTODOS	52

3.2.1.	Espécie utilizada e produção de inóculo	52
3.2.2.	Condições de cultivo	53
3.2.3.	Monitoramento do crescimento	54
3.2.4.	Plasticidade fenotípica	55
3.2.5.	Determinação da biomassa seca livre de cinzas.....	55
3.2.6.	Determinação do teor de lipídios	55
3.2.7.	Delineamento experimental e análise estatística.....	56
3.3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
3.4.	CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES PARA EXPERIMENTOS FUTUROS	72
3.5.	REFERÊNCIAS.....	73
4.	ANEXOS.....	78
4.1.	ANEXO A - Composição dos meios de cultura sintéticos	78
4.2.	ANEXO B - Análise de Variância e análise de resíduos	79
4.3.	ANEXO C – Plasticidade fenotípica.....	83
5.	CONCLUSÕES GERAIS	88

RESUMO

EUCLIDES, Thais Moraes de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2013. **Seleção e otimização de meios de cultura para o cultivo de microalgas.** Orientador: Márcio Arêdes Martins. Coorientador: Adriano Nunes Nesi.

O biodiesel produzido a partir de microalgas é uma alternativa promissora aos combustíveis fósseis. Todavia, sua produção não é ainda economicamente viável, devido aos altos custos em diversas etapas do processo produtivo. Para contornar este problema, o aumento do teor lipídico com redução dos custos do meio de cultura é uma boa alternativa. O objetivo deste trabalho foi selecionar um meio de cultura nutricionalmente adequado a duas espécies de microalgas, com diferentes adições de CO₂ e depois otimizar este meio visando uma maior produção de biomassa e lipídios. Em uma primeira etapa, foram escolhidos seis meios de cultura sintéticos reportados na literatura (BG11, MDM, MBM, BBM, MC e Illman), e determinado qual meio proporcionou menor custo para produção de lipídios. O meio Illman proporcionou maior produção de biomassa, 1,81 g L⁻¹ e 1,4 g L⁻¹ para *Chlorella* sp. BR019 e *Scenedesmus* sp. BR003, respectivamente. Os cultivos que receberam maiores concentrações de CO₂ produziram, em geral, maior quantidade de massa seca. Para *Chlorella* sp. BR019, não houve aumento no teor de lipídios e carboidratos em resposta à maior suplementação com CO₂, ao passo que em *Scenedesmus* sp. BR003, os meios MBM e MC responderam à suplementação com 5 % de CO₂, resultando em aumento lipídico com redução dos teores de carboidratos. Quando comparados os custos, o meio MBM apresentou menor custo médio em relação à produção de lipídios. Na etapa seguinte, o objetivo foi manipular a composição do meio MBM, através de mudanças nos níveis de N, P, K e Mg, com o objetivo de aumentar a produção de biomassa e o conteúdo lipídico de *Scenedesmus* sp. BR003. Utilizando o delineamento composto central rotacional, as variáveis testadas foram biomassa seca e o teor de lipídios por biomassa seca (%). Os resultados obtidos indicam que no intervalo de concentrações utilizado, o N proporcionou grande influencia no crescimento celular, sendo que um aumento 41,7 % na concentração desse nutriente aumenta o rendimento em biomassa livre de cinzas em 27 %. A quantidade total de lipídios teve um aumento de 48 %, quando comparados as maiores e menores concentrações de N e P. Observou-se que é mais vantajoso ter baixas concentrações de N e P no meio de cultura do que um grande número de células, uma vez que esse grande número de células não gerou maior quantidade de lipídios por litro de meio de cultura. A manipulação dos nutrientes do

meio de cultura mostrou-se uma ótima ferramenta para o aumento da produção de lipídios.

ABSTRACT

EUCLIDES, Thais Moraes de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, April, 2013. **Selection and optimization of culture medium for microalgae cultivation.** Adviser: Márcio Arêdes Martins. Co-Adviser: Adriano Nunes Nesi.

Biodiesel produced from microalgae is a promising alternative to fossil fuels. However, its production is not economically viable due to the high costs in various stages of production. To overcome this problem, during the cultivation, increasing the lipid content and reducing the cost of culture medium is a good alternative. The objective of this study was to select a nutritionally adequate medium to two species of microalgae, with different additions of CO₂ and then optimize this medium in order to obtain greater production of biomass and lipids. In a first step, six synthetic culture medium, reported in the literature, were chosen (BG11, MDM, MBM, BBM, MC and Illman), and determined which medium provided the lowest cost production of lipids. For the culture medium, the Illman medium provided the highest production of biomass, 1.81 g L⁻¹ and 1.4 g L⁻¹ for *Chlorella* sp. and *Scenedesmus* sp., respectively. The cultures that received higher concentrations of CO₂ produced, in general, higher amount of dry matter. For *Chlorella* sp., there was no increase in lipid and carbohydrates content in response to supplementation of CO₂, but for *Scenedesmus* sp., the mediums MBM and MC responded to supplementation with 5%, resulting in an increase of lipids and reduction of carbohydrates content. When comparing the costs of the culture medium, MBM medium showed a lower average cost for the production of lipids. In the next stage, the optimization, the goal was to manipulate the composition of the medium MBM, through changes in the levels of N, P, K and Mg, in order to increase the production of biomass and lipid content of *Scenedesmus* sp. BR003. Using the Rotational Central Composite Design, the variables tested were dry biomass and lipid content per dry weight (%). The results indicated that in the range of concentrations used, the nitrogen promoted great influence in cell growth, and an increase in the concentration of this nutrient increases the production of ash-free biomass in 27 %. The total amount of lipids increased by 48 % when compared to the highest and lowest concentrations of N and P. It was observed that it is more advantageous to have low concentrations of N and P in the culture medium than a large number of cells. Since this large number of cells did not generate higher amount of lipid per liter of culture medium. Although the amounts of lipids obtained are still not enough to make feasible

the production of biodiesel from this microalgae, manipulating the nutrients of the culture medium was found to be a great tool for the increase of production of lipids.

1. INTRODUÇÃO GERAL

Diante da perspectiva de que as fontes de combustíveis fósseis são limitadas, a necessidade de obter combustível de outras fontes é cada vez maior, seja na forma de etanol ou na forma de biodiesel.

O biodiesel produzido a partir de vegetais, como soja e pinhão manso, gera conflitos, uma vez que ocupa grandes áreas destinadas à produção de alimentos. Em contrapartida, as microalgas são uma opção atraente dentro deste cenário, principalmente para produção de biodiesel (BOROWITZKA, 2010). Muitas espécies de microalgas possuem elevados teores lipídicos além de hidrocarbonetos e açúcares que podem ser fermentados para produzir etanol (BOROWITZKA E MOHEIMANI, 2013). Além do biodiesel e etanol, a biomassa algal pode ser convertida em biocombustíveis por processos de gaseificação, pirólise, combustão, digestão anaeróbica e produção direta de hidrogênio (MINOWA E SAWAYAMA, 1999; MIAO E WU, 2004; KADAM, 2002; SIALVE *et al.*, 2009; BENEMANN, 2000).

Durante o cultivo, a suplementação com nutrientes deve ser correta para obtenção de maiores produtividades de lipídios utilizadas para produção de biocombustíveis. Para produção em larga escala, considerando produção em tanques e lagoas, são necessárias grandes quantidades de nutrientes. Segundo (BOROWITZKA E MOHEIMANI, 2013) para produzir uma tonelada de biomassa algal são necessários aproximadamente 50 a 80 kg de N, 5 kg de P e 1800 kg de CO₂. As fontes destes nutrientes podem variar bastante, podendo-se utilizar fertilizantes, água residuárias, resíduos vegetais, desde que observada sua composição.

Apesar do uso de nutrientes ser mais eficiente no cultivo de microalgas do que no cultivo de oleaginosas, por não haver perdas por lixiviação, plantas invasoras e imobilização, faz-se necessário ainda uma otimização do processo (MULBRY *et al.* 2005). Para isso a relevância de cada nutriente no cultivo deve ser avaliada.

Por constituir em torno de 50% da biomassa seca o carbono é um elemento necessário em maiores quantidades para algas. A adição de diferentes quantidades de CO₂ no cultivo pode afetar diretamente a produção de biomassa e compostos celulares (DERNER, 2006).

A deficiência de N induz a formação de lipídios, pois ocorre uma diminuição significativa na taxa de divisão celular, além da redução da concentração de proteínas e clorofilas. Como consequência, ocorre o aumento de substância de reservas, entre elas,

os lipídios (LOURENÇO, 2006). O estresse causado pela deficiência de N normalmente tem diferentes efeitos sobre o crescimento e teor de lipídios, variando com cada espécie. Algumas espécies crescem para depois acumular lipídios e algumas espécies acumulam lipídios durante seu crescimento (ADAMS *et al.*, 2013). Lourenço *et al.* (2008) determinaram em quatro espécies de algas marinhas que o consumo de N é elevado durante a fase exponencial de crescimento e reduz na fase estacionária.

Estudos com deficiência de nutrientes mostram que o aumento da produção lipídica ocorre em consequência da interrupção da divisão celular, porém o aumento do teor de óleo não leva a um aumento global. Existe um parâmetro a ser estabelecido para determinar a melhor estratégia de produção. A produção pode ser pautada em uma maior quantidade de biomassa com menor conteúdo lipídico por unidade de biomassa ou em uma menor quantidade de biomassa com maior conteúdo lipídico. A densidade elevada de biomassa (crescimento) é necessária para aumentar o rendimento por unidade de área de cultura e elevado teor de lipídios é necessário para reduzir custos de processamento por unidade de produto de biomassa (GRIFFITHS E HARRISON, 2009).

As algas podem ser enquadradas em três categorias em relação à acumulação de lipídios pelo estresse de N: (1) aumento do conteúdo lipídico na biomassa superando a diminuição do crescimento, resultando em altas concentrações de lipídio por unidade de biomassa (alta produtividade) devida ao grande estresse pela deficiência de N; (2) diminuição do crescimento superando o aumento do conteúdo lipídico resultando em maior produtividade em baixo estresse por N e maior conteúdo lipídico em alto estresse por N e (3) aumento do conteúdo lipídico é compensado pela redução no crescimento, resultando em baixa produtividade independente dos níveis de N (ADAMS *et al.*, 2013). Assim como N e outros nutrientes, o P é essencial para cultivo de microalgas. Ele está presente na transferência de energia intracelular, síntese de ácidos nucléicos e reações associadas com a divisão celular (SANCHO *et al.*, 1999). Estudos mostram que o P, em condições de baixa disponibilidade, pode induzir a produção de lipídios e, em altas quantidades, favorece o consumo de luxo sem acréscimo na quantidade final de biomassa (HU *et al.*, 2012), com o consequente armazenamento do P na célula na forma de polifosfatos (POWELL *et al.*, 2008). Isto resulta em aumento dos custos sem aumento de produção. Estes autores, em um experimento com *Scenedesmus* sp., observaram que no estágio inicial, tanto o consumo de N quanto de P é rápido e se mantém numa proporção de 14 : 1 (N : P), mas com o excesso de P no meio a razão N :

P pode ser alterada para 5 : 1. Para ocorrer o consumo de luxo, é necessária uma quantidade elevada deste nutriente no meio (BORCHARDT E AZAD, 1968; POWELL *et al.*, 2009). Quando cultivadas sob condições limitantes de P, as microalgas armazenam este nutriente no início da sua fase de crescimento e, quando ocorre depleção total no meio, elas utilizam essas reservas armazenadas na forma de polifosfatos (KUHL, 1974). Os polifosfatos podem estar se apresentar como solúvel ou insolúvel em ácido. O polifosfato solúvel em ácido está ativamente envolvido no metabolismo, enquanto polifosfato em insolúvel em ácido é armazenado para quando a concentração de fosfato externo torna-se limitante (MIYACHI *et al.*, 1964).

A deficiência de P no cultivo induz a produção de lipídios, não só por induzir o aumento da biomassa mas também pelo aumento da quantidade de lipídios por unidade de biomassa (HU *et al.*, 2008; LI *et al.*, 2010; XIN *et al.*, 2010). Goldberg e Cohen (2006) relataram aumento nos níveis de lipídios de 6,5 % e para 39,3 % com cultivo em meio deficiente de P, assim como outros estudos mostram aumento do conteúdo lipídico de 10% para 29,5 % (MANDAL E MALLICK, 2009).

Para K e Mg os estudos são escassos. Embora não haja estudos que comprovem que níveis excessivos de magnésio limitem o crescimento de microalgas, é interessante se determinar níveis compatíveis com maiores produções de biomassa, sem onerar os custos de produção.

O Mg tem um efeito significativamente positivo na taxa de crescimento, embora não afete a concentração de biomassa máxima ou teor de lipídios. Ao trabalhar com *Scenedesmus dimorphus*, Schwenk (2010) observou que o aumento das taxas de crescimento também está ligado com a suplementação de P juntamente com Mg. É interessante que se estabeleça um nível mínimo de Mg e K que permita uma taxa máxima de crescimento, evitando o excesso destes nutrientes e reduzindo os custos finais do cultivo.

Estudos com deficiência de nutrientes mostram que o aumento da produção lipídica ocorre em consequência da interrupção da divisão celular, porém o aumento do teor de óleo não leva a um aumento global. Existe um parâmetro a ser estabelecido para determinar a melhor estratégia de produção: maior quantidade de biomassa com menor conteúdo lipídico por unidade de biomassa ou menor quantidade de biomassa com maior conteúdo lipídico. A densidade elevada de biomassa (crescimento) é necessária para aumentar o rendimento por unidade de área de cultura e elevado teor de lipídios é

necessário para reduzir custos de processamento por unidade de produto de biomassa (GRIFFITHS E HARRISON, 2009).

1.1. REFERÊNCIAS

ADAMS, C., GODFREY, V., WAHLEN, B., SEEFELDT, L., BUGBEE, B. Understanding precision nitrogen stress to optimize the growth and lipid content tradeoff in oleaginous green microalgae. **Bioresource Technology**, 131, 188–194, 2013.

BENEMANN, J.R.. Hydrogen production by microalgae. **Journal of Applied Phycology**, 12,291–300, 2000.

BORCHARDT, J.A., AZAD, H.S. Biological extraction of nutrients. **Research journal of the Water Pollution Control Federation** , 40,10, 1739–1754, 1968.

BOROWITZKA, M. A. E MOHEIMANI , N.R. Sustainable biofuels from algae. **Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change**, 18,13–25, 2013.

BOROWITZKA, M.A. Algae oils for biofuels: chemistry, physiology, and production. In: Cohen Z,Ratledge C (eds) Single cell oils. **Microbial and algal oils**. AOCS, Urbana, 271–289, 2010.

BOROWITZKA, M.A. Culturing microalgae in outdoor ponds. In: Anderson RA (ed) **Algal culturing techniques**. Elsevier Academic, London, 205–218, 2005.

CONVERTI, A., CASAZZA, A., ORTIZ, Y., PEREGO, P., DEL BORGHI, M. Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Chlorella vulgaris* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. **Chemical Engineering and Proceeding: Process Intensification**, 48, 1146–1151, 2009.

FRANCISCO, E., NEVES, D., LOPES, E., FRANCO, T. Microalgae as feedstock for biodiesel production: carbon dioxide sequestration, lipid production and biofuel quality. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, 85, 395–403, 2009.

GOLDBERG, I.K., COHEN, Z. The effect of phosphate starvation on the lipid and fatty acid composition of the fresh water eustigmatophyte *Monodus subterraneus*. **Phytochemistry**, 67, 696–701, 2006.

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

HU, Q., SOMMERFELD, M., JARVIS, E., GHIRARDI, M., POSEWITZ, M., SEIBERT, M., AND DARZINS, A. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances, **Plant Journal**, 54, 621-663, 2008.

KADAM, K.L. Environmental implications of power generation via coal-microalgae cofiring. **Energy**, 27,905–922, 2002.

KHOZIN-GOLDBERG, I., COHEN, Z. The effect of phosphate starvation on the lipid and fatty acid composition of the fresh water eustigmatophyte *Monodus subterraneus*. **Phytochemistry**, 67, 696–701, 2006.

KUHL, A. Phosphorus. In: Stewart, W.D.P. (Ed.), **Algal Physiology and Biochemistry**. Blackwell Scientific, Oxford, 636–654, 1974.

LI, X., HU, H., GAN, K., AND SUN, Y. Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp., **Bioresource Technology**, 101, 5494 -5500, 2010.

MANDAL, S., MALLICK, N. Microalga *Scenedesmus obliquus* as a potential source for biodiesel production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 84, 281–291, 2009.

MIYACHI, S.; KANAI, R.; MIHARA, S.; MIYACHI, S.; AOKI, S. Metabolic roles of inorganic polyphosphates in *Chlorella* cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, 93, 3, 625–634,1964.

MIAO, X.L.;WU, Q.Y. Fast pyrolysis of microalgae to produce renewable fuels. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, 71, 855–860, 2004.

MINOWA, T.; SAWAYAMA, S. A novel microalgal system for energy production with nitrogen cycling. **Fuel**, 78,1213–1215, 1999.

MULBRY, W.; WESTHEAD, E.K.; PIZARRO, C.; SIKORA, L. Recycling of manure nutrients: use of algal biomass from dairy manure treatment as a slow release fertilizer. **Bioresource Technology**, 96, 451–458, 2005.

POWELL, N., SHILTON, A., CHISTI, Y., PRATT, S. Towards a luxury uptake process via microalgae – defining the polyphosphate dynamics. **Water Research**, 43, 17, 4207–4213, 2009.

POWELL, N., SHILTON, A., PRATT, S., CHISTI, Y. Factors influencing luxury uptake of phosphorus by microalgae in waste stabilization ponds. **Environmental Science & Technology**, 42, 16, 5958–5962, 2008.

SIALVE, B.; BERNET, N.; BERNARD, O. Anaerobic digestion of microalgae as a necessary step to make microalgal biodiesel sustainable. **Biotechnology Advances**, 27, 409–416, 2009.

SMEDES F., THOMASEN T.K. Evaluation of the Bligh & Dyer Lipid determination method. **Marine Pollution Bulletin**, 32, 681-688.1996.

TAN, Y., LIN, J. Biomass production and fatty acid profile of a *Scenedesmus rubescens*-like microalga. **Bioresource Technology**, 102, 10131–10135, 2011.

XIN, L., HONG-VING, H., KE, G., YING-XUE, S. Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. **Bioresource Technology**, 101, 5494–5500, 2010.

XU, N., ZHANG, X., FAN, X., HAN, L., ZENG, C., TSENG, C. Effects of nitrogen source and concentration on growth rate and fatty acid composition of *Ellipsoidion* sp. Eustigmatophyta. **Journal of Application Phycology**, 13, 463–469, 2001.

YIN-HU, W., YIN, Y., XIN, L., HONG-YING, H., ZHEN-FENG, S. Biomass production of a *Scenedesmus* sp. under phosphorous-starvation cultivation condition. **Bioresource Technology**, 112, 193–198, 2012.

2. ARTIGO I: EFEITO DE DIFERENTES MEIOS DE CULTURA E ADIÇÕES DE CO₂ NO CULTIVO DE *Scenedesmus* sp. BR003 e *Chlorella* sp. BR019.

Resumo: O cultivo de microalgas visando à produção de óleo para biodiesel deve considerar o custo total de produção e o teor de lipídios, o que pode ou não torná-lo inviável. Diante dessa situação, delineou-se um experimento para avaliar o efeito de diferentes meios de cultura (BG 11, MBM, MDM, MC, BBM e Illman) em duas espécies de microalgas, com adições de CO₂ (0,5 % e 5 %), objetivando estabelecer o meio nutricionalmente mais adequado com base na maior produção de massa seca e lipídios. Os cultivos que receberam maiores concentrações de CO₂ produziram, em geral, maior quantidade de massa seca, indicando que estas cepas podem ser adequadas para cultivos com fontes alternativas de CO₂, oriundas de indústrias ou de termoelétricas. Para *Chlorella* sp. BR019, não houve aumento no teor de lipídios e carboidratos em resposta à maior suplementação com CO₂, ao passo que para *Scenedesmus* sp. BR003 os meios MBM e MC responderam à suplementação com 5 % de CO₂, resultando em aumento lipídico com redução nos teores de carboidratos. O meio Illman proporcionou maior produção de biomassa, 1,8 g L⁻¹ e 1,4 g L⁻¹ para *Chlorella* sp. BR019 e *Scenedesmus* sp. BR003, respectivamente. Para esta última, o aumento da biomassa não resultou em incremento no teor lipídico, porém *Chlorella* sp. BR019 apresentou maior produção de biomassa nos meios BG11, BBM e Illman quando comparada a *Scenedesmus* sp. BR003 e maiores concentrações de lipídios, exceto para o meio MC. Quando comparados os custos do meio de cultura, o meio MBM apresentou menor custo médio em relação à produção de lipídios (R\$ 247,93 kg⁻¹) para as duas cepas, com suplementação de 5 % de CO₂. Com base nestes dados, o meio MBM foi otimizado por meio da determinação diferentes níveis de nutrientes, visando obter maior produção de biomassa e lipídios. Para *Chlorella* sp. BR019 foi realizado um cultivo com o meio que apresentou maior produção de biomassa, Illman, buscando uma redução nesta etapa de produção, comparando-se o desempenho do meio Illman formulado com reagentes analíticos e formulado com fertilizantes. O meio elaborado com fertilizantes, apresentou 77% de redução no valor do litro do meio de cultura, reduzindo de R\$ 0,115 para R\$ 0,026. Os valores finais de biomassa e lipídios não apresentaram diferença estatística entre os tratamentos. Estes resultados demonstram a viabilidade do uso de fertilizantes para cultivo de microalgas.

Palavras-chave: Microalgas, *Chlorella* sp. BR019, *Scenedesmus* sp. BR003, meio de cultura, CO₂.

Abstract: The cultivation of microalgae to produce oil for biodiesel should consider the total cost of production and lipid content, which may or may not make it feasible. Given this situation, an experiment was delineated to assess the effect of different culture medium (BG 11, MBM, MDM, MC, and Illman BBM) in two species of microalgae with different additions of CO₂ (0.5% and 5 %), aiming to establish the most appropriate medium nutritionally based on higher dry matter and lipids production. The culture that received higher concentrations of CO₂ produced, in general, higher amount of dry matter, indicating that these strains may be suitable for cultures with alternative sources of CO₂, derived from industrial or power plants. For *Chlorella* sp., there was no increase in lipid and carbohydrates content in response to supplementation of CO₂, but for *Scenedesmus* sp., the mediums MBM and MC responded to supplementation with 5%, resulting in an increase of lipids and reduction of carbohydrates content. For the culture medium, the Illman medium provided the highest production of biomass, 1.8 g L⁻¹ and 1.4 g L⁻¹ for *Chlorella* sp. and *Scenedesmus* sp. respectively. For *Scenedesmus* sp., the increase of biomass did not result in increase in lipid content, but for *Chlorella* sp. showed higher biomass production in BG11, BBM and Illman medium compared to *Scenedesmus* sp. and higher concentrations of lipids, except for the MC medium. When comparing the costs of the culture medium, MBM medium showed a lower average cost for the production of lipids (R\$ 247,83 kg⁻¹) for both strains, with supplementation of 5 % of CO₂. Based on these data, MBM medium was optimized by establishing of different levels of nutrients in order to obtain higher biomass and lipids. For *Chlorella* sp., was performed a culture with the medium that showed higher biomass production, Illman, seeking a reduction in this stage of production. It was compared the performance of Illman medium formulated with analytical reagents and formulated with fertilizers. The medium formulated with fertilizer, showed 77 % of reduction in the value of liter of culture medium, reducing from R\$ 0,115 L⁻¹ to R\$ 0,026 L⁻¹. The final values of biomass and lipids showed no statistical difference between treatments. These results demonstrate the feasibility of using fertilizers for cultivation of microalgae.

Key words: Microalgas, *Chlorella* sp. BR019, *Scenedesmus* sp. BR003, culture medium, CO₂.

2.1. INTRODUÇÃO

As microalgas possuem elevada capacidade de fixação do CO₂, rápida taxa de crescimento além de uma grande quantidade de espécies com potencial para a produção de biomassa e biocombustíveis (OHSE *et al.* 2009), despertando assim interesse para a produção de biodiesel. Entretanto, os custos para a produção de biodiesel algal são elevados e não são economicamente competitivos quando comparados com a produção de biodiesel a partir de oleaginosas. Nagarajan *et al.* (2012) mencionam que o custo do litro de biodiesel produzido a partir de microalgas pode atingir o valor de US\$ 2,11, enquanto o custo do biodiesel produzido a partir da soja custa US\$ 1,05 .

Cumprir mencionar que existe no entanto um potencial significativo para redução dos custos em todo o processo produtivo. A curto prazo, pesquisas devem se concentrar em maximizar o teor de lipídios em relação à taxa de crescimento das algas, por meio da otimização de nutrientes e CO₂, e utilizar equipamentos e processos de baixo custo para extração do óleo (DAVIS *et al.*, 2011). A redução de custos ao se trabalhar a parte biológica do processo, seja pela identificação de espécies com alto potencial produtivo de biomassa e lipídios e o aperfeiçoamento das técnicas de cultivo, mencionado por Wan *et al.* (2012), é de suma importância quando se trabalha com fotobiorreatores, cujo custo envolvido é maior do que a produção em tanques.

Os meios de cultura sintéticos utilizados no cultivo, à base de reagentes analíticos, apresentam elevado custo e sua composição elementar pode não estar adequada para cada espécie de alga. A adequação desses meios pode resultar em diferenças na produção de biomassa e lipídios e também redução de custos. Tem-se observado que a deficiência de nitrogênio (N) durante o cultivo estimula a produção de lipídios (ILLMAN *et al.*, 2000; ZHILA *et al.*, 2005; HU *et al.*, 2008; HSIEH, WU, 2009; XIN *et al.*, 2010; SUALI, SABARTLY, 2012), assim como a fonte deste elemento, que pode ser nitrato, ureia ou amônio (LI *et al.*, 2008). Respostas semelhantes na produção de lipídios têm sido verificadas com deficiência de fósforo (P) e enxofre (S) (KHOZIN-GOLDBERG, COHEN, 2006; SATO *et al.*, 2000).

O P é um nutriente essencial para o crescimento e é imprescindível em muitos processos metabólicos, tais como geração de ATP e biossíntese de ácidos nucleicos. Feng *et al.* (2011) comprovaram que tanto a deficiência de N quanto a deficiência P causam aumento do conteúdo lipídico em comparação com o meio sintético BG11 para *Chlorella* sp., sendo a deficiência por N mais eficaz na produção lipídica do que por P.

A adição de CO₂ durante o cultivo é outro fator significativo para o incremento da biomassa algal e da produção lipídica. Diferentes quantidades de CO₂ adicionadas durante o cultivo podem estimular ou restringir a produção de biomassa e compostos celulares, sendo que algumas espécies de microalgas toleram altos níveis e respondem com grande produtividade. Essa capacidade de tolerar elevadas concentrações de CO₂ é mencionada por Chiu *et al.*(2009), que verificaram que *Chlorella* sp. apresenta um maior teor de lipídios com adição de CO₂ na faixa de 2 % a 5%. Murakami e Ikenouchi (1997) fazem referência a duas cepas, *Chlorella* sp. UK001 e *Chlorella littorale*, que possuem taxas de fixação de CO₂ superiores a 1g L⁻¹ dia⁻¹. Essas altas taxas de fixação de CO₂ verificadas podem justificar o uso de quantidades acima de 2%, ou até mesmo, 10% de CO₂, como Sung *et al.* (1998) que atingiram mais de 5 g L⁻¹ de biomassa algal. A adição de CO₂ para *Chlorella* sp. entre 0,33-15% resultam em aumento da produção de biomassa e lipídios (SUALI E SARTABLY, 2012).

A seleção da cepa é também essencial para o sucesso no cultivo de microalgas. A escolha das espécies para produção em larga escala deve basear-se em alta produtividade de biomassa e lipídios, tolerância às variações ambientais e elevada assimilação de CO₂. Além disso, características que facilitem a recuperação da biomassa após a colheita são desejáveis (GRIFFITHS *et al.*, 2011).

Diante dessa situação, delineou-se um experimento para avaliar o efeito de diferentes meios de cultura, com dois níveis de injeção de CO₂, em duas espécies de microalgas. Objetivou-se estabelecer o meio mais adequado nutricionalmente a cada espécie com base na maior produtividade de massa seca e lipídios.

2.2. MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1. Espécies utilizadas e produção de inóculos

As espécies *Chlorella* sp. BR019 e *Scenedesmus* sp. BR003 foram obtidas junto à Coleção de Cianobactérias e Microalgas do Banco de Microalgas do Projeto Petrobrás, no Laboratório de Ficologia, localizado na Unidade de Crescimento de Plantas (UCP) do Departamento de Biologia Vegetal (DBV) da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

Essas espécies foram escolhida com base em experimentos prévios, onde demonstraram maior tolerância à contaminação por outros microrganismos e à variações

ambientais . Essas cepas utilizadas para produção de inóculos em meio BG11, acondicionados inicialmente em frascos do tipo erlenmeyers de 500 mL, com transferências sucessivas para recipientes de volumes maiores (1, 3 e 10 L). Os inóculos foram cultivados na sala de cultivo da UCP, sob as seguintes condições fotoautotróficas: temperatura de 24 ± 2 °C, fotoperíodo de 16 : 8 h (luz: escuro) e irradiância média de $100 \mu\text{mols f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ proveniente de lâmpadas fluorescentes brancas de 40 W. A agitação dos inóculos foi efetuada pela injeção de ar com vazão de 0,4 vvm (volume de ar por volume de meio por minuto). Ao final desta etapa, os inóculos atingiram uma concentração inicial de 10^7 céls mL⁻¹ para serem utilizados nos experimentos. Os frascos e o meio de cultura utilizados no preparo do inóculo foram esterilizados em autoclave a 2 atm e 121 °C por 20 minutos (KAWACHI E NÖEL, 2005).

2.2.2. Condições de cultivo

Nas mesmas condições utilizadas para produção dos inóculos, foram realizados experimentos com duração de 15 dias. O período do cultivo foi determinado com base em trabalhos previamente realizados, nos quais foram verificados que as cepas *Scenedesmus* sp. BR003 e *Chlorella* sp. BR019 atingiram a fase estacionária aos 10 dias de cultivo. Para montar o cultivo foram utilizados frascos do tipo erlenmeyers de 2 L, contendo 1,5 L de meio de cultura e 500 mL de inóculo (25%). Os frascos e o meio de cultura foram esterilizados em autoclave a 2 atm e 121 °C por 20 minutos (KAWACH E NÖEL, 2005). O cultivo foi mantido sob aeração, com vazão de 0,4 vvm, e adição de dois níveis de CO₂ (0,5% e 5%). O CO₂ utilizado no experimento foi o industrial (90% de pureza) e o teor na mistura gasosa foi quantificado utilizando um analisador de CO₂ (Gas Data, GFM 416, Inglaterra).

A escolha dos seis meios de cultura sintéticos utilizados foi baseada na literatura, onde se buscou composições diferenciadas tanto na quantidade total dos sais quanto na proporção destes. O meio BG11 suplementado com N (ANDERSEN *et al.*, 2005), foi utilizado como testemunha. Os outros cinco meios de cultura utilizados foram o Bristol Modificado (MBM), Detmer Modificado (MDM), MC (WATANABE, 1960); Bold Basal (BBM) (ANDERSEN *et al.*, 2005) e Illman (ILLMAN *et al.*, 2000).

Para controle do pH utilizou-se soluções 1 M de HCl ou NaOH. O pH dos cultivos foi ajustado para $7,6 \pm 0,1$, a cada 3 dias. A evaporação foi monitorada e ajustada adicionando-se água deionizada e autoclavada.

A concentração celular inicial dos cultivos foi estabelecida em 10^7 céls mL⁻¹. Nos experimentos com injeção de 5% de CO₂ a concentração inicial para *Scenedesmus* sp. BR003 foi de $3,7 \times 10^7$ céls. mL⁻¹ e de *Chlorella* sp. BR019 foi de $4,5 \times 10^7$ céls. mL⁻¹. Nos experimentos com injeção de 0,5% de CO₂ as concentrações celulares iniciais foram de $4,2 \times 10^7$ céls mL⁻¹ para *Scenedesmus* sp. BR003 e $2,7 \times 10^7$ céls mL⁻¹ para *Chlorella* sp. BR019.

Ao final de 15 dias de cultivo, 50 mL de amostras foram coletadas para a determinação da massa seca. Também foram retirados mais 50 mL de cada cultivo, congelados utilizando N₂ líquido e mantidos em freezer a -25°C para análises de proteínas hidrossolúveis totais e carboidratos neutros totais. Do restante do cultivo, uma amostra de 1 litro foi centrifugada (Thermo Scientific, Heraeus Multifuge X3, Alemanha) a 11.000 rpm por 10 minutos. A biomassa algal foi congelada utilizando N líquido, e posteriormente liofilizada e mantida em freezer a -25°C para análise dos lipídios totais.

2.2.3. Determinação de massa seca livre de cinzas

A amostra coletada de 15 mL foi homogeneizada e transferida para o sistema de filtração, contendo filtros de 0,22 µm de porosidade (Durapore, GVWP04700), conectado a uma linha de vácuo. Em seguida foi realizada a lavagem dessa biomassa, com o objetivo de retirar excesso de sais e evitar que material permaneça na parede do sistema de filtração. As membranas foram retiradas e acondicionadas em estufa a $60 \pm 0,5^\circ\text{C}$ até atingirem massa seca constante. A massa seca foi então determinado através da diferença do peso inicial da membrana e a massa final desta mesma membrana após filtração do material e secagem em estufa. O teor em massa das cinzas da biomassa foi obtido por calcinação. As membranas foram colocadas em cadinhos de 5 mL e calcinadas em mufla a 575°C por 1 hora. Para se obter o valor da biomassa livre de cinzas, subtraiu-se a massa residual resultante da calcinação do valor da massa da membrana com a biomassa seca.

2.2.4. Determinação de proteínas hidrossolúveis totais

O método de Lowry, adaptado por Lucarini e Kilikian (1999), foi utilizado para extração e quantificação de proteínas. Amostras de 2 mL foram coletadas de cada

unidade experimental, em triplicata, e centrifugadas a 11.000 rpm por 10 minutos. Após a centrifugação, as amostras foram ressuspensas em água deionizada, homegenizadas e novamente centrifugadas, sendo este procedimento repetido por três vezes. Em seguida, foram adicionados 500 µL de solução composta por NaOH 0,1M e 1% sulfato dodecil de sódio (SDS). Depois de adicionar esta solução os microtubos foram acondicionados em banho termostatizado (Tecnal, TE-184, Brasil) por 30 minutos a 95 °C, seguido de resfriamento a 0 °C por 5 minutos. Adicionou-se às amostras 125 µL de solução 0,4 M de HCl, seguido de homogeneização e centrifugação. Posteriormente, 100 µL do sobrenadante foram transferidos para microtubos de 2 mL, com adição de 500 µL do reagente D, que é composto por 60 mL de solução 0,1 M de NaOH e 3 % (m v⁻¹) de Na₂CO₃, 600 µL de solução 2 % (m v⁻¹) de CuSO₄ e 600 µL de solução 4% (m v⁻¹) de tartarato de sódio e potássio, seguido de homogeneização e mantidos em temperatura ambiente por 20 minutos. Decorridos os 20 minutos, foram adicionados 100 µL do reagente E, composto por uma diluição 50% (v v⁻¹) de folin-fenol, seguido de homogeneização e mantido em temperatura ambiente, na ausência de luz, por 40 minutos. Uma alíquota de 200 µL foi disposta em uma microplaca para leitura em espectrofotômetro (Thermo Scientific, Multiskan GO, Finlândia) a 750 nm. Em paralelo, uma curva-padrão foi preparada utilizando diferentes concentrações de albumina de soro bovino (BSA).

2.2.5. Determinação de carboidratos neutros totais

Foi utilizado o método fenol-ácido sulfúrico em microplacas (MASUKO *et al.*, 2004), com o objetivo de caracterizar o armazenamento de reservas pela célula na forma de carboidratos. Alíquotas de 2 mL foram coletadas de cada unidade experimental, em triplicata e foram acondicionadas em microtubos de 2 mL. Após a centrifugação a 11.000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e as amostras foram ressuspensas em água deionizada, homegenizadas e novamente centrifugadas, repetindo este procedimento três vezes. Para a extração, adicionou-se 1 mL de solução 2 N de H₂SO₄ sem agitar, mantendo a amostra em banho termostatizado por 30 minutos a 80 °C. Após nova centrifugação, foram pipetados 100 µL do sobrenadante em novos microtubos de 2 mL e adicionados 60 µL de solução de fenol a 5 % e 300 µL de H₂SO₄, sendo mantidos em banho termostatizado a 90 °C por 5 minutos. Após o resfriamento dos microtubos, alíquotas de 200 µL de cada amostra foram utilizadas para leitura em

espectrofotômetro a 490 nm. Em paralelo, uma curva-padrão foi preparada, utilizando diferentes concentrações de glicose.

2.2.6. Determinação de lipídios

A determinação de lipídios foi feita pelo método Schmid-Bondzynski-Ratzlaff (International Standard 5B, 1986). O método baseia-se na digestão da amostra com HCl, adição de álcool etílico e subsequente extração da solução ácido-etanólica com éter etílico e éter de petróleo. A remoção dos solventes é feita por evaporação e a determinação da massa das substâncias extraídas solúveis em éter de petróleo é obtida por meio da determinação da massa dos tubos de extração contendo os extratos.

O procedimento foi realizado em tubos do tipo falcon de 15 mL, previamente secos em estufa a $102 \pm 0,5^\circ\text{C}$ e resfriados em dessecador. Nos tubos pesou-se 100 mg de amostra liofilizada, também seca em estufa a $60 \pm 0,5^\circ\text{C}$ até atingir peso seco constante. Após a adição de 1 ml de HCl 8 M, a suspensão foi mantida em banho termostaticado a 70°C por 20 minutos. Após esta etapa, foram adicionados 2 mL de álcool etílico, 2,5 mL de éter etílico e 2,5 mL de éter de petróleo. A homogeneização foi feita em agitador tipo vórtex (Arsec, ATS-200) por 1 minuto, seguida de centrifugação a 1000 rpm por 2 minutos. O sobrenadante foi vertido em um tubo de vidro com tampa de rosca de 50 mL de capacidade. Foram realizadas 3 a 5 extrações usando 2,5 mL de cada tipo de éter, transferindo a camada sobrenadante para o tubo de vidro com tampa de rosca. Ao final das extrações, os tubos de vidro, foram mantidos em banho termostaticado a $60 \pm 0,5^\circ\text{C}$, até a completa evaporação dos solventes e depois acondicionados em estufa a $102 \pm 0,5^\circ\text{C}$ durante 1 hora. Decorrido este tempo, os frascos foram resfriados em dessecador e posteriormente pesados. As operações de secagem e pesagem foram repetidas até obtenção de massa seca constante, que demandou em média 6 horas.

O percentual de lipídios foi determinado pela equação 1:

$$\% \text{ Lipídios} = \frac{(m3 - m1)}{m2} \times 100 \quad (1)$$

em que:

m1 = massa em gramas do tubo de vidro (g);
m2 = massa da amostra (g); e
m3 = massa do tubo de vidro com o material extraído (g).

2.2.7. Determinação da concentração de N no meio de cultura

2.2.7.1. Amônio

O método proposto por Riley (1953) foi adaptado para quantificação da concentração de amônio utilizando-se pequenas quantidades de amostra, com leituras de absorbâncias em microplacas. Uma amostra de 1mL de cada cultivo foi adicionada a um microtubo de 2mL. Em seguida, acrescentou-se 266µL da solução de fenato de sódio, 133µL de solução de NaClO, 66µL da solução de MnSO₄ e, por fim, 200µL de água deionizada. Após a homogeneização, a amostra foi acondicionada em banho termostatizado a 70°C por 45 minutos. Após o resfriamento alíquotas de 300 µL de foram dispostas em microplaca para leitura de absorbância a 625 nm em espectrofotômetro (Thermo Scientific, Multiskan GO, Finlândia).

2.2.7.2. Nitrato

Para determinação da concentração de nitrato foi utilizado o método APHA-4500-NO₃-C adaptado por Oliveira (2007). O método utiliza segundas derivadas da leitura direta no UV (equação 2), como alternativa à leitura direta no UV em único comprimento de onda, que sofre interferência da matéria orgânica e dos bicarbonatos. As amostras foram submetidas à leitura em espectrofotômetros, utilizando cubeta de quartzo, nos comprimentos de onda 210, 220 e 230 nm para anular a interferência causada por matéria orgânica presente na amostra. Utilizou-se como branco a leitura em água deionizada no comprimento de onda de 210 nm. Posteriormente efetuou-se a leitura da absorbância da amostra a 220 e 230nm. Em paralelo, uma curva-padrão foi preparada, utilizando diferentes concentrações de nitrato de potássio para estimativa da concentração de nitrato.

$$\textit{Segunda derivada} = (\text{Abs}210 - \text{Abs}220) - (\text{Abs}220 - \text{Abs}230) \quad (2)$$

2.2.8. Determinação da concentração de fosfato no meio de cultura

Para determinação da concentração de fosfato foi utilizado o método proposto por Murphy e Riley (1958). Alíquotas de 1ml de cada unidade experimental foram acondicionadas em microtubos de 2mL. Em seguida foram adicionados 200 µL do reagente A, composto por 5N de H₂SO₄, solução 4 % (m/v) de (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4 H₂O e 0,1M de ácido ascórbico. Posteriormente, adicionou-se 50 µL de água deionizada. Após homogeneização, a amostra foi acondicionada em banho termostatizado a 60°C por 30 minutos. Após o resfriamento, alíquotas de 300 µL de foram dispostas em uma microplaca para leitura de absorbância a 827nm em espectrofotômetro (Thermo Scientific, Multiskan GO, Finlândia).

2.2.9. Análises estatísticas

O experimento foi montado segundo esquema fatorial completo 6 x 2 x 2 , com três repetições. Os fatores estudados foram 6 meios de cultura sintéticos, 2 cepas de algas e 2 níveis de suplementação de CO₂. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey de probabilidade. A ANOVA e o teste de Tukey foram executados no SISVAR.

2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1. Escolha dos meios de cultura e determinação do meio controle

Para escolha dos meios utilizados no experimento foram consideradas as diferenças nutricionais, o efeito dos macronutrientes no crescimento e no conteúdo celular de microalgas. Os meios de culturas selecionados foram: BG11 e BBM (ANDERSEN *et al.*, 2005), MC, MBM, MDM (WATANABE, 1960) e o meio com baixo teor de nitrogênio (ILLMAN *et al.*, 2000). O teor dos principais nutrientes se encontra na Tabela 1 e a composição completa dos meios de cultura é apresentada no ANEXO A.

Tabela 1 - Principais nutrientes que compõem os meios de cultura utilizados no cultivo de *Scenedesmus* sp. BR003 e *Chlorella* sp. BR019.

Principais nutrientes	Concentração (g L ⁻¹)					
	BG11	MC	BBM	MBM	MDM	ILLMAN
N	0,248	0,173	0,041	0,035	0,139	0,043
P	0,004	0,203	0,036	0,036	0,025	0,269
K	0,010	0,100	0,113	0,188	0,451	1,732
Ca	0,002	-	0,007	0,003	0,003	-
Fe	0,004	0,004	0,001	0,004	0,004	0,002
Mg	0,007	0,002	0,007	0,007	0,025	0,243
Cu	0,020	0,020	-	0,02	0,02	-
Relação entre nutrientes						
N:P:K	62 : 2,5 :	1,7 : 2 :	1,1 : 1 :	1 : 1 :	5,6 : 1 :	1 : 6,7 :
	1	1	3,1	5,4	18	43,3
N:P	24,8 : 1	1 : 1,2	1,1 : 1	1 : 1	5,6 : 1	1 : 6,7
Fe:Mg	1 : 1,8	2 : 1	7 : 1	1 : 1,8	1 : 6,3	1 : 121,5
Concentração total de sais (g L ⁻¹)	1,673	2,545	0,735	0,635	1,635	6,275
Custo (R\$ L ⁻¹)	0,127	0,247	0,079	0,053	0,176	0,115

O meio escolhido como controle foi o BG11 devido à alta concentração de N na forma de NaNO₃ e por ser referenciado como adequado para produção de lipídios (CHEN *et al.*, 2011; FENG *et al.*, 2011), além de ter sido utilizado em estudos anteriores em nossos laboratórios (SOARES, 2012).

Os meios BBM, MBM e Illman são meios com teores de N baixos. O meio Illman além de apresentar sua fonte de N na forma de amônio, possui elevados teores de P, K e Mg. Os meios BBM e MBM possuem a razão N:P próxima de 1:1 e os menores custos por litro de cultivo (Tabela 1).

O meio Illman, assim como o MC, possui maiores quantidades de sais, porém, o primeiro, além de possuir baixo N na forma de amônio, não apresenta adição de micronutrientes (ANEXO A). O meio MC possui a proporção de N : P : K (1,7 : 2 : 1) mais homogênea do que o meio Illman (1 : 6,7 : 43,3).

O meio MDM, assim como o BG11, possui baixo P em relação ao N. A deficiência de P afeta diretamente os níveis de ATP, DNA e fosfolipídios, reduzindo as taxas de multiplicação celular requeridas em cultivos de alta densidade e estimulando

assim a produção de lipídios. Segundo Xin *et al.* (2010) há uma contradição entre conteúdo lipídico e produtividade lipídica, pois com a deficiência do N e P, estes autores verificaram elevados teores lipídicos no cultivo de *Scenedesmus* sp. Entretanto, estes autores também observaram que a produção de biomassa foi relativamente baixa e a taxa de acumulação lipídica não estava no nível mais elevado.

2.3.2. Teores de lipídios para diferentes meios de cultura no cultivo de *Scenedesmus* sp. BR003 e *Chlorella* sp. BR019

O método Bligh e Dyer (SMEDES E THOMASEN, 1996) é tradicionalmente utilizado para a determinação de lipídios em microalgas. Trabalhos realizados também comprovam que este método também extrai clorofilas (solução clorofórmio-metanol) juntamente com os lipídios, podendo resultar em uma superestimativa dos valores de lipídios, fato este verificado através de espectroscopia de fluorescência (ARCHANAA *et al.*, 2012). O método Schmid-Bondzynski-Ratzlaff possui menor afinidade por clorofilas, sendo o álcool etílico o solvente utilizado. Com a adição dos dois éteres, que possuem maior afinidade por lipídios por serem mais apolares, ocorre a migração dos lipídios para a fase etérea. Além disso, por serem mais apolares que o clorofórmio, os éteres podem apresentar maior capacidade de extração. O método Schmid-Bondzynski-Ratzlaff, é um método seletivo para lipídios esterificáveis para produção de biodiesel e apresenta boa repetibilidade e facilidade de execução.

Os aspectos das células após as etapas de digestão ácida e a extração ácido-etanólica estão apresentados na Figura 1. Verifica-se que o rompimento total das células ocorre na fase 1 (digestão ácida). Entretanto, para algumas espécies o rompimento celular só ocorre após a adição do etanol, como consequência da rápida desidratação do material.

As concentrações de lipídios para *Scenedesmus* sp. BR003 e *Chlorella* sp. BR019 obtidos pelo método supracitado encontram-se na Tabela 2. As maiores concentrações foram obtidas para *Chlorella* sp. BR019 tanto com adição de 0,5 % quanto com 5 % de CO₂, para todos os meios de cultura, se comparados ao cultivo com *Scenedesmus* sp. BR003.

Os meios com baixos níveis de N e P estimulam a produção de lipídios (ILLMAN *et al.*, 2000; ZHILA *et al.*, 2004; HU *et al.*, 2008; HSIEH, WU, 2009; XIN *et al.*, 2010; SUALI, SABARTLY, 2012). Esta condição de estímulo à produção lipídica

pode não ter ocorrido, pois ao se adicionar o inóculo, uma quantidade residual de nitrato contido no meio de cultivo no qual se encontrava o inóculo, foi adicionada. Isso pode ter afetado as características dos meios com baixo N e P, uma vez que não foram mantidas as quantidades originais de N e P. Illman *et al.* (2000) observaram até 63% de ganho na produção de lipídios para *Chlorella* sp. com restrição de N durante 14 dias, porém não houve uma fase de depleção tão grande nos cultivos realizados neste trabalho. Observou-se que no meio onde a fonte de N foi amônio, este foi consumido preferencialmente, e o consumo de nitrato aumenta significativamente à medida que a quantidade de amônio presente decaía. A adição de P juntamente com o inóculo pode ter estimulado o consumo de luxo deste nutriente, desfavorecendo assim o acúmulo de lipídios decorrente da restrição de nutrientes. A diferença entre a absorção e armazenamento de N e P inevitavelmente causa a mudança da razão N : P em microalgas. Na fase inicial de crescimento, as células de algas assimilam tanto N quanto P rapidamente, resultando em razões N:P diferentes de acordo com a quantidade de P presente no meio (YIN-HU *et al.*, 2012).

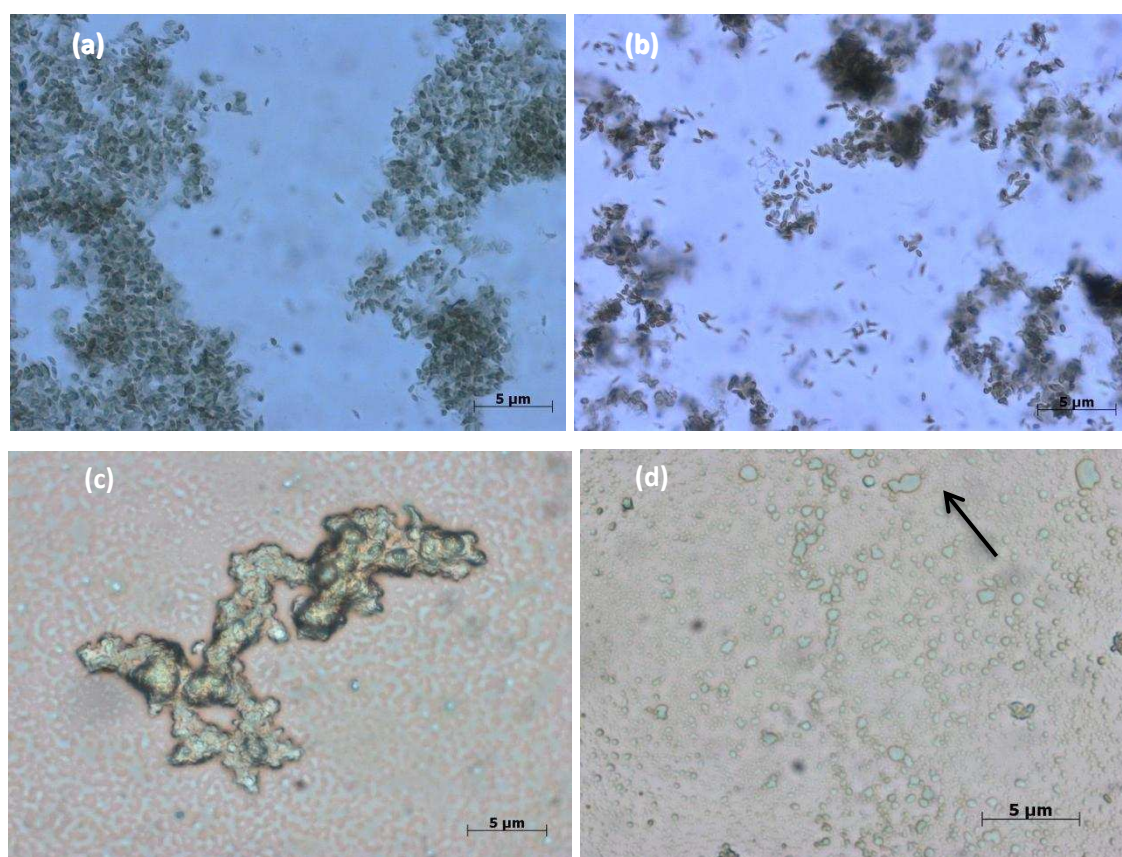


Figura 1. Aspectos das células no processo de extração de lipídios para *Scenedesmus* sp. BR003. (a) após adição de HCl 8M e aquecimento em banho termostatizado; (b) após adição de etanol; (c) após adição do éter etílico e éter de petróleo; e (d) gotas de

Tabela 2 – Produção de biomassa e análise de composição da biomassa de acordo com a adição de CO₂ para *Chlorella* sp. BR019 e *Scenedesmus* sp. BR003.

Meio de Cultura	Teor de CO ₂ (%)	Biomassa (g L ⁻¹)		Lipídio (g L ⁻¹)		Lipídio (%)	
		BR019	BR003	BR019	BR003	BR019	BR003
BG11	0,5	0,723 ± 0,028 Aa	0,687 ± 0,007 Aa	0,147 ± 0,004 Ab	0,090 ± 0,011 Aa	20,3 ± 0,244 Ab	15,0 ± 1,400 Aa
	5	1,457 ± 0,046 Ba	1,120 ± 0,014 Bb	0,297 ± 0,016 Bb	0,183 ± 0,004 Ba	20,4 ± 0,955 Ab	16,3 ± 0,355 Aa
MDM	0,5	0,546 ± 0,066 Aa	0,688 ± 0,015 Ab	0,106 ± 0,012 Aa	0,103 ± 0,003 Aa	19,4 ± 0,127Ab	15,0 ± 0,119 Aa
	5	1,175 ± 0,010 Ba	1,064 ± 0,006 Ba	0,229 ± 0,006 Bb	0,170 ± 0,007 Ba	19,5 ± 0,358 Ab	15,9 ± 0,623 Aa
MBM	0,5	0,584 ± 0,121 Aa	0,740 ± 0,007 Ab	0,123 ± 0,035 Aa	0,113 ± 0,009 Aa	20,9 ± 1,184 Ab	11,6 ± 4,465 Aa
	5	1,214 ± 0,022 Ba	1,208 ± 0,006 Ba	0,246 ± 0,007 Bb	0,189 ± 0,009 Ba	20,3 ± 0,593 Ab	15,7 ± 0,818 Ba
BBM	0,5	0,866 ± 0,083 Ab	0,650 ± 0,024 Aa	0,158 ± 0,015 Ab	0,098 ± 0,015Aa	18,3 ± 0,591 Ab	11,8 ± 2,491 Aa
	5	1,192 ± 0,007 Bb	0,695 ± 0,009 Aa	0,178 ± 0,038 Ab	0,109 ± 0,004 Aa	15,0 ± 3,131 Ab	15,8 ± 0,260 Aa
MC	0,5	0,526 ± 0,049 Aa	0,744 ± 0,017 Ab	0,088 ± 0,001 Aa	0,088 ± 0,022Aa	18,8 ± 0,220 Ab	13,1 ± 2,106 Aa
	5	1,108 ± 0,004 Ba	1,210 ± 0,012 Ba	0,198 ± 0,003 Ba	0,164 ± 0,002 Ba	17,8 ± 0,355 Aa	13,5 ± 0,223 Aa
Illman	0,5	0,423 ± 0,033 Aa	0,711 ± 0,032 Ab	0,063 ± 0,011 Aa	0,111 ± 0,019 Ab	15,3 ± 0,842Aa	15,4 ± 1,830 Aa
	5	1,807 ± 0,062 Bb	1,397 ± 0,006 Ba	0,329 ± 0,043 Bb	0,173 ± 0,009 Ba	17,4 ± 3,091 Ab	12,4 ± 0,583 Aa

Médias contendo diferentes letras minúscula nas linhas, para cada resultado observado, denotam diferenças significativas entre as duas espécies de algas pelo teste Tukey (p ≤ 0,05). Médias contendo diferentes letras maiúsculas nas colunas, para cada resultado observado, denotam diferenças significativas entre as adições de CO₂ pelo teste Tukey (p ≤ 0,05).

2.3.3. Efeito de diferentes meios de cultura sintéticos e da adição de CO₂ no cultivo de *Scenedesmus* sp. BR003 e *Chlorella* sp. BR019

A adição de CO₂ mostrou-se importante para produção de biomassa final, entretanto este fator não está sempre associado ao aumento das concentrações dos conteúdos celulares. Para a cepa *Chlorella* sp. BR019 houve aumento da quantidade de biomassa com o aumento da adição de CO₂ (Tabela 2), porém não houve aumento no teor de lipídios por unidade de biomassa entre diferentes adições de CO₂. A concentração de carboidratos totais também não foi influenciada pela quantidade de CO₂ fornecida. O meio Illman apresentou diminuição da concentração de proteínas com o aumento da adição de CO₂. Com a adição de 0,5% o valor obtido no cultivo foi de $41,0 \pm 3,7$ % e para adição de 5%, $14,9 \pm 1,7$ % (Tabela 3).

Para a cepa *Scenedesmus* sp. BR003 também houve aumento da quantidade de biomassa com o aumento da injeção de CO₂, com exceção do meio BBM, onde a adição com CO₂ não foi significativa. Para a produção lipídica, houve diferença para os meios MBM e MC, sendo a maior produção observada com a adição de 5% de CO₂. Para o meio MBM, houve um aumento na concentração de lipídios de $11,6 \pm 4,5$ % para $15,7 \pm 0,8$ %, a qual foi simultânea com uma queda na concentração de carboidratos, de $47,4 \pm 6,2$ % para $33,4 \pm 3,8$ % (Tabela 3). Para os outros meios de cultura, o aumento na injeção de CO₂, não proporcionou aumento no teor de lipídios, sugerindo que as maiores quantidades de lipídios obtidas foram consequência do aumento da biomassa e não da quantidade de lipídios por unidade de biomassa. Em alguns tratamentos o aumento da biomassa não foi proporcional ao aumento do teor de lipídios. No cultivo de *Chlorella* sp. BR019 no meio Illman, o ganho na concentração de biomassa foi de aproximadamente 4 vezes, enquanto o ganho na concentração de lipídios foi superior a 5 vezes, resposta observada também pelo aumento do teor de lipídios.

A concentração de carboidratos para injeção de 5% de CO₂ foi menor também para os meios MC e Illman, porém sem aumento da concentração lipídica para este último meio. Para proteínas, com exceção do meio MBM, a presença de maiores quantidades de CO₂, não resultou em maiores quantidades de proteínas (Tabela 3).

Quando a produção de lipídios é avaliada por litro de meio de cultivo, as respostas são diferentes. A adição de 5 % de CO₂ resultou em incremento na produção lipídica para todos os meios, exceto o meio BBM, onde a produção foi estatisticamente igual para os dois níveis de CO₂ adicionados. A cepa *Chlorella* sp. BR019 produziu

mais lipídios que a cepa *Scenedesmus* sp. BR003 em todos os tratamentos com adição de 5 % de CO₂, exceto no meio MC, onde a produção foi igual para as duas cepas. Para adição de 0,5 % de CO₂, a produção de lipídio também foi maior para a cepa *Chlorella* sp. BR019 nos meios BG11 e BBM, porém no cultivo com meio Illman para este mesmo nível de CO₂, a cepa *Scenedesmus* sp. BR003 produziu mais lipídios ($0,111 \pm 0,02 \text{ g L}^{-1}$). Para os meios MDM, MBM e MC a produção de lipídios foi estatisticamente igual para as duas cepas (Tabela 2).

Os meios de cultura influenciaram pouco a produção lipídica para a cepa *Scenedesmus* sp. BR003. Com a adição de 0,5 % de CO₂, não houve diferença estatística entre os tratamentos e para adição de 5 %, o meio MBM apresentou menor produção ($0,189 \pm 0,009 \text{ g L}^{-1}$) em relação aos demais tratamentos. Para *Chlorella* sp. BR019, a produção de lipídios variou com os diferentes meios de cultura, sendo as maiores produções obtidas nos meios BBM ($0,158 \pm 0,015 \text{ g L}^{-1}$) e BG11 ($0,147 \pm 0,004 \text{ g L}^{-1}$) para adição de 0,5 % de CO₂ e nos meios BG11 ($0,297 \pm 0,016 \text{ g L}^{-1}$) e Illman ($0,329 \pm 0,043 \text{ g L}^{-1}$) para adição de 5 % de CO₂ (Tabela 4).

Estudos realizados por Chiu *et al.* (2009) indicam que a adição de 2% de CO₂ pode resultar em aumento na biomassa final de até 5 vezes superior ao proporcionado pela aeração convencional, sem adição suplementar de CO₂, e que a adição de CO₂ acima de 5% pode ser inibitória para determinadas cepas. O aumento da disponibilidade de CO₂ influencia positivamente a fotossíntese. Quando uma concentração excessiva é fornecida e a fotossíntese chega a valores máximos, porém ocorre o declínio em uma fase subsequente, onde podem ser geradas concentrações tóxicas de algumas substâncias que se acumulam durante o metabolismo do carbono. Em um trabalho com espécies do gênero *Chlorella*, Lv *et al.* (2010) relatam que concentrações de CO₂ acima de 2% podem inibir o crescimento resultando em baixa produção de biomassa. No entanto Ryu *et al.* (2009) obtiveram maior rendimento em massa seca quando cultivaram *Chlorella* sp. AG10002 com adição de 5 % de CO₂. Nas condições testadas no presente trabalho, a adição com 5 % de CO₂ proporcionou aumento na concentração de biomassa, porém pouco incremento no teor de lipídios por unidade de biomassa.

A capacidade de tolerar elevadas concentrações de CO₂ é mencionada por Chiu *et al.* (2009), que afirmaram que *Chlorella* sp. acumula mais lipídios com adição de CO₂ na faixa de 2% a 5% de CO₂. Murakami e Ikenouchi, (1997) fazem referência a duas cepas, *Chlorella* sp. UK001 e *Chlorella littorale*, que apresentaram a capacidade de fixação de CO₂ superiores a $1 \text{ g L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$, o que pode justificar o uso de quantidades

acima de 2 % ou até mesmo 10% de CO₂ como Sung *et al.* (1999) que atingiu teor de biomassa de 5 g L⁻¹. A adição de CO₂ em cultivos de *Chlorella* sp. com suplementação de CO₂ entre 0,33 e 15% resultou em maior produção de biomassa e lipídios (SUALI, SARTABLY, 2012). Tais resultados sugerem que a resistência a diferentes concentrações de CO₂ varia de acordo com a espécie cultivada.

Tabela 3 – Análise de composição da biomassa de acordo com a adição de CO₂ para *Chlorella* sp. BR019 e *Scenedesmus* sp. BR003.

Meio de Cultura	Teor de CO ₂ (%)	Carboidrato (%)		Proteína (%)	
		BR019	BR003	BR019	BR003
BG11	0,5	25,8 ± 0,883 Aa	45,3 ± 2,660 Ab	28,5 ± 0,901 ABa	27,3 ± 1,552 Aa
	5	22,8 ± 0,495 Aa	39,9 ± 9,078 Ab	23,7 ± 1,970 ABa	30,6 ± 1,832 ABCa
MDM	0,5	23,3 ± 2,261 Aa	43,1 ± 1,421 Ab	36,9 ± 2,561 ABa	30,2 ± 8,087 Aa
	5	26,4 ± 2,967 Aa	34,2 ± 2,687 Aa	31,4 ± 1,725 Ba	34,8 ± 2,319 BCa
MBM	0,5	35,7 ± 10,223 Aa	47,4 ± 6,204Ba	40,2 ± 9,057 Bb	29,9 ± 4,610 Aa
	5	24,7 ± 1,201 Aa	33,4 ± 3,771 Aa	28,5 ± 1,591 ABa	28,6 ± 1,240 Aba
BBM	0,5	18,3 ± 3,713 Aa	50,0 ± 11,088 Ab	25,0 ± 4,151 Aa	22,8 ± 0,958 Aa
	5	28,4 ± 5,317 Aa	46,2 ± 8,793 Ab	26,3 ± 1,659 ABa	45,1 ± 2,840 Cb
MC	0,5	31,2 ± 2,739 Aa	53,0 ± 1,954 Ab	37,0 ± 2,927 ABb	20,6 ± 1,527 Aa
	5	30,5 ± 4,438Aa	35,9 ± 2,973 Aa	28,5 ± 2,376 ABa	26,1 ± 2,109 ABa
Illman	0,5	22,7 ± 1,972 Aa	51,3 ± 0,078 Ab	41,0 ± 3,696 Bb	23,9 ± 3,326 Aa
	5	18,6 ± 2,483 Aa	31,9 ± 4,524 Aa	14,9 ± 1,728 Aa	19,4 ± 2,716 Aa

Médias contendo diferentes letras minúscula nas linhas, para cada resultado observado, denotam diferenças significativas entre as duas espécies de algas pelo teste Tukey (p ≤ 0,05). Médias contendo diferentes letras maiúsculas nas colunas, para cada resultado observado, denotam diferenças significativas entre as adições de CO₂ pelo teste Tukey (p ≤ 0,05).

Para o cultivo com *Chlorella* sp., BR019 o efeito foi positivo na produção de biomassa, porém em outros estudos realizados por este grupo de pesquisa, a adição com 5 % de CO₂ resultou em efeito negativo no cultivo de *Chlorella* sp. BR001 resultando em baixa produção de biomassa (SOARES, 2012).

O efeito do meio de cultura, quando utilizada a injeção de 0,5 % de CO₂, não foi observado para *Scenedesmus* sp. BR003, onde as médias de biomassa não diferiram, assim como o conteúdo lipídico. Em comparação com *Chlorella* sp. BR019, os meios MDM, MBM, MC e Illman apresentaram maior produção de biomassa para *Scenedesmus* sp. BR003. Como citado anteriormente, o incremento na injeção de CO₂ resultou em aumento da biomassa, com diferença entre os meios de cultura, onde o meio Illman apresentou maior produção de biomassa ($1,397 \pm 0,006 \text{ mg mL}^{-1}$). O meio que resultou em menor biomassa foi o MBM com produção de ($0,695 \pm 0,009 \text{ mg mL}^{-1}$). As concentrações de lipídios não variaram entre os meios de cultura para esta cepa (Tabela 4).

Para *Chlorella* sp. BR019 houve diferença entre os meios de cultura tanto na produção de biomassa quanto na produção de lipídios. O meio BBM apresentou maior produção de biomassa ($0,866 \pm 0,083 \text{ mg mL}^{-1}$), porém, a maior quantidade de lipídios por unidade de biomassa foi obtida no meio MBM ($20,8 \pm 1,2 \%$) (Tabela 4). O aumento da injeção de CO₂ também resultou em aumento da biomassa para esta cepa, com diferença de produção entre os meios de cultura. A maior produção de biomassa para *Chlorella* sp. BR019, assim como para *Scenedesmus* sp. BR003, foi obtida no cultivo realizado no meio Illman ($1,807 \pm 0,062 \text{ mg mL}^{-1}$), porém este aumento de biomassa não resultou em aumento no teor de lipídios. A cepa *Chlorella* sp. BR019 apresentou maior produção de biomassa nos meios BG11, BBM e Illman quando comparada à *Scenedesmus* sp. BR003. Para produção de lipídios, *Chlorella* sp. BR019 obteve maiores concentrações em todos os meios, com exceção do meio MC, onde a *Scenedesmus* sp. BR003 foi mais produtiva (Tabela 4).

Apesar de haver relatos contraditórios, as condições de cultivo podem influenciar na produção de carboidratos. Diferentes concentrações de CO₂ e limitação nutricional podem afetar a produção de carboidratos. Porém as respostas podem variar com cada espécie (MARKOU *et al.*, 2012). A redução nas concentrações de CO₂ resulta no aumento do teor de carboidratos (THYSSEN *et al.*, 2001). Esse aumento de carboidratos está relacionado com o mecanismo de concentração de CO₂, que permite que as microalgas acumulem carbono inorgânico em condições de baixa disponibilidade

(IZUMO *et al.*, 2007). As microalgas possuem mecanismos de concentração de CO₂ que envolvem o transporte transmembrana e a anidrase carbônica. Em baixas concentrações de CO₂ no meio, a atividade da anidrase carbônica aumenta para garantir maior disponibilidade de CO₂ para a atividade da enzima rubisco presente no ciclo de Calvin, responsável pela redução do carbono a carboidrato. A atividade da anidrase carbônica é induzida pelo pH alcalino além da baixa concentração de carbono. Outros nutrientes como N e P também podem alterar quantidade de carboidrato presente na célula. Em condições de baixa disponibilidade de N e P, o fluxo de carbono é desviado da síntese de proteínas para a síntese de carboidratos e lipídios (HU, 2004).

As duas espécies estudadas neste trabalho diferiram na produção de carboidratos, sendo que *Scenedesmus* sp. BR003 apresentou maiores quantidades de carboidratos em sua composição para todos os meios de cultura com adição de 0,5% de CO₂, exceto para o meio MBM. Neste meio, a menor adição de CO₂ resultou em um maior teor de carboidratos. Para *Chlorella* sp. BR019, as concentrações de carboidratos não apresentaram diferença entre os meios, independente da adição de CO₂. As cepas se comportaram de maneiras diferentes, sendo que *Scenedesmus* sp. BR003 apresentou maior capacidade de acumular carboidratos do que *Chlorella* sp. BR019 (Tabela 5).

O teor de proteínas não foi influenciado pelos meios de cultura no cultivo de *Scenedesmus* sp. BR003 com injeção de 0,5%, porém houve diferença entre os meios com injeção de 5 % de CO₂. As concentrações de proteína diferiram nos meios para *Chlorella* sp. BR019 com adição de 0,5 %, sendo que o meio BBM produziu menor quantidade de proteína (25,0 ± 4,15 %). No cultivo com adição de 5% de CO₂, também houve diferença entre os meios, porém o Illman foi o que produziu menor quantidade de proteínas (14,9 ± 1,73 %) (Tabela 5).

Tabela 4 – Produção de biomassa e lipídios para adição de 0,5 % e 5 % de CO₂, para *Chlorella* sp. BR019 e *Scenedesmus* sp. BR003.

Adição de CO ₂	Meio de Cultura	Biomassa (g L ⁻¹)		Lipídio (g L ⁻¹)		Lipídio (%)	
		BR019	BR003	BR019	BR003	BR019	BR003
0,5%	BG11	0,723 ± 0,028 BCa	0,687 ± 0,007 Aa	0,147 ± 0,004 Cb	0,090 ± 0,011 Aa	20,3 ± 0,244 ABb	15,0 ± 0,139 Aa
	MDM	0,546 ± 0,066 Aa	0,688 ± 0,015 Ab	0,106 ± 0,012 ABCa	0,103 ± 0,003 Aa	19,4 ± 0,127 ABb	15,0 ± 0,119 Aa
	MBM	0,584 ± 0,121 ABb	0,740 ± 0,007 Ab	0,123 ± 0,035 BCa	0,113 ± 0,009 Aa	20,8 ± 1,184 Bb	11,6 ± 4,465 Aa
	BBM	0,866 ± 0,083 Cb	0,650 ± 0,024 Aa	0,158 ± 0,015 Cb	0,098 ± 0,015 Aa	18,3 ± 0,590 ABb	11,8 ± 2,491 Aa
	MC	0,526 ± 0,049 Aa	0,744 ± 0,017 Ab	0,088 ± 0,001 ABa	0,088 ± 0,022 Aa	18,8 ± 0,220 ABb	13,1 ± 2,106 Aa
	ILLMAN	0,423 ± 0,033 Aa	0,711 ± 0,032 Ab	0,063 ± 0,011 Aa	0,111 ± 0,019 Ab	15,3 ± 0,842 Aa	15,4 ± 1,830 Aa
5%	BG11	1,457 ± 0,046 Bb	1,120 ± 0,014 Ba	0,297 ± 0,016 Cb	0,183 ± 0,004 Ba	20,4 ± 0,955 ABb	16,3 ± 0,355 Aa
	MDM	1,175 ± 0,010 Aa	1,064 ± 0,006 Ba	0,229 ± 0,006 Bb	0,170 ± 0,007 Ba	19,5 ± 0,358 ABb	15,9 ± 0,623 Aa
	MBM	1,214 ± 0,022 Aa	1,208 ± 0,006 Ba	0,246 ± 0,007 Bb	0,189 ± 0,009 Ba	20,3 ± 0,593 Bb	15,7 ± 0,818 Aa
	BBM	1,192 ± 0,007 Ab	0,695 ± 0,009 Aa	0,178 ± 0,038 Ab	0,109 ± 0,004 Aa	15,0 ± 3,131 Bb	15,8 ± 0,260 Aa
	MC	1,108 ± 0,004 Aa	1,210 ± 0,012 Ba	0,198 ± 0,003 ABa	0,164 ± 0,002 Ba	17,8 ± 0,355 Aa	13,5 ± 0,223 Aa
	ILLMAN	1,807 ± 0,062 Cb	1,397 ± 0,006 Ca	0,329 ± 0,043 Cb	0,173 ± 0,009 Ba	17,4 ± 3,091 ABb	12,4 ± 0,583 Aa

Médias contendo diferentes letras minúscula nas linhas, para cada resultado observado, denotam diferenças significativas entre as duas espécies de algas pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$). Médias contendo diferentes letras maiúsculas nas colunas, para cada resultado observado, denotam diferenças significativas entre os meios de cultura pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$).

Tabela 5 – Análise da composição da biomassa para adição de 0,5 % e 5 % de CO₂, para *Chlorella* sp. BR019 e *Scenedesmus* sp. BR003.

Adição de CO ₂	Meio de Cultura	Carboidrato (%)		Proteína (%)	
		BR019	BR003	BR019	BR003
0,5%	BG11	25,8 ± 0,883 Aa	45,3 ± 2,660 Ab	28,5 ± 0,901 ABa	27,3 ± 1,552 Aa
	MDM	23,3 ± 2,261 Aa	43,1 ± 1,421 Ab	36,9 ± 2,561 ABa	30,2 ± 8,087 Aa
	MBM	35,7 ± 10,223 Aa	47,4 ± 6,204 Aa	40,2 ± 9,057 Bb	29,9 ± 4,610 Aa
	BBM	18,3 ± 3,713 Aa	50,0 ± 11,088 Ab	25,0 ± 4,151 Aa	22,8 ± 0,958 Aa
	MC	31,2 ± 2,739 Aa	53,0 ± 1,954 Ab	37,0 ± 2,927 ABb	20,6 ± 1,527 Aa
	ILLMAN	22,7 ± 1,972 Aa	51,3 ± 0,078 Ab	41,0 ± 3,696 Bb	23,9 ± 3,326 Aa
5%	BG11	22,8 ± 0,495 Aa	39,9 ± 9,078 Ab	23,7 ± 1,970 ABa	30,6 ± 1,832 ABCa
	MDM	26,4 ± 2,967 Aa	34,2 ± 2,687 Aa	31,4 ± 1,725 Ba	34,8 ± 2,319 BCa
	MBM	24,7 ± 1,201 Aa	33,4 ± 3,771 Aa	28,5 ± 1,591 ABa	28,6 ± 1,240 Aba
	BBM	28,4 ± 5,317 Aa	46,2 ± 8,793 Ab	26,3 ± 1,659 ABa	45,1 ± 2,840 Cb
	MC	30,5 ± 4,438Aa	35,9 ± 2,973 Aa	28,5 ± 2,376 ABa	26,1 ± 2,109 ABa
	ILLMAN	18,6 ± 2,483 Aa	31,9 ± 4,524 Aa	14,9 ± 1,728 Aa	19,4 ± 2,716 Aa

Médias contendo diferentes letras minúscula nas linhas, para cada resultado observado, denotam diferenças significativas entre as duas espécies de algas pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$). Médias contendo diferentes letras maiúsculas nas colunas, para cada resultado observado, denotam diferenças significativas entre os meios de cultura pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$).

2.3.4. Custos relacionados com o cultivo das cepas *Scenedesmus* sp. BR003 e *Chlorella* sp. BR019 em diferentes meios de cultura sintéticos e com diferentes adições de CO₂

Os custos dos cultivos foram calculados com base na produção de biomassa e de lipídios, levando em consideração o custo do meio de cultura e os níveis de CO₂. O incremento na produção devido à maior injeção de CO₂ acarretou em maior custo devido ao gasto com este gás. Isso fica evidente quando os cálculos são feitos com o CO₂ e os maiores custos com meio de cultura estão associados à injeção de 5 % de CO₂. Para produção de lipídios, os menores custos são atribuídos à cepa *Chlorella* sp. BR019, com adição de 0,5 % de CO₂ para os meios MBM (R\$ 484,00) e BBM (R\$ 687,00). De forma geral, os custos relacionados aos nutrientes para a cepa *Scenedesmus* sp. BR003 são maiores quando comparados à cepa *Chlorella* sp. BR019, tendo seu menor valor no meio BBM (R\$ 917,00) para injeção de 0,5 % de CO₂ (Tabelas 8 e 9).

O custo da injeção de CO₂ não foi considerado visto que os cenários produtivos objetivam empregar gases residuais. O meio MBM apresentou o menor custo (R\$ 0,0528 L⁻¹) e, conseqüentemente, apresentou o menor custo por unidade de biomassa produzida tanto para *Scenedesmus* sp. BR003 (R\$ 43,72) quanto para *Chlorella* sp. BR019 (R\$ 43,51), quando suplementado com 5% de CO₂ (Tabelas 6 e 7).

Quando a injeção de CO₂ é considerada, seu impacto nos custos é expressivo. Para produção de biomassa cultivando *Scenedesmus* sp. BR003, todos os meios tiveram menor custo com adição de 0,5 %. Para *Chlorella* sp. BR019 os meios de cultura que apresentaram diferença de custos com baixa adição de CO₂ foram os meios BG11, MBM e BBM. Para as duas cepas, o menor custo por litro de cultivo também foi obtido no meio MBM, R\$ 100,70 e R\$ 96,25 para *Chlorella* sp. BR019 e *Scenedesmus* sp. BR003, respectivamente (Tabelas 6 e 7).

Tabela 6 – Custo do meio de cultura para produção de biomassa e lipídios de acordo com as diferentes adições de CO₂ para *Chlorella* sp. BR019 e *Scenedesmus* sp. BR003 (desconsiderando o custo de injeção do CO₂).

Meio de Cultura	Teor de CO ₂ (%)	Custo por unidade de biomassa produzida (R\$ kg ⁻¹)		Custo por unidade de lipídio produzido (R\$ kg ⁻¹)	
		BR019	BR003	BR019	BR003
BG11	0,5	176,69 ± 5,30 Ba	185,37 ± 3,43 Ba	957,05 ± 50,07 Aa	1471,56 ± 355,51Ba
	5	87,52 ± 4,94 Aa	113,66 ± 2,49 Aa	490,94 ± 35,18 Aa	841,58 ± 36,92 Aa
MDM	0,5	325,08 ± 65,03 Bb	255,65 ± 9,95 Ba	1678,67 ± 321,25 Ba	1704,86 ± 53,05 Ba
	5	149,62 ± 2,32Aa	165,20 ± 1,64 Aa	768,61 ± 36,15 Aa	1039,55 ± 70,71 Aa
MBM	0,5	75,75 ± 1,45 Aa	71,30 ± 1,17 Aa	364,72 ± 34,12 Aa	860,74 ± 678,70Ba
	5	43,51 ± 1,38 Aa	43,72 ± 0,44 Aa	214,90 ± 11,23 Aa	280,76 ± 22,15 Aa
BBM	0,5	114,50 ± 21,34 Aa	112,72 ± 14,77 Aa	564,74 ± 106,80Aa	759,72 ± 160,10 Aa
	5	65,86 ± 0,60 Aa	112,99 ± 2,58 Aa	324,77 ± 25,43 Aa	693,05 ± 18,15 Aa
MC	0,5	495,86 ± 84,97 Bb	332,20 ± 13,38 Ba	2714,40 ± 476,99 Ba	2934,33 ± 756,84 Ba
	5	222,89 ± 1,43 Aa	204,05 ± 3,57 Aa	1553,28 ± 400,93 Aa	1293,13 ± 13,72 Aa
Illman	0,5	273,27 ± 103,51 Bb	162,75 ± 12,12 Ba	1826,03 ± 855,90 Bb	1091,64 ± 270,32 Ba
	5	63,90 ± 3,23 Aa	85,52 ± 0,51 Aa	371,83 ± 63,60 Aa	667,11 ± 48,04 Aa

Médias contendo diferentes letras minúscula nas linhas, para cada resultado observado, denotam diferenças significativas entre as duas espécies de algas pelo teste Tukey (p ≤ 0,05). Médias contendo diferentes letras maiúsculas nas colunas, para cada resultado observado, denotam diferenças significativas entre as adições de CO₂ pelo teste Tukey (p ≤ 0,05).

Tabela 7 – Custo do meio de cultura para produção de biomassa a partir do cultivo de *Chlorella* sp. BR019 e *Scenedesmus* sp. R003(desconsiderando o custo de injeção do CO₂).

Adição de CO ₂	Meio de Cultura	Custo por unidade de biomassa produzida (R\$ kg ⁻¹)		Custo por unidade de lipídio produzido (R\$ kg ⁻¹)	
		BR019	BR003	BR019	BR003
0,5%	BG11	176,69 ± 5,30 Ba	185,37 ± 1,98 BCa	957,05 ± 28,91 ABa	1471,56 ± 205,25 ABa
	MDM	289,90 ± 22,71 Cb	255,65 ± 5,74 Ca	1678,67 ± 185,47 BCa	1704,86 ± 30,63 Ba
	MBM	75,75 ± 0,84 Aa	71,30 ± 0,68 Aa	364,72 ± 19,70 Aa	860,74 ± 391,85 Aa
	BBM	114,50 ± 12,32 ABa	112,72 ± 8,53 ABa	564,74 ± 61,66 Aa	759,72 ± 92,43 Aa
	MC	544,70 ± 8,01 Db	332,20 ± 7,67 Da	2714,40 ± 275,39 Da	2934,33 ± 436,96 Ca
	ILLMAN	214,87 ± 22,02 Cb	162,75 ± 1,53 Ba	1826,03 ± 494,16 Cb	1091,64 ± 156,07 ABa
5%	BG11	87,52 ± 2,85 ABa	113,66 ± 1,43 ABa	490,94 ± 20,31 Aa	841,58 ± 21,31 ABa
	MDM	149,62 ± 1,34 BCa	165,20 ± 0,95 BCa	768,61 ± 20,87 ABa	1039,55 ± 40,83 ABa
	MBM	43,51 ± 0,80 Aa	43,72 ± 0,25 Aa	214,90 ± 6,48 Aa	280,75 ± 12,79 Aa
	BBM	65,86 ± 0,35 Aa	113,48 ± 1,98 ABa	324,77 ± 14,68 Aa	645,29 ± 37,40 ABa
	MC	222,89 ± 0,83 Ca	204,05 ± 2,06 Ca	1553,28 ± 231,48 Ba	1239,13 ± 7,92 Ba
	ILLMAN	132,90 ± 0,78 Aa	85,52 ± 0,29 Aa	811,26 ± 81,35 Aa	667,11 ± 27,74 ABa

Médias contendo diferentes letras minúscula nas linhas, para cada resultado observado, denotam diferenças significativas entre as duas espécies de algas pelo teste Tukey (p ≤ 0,05). Médias contendo diferentes letras maiúsculas nas colunas, para cada resultado observado, denotam diferenças significativas entre os meios de cultura pelo teste Tukey (p ≤ 0,05).

Tabela 8 – Custo do meio de cultura com adição de CO₂ para produção de biomassa e lipídios para *Chlorella* sp. BR019 e *Scenedesmus* sp. BR003.

Meio de Cultura	Teor de CO ₂ (%)	Custo por unidade de biomassa produzida (R\$ kg ⁻¹)		Custo por unidade de lipídio produzido (R\$ kg ⁻¹)	
		BR019	BR003	BR019	BR003
BG11	0,5	201,63 ± 5,30 Aa	210,31 ± 1,98 Aa	1092,16 ± 29,28 Aa	1670,11 ± 234,89 Aa
	5	336,94 ± 2,85 Ba	363,08 ± 1,43 Ba	1889,52 ± 393,16 Ba	2687,87 ± 45,69 Bb
MDM	0,5	350,02 ± 37,54 Ab	280,60 ± 5,74 Aa	1807,60 ± 184,92 Aa	1871,23 ± 29,89 Aa
	5	399,05 ± 1,34 Aa	414,62 ± 0,95 Ba	2049,48 ± 44,46 Aa	2609,12 ± 102,23 Ba
MBM	0,5	100,70 ± 0,84 Aa	96,25 ± 0,68 Aa	484,70 ± 24,99 Aa	1159,91 ± 525,94 Ab
	5	292,93 ± 0,80 Ba	293,14 ± 0,25 Ba	1447,20 ± 42,62 Ba	1883,46 ± 93,42 Ba
BBM	0,5	139,45 ± 12,32 Aa	137,66 ± 8,53 Aa	687,76 ± 61,83Aa	917,21 ± 101,66 Aa
	5	315,29 ± 0,35 Ba	362,41 ± 1,49 Ba	1555,08 ± 74,24 Ba	2223,62 ± 42,34 Bb
MC	0,5	520,81 ± 49,06 Ab	357,14 ± 7,67 Aa	2851,06 ± 276,24 Aa	3153,38 ± 464,46 Aa
	5	472,31 ± 0,83 Aa	453,48 ± 2,06 Ba	3293,35 ± 496,82 Aa	2874,11 ± 23,31 Aa
Illman	0,5	298,21 ± 59,76 Ab	187,69 ± 7,00 Aa	1989,63 ± 501,83 Ab	1257,44 ± 173,63 Aa
	5	313,33 ± 1,86 Aa	331,95 ± 0,29 Ba	1834,92 ± 187,35 Aa	2682,92 ± 104,69 Bb

Médias contendo diferentes letras minúscula nas linhas, para cada resultado observado, denotam diferenças significativas entre as duas espécies de algas pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$). Médias contendo diferentes letras maiúsculas nas colunas, para cada resultado observado, denotam diferenças significativas entre as adições de CO₂ pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$).

Tabela 9 – Custo do meio de cultura com adição de CO₂ para produção de biomassa a partir do cultivo de *Chlorella* sp. BR019 e *Scenedesmus* sp. BR003.

Adição de CO ₂	Meio de Cultura	Custo por unidade de biomassa produzida (R\$ kg ⁻¹)		Custo por unidade de lipídio produzido (R\$ kg ⁻¹)	
		BR019	BR003	BR019	BR003
0,5%	BG11	201,63 ± 5,30 Ba	210,31 ± 1,98 BCa	1092,16 ± 29,28 ABa	1670,11 ± 234,89 Aa
	MDM	350,02 ± 37,54 Cb	280,60 ± 5,74 Ca	1807,60 ± 184,92 Ba	1871,23 ± 29,89 Aa
	MBM	100,70 ± 0,84 Aa	96,25 ± 0,68 Aa	484,70 ± 24,99 Aa	1159,91 ± 525,94 Ab
	BBM	139,45 ± 12,32 ABa	137,66 ± 8,53 ABa	687,76 ± 61,83Aa	917,21 ± 101,66 Aa
	MC	520,81 ± 49,06 Db	357,14 ± 7,67 Da	2851,06 ± 276,24 Ca	3153,38 ± 464,46Ba
	ILLMAN	298,21 ± 59,76 Cb	187,69 ± 7,00 Ba	1989,63 ± 501,83 BCb	1257,44 ± 173,63 Aa
5%	BG11	336,94 ± 2,85 ABa	363,08 ± 1,43 ABa	1889,52 ± 393,16 Aa	2687,87 ± 45,69 ABb
	MDM	399,05 ± 1,34 BCa	414,62 ± 0,95 BCa	2049,48 ± 44,46 Aa	2609,12 ± 102,23 ABa
	MBM	292,93 ± 0,80 Aa	293,14 ± 0,25 Aa	1447,20 ± 42,62 Aa	1883,46 ± 93,42 Aa
	BBM	315,29 ± 0,35 Aa	362,41 ± 1,49 ABa	1555,08 ± 74,24 Aa	2223,62 ± 42,34 ABb
	MC	472,31 ± 0,83 Ca	453,48 ± 2,06 Ca	3293,35 ± 496,82 Ba	2874,11 ± 23,31 Ba
	ILLMAN	313,33 ± 1,86 Aa	331,95 ± 0,29 Aa	1834,92 ± 187,35 Aa	2682,92 ± 104,69 ABb

Médias contendo diferentes letras minúscula nas linhas, para cada resultado observado, denotam diferenças significativas entre as duas espécies de algas pelo teste Tukey (p ≤ 0,05). Médias contendo diferentes letras maiúsculas nas colunas, para cada resultado observado, denotam diferenças significativas entre os meios de cultura pelo teste Tukey (p ≤ 0,05).

Devido ao menor custo, o meio MBM foi otimizado visando um aumento na produção de biomassa algácea e lipídios. O meio Illman, por apresentar a maior concentração de biomassa produzida, foi caracterizado no cultivo de *Chlorella* sp. BR019 por meio da quantificação de biomassa, lipídios, carboidratos e consumo de nitrogênio e fósforo durante um cultivo de 15 dias.

2.3.5. Resposta da cepa *Chlorella* sp. BR019 ao meio de cultura sintético Illman suplementado com 5% de CO₂

A cepa *Chlorella* sp. BR019 obteve a maior produção de biomassa quando cultivada no meio Illman com injeção de 5% de CO₂. Para caracterizar o comportamento desta cepa no meio Illman e buscar uma alternativa para redução dos custos nesta etapa produtiva, foram realizados cultivos com um meio alternativo elaborado a partir de fertilizantes agrícolas e comparados ao meio Illman elaborado a partir de reagentes analíticos.

A quantidade de fertilizante utilizada no preparo do meio de cultura foi calculada a partir da porção mínima solúvel informada pelo fabricante. Os fertilizantes foram obtidos junto ao Departamento de Fitotecnia da UFV e também são facilmente encontrados no comércio local. Os cinco fertilizantes utilizados foram determinados para suprirem os macronutrientes do meio de cultura controle. Os fertilizantes utilizados foram: monofosfato de amônio purificado (Fertilizantes Heringer, Brasil), superfosfato simples (Adubos Marisa, Brasil), cloreto de potássio (Fertilizantes Heringer, Brasil), sulfato de magnésio (Multitécnica Nutrientes Minerais, Brasil), solução de ferro quelado (Ubyfol Agroquímica, Brasil). Alguns nutrientes ausentes na formulação original do meio foram adicionados por fazerem parte da composição dos fertilizantes como, por exemplo, o cálcio. Os custos dos fertilizantes utilizados são apresentados na Tabela 12.

O meio Illman elaborado a partir de fertilizantes agrícolas teve seu custo reduzido em aproximadamente 77,4 %, atingindo o valor de R\$ 0,026. Os sais utilizados para elaboração do meio de cultura e o respectivo custo são apresentados na Tabela 12.

Tabela 12 – Fertilizantes agrícolas utilizados na elaboração do meio de cultura Illman e o custo final do meio.

Fertilizantes	Concentração (g L ⁻¹)	Custo (R\$ L ⁻¹)
Monofosfato de amônio (Fertilizante Heringer)	0,358	0,00222
Superfosfato simples (Adubos Marisa)	3,290	0,00388
Cloreto de Potássio (Fertilizante Heringer)	3,439	0,01277
Sulfato de magnésio (Multitécnica Nutrientes)	5,48	0,00651
Ubyfol* (Ubyfol Agroquímica)	0,040	0,00072
Total		0,02610

*Quantidade utilizada em mL.

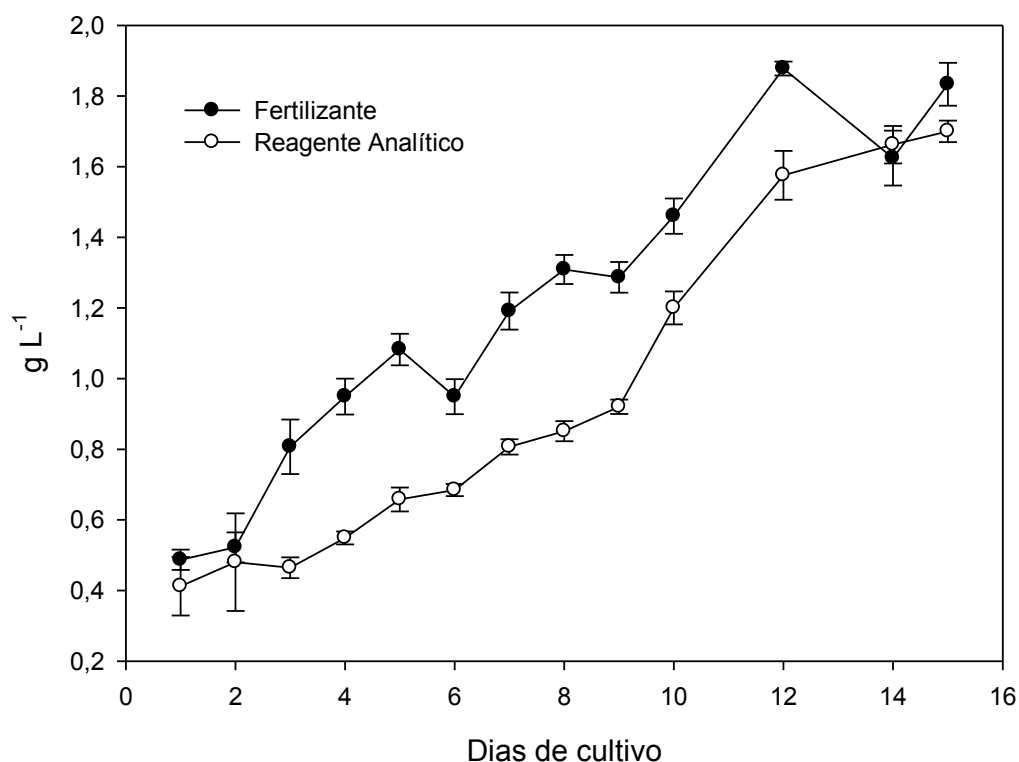
No preparo do meio de cultura foi realizada a mistura prévia dos sais e posterior filtração, devido à necessidade de não adicionar resíduos sólidos presentes em grande quantidade nos fertilizantes. Estes resíduos sólidos podem prejudicar a entrada de luz no cultivo e a determinação da densidade ótica através da opacidade. Para um total de 12,567 g, ficaram retidos nos filtro 10,140 g, ou seja, 80,7 % de resíduos, resultantes principalmente do material inerte presente no cloreto de potássio e à baixa solubilidade do superfosfato simples. A opção de utilizar o superfosfato simples como fonte de fósforo foi uma alternativa para evitar a suplementação com sais de pureza analítica, uma vez que o P presente no monofosfato de amônio não foi suficiente para atingir a quantidade necessária. Devido à baixa solubilidade do superfosfato simples, a concentração presente no meio de cultura alternativo foi inferior à concentração do meio de cultura formulado a partir de reagentes analíticos. A quantidade de P solubilizada, detectada pelo método proposto por Murphy e Riley (1958), foi de 48,60 mg L⁻¹ para o meio à base de fertilizantes e 78,18 mg L⁻¹ para o meio à base de reagentes de pureza analítica.

2.3.6. Massa seca

No experimento realizado anteriormente para seleção dos meios de cultura, o cultivo de *Chlorella* sp. BR019 resultou em uma biomassa final de 1,807 ± 0,062 g L⁻¹. Neste cultivo foram obtidos valores finais de biomassa próximos àqueles obtidos no experimento anterior, sendo 1,833 ± 0,061 g L⁻¹ para o cultivo em meio de cultura

formulado a partir de fertilizantes e $1,70 \pm 0,031 \text{ g L}^{-1}$ para meio de cultura formulado a partir de reagentes analíticos (Figura 5), indicando uma boa repetibilidade dos experimentos. Para o resultado final de biomassa, não houve diferença estatística significativa entre os tratamentos, sugerindo que a quantidade de biomassa produzida não dependeu da fonte de sais utilizada. Para obter a produtividade deste cultivo, foi calculada a quantidade de biomassa produzida diariamente por metro quadrado, que correspondeu a $0,024 \text{ kg m}^{-2} \text{ dia}^{-1}$ e $0,023 \text{ kg m}^{-2} \text{ dia}^{-1}$ para os meios a base de fertilizante e reagente, respectivamente.

Figura 5 - Massa seca de *Chlorella* sp. BR019 durante 15 dias de cultivo no meio Illman, à base de fertilizantes e de reagentes analíticos, com adição de 5% de CO_2 .



Durante os cultivos, o pH apresentou pouca variação. A injeção de 5% de CO_2 e a quantidade de P presente no meio auxiliaram na regulação do pH. O primeiro tende a acidificar o meio de cultura e o P apresenta capacidade de tamponar o meio de cultivo. O pH foi corrigido para $7,5 \pm 0,1$ e, durante o cultivo, a variação verificada foi de 7,1 a 8,0, onde os menores valores foram obtidos no meio a base de fertilizante (pH 7,1 a 7,6) e os maiores no meio a base de reagentes analíticos (pH 7,6 a 8,0). Apesar de não ter ocorrido grandes variações no pH, o meio formulado a partir de fertilizante se comportou de forma diferente ao meio formulado com reagentes analíticos. Não ocorreu

precipitação de microalgas em nenhum momento do cultivo para o meio a base de fertilizantes, o que ocorreu para o meio formulado com reagentes analíticos, que apresentou maior nível de sedimentação de biomassa algal a partir do sexto dia de cultivo (Figura 6).



Figura 6 - Precipitação observada após o 6º dia de cultivo de *Chlorella* sp. BR0019 para os meios formulados a partir de reagentes analíticos.

Verificou-se que o uso de densidade óptica é adequado para estimar a curva de crescimento dos cultivos. Neste trabalho o coeficiente de correlação entre a densidade óptica e o teor de biomassa foi elevado, $R^2 \geq 0,95$ (Figura 7). Essas estimativas para concentração de biomassa são práticas e demandam pouco tempo, entretanto podem ocorrer erros pela presença de partículas em suspensão, resultantes, por exemplo, do uso de fertilizantes sem filtração.

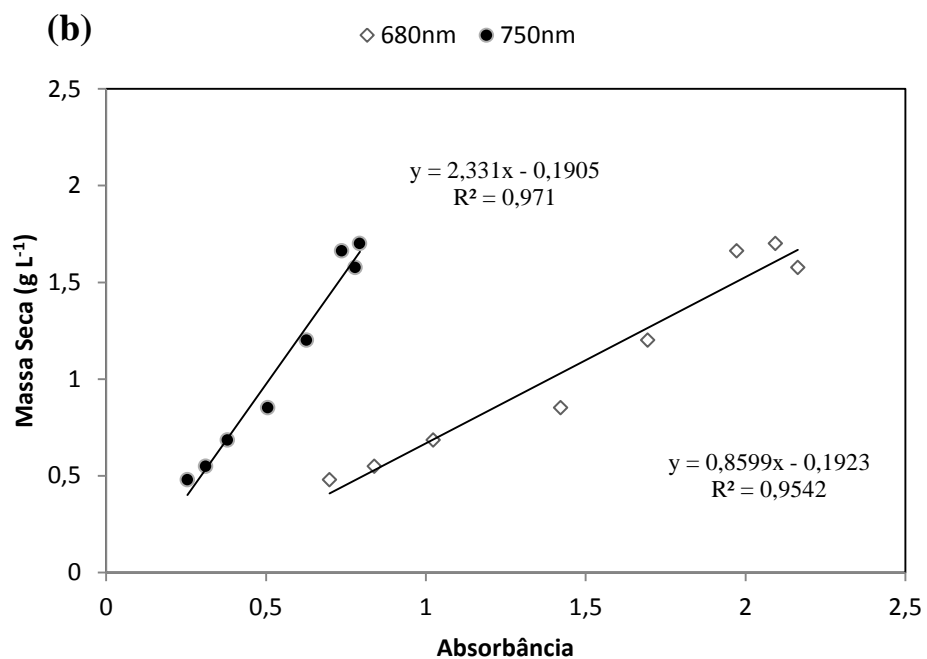
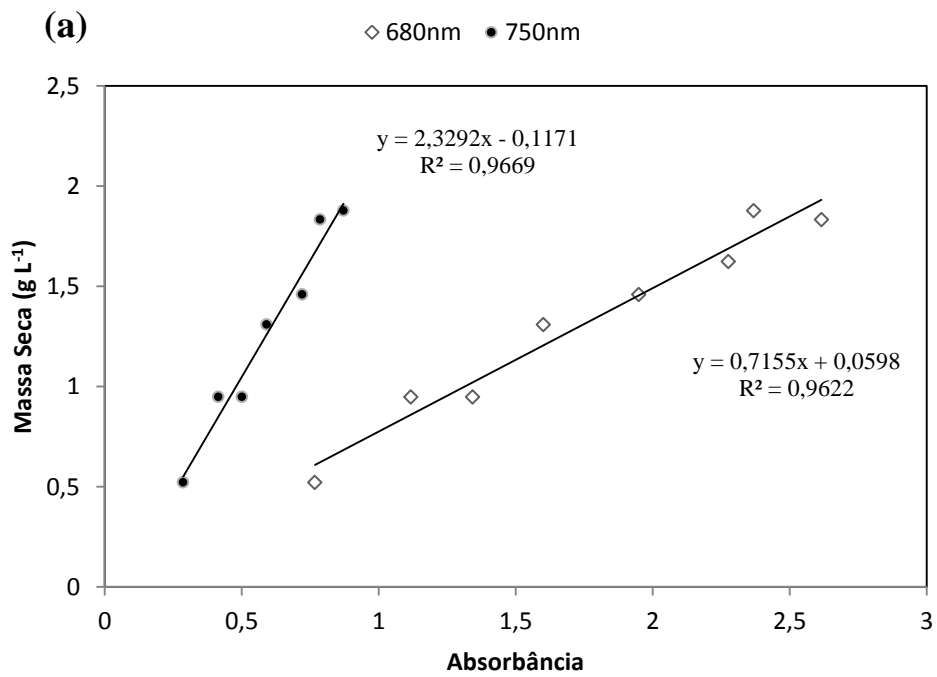


Figura 7 - Regressão linear obtida a partir da correlação entre massa seca e absorbância a 680nm e 750nm para meio Illman à base de fertilizante (a) e para meio Illman à base de reagente analítico (b) durante 15 dias de cultivo *Chlorella* sp. BR0019 no meio Illman, com adição de 5% de CO_2 .

2.3.7. Carboidratos e lipídios

Para produção de lipídios, foram obtidos $18,7 \pm 2,31$ % para meio à base de reagente analítico e $14,97 \pm 0,73$ % para meio a base de fertilizante. No experimento anterior onde foram obtidos $17,4 \pm 3,09$ % (Figura 8). Na determinação de lipídios, ao final do cultivo, não houve diferença significativa entre os tratamentos, indicando que a quantidade de lipídios produzida não dependeu da fonte de sais utilizada. Com este resultado, pode-se comprovar que, para produção de lipídios, é possível a substituição total dos constituintes do meio Illman, de pureza analítica, por fertilizantes, uma vez que os teores finais não apresentaram diferenças significativas em relação ao tratamento testemunha a base de reagentes analíticos.

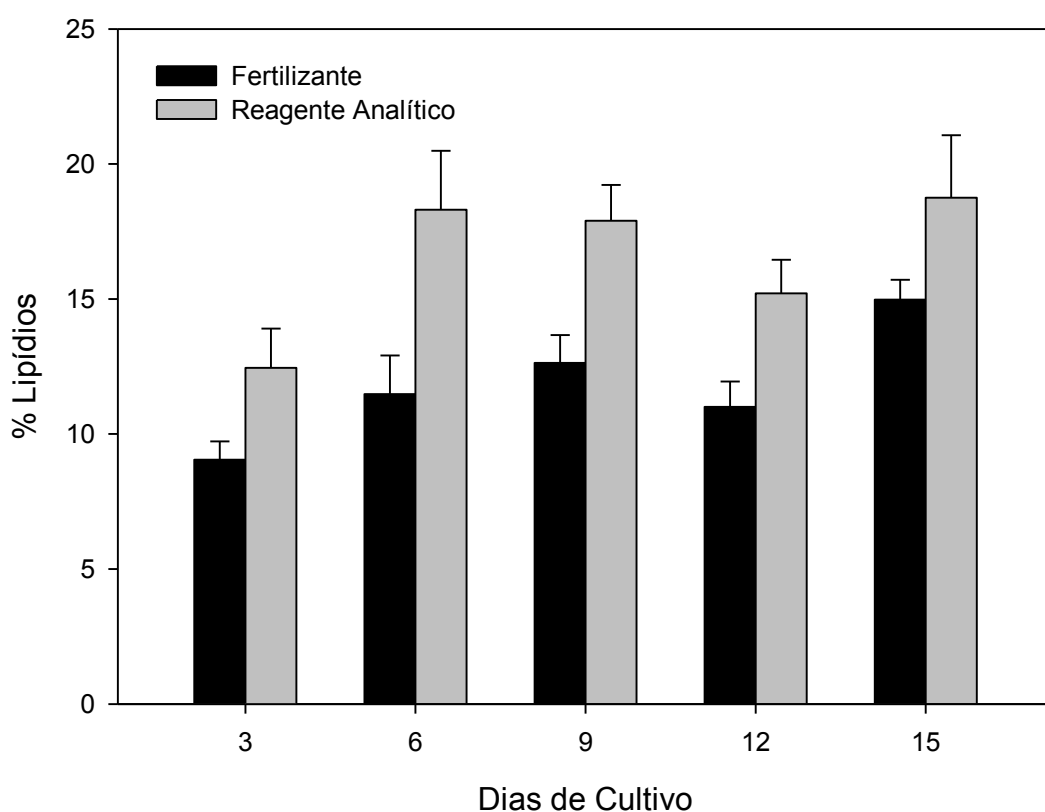


Figura 8 – Percentual de lipídios para o meio à base de fertilizantes e para o meio à base de reagentes analíticos durante 15 dias de cultivo de *Chlorella* sp. BR0019 no meio Illman, com adição de 5% de CO₂.

Já na produção de carboidratos, foram obtidos $17,5 \pm 0,88$ % para meio à base de reagente analítico e $13,4 \pm 0,67$ % para meio a base de fertilizante (Figura 9). Ao final do cultivo, houve diferença estatística significativa entre os tratamentos, mostrando que a quantidade de carboidratos produzida dependeu da fonte de sais utilizada, sendo maior no meio à base de reagentes analíticos.

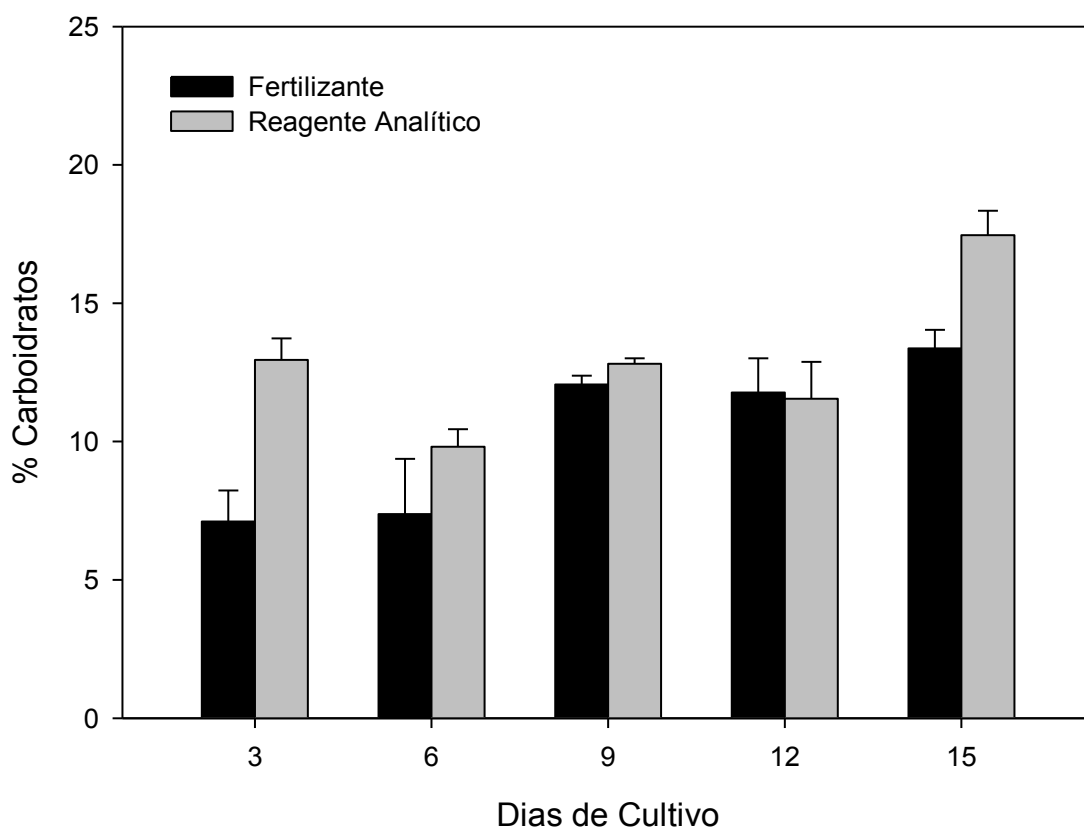


Figura 9 –Percentual de carboidratos para o meio à base de fertilizantes e para o meio à base de reagentes analíticos durante 15 dias de cultivo de *Chlorella* sp. BR0019 no meio Illman, com adição de 5% de CO₂.

2.3.8. Consumo de P e N

O consumo de P teve seu comportamento bem definido, com fases distintas de aumento na assimilação para os dois tratamentos. A primeira fase foi caracterizada pelo maior consumo de amônio em relação ao nitrato, uma vez que o custo energético para absorção de amônio pelas algas é menor quando comparado à absorção de nitrato. Na segunda fase, o aumento do consumo de nitrato ocorreu com a exaustão do amônio presente no meio. Uma terceira fase foi observada a partir do dia 12, sendo que o consumo de amônio manteve-se baixo, coincidindo com o início de uma fase estacionária do cultivo para o meio a base de reagente analítico e uma queda na produção de biomassa no meio a base de fertilizante. Foi observada uma pequena fase *lag*, para o consumo de N e P, até o segundo dia de cultivo, na qual consumo destes nutrientes foram baixos (Figura 12).

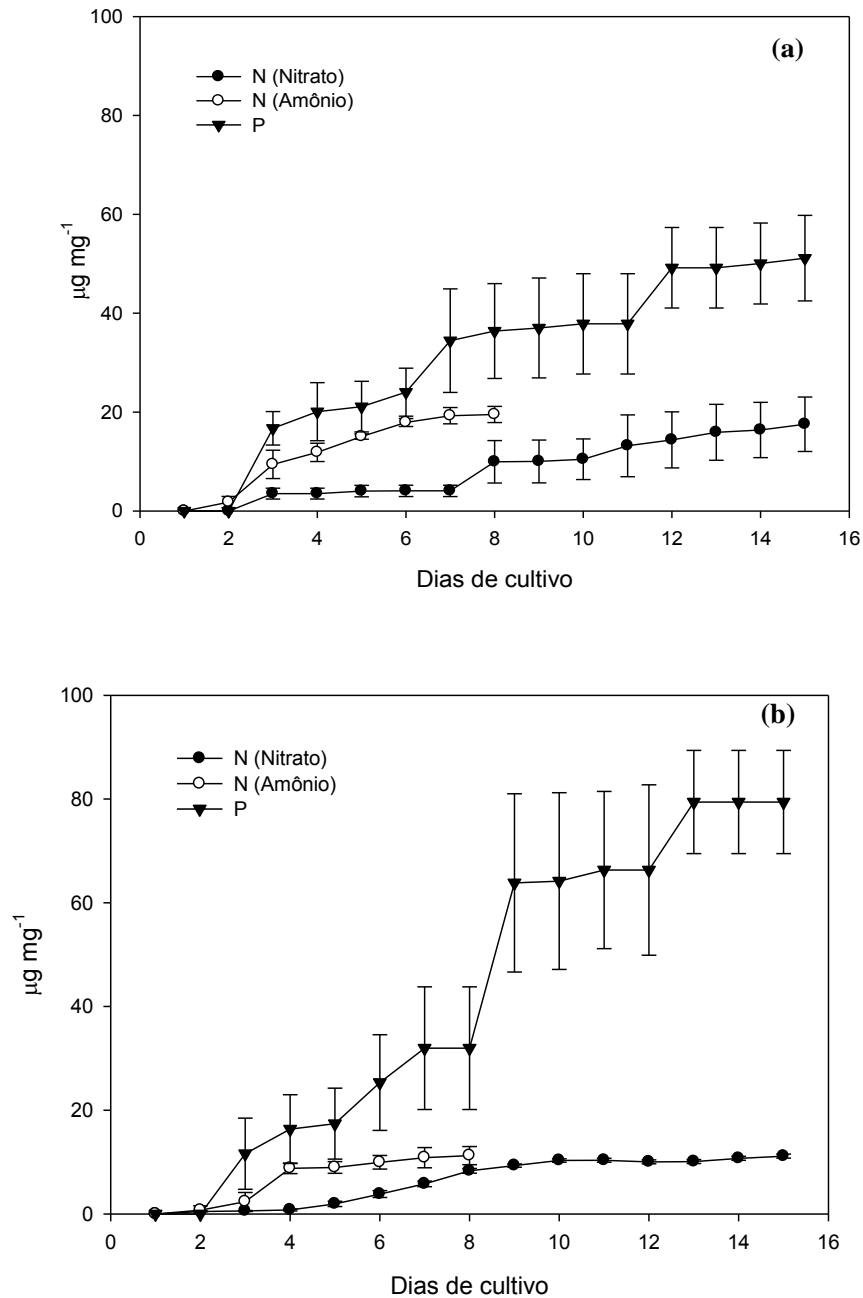


Figura 12. Consumo acumulado de nitrogênio, na forma de amônio e nitrato, e fósforo durante os 15 dias de cultivo no meio Illman à base de fertilizantes (a) e à base de reagentes analíticos (b) com adição de 5% de CO₂ para *Chlorella* sp. BR019.

O consumo e metabolismo de P têm sido estudados em microalgas que crescem sob condições de excesso e limitação de P (SANCHO *et al.*, 1999). As microalgas usualmente contém cerca de 1% P de sua massa seca (BORCHARDT E AZAD, 1968; GOLDMAN, 1980). Entretanto, o consumo de P na produção de bioenergia pode ir muito além, chegando a 3,85% (POWELL *et al.*, 2009). As microalgas têm a capacidade de assimilar P, até mesmo na ausência de crescimento, o que é chamado de

consumo de luxo e pode induzir o importante aumento no teor de P nas células que é armazenado na forma de polifosfatos (LEVIN, SHAPIRO, 1965; BORCHARDT E AZAD, 1968; POWELL *et al.*, 2008).

Analisando o ciclo de vida de um cultivo, Yang *et al.* (2011) concluíram que são necessários 0,71 kg de P para gerar 1 kg de biodiesel. Uma das alternativas para estimar a quantidade de P necessária no meio de cultura, além dos dados disponíveis na literatura, é a análise do cultivo para cada espécie de alga e suas condições específicas de cultivo. Nos cultivos realizados neste trabalho foi estimado o consumo de P para os meios à base de reagente analítico e fertilizantes, que foi de $79,4 \pm 9,95 \text{ mg L}^{-1}$ e $51,1 \pm 8,65 \text{ mg L}^{-1}$ respectivamente.

Yin-Hu *et al.*, (2012) observaram que a absorção de P pode variar conforme as formas de cultivo. Com limitação de P, ou seja, após consumo total do fosfato no meio, a biomassa algal continuou crescendo por 15 dias, porém quando houve excesso de fosfato, ocorreu o consumo de luxo, dobrando a taxa de absorção e sem crescimento de biomassa.

A absorção de luxo deve ser evitada durante a produção de biomassa com o objetivo de reduzir custos, o que limita produção do biodiesel a partir de microalgas. Apenas uma concentração relativamente elevada de fosfato no meio de cultura pode provocar a absorção de luxo (BORCHARDT, AZAD, 1968; POWELL *et al.*, 2009). Assim, na produção de biomassa de microalgas, a dosagem de P deve ser limitada para evitar a assimilação indesejável deste nutriente.

A diferença entre a absorção e o armazenamento de N e P causa a mudança da razão N:P em microalgas. Na fase inicial de crescimento, de células de algas assimilam tanto N quanto P rapidamente, resultando em razões N:P diferentes de acordo com a quantidade de P presente no meio. As algas que apresentaram consumo de luxo de P, continuam a consumir fósforo, apesar da ausência de absorção de nitrogênio, o que causa uma diminuição considerável na relação N: P (YIN-HU *et al.*, 2012).

O consumo do amônio ocorreu nos primeiros dias de cultivo (Figura 12), encerrando no 8º dia para os dois tratamentos, com consumo de $11,24 \pm 1,75 \text{ mg L}^{-1}$ para o meio à base de reagente analítico, e no 10º dia para o meio à base de fertilizantes, com consumo de $19,52 \pm 1,64 \text{ mg L}^{-1}$.

A baixa disponibilidade de N é relatada por inúmeros autores como forma de estimular a produção de lipídeos (ILLMAN *et al.*, 2000; ZHILA *et al.*, 2004; HU *et al.*, 2008; HSIEH, WU, 2009; XIN *et al.*, 2010; SUALI E SABARTLY, 2012). Illman *et al.* (2000) conseguiram até 63% de ganho na produção de lipídeos com restrição de N

durante 14 dias para *Chlorella* sp.. No presente trabalho, o meio não pode ser caracterizado como meio de baixo N pois, ao verter o inóculo, cultivado em meio BG11, uma quantidade residual de nitrato, foi adicionada. Tal fato pode ter alterado as características do meio e uma vez que não ocorreu a restrição de N não houve o aumento esperado na produção de lipídeos. Observou-se que no meio em que a fonte de N foi amônio, o mesmo foi consumido preferencialmente, e a assimilação de nitrato teve um aumento significativo à medida que a quantidade de amônio presente decaía e suprimindo o cultivo até o 15º dia, sem nenhum dia de restrição de N (Figura 12).

Foram consumidos $11,14 \pm 0,38 \text{ mg L}^{-1}$ de N, na forma de nitrato, para o meio à base de fertilizantes e $17,54 \pm 5,51 \text{ mg L}^{-1}$ para o meio à base de reagentes analíticos (Figura 12). O consumo de nitrato se manteve baixo até o 7º dia para o meio a base de fertilizante e até o 5º dia para o meio à base de reagente analítico (Figura 12). O consumo de N na forma de nitrato só aumentou quando o consumo de amônio, que é preferencial para a alga, diminuiu. Este consumo de nitrato aumentou gradualmente e manteve-se até o fim do cultivo, comprovando que não houve deficiência de N (Figura 12). No meio à base de reagentes analíticos o consumo de nitrato cessou no 13º dia, o que pode ter sido responsável pela produção de uma menor quantidade de biomassa.

2.4. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES PARA EXPERIMENTOS FUTUROS

A adição de CO₂ ao cultivo proporcionou aumento da biomassa produzida e, conseqüentemente, um aumento na quantidade de lipídios por litro de cultivo produzidos decorrente da quantidade de biomassa. No entanto, o aumento no teor de lipídios só foi obtido no cultivo com o meio MBM para *Scenedesmus* sp. BR003 concomitante com a redução no teor de carboidratos.

Quando avaliada a produção lipídica por litro de cultivo, observou-se que a composição do meio de cultura influenciou mais a cepa *Chlorella* sp. BR019 em comparação à cepa *Scenedesmus* sp. BR003 e a injeção de uma maior quantidade de CO₂ aumentou a produção lipídica para as duas cepas, porém as maiores concentrações de lipídios foram obtidas com a cepa *Chlorella* sp. BR019.

A espécie *Chlorella* sp. BR019 apresentou uma maior tolerância a elevadas concentrações de CO₂ presentes no cultivo, tendo como resposta o aumento de biomassa e de lipídios. Isto sugere que estas algas têm potencial para cultivo utilizando

fontes alternativas de CO₂ (resíduos industriais), que podem reduzir os custos relacionados à adição do CO₂ industrial (90% de pureza).

Com o cultivo de *Chlorella* sp. BR019 realizado no meio Illman foi possível observar que a quantidade de P adicionada ao meio é excessiva, uma vez que as algas absorveram quantidades muito inferiores às disponibilizadas. Com isto é possível estabelecer uma redução da quantidade de sais presentes no meio, diminuindo custos do meio de cultura.

O uso de fertilizantes agrícolas gerou um resultado equivalente ao uso de reagente analítico, sendo uma boa alternativa para redução dos custos nesta etapa produtiva. Como o meio Illman não possui adição de micronutrientes, a utilização dos fertilizantes para suprir a necessidade de macronutrientes primários e secundários foi eficiente, não havendo necessidade de suplementação com reagentes analíticos ou outros sais.

O meio de cultura Illman formulado a partir de fertilizantes é economicamente viável para o cultivo de microalgas em escala comercial. O meio apresentou biomassa seca superior ao meio controle, e o custo da produção do meio de cultura foi reduzido em cerca de 77 %.

A utilização de fertilizantes dificulta o ajuste da concentração dos meios de cultura em função do meio de referência, em alguns casos adicionando macronutrientes secundários, como o cálcio, e alguns micronutrientes ou metais pesados que estejam presentes em quantidades traço como contaminantes do produto comercial. Porém, neste experimento não foi observado nenhum efeito negativo resultante dessa falta de ajuste de nutrientes, o que não restringe sua utilização.

O método proposto por Murphy e Riley (1958), apresentou os valores de erro padrão associados grandes. Diante dessa situação, este método deve ser aperfeiçoado ou outro método deve ser utilizado para quantificação de P no meio.

2.5. REFERÊNCIAS

ARCHANAA, S.; MOISE, S.; SURAIHKUMAR, G. K. Chlorophyll interference in microalgal lipid quantification through the Bligh and Dyer method. **Biomass and Bioenergy**, 6, 6-9, 2012.

BORCHARDT, J.A., AZAD, H.S. Biological extraction of nutrients. **Journal of Water Pollution Control Federation**, 40, 10, 1739–1754, 1968.

CHIU S.Y., KAO C.Y., TSAI M., ONG S.C., CHEN C.H., KUAN T.C., LIN C.S. Lipid accumulation and CO₂ utilization of *Nannocloropsis oculata* in response to CO₂ aeration. **Bioresource Technology**, 100, 833-838, 2009.

DAVIS, R., ADEN, A., PIENKOS, P.T. Techno-economic analysis of autotrophic microalgae for fuel production. **Applied Energy**, 88, 3524-3531, 2011.

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

GOLDMAN, J.C. Physiological aspects in algal mass cultures. In: **Algal Biomass**, 343–59, Amsterdam: Elsevier/North Holland Biomedical Press, 1980.

GRIFFITHS M.J., GARCIN C., VAN HILLE R.P., HARRISON S.T.L. Interference by pigment in the estimation of microalgal biomass concentration by optical density. **Journal Microbiology Methods**, 85, 119-123, 2011.

HSIEH, C.H., WU, W.T. Cultivation of microalgae for oil production with a cultivation strategy of urea limitation. **Bioresource Technology**, 100, 3921-3926, 2009.

HU, Q. Environmental effects on cell composition. In: Richmond A (ed) **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, 2004.

HU Q., SOMMERFELD M., JARVIS E., GHIRARDI M., POSEWITZ M., SEIBERT M., DARZINS A. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. **Plant Journal**, 54, 621–639, 2008.

ILLMAN, A. M.; SCRAGG, A. H.; SHALES, S. W.. Increase in *Chlorella* Strains Calorific Values When Grown in Low Nitrogen Medium. **Microbiology Technology**, 27, 631–635, 2000.

International Dairy Federation 5B: cheese and processed cheese products: determination of fat content (gravimetric method - reference method). Brussels, Belgium 1986.

IZUMO, A., FUJIWARA, S., OYAMA, Y., SATOH, A., FUJITA, N., NAKAMURA, Y. TSUZUKI M. Physicochemical properties of starch in *Chlorella* change depending on the CO₂ concentration during growth: comparison of structure and properties of pyrenoid and stroma starch. **Plant Science**, 172, 6, 1138–1147, 2007.

KAWACHI M., NOËL M.H. Sterilization and sterile technique, in: Andersen, R.A. (Ed.), *Algal culturing techniques*, first ed. **Elsevier Academic Press**, 65-81, 2005.

KHOZIN-GOLDBERG, I., COHEN, Z. Effect of phosphate starvation on lipid and fatty acid composition of the eustigmatophyte *Monodussubterraneus*. **Phytochemistry**, 67, 696–701, 2006.

LEVIN, G. V. Y., SHAPIRO, J. Metabolic uptake of phosphorus by wastewater organisms. **Journal Water Pollution Control Federation**, 37, 6, 800-822, 1965

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

LV J.M, CHENG L.H., XU X.H., ZHANG L., CHEN H.L. Enhanced lipid production of *Chlorella vulgaris* by adjustment of cultivation conditions. **Bioresource Technology**, 101, 6797-6804, 2010.

MARKOU, G.; ANGELIDAKI, I.; GEORGAKAKIS, D. Microalgal carbohydrates : an overview of the factors influencing carbohydrates production , and of main bioconversion technologies for production of biofuels. **Applied Microbiology Biotechnology**, 631-645, 2012.

MASUKO, T., MINAMI, A., IWASAKI, N., MAJIMA, T., NISHIMURA, S.I., LEE Y.C. Carbohydrate analysis by a phenol–sulfuric acid method in microplate format. **Analytical Biochemistry**, 339, 69-72, 2005.

MURAKAMI, M., IKENOUCI, M.. The biological CO₂ fixation and utilization by RITE (2) Screening and breeding of microalgae with high capability in fixing CO₂. **Energy Conversion and Management**, 38, 493-S497, 1997.

MURPHY, J.B.; RILEY, J.P. A single solution method for the determination of phosphate in natural waters. **Marine Biology Association**, 37, 9-14, 1958.

OHSE, S., DERNER, R.B., OZÓRIO, R. A., BRAGA, M.V.C., CUNHA, P., LAMARCA, C. P., SANTOS, M.E. Produção de biomassa e teores de carbono, hidrogênio, nitrogênio e proteína em Microalgas. **Ciência Rural**, Santa Maria, 39, 6, 1760-1767, 2009.

OLIVEIRA, F.M. Aplicação e testes do método APHA-4500-NO₃-C para determinação de nitratos em águas por leitura em UV com segunda-derivada. **Revista Analytica**, 27, 80-88, 2007.

POWELL, N. **Biological Phosphorus Removal by Microalgae in Waste Stabilisation Ponds**. PhD thesis. School of Engineering and Advanced Technology, Massey University, Palmerston North, New Zealand, 2009.

POWELL, N., SHILTON, A., PRATT, S., CHISTI, Y. Factors influencing luxury uptake of phosphorus by microalgae in waste stabilization ponds. **Environmental Science and Technology**. 42, 16, 5958–5962, 2008.

RILEY, J.P. The spectrophotometric determination of ammonia in natural waters with particular referencetosea-water. **Analytica-Chimica**, 9, 575-589, 1953.

RYU H.J., OH K.K., KIM Y.S. Optimization of the influential factors for the improvement of CO₂ utilization efficiency and CO₂ mass transfer rate. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, 15, 471-475, 2009.

SANCHO, M., CASTILLO, J., YOUSFI, F. Photoautotrophic consumption of phosphorus by *Scenedesmus obliquus* in a continuous culture. Influence of light intensity. **Biochemistry**, 34, 811–818, 1999.

SATO, N., HAGIO, M., WADA, H. , TSUZUKI, M. Environmental effects on acidic lipids of thylakoid membranes. **Biochemical Society Transactions**, 28, 912-914, 2000.

SOARES, J. **Desenvolvimento de meios de cultura a partir de fertilizantes agrícolas para cultivo de microalgas.** 2012. 98 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2012.

SUALI, E. ESARBATLY, R.; Conversion of microalgae to biofuel. Renewable and Sustainable **Energy Reviews**, 16, 4316– 4342, 2012.

SUNG K.D., LEEA J. S., SHIN C.S., PARK S.C., CHOI H. M. J. CO₂ fixation by *Chlorella* sp. KR-1 and its cultural characteristics. **Bioresource Technology**, 68, 269-273, 1998.

THYSSEN, C., SCHLICHTING, R., GIERSCH, C. The CO₂-concentrating mechanism in the physiological context: lowering the CO₂ supply diminishes culture growth and economises starch utilisation in *Chlamydomonas reinhardtii* . **Planta**, 213, 4, 629–639, 2001.

WAN M.X., WANG R.M., XIA J.L., ROSENBERG J.N., NIE Z.Y., KOBAYASHI N., OYLER G.A., BETENBAUGH M.J. Physiological evaluation of a new *Chlorella sorokiniana* isolate for its biomass production and lipid accumulation in photoautotrophic and heterotrophic cultures. **Biotechnology Bioengineering**, 109, 1958-1964, 2012.

WELLBURN A.R. The spectral determination of chlorophylls *a* and *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers or different resolution. **Journal Plant Physiology**, 144, 307-313, 1994.

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

YANG, J., XU, M., ZHANG, X., HU, Q. Sommerfeld, M., Chen, Y. Life-cycle analysis on biodiesel production from microalgae: water footprint and nutrients balance. **Bioresource Technology**, 102, 159-165, 2011.

YIN-HU, W., XIN, L., HONG-YING, H., ZHEN-FENG, S. Biomass production of a *Scenedesmus* sp. under phosphorous-starvation cultivation condition. **Bioresource Technology**, 112, 93–198, 2012.

ZHILA, N. O., KALACHEVA, G. S., VOLOVA, T. G. Effect of Nitrogen Limitation on the Growth and Lipid Composition of the Green Alga *Botryococcus braunii* Kütz IPPAS H-252. **Russian Journal of Plant Physiology**, 52, 3, 311–319, 2005.

3. ARTIGO II: OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOMASSA E LIPÍDIOS NO CULTIVO DE *Scenedesmus* sp. BR003

Resumo: O desempenho de cultivos de *Scenedesmus* sp. BR003 foi avaliado em diferentes meios de cultura, onde as concentrações de N, P, K e Mg foram modificadas. O delineamento composto central rotacional foi empregado para estudar o efeito destes fatores sobre a concentração de biomassa e lipídios. A metodologia de superfície de resposta foi utilizada para delimitar a região das condições ótimas para o processo de otimização. Os experimentos foram realizados com diferentes concentrações de N (0,010; 0,035; 0,060; 0,085; 0,110 g L⁻¹), P (0,008; 0,036; 0,064; 0,092; 0,120 g L⁻¹), K (0,076; 0,188; 0,300; 0,412; 0,524 g L⁻¹) e Mg (0,002; 0,007; 0,012; 0,017; 0,022 g L⁻¹). A concentração de N influenciou de forma significativa a concentração de biomassa e os fatores N e P influenciaram o teor de lipídios, nas mesmas condições. A concentração de biomassa aumentou com o aumento da concentração de N e o teor de lipídios aumentou com a diminuição simultânea das concentrações de N e P. A concentração de N que maximizou a concentração de biomassa foi igual a 0,085 g L⁻¹ e o teor de lipídios foi maximizado utilizando concentrações de N e P iguais a 0,035 g L⁻¹ e 0,036 g L⁻¹, respectivamente. Nestas condições ótimas, a concentração de biomassa foi de 2,93 g L⁻¹. Para o teor de lipídios, as menores concentrações de N e P resultaram em teores de 19,78 %, sendo a interação destes fatores favorável ao aumento do teor de lipídios. Maiores concentrações de biomassa foram verificadas para maiores concentrações de N e maiores teores de lipídios foram obtidos para menores concentrações de N e P. As concentrações de K e Mg não influenciaram a concentração de biomassa e de lipídios, nas condições testadas, sendo assim a redução da quantidade dos sais utilizados para suprir esses dois nutrientes resulta em uma redução dos custos associados ao cultivo.

Palavras-chave: *Scenedesmus* sp. BR003, Microalgas, Biodiesel, otimização de meios de cultura, meios de cultura alternativos.

Abstract: The performance of cultivation of *Scenedesmus* sp. BR003 was evaluated in different culture medium, where the concentrations of N, P, K and Mg were changed. The rotational central composite design was employed to study the effect of these factors on the concentration of biomass and lipids. The response surface methodology was used to delimit the region of optimal conditions for the optimization process. The experiments were performed with 4 concentrations of N (0.010, 0.035, 0.060, 0.085, 0.110 g L⁻¹), P (0.008, 0.036, 0.064, 0.092, 0.120 g L⁻¹), K (0.076, 0.188, 0.300; 0.412, 0.524 g L⁻¹) and Mg (0.002, 0.007, 0.012, 0.017, 0.022 g L⁻¹). The N concentration significantly influenced biomass concentration and the factors N and P influenced the lipids content in the same conditions. For the interval studied, the biomass concentration increased with the increase of N concentration and lipid content increased with the simultaneous decrease of the concentrations of N and P. The concentration of N which maximized the biomass concentration was equal to 0.086 g L⁻¹ and lipid content was maximized using concentrations of N and P equal to 0.035 g L⁻¹ and 0.036 g L⁻¹, respectively. Under these optimum conditions, the biomass concentration was 2.93 g L⁻¹. For the lipid content, the lowest concentration of N and P resulted in content of 19.78%, and the interaction of these factors was favorable to increase the lipid content. Higher concentrations of biomass were observed for higher concentrations of N and higher lipid content were obtained for lower concentrations of N and P. The concentrations of K and Mg did not influence the concentration of biomass and lipids, under the conditions tested, thus the reduction of the amount of salt used to supply these two nutrients results in a reduction of costs associated with cultivation.

Keywords: *Scenedesmus* sp. BR003, Microalgae, Biodiesel, optimization of culture medium, alternative culture medium.

3.1. INTRODUÇÃO

As microalgas são organismos fotossintetizantes capazes de armazenar energia na forma de carboidratos e lipídios (DENG *et al.*, 2009). Em comparação com outras fontes de biomassa utilizadas como matéria prima para biodiesel, as microalgas apresentam como principal vantagem a elevada taxa de crescimento e de produção de lipídios, e baixo consumo de águas, o que tem motivado diversos estudos como fonte alternativa e renovável de combustíveis (CHISTI, 2007; MATA *et al.*, 2009; SAKAMOTO *et al.*, 2012).

Semelhante às plantas superiores, os lipídios produzidos por microalgas são compostos por lipídios neutros e lipídios polares. Em condições ambientais favoráveis, microalgas sintetizam, principalmente, lipídios polares, tais como glicolipídios e fosfolipídios. Quando as condições ambientais não são favoráveis para o crescimento e multiplicação celular, sejam por restrições nutricionais ou outros fatores ambientais, algumas espécies de microalgas tendem a acumular lipídios neutros como forma de armazenamento de carbono ao invés de formar compostos estruturais. Os lipídios neutros consistem triacilgliceróis (TAG), e éster, essencialmente sob a forma de TAG (HU *et al.*, 2008; LI *et al.*, 2011; DENG *et al.*, 2011).

Muitos estudos abordam condições e estratégias de restrição de nutrientes para aumentar a produção de biomassa e lipídios reduzindo, assim, os custos de produção (TAKAGI *et al.*, 2000; PRUVOST *et al.*, 2009; DAMIANI *et al.*, 2010; GU *et al.*, 2012; LIN *et al.*, 2012). A restrição de nitrogênio e fósforo induz um aumento significativo no teor de lipídios em inúmeras espécies de microalgas (MERZLYAK *et al.*, 2007; ILLMAN *et al.*, 2000; LI *et al.*, 2008; HU *et al.*, 2008; SCARSELLA, 2010; TAN E LIN, 2011).

A espécie *Scenedesmus* sp. tem sido estudada devido ao seu desempenho em sistemas abertos, uma vez que tolera variações de temperatura e pH e é resistente à contaminação por outras espécies de microalgas. No cultivo de *Scenedesmus* sp. foi observado tanto em fotobiorreatores, quanto em cultivo aberto, que baixas concentrações de N e P resultam na produção de mais lipídios, principalmente com cadeias de 18 carbonos, que é um ácido graxo de grande interesse para produção de biodiesel (TAN E LIN, 2011; LIN *et al.*, 2012).

Schwenk (2010) observou que o aumento das taxas de crescimento de *Scenedesmus dimorphus* também está ligado com a suplementação de Mg. Quando analisado o consumo de K, foi observado um consumo acumulado entre 56 e 119 mg L⁻¹

¹ para várias espécies estudadas (Sydney *et al.*, 2010), valor bem abaixo das concentrações presentes nos meios de cultura Bristol Modificado (MBM), Detmer Modificado (MDM), MC (WATANABE, 1960); Bold Basal (BBM) (ANDERSEN *et al.*, 2005) e no meio com baixo teor de N (ILLMAN *et al.*, 2000). É importante que se estabeleça um nível mínimo de Mg e K que permita uma taxa máxima de crescimento, evitando o excesso destes elementos e reduzindo os custos finais do cultivo.

A maioria dos estudos sobre o cultivo de microalgas é feito avaliando o efeito fisiológico de um único fator, seja ele nutricional ou ambiental. Essa forma de avaliar o desempenho de um cultivo geram informações incompletas, uma vez que não são avaliadas as interações entre os fatores. A otimização de meios de cultura, no qual se avalia mais de um fator permite obter informações sobre a influência de cada fator na produção de biomassa e conteúdos celulares, assim como o efeito das interações entre os diversos nutrientes.

O grande número de nutrientes que compõem os meios de cultura torna proibitivo o uso de delineamentos fatoriais completos para estudos dos fatores que podem exercer maior influência na produção dos compostos de interesse. O delineamento composto central rotacional (DCCR) permite planejar experimentos sobre os efeitos e interações de diversos fatores com número reduzido de tratamentos em relação aos delineamentos fatoriais completos, sendo, desta forma, adequado para os estudos de otimização de meios de cultura.

Neste trabalho foram estudados o efeito de diferentes concentrações N, P, K e Mg na concentração de biomassa e no teor de lipídios no cultivo de *Scenedesmus* sp. BR003 no meio de cultura MBM. Além de elevar a concentração de biomassa, assim como a produção e produtividade de lipídios, espera-se obter redução do custo do meio de cultura por meio da determinação de níveis ótimos de cada nutriente.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1. Espécie utilizada e produção de inóculo

A espécie *Scenedesmus* sp. BR003 foi obtida junto à Coleção de Cianobactérias e Microalgas do Banco de Microalgas do Projeto Petrobrás, localizada na Unidade de Crescimento de Plantas (UCP) do Departamento de Biologia Vegetal (DBV) da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Os cultivos foram realizados no laboratório CFDBIO.

Essa espécie foi utilizada para produção do inóculo em meio BG11, acondicionados inicialmente em frascos tipo erlenmeyers de 500 mL, com transferências sucessivas para recipientes de volumes maiores (1, 3 e 10 L) e cultivada sob condições fotoautotróficas de temperatura de 24 ± 5 °C, fotoperíodo de 16: 8 h (luz: escuro) e irradiância média de $85 \mu\text{mols f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, proveniente de lâmpadas fluorescentes brancas de 40 W. A agitação dos inóculos foi efetuada pela injeção de ar com vazão de 0,4 vvm (volume de ar por volume de cultivo por minuto). Ao final desta etapa, os inóculos atingiram uma concentração inicial de 10^7 céls mL⁻¹ para serem utilizados nos experimentos.

O inóculo foi submetido à centrifugação (Thermo Scientific, Heraeus Multifuge X3, Alemanha) a 11.000 rpm por 10 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e as amostras foram lavadas com água deionizada, em seguida foram homogeneizadas e centrifugadas, sendo este processo repetido três vezes. Posteriormente, a biomassa centrifugada foi ressuspensa em 50 mL do meio de cultura correspondente a cada tratamento.

3.2.2. Condições de cultivo

Os frascos e o meio de cultura foram esterilizados em autoclave a 2 atm e 121 °C por 20 minutos (KAWACHI E NÖEL, 2005). O cultivo foi realizado em frascos tipo erlenmeyers de 250 mL, contendo 150 mL de meio de cultura e 50 mL de inóculo (25 %), acondicionados em incubadora horizontal (Ethik Technology, modelo 430-RFPDE), com temperatura controlada de 25°C, mantido sob agitação de 120 rpm, com fotoperíodo de 16: 8 h (luz : escuro) e irradiância média de $114 \mu\text{mols f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ proveniente de lâmpadas fluorescentes brancas de 14 W. Foi feita a adição de gás carbônico correspondente a 5 % de CO₂ utilizado no experimento anterior por meio da injeção direta de CO₂ nos cultivo a uma vazão média de 6,72 L h⁻¹. O CO₂ utilizado no experimento foi o industrial (90 % de pureza) e a vazão foi controlada do utilizando um rotâmetro (Omel, modelo P, Brasil). Para controle do pH utilizou-se soluções de 1 M de HCl e 1M NaOH. O pH dos cultivos foi ajustado para $7,6 \pm 0,1$, a cada 3 dias. O meio de cultura utilizado foi como tratamento testemunha foi o MBM (ANEXO A) e as variações foram obtidas por meios dos diferentes níveis de N, P, K e Mg (Tabela 1).

Tabela 1 – Níveis utilizados na formulação dos meios de cultura para os quatro fatores nutricionais avaliados

Variáveis	Código	Níveis (g L ⁻¹)				
		-2	-1	0	1	2
N	x1	0,010	0,035	0,060	0,085	0,110
P	x2	0,008	0,036	0,064	0,092	0,120
K	x3	0,076	0,188	0,300	0,412	0,524
Mg	x4	0,002	0,007	0,012	0,017	0,022

Os sais utilizados na formulação do meio MBM são KNO₃, K₂HPO₄.3H₂O, MgSO₄.7H₂O, KH₂PO₄.3H₂O, FeSO₄.7H₂O, NaCl, e uma solução composta de micronutrientes (ANEXO A) . Em algumas combinações de nutrientes, os níveis de fósforo não puderam ser obtidos utilizando os sais da formulação original do MBM (K₂HPO₄.3H₂O e KH₂PO₄.3H₂O). Para atender às concentrações estipuladas, foram adicionados Ca(H₂PO₄)₂ e NaH₂PO₄ como fonte de P e as concentrações de Ca e Na foram complementadas utilizando CaCl₂.2H₂O e NaCl. As fontes de N, K, Mg, Fe e micronutrientes não foram alteradas.

Quando os cultivos atingiram a fase estacionária e, nela permaneceram por cinco dias, os tratamentos foram retirados para análise. Esta fase é caracterizada por diminuição ou ausência de crescimento, onde as células começam a sofrer alterações bioquímicas. Em geral, as microalgas começam a acumular lipídios nessa fase (MATA *et al.*, 2009). Amostras foram coletadas para a determinação da massa final. O restante do cultivo foi centrifugado (Thermo Scientific, Heraeus Multifuge X3, Alemanha) a 11.000 rpm por 10 minutos. A biomassa algal foi congelada utilizando N líquido, e posteriormente liofilizada e mantida em freezer a -25°C para análise dos lipídios.

3.2.3. Monitoramento do crescimento

Foram coletadas amostras de 1mL para monitorar o crescimento do cultivo por densidade óptica. Amostras foram coletadas em duplicata e submetidas à leitura de absorbância em espectrofotômetro (modelo Thermo Scientific, Multiskan GO, Finlândia) no comprimento de onda de 750 nm (GRIFFITHS *et al.*, 2011). Os valores

de absorvância foram dispostos em gráfico para caracterizar o crescimento de cada tratamento e seus respectivos estádios fisiológicos.

3.2.4. Plasticidade fenotípica

Para avaliar os cenóbios, foram coletadas amostras de 1 mL de cada tratamento no último dia de cultivo para montagem das lâminas. As fotomicrografias foram feitas imediatamente após a coleta das amostras e sem fixar as células, utilizando microscópio com aumento de 40 vezes (modelo GmbH, Zeiss, Alemanha). A partir das fotomicrografias, os padrões de formação de cenóbios foram avaliados.

3.2.5. Determinação da biomassa seca livre de cinzas

Uma amostra de 10 mL foi coletada e homogeneizada, sendo transferida para o sistema de filtração contendo filtros de 0,22 μm de porosidade (Durapore, GVWP04700), conectado a uma linha de vácuo. Em seguida foi realizada a lavagem da biomassa retida, com o objetivo de retirar sais adsorvidos e evitar que permaneça material na parede do sistema de filtração. As membranas filtrantes com biomassa algal foram retiradas e acondicionadas em estufa a $60 \pm 0,5^\circ\text{C}$ até atingirem massa constante. A massa seca foi então determinada através da diferença da massa inicial da membrana e da massa no final desta mesma membrana após filtração do material e secagem em estufa. O teor em massa das cinzas da biomassa foi obtido por calcinação. As membranas foram colocadas em cadinhos de 5 mL e calcinadas em mufla a 575°C por 1 hora. Para se obter o valor da biomassa livre de cinzas, subtraiu-se a massa residual resultante da calcinação do valor da massa da membrana com a biomassa seca.

3.2.6. Determinação do teor de lipídios

A determinação do teor de lipídios foi feita pelo método Schmid-Bondzynski-Ratzlaff (International Standard 5B, 1986) O método baseia-se na digestão da amostra com HCl, adição de álcool etílico e subsequente extração da solução ácido-etanólica com éter etílico e éter de petróleo. A remoção dos solventes é feita por evaporação e a determinação da massa das substâncias extraídas, solúveis em éter de petróleo, é obtida por meio da determinação da massa dos tubos de extração contendo os extratos.

O procedimento foi realizado em tubos do tipo falcon de 15 mL de capacidade, previamente secos em estufa a $102 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e resfriados em dessecador. Pesou-se 100 mg de amostra liofilizada diretamente nos tubos. Após a adição de 1 ml HCl 8 M, a suspensão foi mantida em banho termostatzado a 70°C por 20 minutos. Após esta etapa, foram adicionados 2 mL de álcool etílico, 2,5 mL de éter etílico e 2,5 mL de éter de petróleo. A homogeneização foi feita em agitador tipo vórtex (Arsec, ATS-200) por 1 minuto, seguida de centrifugação a 1000 rpm por 2 minutos. O sobrenadante foi vertido em um tubo de vidro com tampa de rosca de 50 mL de capacidade. Foram realizadas 3 a 5 extrações usando 2,5 mL de cada tipo de éter, transferindo a fase superior para o tubo de vidro com tampa de rosca. Ao final das extrações, os tubos de vidro foram mantidos em banho termostatzado a $60 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ até a completa evaporação dos solventes e depois acondicionados em estufa a $102 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ até massa constante, que ocorreu em 6 horas. O teor de lipídios foi determinado pela equação 1:

$$\text{Teor de lipídios} = \frac{(m_3 - m_1)}{m_2} \times 100 \quad (1)$$

em que:

m_1 = massa em gramas do tubo de vidro (g);

m_2 = massa da amostra (g);

m_3 = massa do tubo de vidro com o material extraído (g).

3.2.7. Delineamento experimental e análise estatística

O Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) é uma técnica de delineamento alternativa que objetiva a redução do número de unidades experimentais. Aliado à uma técnica de otimização, tal como a análise de superfícies de respostas, o DCCR proporciona um maior número de informações sobre o processo em estudo pois permite avaliar um maior número de fatores com menor número de unidades experimentais, quando comparados aos delineamentos completos, tal como o fatorial (BOX, WILSON, 1951; COCHRAN, COX, 1957; HENIKA, 1972; GIOVANI, 1983; RODRIGUES, IEMMA, 2009).

O DCCR é um delineamento simétrico e de segunda ordem, constituído de duas partes: o fatorial 2^k , com um ou mais pontos centrais, e os pontos axiais. Além de demandar um número menor de tratamentos em relação aos fatoriais completos, pode ser realizado sequencialmente, de forma a caminhar no sentido da otimização através da técnica do caminhar ascendente ótimo. (MATHEUS *et al.*, 2001). Essa técnica consiste em atingir à região que contém o ótimo e avaliar a parte curvilínea de forma a chegar à solução ótima (RODRIGUES, IEMA, 2009).

Para que se execute uma inferência estatística neste tipo de delineamento, são feitos ensaios no ponto central para viabilizar o cálculo de resíduos, do erro padrão e das estimativas por intervalo. Os ensaios no ponto central fornecem informações importantes sobre o comportamento das respostas entre os níveis atribuídos aos fatores. (RODRIGUES, IEMA, 2009).

A Metodologia de Superfície de Resposta (MSR) permite selecionar a combinação de níveis ótimos na obtenção da melhor resposta para uma dada situação (SILVA, 2005). A relação entre as respostas e os níveis dos fatores tem por objetivos estabelecer uma descrição de como uma resposta é afetada por um número de fatores em alguma região de interesse e explorar a relação entre as variáveis respostas, localizando e explorando a vizinhança da respectiva resposta (CUSTÓDIO, 2000).

Neste trabalho adotou-se a técnica de planejamento experimental estatístico DCCR com um fatorial 2^4 com 16 combinações, 8 pontos axiais e 4 repetições no ponto central, totalizando 28 ensaios (Tabela 2). As variáveis independentes foram N, P, K e Mg e as variáveis dependentes a concentração de biomassa e o teor de lipídios.

Os resultados da concentração de biomassa e teor de lipídios são representados por um modelo matemático, sendo o mais adequado o polinomial generalizado (Equação 2):

$$\begin{aligned} \gamma_1 = & \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_3x_3 + \beta_4x_4 + \beta_{11}x_1^2 + \beta_{22}x_2^2 + \beta_{33}x_3^2 + \beta_{44}x_4^2 + \beta_{12}x_1x_2 \\ & + \beta_{13}x_1x_3 + \beta_{14}x_1x_4 + \beta_{23}x_2x_3 + \beta_{24}x_2x_4 \\ & + \beta_{34}x_3x_4 \end{aligned} \quad (2)$$

em que:

x_1, x_2, x_3, x_4 são as variáveis referentes aos fatores (N, P, K, Mg);

β_0 (o ponto de inserção);

$\beta_1, \beta_2, \beta_3$ e β_4 (os efeitos lineares);

$\beta_{11}, \beta_{22}, \beta_{33}$ e β_{44} (os efeitos quadráticos);

β_{12} , β_{13} , β_{14} , β_{23} , β_{24} e β_{34} (os efeitos de interação dupla) e ε_1 é o erro experimental associado à resposta γ_1 .

Tabela 2: Matriz do delineamento experimental contendo os valores codificados

Tratamentos	N	P	K	Mg
1	-1	-1	-1	1
2	0	0	0	-2
3	1	-1	1	1
4	2	0	0	0
5*	0	0	0	0
6*	0	0	0	0
7	-1	-1	1	1
8	1	1	-1	1
9	-1	-1	1	-1
10	1	1	1	1
11	-1	-1	-1	-1
12	0	0	0	2
13*	0	0	0	0
14	1	-1	-1	1
15	0	2	0	0
16	0	0	-2	0
17	-2	0	0	0
18	1	1	1	-1
19*	0	0	0	0
20	0	0	2	0
21	-1	1	1	-1
22	1	-1	1	-1
23	-1	1	-1	-1
24	0	-2	0	0
25	-1	1	-1	1
26	1	-1	-1	-1
27	-1	1	1	1
28	1	1	-1	-1

*Os valores em negrito denotam as repetições no ponto central (4). Os níveis utilizados estão apresentados na Tabela 1.

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os efeitos dos fatores sobre a concentração de biomassa livre de cinzas e o teor de lipídios foram avaliados utilizando a metodologia de superfície de resposta com delineamento composto central rotacional. Apenas o fator N, para concentração de

biomassa, e os fatores N e P, para teor de lipídios, foram estatisticamente significativos, ao nível de significância de 5 %.

A matriz do delineamento experimental com as respostas de concentração de biomassa e teor de lipídios é apresentada na Tabela 3. Os valores de biomassa livre de cinzas variaram de 1,863 g L⁻¹ a 2,93 g L⁻¹, os teores de lipídios variaram de 9,656 % a 19,79 % e de 0,375 g L⁻¹ e 0,421 g L⁻¹, respectivamente.

Tabela 3 - Matriz do delineamento experimental da otimização do meio de cultura MBM e respostas para produção de biomassa livre de cinzas.

Tratamento	Níveis				Concentração de biomassa (g L ⁻¹)	Teor de lipídios (%)	Concentração de lipídios (g L ⁻¹)
	x ₁ (N)	x ₂ (P)	x ₃ (K)	x ₄ (Mg)			
1	-1	-1	-1	1	2,053	18,23	0,374
2	0	0	0	-2	1,863	15,15	0,282
3	1	-1	1	1	2,297	10,97	0,252
4	2	0	0	0	2,430	13,92	0,338
5*	0	0	0	0	2,310	13,01	0,300
6*	0	0	0	0	2,187	14,18	0,310
7	-1	-1	1	1	1,893	19,79	0,375
8	1	1	-1	1	2,930	14,36	0,421
9	-1	-1	1	-1	1,930	19,54	0,377
10	1	1	1	1	2,277	15,82	0,360
11	-1	-1	-1	-1	1,903	18,49	0,352
12	0	0	0	2	2,170	14,41	0,313
13*	0	0	0	0	2,260	13,23	0,299
14	1	-1	-1	1	2,503	10,81	0,271
15	0	2	0	0	2,297	9,656	0,222
16	0	0	-2	0	2,270	12,14	0,276
17	-2	0	0	0	1,038	19,23	0,200
18	1	1	1	-1	2,127	10,54	0,224
19*	0	0	0	0	2,333	12,99	0,303
20	0	0	2	0	2,183	12,70	0,277
21	-1	1	1	-1	2,093	15,46	0,324
22	1	-1	1	-1	2,257	14,03	0,317
23	-1	1	-1	-1	2,360	16,18	0,382
24	0	-2	0	0	2,107	13,82	0,291
25	-1	1	-1	1	2,040	16,61	0,339
26	1	-1	-1	-1	2,390	11,16	0,267
27	-1	1	1	1	1,873	15,26	0,286
28	1	1	-1	-1	2,293	10,62	0,244

*Os valores em negrito denotam as repetições no ponto central (4). Os níveis para cada nutriente estão apresentados na Tabela 1.

Para concentração de biomassa, o termo linear e o quadrático da variável N(x1) foram estatisticamente significativos, ao nível de significância de 5 %. Houve uma grande variação nos parâmetros do modelo com a remoção dos coeficientes de regressão estatisticamente não significativos, para a falta de ajuste, devido à reparametrização dos modelos (Rodrigues e Iema, 2009). A equação do modelo reparametrizado foi determinada a partir das variáveis codificadas que contém apenas os termos estatisticamente significativos (Tabela 4).

Tabela 4 - Coeficientes de regressão para concentração de biomassa livre de cinzas

Fatores	Coeficiente de Regressão	Erro padrão	t (13)	p-valor	
Média	β_0	2,273	0,097	23,403	0,000
x1 (L)	β_1	0,238	0,040	6,003	0,000
x1 (Q)	β_{11}	-0,109	0,040	1,205	0,017

A análise de variância (ANOVA) indicou uma porcentagem de variação explicada de 62,05 % e p-valor < 0,01 (ANEXO B). Uma nova análise de variância foi feita excluindo-se os efeitos não significativos, obtendo-se um coeficiente de determinação R^2 ajustado, igual a 0,59. Valor de R^2 ajustado sugere que esse modelo é adequado para avaliar a tendência da variação na concentração de biomassa em relação à variação da concentração de N. Os resultados da ANOVA para produção de biomassa estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 – Análise de variância para produção de biomassa livre de cinzas considerando os fatores significativos

Fontes de Variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrados médios	Fcalc	p-valor
Regressão	1,668	2	0,834	20,53	0,000
Resíduos	1,016	25	0,041	-	-
Total	2,684	27		-	-

$R^2 = 0,6216$; R^2 ajustado = 0,5913; $F_{2, 25; 0,05} = 3,39$;

Substituindo-se os coeficientes de regressão apresentados na Tabela 5 na Equação 2, obteve-se o modelo de regressão reparametrizado utilizado para a geração das curvas de superfície de resposta (Equação 3).

$$\text{Biomassa} = 2,273 + 0,249x_1 - 0,121x_1^2 \quad (3)$$

A análise estatística foi complementada por uma análise de resíduos, com o objetivo de verificar a validade dos pressupostos estabelecidos e a qualidade do ajuste do modelo. No ANEXO B1 encontram-se os gráficos dos valores estimados em função dos resíduos e o gráfico de probabilidade normal.

O nível da variável N que resultou em maior concentração de biomassa de acordo com o modelo foi determinado igualando-se a zero a derivada da Equação 3. As condições necessárias para obtenção de uma maior produção de biomassa foram N igual a $0,086 \text{ g L}^{-1}$. Para estas condições a produção de biomassa foi estimada em $2,282 \text{ g L}^{-1}$.

As curvas de monitoramento do cultivo apresentadas foram obtidas a partir do log da leitura de absorbância no comprimento de onda de 750 nm em função dos dias de cultivo e da concentração de nutrientes (Figuras 1 a 3).

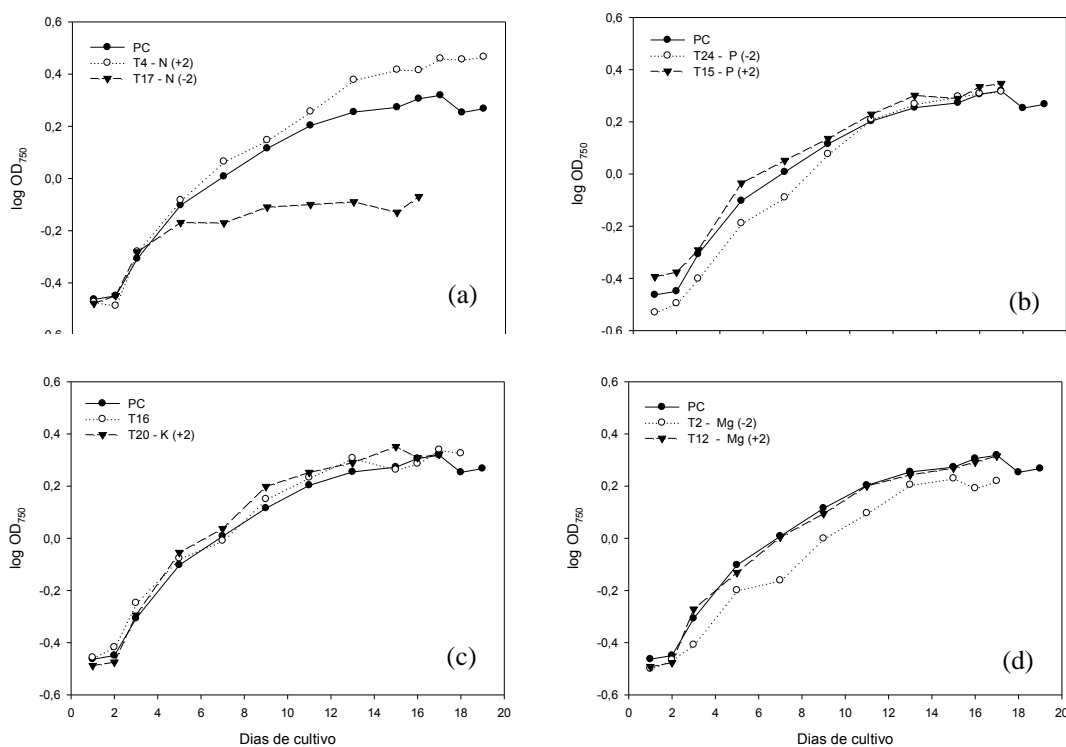


Figura 1 - Monitoramento do cultivo de *Scenedesmus* sp. BR003 obtido a partir de leituras de absorbância no comprimento de onda de 750 nm. Curvas contendo o ponto central (PC) e os pontos axiais para os fatores (a) N, (b) P, (c) K e (d) Mg.

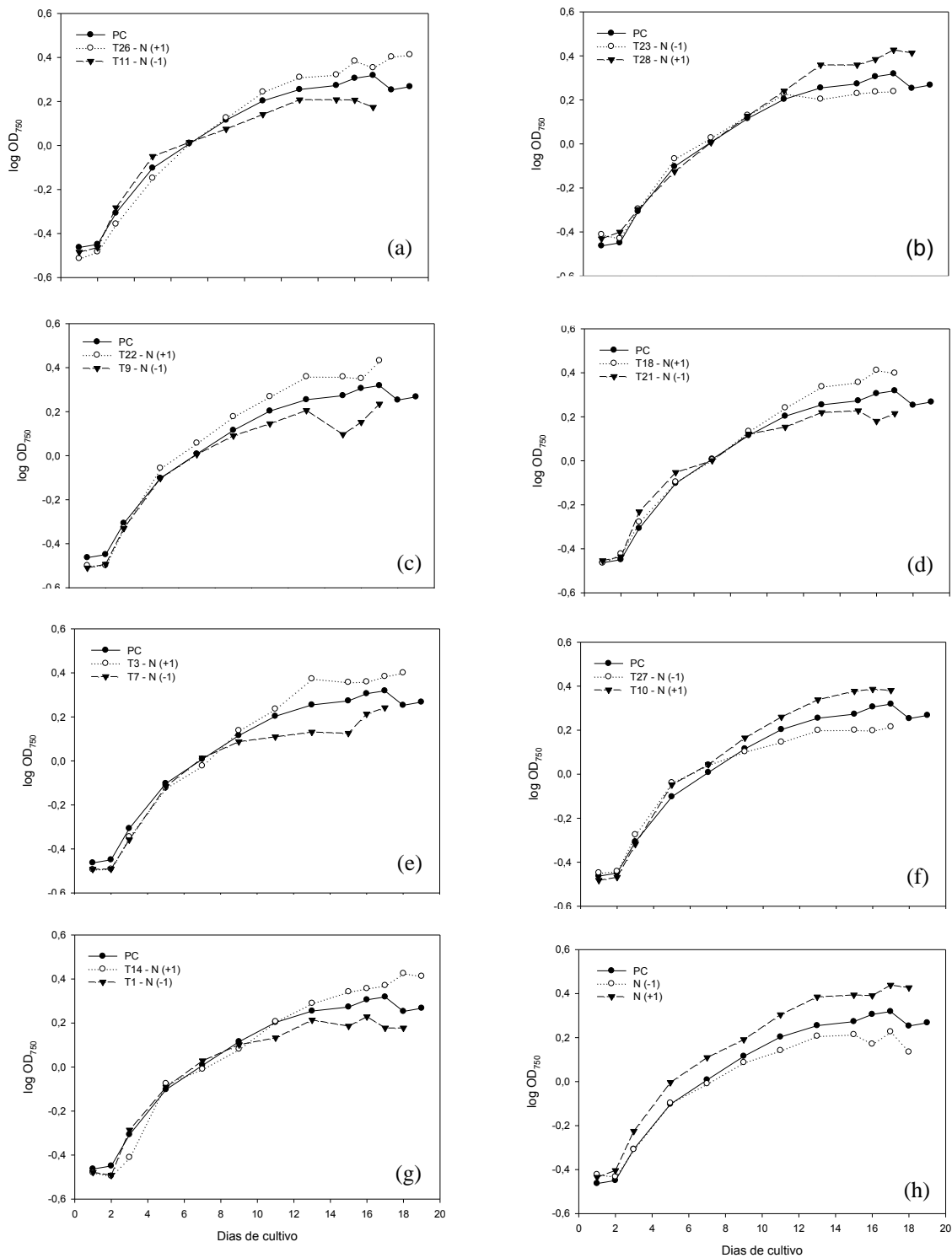


Figura 2 - Monitoramento do cultivo de *Scenedesmus* sp. BR003 obtido a partir de leituras de absorbância no comprimento de onda de 750 nm. Curvas contendo o ponto central (PC) e os pontos cúbicos para o fator N nos seguintes níveis de P, K e Mg: (a) P (-1), K(-1) e Mg (-1); (b) P (+1), K(-1) e Mg (-1); (c) P (-1), K(+1) e Mg (-1); (d) P (+1), K(+1) e Mg (-1); (e) P (-1), K(+1) e Mg (+1); (f) P (+1), K(+1) e Mg (+1); (g) P (-1), K(-1) e Mg (+1); (h) P (+1), K(-1) e Mg (+1).

Por meio dos resultados descritos nas Figuras 1 a 3, verifica-se que todos os tratamentos apresentaram uma fase *lag* rápida, pois as condições de cultivo do inóculo se diferenciavam das condições do cultivo, principalmente quanto a concentração de nutrientes (N, P, K, Mg e CO₂)

Por meio do monitoramento do cultivo foi possível observar o efeito do N no crescimento do cultivo. No cultivo que recebeu a maior concentração de N (T4, 110 mg L⁻¹, Tabela 3) em comparação com o cultivo que recebeu a menor concentração de N (T17, 10 mg L⁻¹, Tabela 3), a concentração de biomassa foi maior e o número de dias de cultivo foi o mesmo quando comparado ao ponto central (PC). Com relação aos outros fatores (P, K e Mg) não houve diferença significativa entre os tratamentos para concentração de biomassa algal livre de cinzas.

Nos outros tratamentos, a menor concentração de biomassa foi diretamente relacionada à menor concentração de N disponibilizada no cultivo, não sendo influenciada de maneira significativa pela presença de P, K e Mg. A superfície de resposta que descreve a concentração de biomassa de acordo com os tratamentos estão representadas na Figura 5.

Para verificação da formação de cenóbios, foram feitas fotos do material não fixado. A partir das fotomicrografias observou-se que houve pouca influência do meio de cultura na formação de cenóbios. Ocorreram poucas células individuais em todos os tratamentos, predominando cenóbios com 4 células, com presença menor de cenóbios de 2 células em todos os tratamentos. Porém para os tratamentos 7 e 11, caracterizados por baixa concentração de N, a presença de cenóbios com 2 células foi maior do que cenóbios com 4 células (Figura 4). As fotomicrografias para os demais tratamentos são apresentadas no ANEXO C.

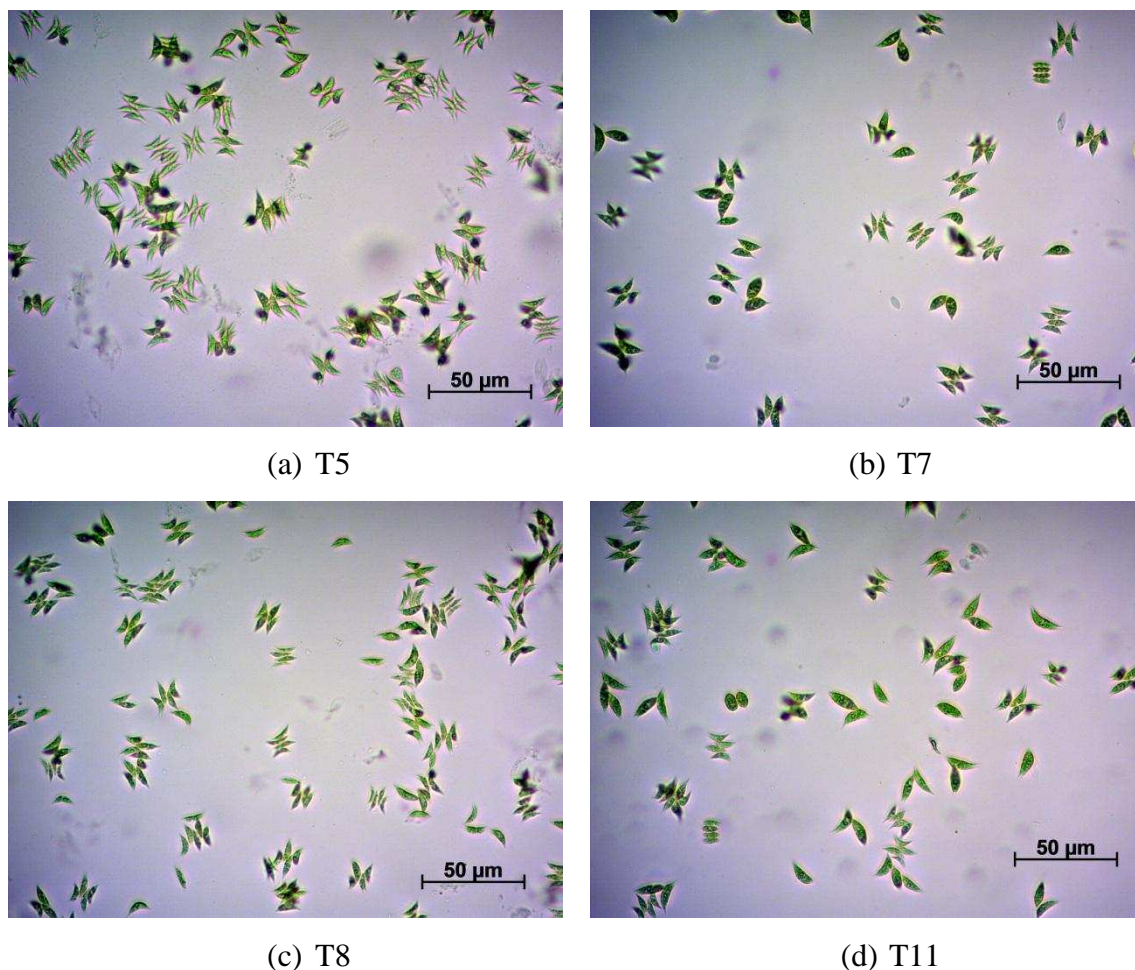


Figura 4 - Padrão de cenóbios de *Scenedesmus* sp. BR003 no último dia de cultivo para os tratamentos (a) T5 - PC , (b) T7, (c) T8 e (d) T11

O aumento da concentração de biomassa foi decorrente do aumento da concentração de N, sendo que este aumento não foi limitado pelas variações dos demais nutrientes, nos níveis testados. Aumentos nessa variável acarretam em uma maior concentração de biomassa, e, conseqüentemente, na concentração de lipídios.

A matriz do delineamento experimental com as respostas do teor de lipídios está apresentada na Tabela 3. Os valores de lipídios variaram de 9,656 % a 19,79 %, conforme as formulações dos ensaios realizados. Para a resposta teor de lipídios, o fator N(x1), linear e quadrático, o fator P linear e a interação NxP foram estatisticamente significativos ao nível de 5 % de significância estabelecido (Tabela 6).

Assim como na produção de biomassa, houve uma grande variação nos parâmetros do modelo com a remoção dos coeficientes de regressão estatisticamente não significativos, para a falta de ajuste, devido à reparametrização do modelo. A equação do modelo reparametrizado foi determinada a partir das variáveis codificadas que contém apenas os termos estatisticamente significativos (Tabela 6).

Tabela 6 - Coeficientes de regressão estatisticamente significativos para lipídios

Fatores	Coeficiente de Regressão	Erro padrão	t (13)	p-valor	
Média	β_0	13,35	0,762	17,530	0,000
x1(L)	β_1	-2,160	0,311	-6,948	0,000
x2 (L)	B_2	-0,687	0,311	-2,209	0,046
x1 (Q)	β_{11}	0,971	0,311	3,123	0,008
x1 x2	β_{12}	1,057	0,381	2,775	0,016

A análise de variância indicou uma porcentagem de variação explicada de 71,97 % e o valor de F calculado foi superior ao valor tabelado (ANEXO B). Uma nova análise de variância foi feita excluindo-se os efeitos não significativos, obtendo-se um coeficiente de determinação R^2 ajustado, igual a 0,6937. Valor de R^2 ajustado sugere que esse modelo é adequado para avaliar o comportamento do teor de lipídios em relação à variação de N e P. Os resultados da ANOVA para produção de biomassa estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 – Análise de variância para produção de lipídios considerando os fatores significativos

Fontes de Variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrados médios	F_{calc}	p-valor
Regressão	165,16	4	41,290	16,29	0,002
Resíduos	58,31	23	2,535	-	-
Total	223,47	27	-	-	-

$R^2 = 0,7391$; R^2 ajustado = 0,6937; $F_{4, 23; 0,05} = 2,796$;

O modelo foi estatisticamente significativo e preditivo, pois apresentou o valor da razão QM regressão/QM resíduo (F_{calc}) cinco vezes superior ao valor de F tabelado. Substituindo-se os coeficientes de regressão apresentados na Tabela 10 na equação 2, obteve-se o modelo de regressão utilizado para a geração da superfície de resposta (Equação 4).

$$\text{Teor de lipídios} = 13,35 - 2,160x_1 - 0,6870x_2 + 0,9710x_1^2 + 1,057x_1x_2 \quad (4)$$

A análise estatística foi complementada por uma análise de resíduos, com o objetivo de verificar a validade dos pressupostos estabelecidos e a qualidade do ajuste

do modelo. No ANEXO B encontram-se os gráficos dos valores estimados em função dos resíduos e o gráfico de probabilidade normal.

Analisando a Equação 4 é possível observar que a interação N/P tem efeito positivo na produção de lipídios enquanto N e P separadamente tem seu efeito maximizado quando presentes em menores concentrações no meio de cultivo. Os maiores teores de lipídios (Tabela 3) foram observados quando N foi igual a 10 mg L^{-1} (19,23%) e quando N e P estavam, associados em concentrações mais baixas (N igual a 35 mg L^{-1} e P igual a 36 mg L^{-1}), resultando em teor de lipídio de 19,79%. A superfície de resposta para concentração de biomassa, teores de lipídios e concentração de lipídios em função das concentrações de N e P estão representadas na Figura 5.

O nível das variáveis N e P que proporcionou maior teor de lipídios foi determinado pelo ponto máximo da Equação 3. Este ponto corresponde às concentrações de N e P iguais a $0,019 \text{ g L}^{-1}$ e $0,008 \text{ g L}^{-1}$, respectivamente.

O N é, quantitativamente, o nutriente que mais afeta o aumento da produção de biomassa e lipídios em várias microalgas (GRIFFITHS, HARRISON, 2009). Sendo um componente quantitativamente importante, presente na biomassa em quantidades que podem variar de 1 a 10 % da massa seca, está presente em proteínas, ácidos nucleicos e pigmentos. Além da presença em substâncias estruturais, o N ainda pode ser encontrado em formas inorgânicas não assimiladas como nitrato, nitrito e amônio (LOURENÇO, 2006; RICHMOND, 2004).

A capacidade de utilizar essas fontes internas de N, orgânicas e inorgânicas, é importante na caracterização da produção de biomassa para determinadas cepas. *Scenedesmus* sp. é relatada como uma espécie capaz de utilizar quase todos os aminoácidos como fonte interna de N (RICHMOND, 2004) e nitrato, ureia e amônio como fonte externa (LI *et al.*, 2008; XIN *et al.*, 2010; LIN, LIN, 2011; PECCIA *et al.*, 2013; ARUMUGAN *et al.*, 2013).

A maior disponibilidade de N no meio tende a gerar mais proteínas e clorofilas, gerando condições favoráveis para a divisão celular e consequente aumento na concentração de biomassa (BENIDER *et al.*, 2001; LOURENÇO, 2006; ARUMUGAM *et al.*, 2013). Tan e Lin (2011) também obtiveram maiores produções de biomassa com os meios de cultura nos quais as concentrações de N, na forma de nitrato, foram maiores, reportando concentrações de biomassa seca de $1,2 \text{ g L}^{-1}$. Resultado semelhante ao obtido por Mandal e Mallick (2009) para *Scenedesmus* sp., porém com valor inferior ao máximo obtido neste experimento para a concentração de biomassa ($2,93 \text{ g L}^{-1}$).

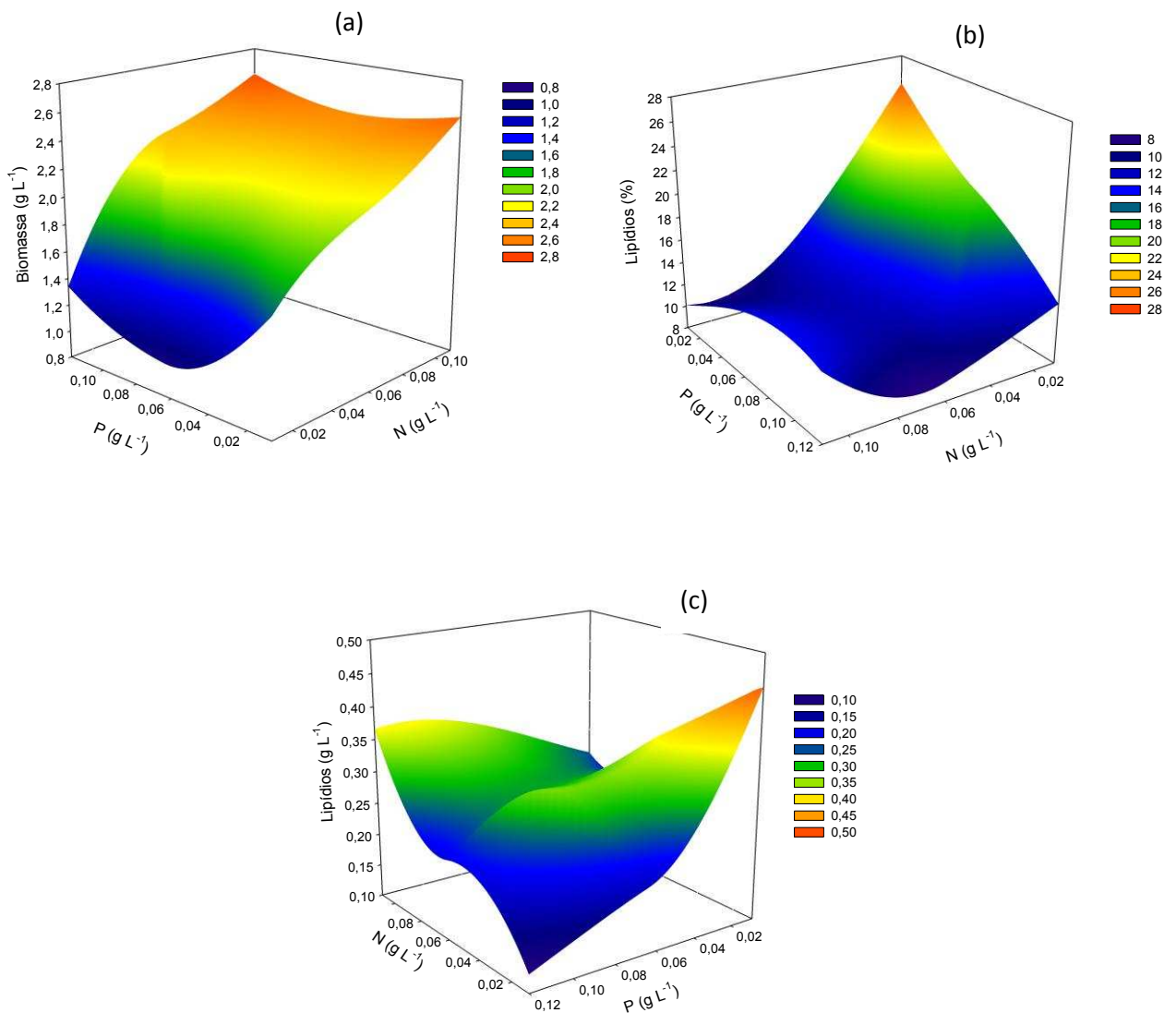


Figura 5 - Superfície de resposta para (a) concentração de biomassa, (b) teor de lipídios, (c) concentração de lipídios em função das concentrações (g L⁻¹) de N e P, para *Scenedesmus* sp. BR003, ao final do cultivo (fase estacionária).

Como os nutrientes P, K e Mg não afetaram significativamente a concentração de biomassa no intervalo estudado, a formulação recomendada para o meio de cultura otimizado utiliza níveis mínimos destes nutrientes (Tabela 8). Para formulação deste meio, mantendo as concentrações de N, P, K e Mg determinadas no processo de otimização, foi indispensável a adição de uma nova fonte de nitrato (NaNO₃). Essa nova fonte foi necessária para alcançar a concentração de N necessária sem alterar a concentração de K.

Tabela 8 – Comparação do meio de cultura MBM com o meio obtido no processo de otimização para produção de biomassa

Composição	Meio otimizado (g L ⁻¹)	Custo (R\$)
NaNO ₃	0,400	0,0264
KNO ₃	0,137	0,0271
K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	-	-
KH ₂ PO ₄ .3H ₂ O	0,049	0,0018
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,010	0,0002
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,020	0,0002
FeSO ₄ .5H ₂ O	0,020	0,0005
NaCl	-	-
H ₃ BO ₃	0,0029	0,0007
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,00181	0,0012
CuSO ₄ .7H ₂ O	0,00008	1,6E-06
(NH ₄) ₂ MoO ₄	0,00018	3,2E-05
ZnCl ₂	0,00011	1,36E-05
Total de sais (g L ⁻¹)	0,66608	
Custo do meio de cultura		R\$ 0,055

O custo por unidade de volume de meio de cultura obtido pela otimização (R\$ 0,055 L⁻¹) foi maior que o custo do meio MBM (R\$ 0,053 L⁻¹), devido ao aumento nas concentrações das fontes de N. No entanto o custo por unidade de biomassa algal produzida com o meio otimizado diminuiu, uma vez que houve um ganho de 27% na concentração e biomassa.

O aumento do teor de lipídios verificado neste trabalho foi principalmente decorrente restrição simultânea de N e P, em que os demais nutrientes estudados não apresentaram efeito significativo. Foi observado que a restrição de P e N gerou maior estímulo à produção de lipídios, porém, com efeito negativo sobre a produção de biomassa (Tabela 3). Geralmente as microalgas acumulam maiores quantidades de lipídios sob limitação de nutrientes quando a fonte de energia (luz) e da fonte de carbono (CO₂) e os mecanismos para realização da fotossíntese estão ativos (XIN *et al.*, 2010). Isso ocorre como consequência da limitação da divisão celular e diminuição da produção de proteínas e pigmentos fotossintetizantes. Com disponibilidade de N no meio de cultura, a taxa de fixação de carbono é de 7 a 10 vezes maior que taxa de assimilação de N, que é uma proporção adequada para síntese de conteúdos celulares essenciais que contém N. No início da fase de restrição de N, quando a capacidade fotossintética diminui, a capacidade de fixação de C pode exceder a demanda inicial de N para assimilação de C e este excesso de C é alocado em compostos de reserva como lipídios

e carboidratos. Como há essa mudança no metabolismo, onde as substâncias de reserva passam a ser prioridade em relação às proteínas e outros compostos, a taxa de crescimento é diminuída (ADAMS *et al.*, 2013).

Suali e Sarbatly (2012) afirmam que a restrição de N gera o decréscimo da concentração de clorofila e do número de cloroplastos presentes na célula. Nos cloroplastos se encontram uma grande quantidade de fosfolipídios e glicolipídios, afetando o consumo intracelular de N para síntese de material necessário para divisão celular. Com isso, a produção de maiores quantidades de biomassa é restringida.

Hu *et al.* (2008) relataram o incremento no teor de lipídios resultante da restrição de N e P, e os valores variaram, em média, 46 %. Os valores obtidos para incremento lipídico em alguns cultivos reportados na literatura para *Scenedesmus* sp. estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 – Incremento lipídico resultante da restrição de N e P no cultivo de microalgas

Espécies estudadas	Restrição nutricional	Incremento lipídico	Referência
<i>Scenedesmus</i> sp. BR003	N, P, K e Mg	48 %	Este trabalho
<i>Scenedesmus obliquus</i>	N e P	43 %	Mandal e Mallick (2009)
<i>Scenedesmus dimorphus</i>	N	23 %	Adams <i>et al.</i> (2013)
<i>Scenedesmus naegelli</i>	N	60 %	Adams <i>et al.</i> (2013)

O estresse causado pela restrição de N pode ter efeitos desproporcionais sobre crescimento e a produtividade de lipídios, de acordo com a espécie estudada. Estudando as espécies *Scenedesmus dimorphus* e *Scenedesmus naegelli*, Adams *et al.* (2013) observaram que no cultivo de *S. dimorphus* o aumento da produtividade de lipídios excedeu a diminuição do crescimento, resultando em produtividade de lipídio de 23 % com a restrição de N. Já no cultivo de *S. naegelli*, o aumento do teor de lipídios, foi compensado pela redução no crescimento, resultando na mesma produtividade de lipídios, independente da concentração de N. Neste caso a utilização de menores concentrações de N seria economicamente mais atrativa. Neste trabalho, no cultivo de *Scenedesmus* sp. BR003 foi observado que quanto menor quantidade de N, leva a um maior teor de lipídios.

O fósforo é um nutriente essencial para o crescimento de microalgas, sendo seu teor médio em microalgas de 1% em massa (YANG *et al.*, 2011). Powell *et al.* (2009) investigaram o consumo de luxo de P por microalgas e descobriram que o teor de P nas células pode variar de 0,21 a 3,85 %. É importante ressaltar que mesmo após a depleção total de P no meio de cultura, as microalgas podem continuar crescendo e multiplicando utilizando o P intracelular como fonte. Wu *et al.* (2013) observaram que no cultivo de 7 espécies diferentes de microalgas, incluindo *Scenedesmus* sp. LX1, houve crescimento mesmo após 12 dias de esgotamento do P no meio de cultura.

Para formulação do meio de cultura resultante da otimização, foram utilizados os valores de N e P que propiciaram maior teor de lipídios e, como os nutrientes K e Mg não afetaram significativamente no teor de lipídios no intervalo estabelecido, são utilizados seus níveis mínimos (Tabela 10).

Tabela 10 – Formulação do meio de cultura MBM e o meio obtido no processo de otimização para a estimular o aumento no teor de lipídios

Composição	Meio otimizado (g L ⁻¹)	Custo (R\$)
KNO ₃	0,137	0,0219
K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	-	-
KH ₂ PO ₄ .3H ₂ O	0,221	0,008
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,010	0,0002
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,020	0,0002
FeSO ₄ .5H ₂ O	0,020	0,0005
NaCl	0,025	0,0002
H ₃ BO ₃	0,0029	0,0007
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,00181	0,0012
CuSO ₄ .7H ₂ O	0,00008	1,6E-06
(NH ₄) ₂ MoO ₄	0,00018	3,2E-05
ZnCl ₂	0,00011	1,36E-05
Total de sais (g L ⁻¹)	0,43808	
Custo do meio de cultura		R\$ 0,033

O custo por unidade de volume de meio de cultura MBM foi de R\$ 0,053 L⁻¹, com redução da quantidade de sais no processo de otimização, principalmente de N, o custo foi de R\$ 0,033 L⁻¹, o que corresponde a uma redução de 37,7 %.

Quando considerados os custos dos meios de cultura para os tratamentos que obtiveram maior concentração de biomassa e maior teor de lipídios, verifica-se que o menor custo por unidade de lipídios (R\$ 88,11) é obtido onde o teor de lipídios é maior (Tabela 11). Com isso, pode-se concluir que nas condições estudadas neste trabalho é

mais vantajosa a utilização do meio de cultura obtido pela otimização do teor de lipídios (Tabela 10), uma vez que a concentração de lipídios obtida com a maior concentração de biomassa foi inferior a concentração de lipídios obtida com o maior teor de lipídios.

Tabela 11 – Custo dos meios de cultura obtidos no processo de otimização

Trat.	Níveis				Biomassa (g L ⁻¹)	Lipídios (%)	Lipídios (g L ⁻¹)	Meio de cultura (R\$ L ⁻¹)	Custo por kg de biomassa (R\$)	Custo por kg de lipídios (R\$)
	N	P	K	Mg						
PC	0	0	0	0	2,273	13,35	0,303	0,053	23,32	174,85
7	-1	-1	1	1	1,893	19,79	0,375	0,033	17,43	88,11
8	1	1	-1	1	2,930	14,36	0,421	0,055	18,77	130,70

3.4. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES PARA EXPERIMENTOS FUTUROS

Os resultados apresentados demonstram que a concentração de biomassa na microalga *Scenedesmus* sp. BR003 é dependente da concentração de N do meio de cultura. O meio otimizado, formulado a partir do meio MBM objetivando a produção de biomassa, apresenta como característica maior concentração de N, menores concentrações de P, K e Mg e os demais nutrientes na mesma concentração do meio MBM. Apesar da alteração da quantidade de sais presentes no meio houve uma redução de 19,51 % no custo por unidade de biomassa algal produzida (de R\$ 23,32 kg⁻¹ para R\$ 18,77 kg⁻¹). A redução nas concentrações de N e P, no intervalo estudado, estimulou o acúmulo de lipídios como reserva carbono nas células, verificado pelo aumento do teor de lipídios. Utilizando os níveis otimizados de N e P e os níveis mínimos de K e Mg, um meio de cultura alternativo foi formulado, tendo como características em relação ao meio MBM, menores concentrações de N, P, K e Mg mantendo os demais nutrientes na mesma concentração. Com a alteração da quantidade de nutrientes presentes no meio proposto, o custo foi reduzido de R\$ 0,055 L⁻¹ para R\$ 0,033 L⁻¹, ou seja, uma redução de 37,7 %. Os custos por unidade de biomassa produzida também foram reduzidos de R\$ 23,32 kg⁻¹ para R\$ 17,43 kg⁻¹ de biomassa e de R\$ 174,85 kg⁻¹ para R\$ 88,11 kg⁻¹ de lipídios.

Nas condições estudadas neste trabalho concluiu-se que a utilização do meio de cultura obtido visando a otimização do teor de lipídios é mais vantajosa, uma vez que a concentração de lipídios (g L⁻¹) obtida com a maior concentração de biomassa foi inferior a concentração de lipídios obtida com o maior teor de lipídios. Quando considerados os custos dos meios de cultura para os tratamentos que resultaram em maior concentração de biomassa e maior teor de lipídios, verifica-se que o menor custo por unidade de massa de lipídios (R\$ 88,11 kg⁻¹) é obtido onde o teor de lipídios é maior (19,79 %).

Tomados em conjunto com dados da literatura, os resultados aqui obtidos sugerem que se estabeleça um novo intervalo, com concentrações de N e P ainda menores, para se estabelecer a quantidade real necessária e, conseqüentemente, avaliar o incremento nos teores de lipídios e os custos dessa redução de nutriente.

3.5. REFERÊNCIAS

ADAMS, C, GODFREY, V., WAHLEN, B., SEEFELDT, L., BUGBEE, B. Understanding precision nitrogen stress to optimize the growth and lipid content tradeoff in oleaginous green microalgae. **Bioresource Technology**, 131, 188-194, 2013.

ANDERSEN, R.A. Algal culturing techniques, first ed. **Elsevier Academic Press**. 2005.

ARUMUGAM, M., AGARWAL, A., CHANDRA, M., AHMED, Z. Influence of nitrogen sources on biomass productivity of microalgae *Scenedesmus bijugatus*. **Bioresource Technology**, 131, 246-249, 2013.

BENIDER, A., TAHIRI, M., BELKOURA, M., DAUTA, A. Interacting effect of heliothermic factors on the growth rate of 3 *Scenedesmus* species. **International Journal of Limnology**, 37, 257–266, 2001.

BOX, G.E.P.; WILSON, K.B. On the experimental attainment of optimum conditions. **Journal of the Royal Statistical Society**, Oxford, B13, 1-45, 1951.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**. 25, 294–306., 2007.
COCHRAN, W.G.; COX, G.M. Experimental designs. New York: **John Wiley and Sons**, 661p. 1957.

CUSTÓDIO, C. C. **Efeito do ácido sulfúrico concentrado sobre o potencial fisiológico de sementes de *Brachiaria brizantha* (A. Rich.) Stapf cv. "MARANDU" e *Brachiaria humidicola* (Rendle) Schweick. Cv. "TULLY" durante o armazenamento.** 202f.. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2000.

DAMIANI, M.C., POPOVICH, C.A., CONSTENLA, D., LEONARDI, P.I. Lipid analysis in *Haematococcus pluvialis* to assess its potential use as a biodiesel feedstock. **Bioresource Technology**, 101, 3801–3807, 2010.

DENG, X.D., LI Y.J., FEI, X.W .Microalgae: a promising feedstock for biodiesel. **African Journal of Microbiology Research**, 3, 1008-1014, 2009.

DENG, X.; FEI, X.; LI, Y. The effects of nutritional restriction on neutral lipid accumulation in *Chlamydomonas* and *Chlorella*. **African Journal of Microbiology Research**, 5, 3, 260-270, 2011.

FRANCISCO, E., NEVES, D., LOPES, E., FRANCO, T., Microalgae as feedstock for biodiesel production: Carbon dioxide sequestration, lipid production and biofuel quality. **Journal Chem. Technol. Biotechnol**, 85, 395–403, 2009.

GIOVANI, E. M. Response surface methodology and product optimization. **Food Technology**, London, 37, 11, 41-83, 1983.

GRIFFITHS M.J., GARCIN C., VAN HILLE R.P., HARRISON S.T.L. Interference by pigment in the estimation of microalgal biomass concentration by optical density. **Journal Microbiology Methods**, 85, 119-123, 2011.

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

GU, N., LIN, Q., LI, G., QIN, G., LIN, J.D., HUANG, L.M. Effect of salinity change on biomass and biochemical composition of *Nannochloropsis oculata*. **Journal World Aquaculture Society**, 43, 1, 97–106, 2012.

HENIKA, R.G. Simple and effective system for use with response surface methodology. **Cereal Science Today**, St. Paul, 17, 10, 309 - 334, 1972.

HU, Q., SOMMERFELD, M., JARVIS, E., GHIRARDI, M., POSEWITZ, M., SEIBERT, M., DARZINS, A . Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. **Plant Journal**, 54, 621-639, 2008.

ILLMAN AM, SCRAGG AH, SHALES SW .Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium. **Enzyme Microbiology Technology**, 27, 631-635, 2000.

KAWACHI M., NOËL M.H. Sterilization and sterile technique, in: Andersen, R.A. (Ed.), *Algal culturing techniques*, first ed. **Elsevier Academic Press**, 65-81, 2005.

KRAEBS G, BUECHEL C. Temperature and salinity tolerances of geographically separated *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin strains, maximum quantum yield of primary photochemistry, pigmentation, proline content and growth. **Botanica Marina**, 54, 231–241, 2005.

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

LI, Y.C., CHEN, Y.F., CHEN, P., MIN, M., ZHOU, W.G., Martinez, B., Zhu, J., Ruan, R, Characterization of a microalga *Chlorella* sp. well adapted to highly concentrated municipal wastewater for nutrient removal and biodiesel production. **Bioresource Technology**, 102, 5138–5144, 2011.

LIN, Q.; LIN, J. Effects of nitrogen source and concentration on biomass and oil production of a *Scenedesmus rubescens* like microalga. **Bioresource Technology**, 102, 2, 1615-1621, 2011.

LIN, Q., GUA, N., LIN, J. Effect of ferric ion on nitrogen consumption, biomass and oil accumulation of a *Scenedesmus rubescens*-like microalga. **Bioresource Technology**, 112, 242–247, 2012.

MANDAL, S.; MALLICK, N. Microalga *Scenedesmus obliquus* as a potential source for biodiesel production. **Applied microbiology and biotechnology**, 84, 2, 281-91, 2009.

MASUKO T., MINAMI A., IWASAKI N., MAJIMA T., NISHIMURA S.I., LEE Y.C. Carbohydrate analysis by a phenol–sulfuric acid method in microplate format. **Analytical Biochemistry**, 339, 69-72, 2005.

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

MATEUS, N. B; BARBIN, D.; CONAGIN, A. Viabilidade de uso do delineamento composto central. **Acta Scientiarum Maringá**, 23, 6, 1537-1546, 2001.

MATEUS, N.B. **O delineamento composto central e sua viabilidade de uso em algumas áreas de pesquisa**. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.

MERZLYAK, M.N., CHIVKUNOVA, O.B., GORELOVA, O.A., RESHETNIKOVA, I.V., SOLOVCHENKO, A.E., KHOZIN-GOLDBERG, I., COHEN, Z. Effect of nitrogen starvation on optical properties, pigments, and arachidonic acid content of the unicellular green alga *Parietochloris incise* (*Trebouxiophyceae*, *Chlorophyta*). **Journal Phycology**, 43, 833–843, 2007.

PECCIA, J. *et al.* Nitrogen supply is an important driver of sustainable microalgae biofuel production. **Cell press**, 1-5, 2013.

PRUVOST, J., VAN VOOREN, G., COGNE, G., LEGRAND, J. Investigation of biomass and lipids production with *Neochloris oleoabundans* in photobioreactor. **Bioresource Technology**, 100, 5988–5995, 2009.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. Planejamento de experimentos e otimização de processos. 2. ed. São Paulo: **Casa do Espírito Amigo Fraternidade Fé e Amor**, 2009.

SAKAMOTO, K. *et al.* Optimization of light for growth, photosynthesis, and hydrocarbon production by the colonial microalga *Botryococcus braunii* BOT-22. **Bioresource technology**, 110, 474-9, 2012.

SCARSELLA, M. Study on the optimal growing conditions of *Chlorella vulgaris* in bubble column photobioreactors. **Chemical Engineering Transactions**, 17, 85–90, 2010.

SUALI, E.; SARBATLY, R. Conversion of microalgae to biofuel. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 16, 6, 4316-4342, 2012.

SYDNEY, E.B.; STURM, W.; CARVALHO, J. C.; SOCCOL, V. T.; LARROCHE, C.; PANDEY, A.; SOCCOL, C.R. Potential carbon dioxide fixation by industrially important microalgae. **Bioresource Technology**, 101, 15, 5892-5896, 2010.

TAKAGI, M., KARSENO, YOSHIDA, T. Effect of salt concentration on intracellular accumulation of lipids and triacylglyceride in marine microalgae *Dunaliella* cells. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 101, 223-226, 2006.

TAN, Y.X., LIN, J.D. Biomass production and fatty acid profile of a *Scenedesmus rubescens*- like microalga. **Bioresource Technology**, 102, 10131–10135, 2011

WATANABE, A. List of algal strains in the collection at the Institute of Applied Microbiology, University of Tokyo. **Journal of General and Applied Microbiology**, 6, 283-292, 1960.

WU, Y.; YU, Y.; HU, H. Potential biomass yield per phosphorus and lipid accumulation property of seven microalgal species. **Bioresource Technology**, 130, 599-602, 2013.

XIN, L. *et al.* Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. **Bioresource Technology**, 101, 14, 5494-5500, 2010.

XIN, L. *et al.* Growth and nutrient removal properties of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. LX1 under different kinds of nitrogen sources. **Ecological Engineering**, 36, 4, 379-381, abr. 2010.

YANG, J., XU, M., ZHANG, X.-Z., HU, Q., SOMMERFELD, M., CHEN, Y.-S. Life-cycle analysis on biodiesel production from microalgae: water footprint and nutrients balance. **Bioresource Technology**, 102, 11, 6633. 2011.

4. ANEXOS

4.1. ANEXO A - Composição dos meios de cultura sintéticos

Tabela A1 – Composição dos seis meios de cultura sintéticos

Composição	BG11	MDM	MBM	BBM	MC	Illman
	g.L ⁻¹					
NaNO ₃	1,5					
KNO ₃		1	0,25		1,25	
NaNO ₃				0,25		
(NH ₄) ₂ HPO ₄						0,203
K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	0,04	0,25	0,075	0,075		
KH ₂ PO ₄ .3H ₂ O			0,175	0,175	1,25	1,361
KCl						2,236
KOH				0,031		
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,075	0,25	0,075	0,075	0,02	2,465
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,025	0,01	0,01	0,025		
C ₆ H ₈ O ₇	0,006					
C ₁₂ H ₂₂ FeN ₃ O ₁₄	0,006					
C ₁₀ H ₁₂ N ₂ O ₈ .Mg						
.2Na	0,001			0,05		
Na ₂ CO ₃	0,02					
H ₃ BO ₃	0,00000286	0,0029	0,0029	0,01142	0,0029	
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,00000181	0,00181	0,00181	0,00144	0,00181	
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,000000222			0,00882		
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,000000391					
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,000000079	0,00008	0,00008	0,00157	0,00008	
Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	0,000000049			0,00049		
FeSO ₄ .7H ₂ O		0,02	0,02	0,00498	0,02	0,01
NaCl		0,1	0,025	0,025		
3(NH ₄)O.7Mo					0,00001	
O ₃		0,00008	0,000018		8	
ZnCl ₂		0,00011	0,00011		0,00011	
MoO ₃				0,00071		
H ₂ SO ₄				1*		

*Quantidade expressa em mL

4.2. ANEXO B - Análise de Variância e análise de resíduos

Tabela B1 - Análise de Variância e análise de resíduos para concentração de biomassa livre de cinzas - Coeficientes de regressão para concentração de biomassa.

Fatores	Coeficiente de Regressão	Erro padrão	t (13)	p-valor	
Média	β_0	2,273	0,097	23,403	0,000
x1(L)	β_1	0,238	0,040	6,003	0,000
x1 (Q)	β_{11}	-0,109	0,040	1,205	0,017
x2 (L)	β_2	0,048	0,040	-1,997	0,250
x2 (Q)	β_{22}	0,008	0,040	1,184	0,836
x3 (L)	β_3	-0,079	0,040	-2,739	0,067
x3 (Q)	β_{33}	0,015	0,040	0,212	0,718
x4 (L)	β_4	0,047	0,040	0,369	0,258
x4 (Q)	β_{44}	-0,038	0,040	-0,955	0,357
x1 x2	β_{12}	-0,025	0,049	-0,524	0,609
x1 x3	β_{13}	-0,037	0,049	-0,764	0,459
x1 x4	β_{14}	0,085	0,049	1,759	0,102
x2 x3	β_{23}	-0,049	0,049	-1,004	0,334
x2 x4	β_{24}	-0,001	0,049	-0,026	0,980
x3 x4	β_{34}	-0,040	0,049	-0,832	0,420

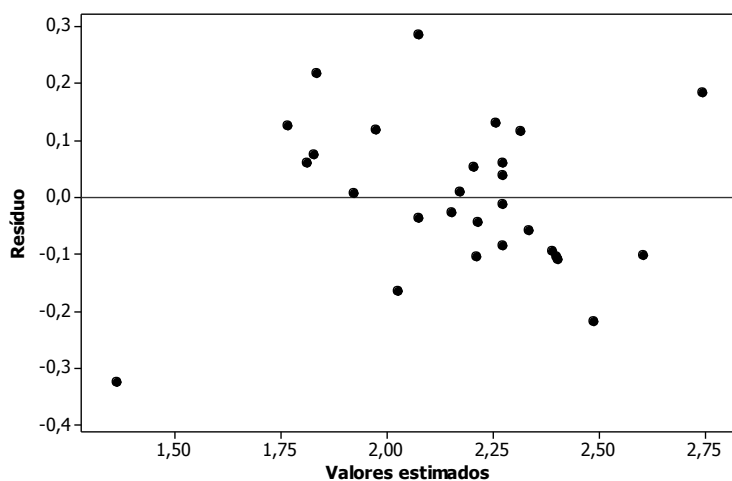


Figura B1 - Resíduos padronizados versus valores estimados pelo modelo de regressão (concentração de biomassa).

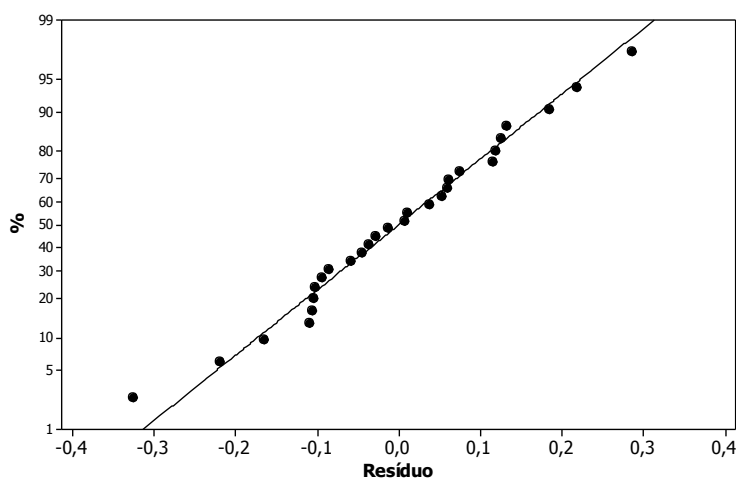


Figura B2. Valores de resíduos sob normalidade (concentração de biomassa).

Tabela B2 - Análise de Variância e análise de resíduos para teor de lipídios - Coeficientes de regressão para teor de lipídios.

Fatores	Coeficiente de Regressão	Erro padrão	t (13)	p-valor	
Média	β_0	13,350	0,762	17,530	0,000
x1(L)	β_1	-2,160	0,311	-6,948	0,000
x1 (Q)	β_{11}	0,971	0,311	3,123	0,008
x2 (L)	β_2	-0,687	0,311	-2,209	0,046

Fatores	Coefficiente de Regressão	Erro padrão	t (13)	p-valor	
x2 (Q)	β_{22}	-0,238	0,311	-0,766	0,457
x3 (L)	β_3	0,253	0,311	0,812	0,431
x3 (Q)	β_{33}	-0,068	0,311	-0,217	0,831
x4 (L)	β_4	0,181	0,311	0,583	0,570
x4 (Q)	β_{44}	0,522	0,311	1,679	0,117
x1 x2	β_{12}	1,057	0,381	2,775	0,016
x1 x3	β_{13}	0,240	0,381	0,632	0,538
x1 x4	β_{14}	0,337	0,381	0,885	0,392
x2 x3	β_{23}	-0,395	0,381	-1,037	0,318
x2 x4	β_{24}	0,793	0,381	2,081	0,058
x3 x4	β_{34}	-0,080	0,381	-0,210	0,837

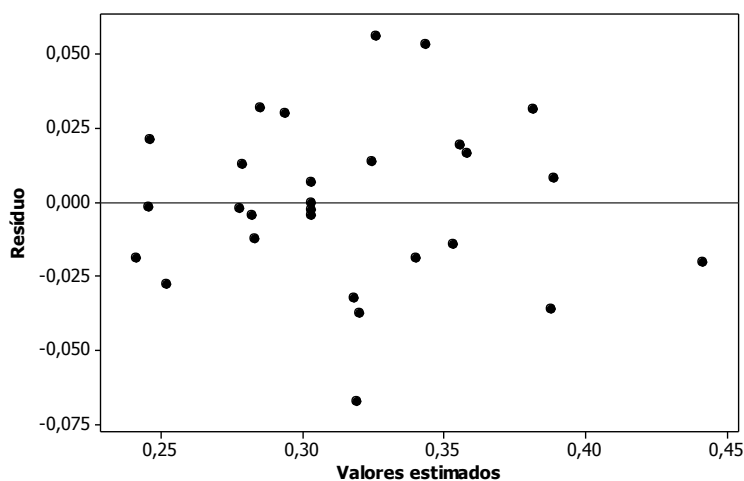


Figura B3. Resíduos padronizados versus valores estimados pelo modelo de regressão (teor de lipídios).

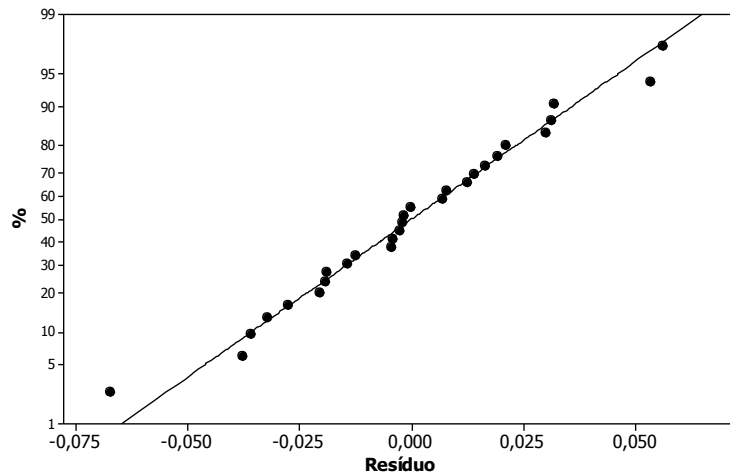
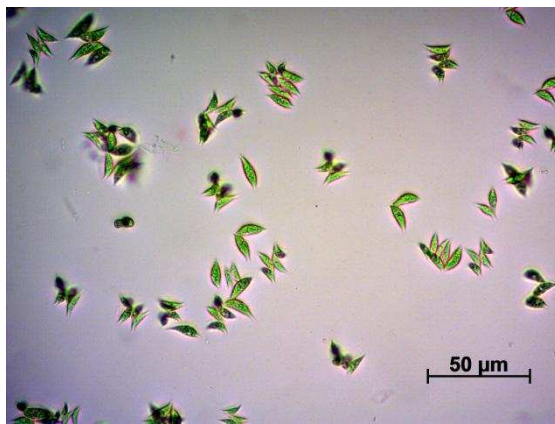


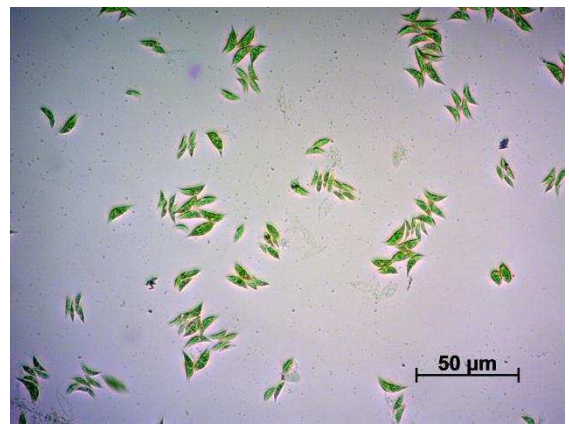
Figura B4. Valores de resíduos sob normalidade (teor de lipídios).

Nos gráficos de resíduos em função dos valores estimados, os valores estão uniformemente distribuídos acima e abaixo do eixo x ao longo do intervalo de dados, indicando variância é independente dos valores de biomassa e lipídios. O gráfico de probabilidade normal mostra que os resíduos estão dispostos ao longo de uma reta, seguindo a distribuição normal. Estas propriedades sustentam os pressupostos do modelo empírico e permitem a aceitação do modelo para a descrição das variações na produção de biomassa e lipídios nos intervalos estudados.

4.3. ANEXO C – Plasticidade fenotípica



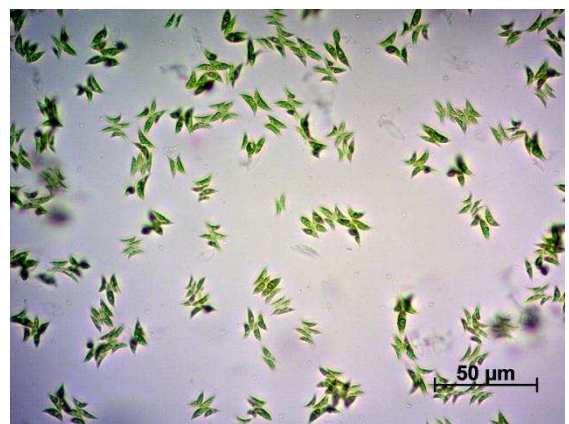
T1



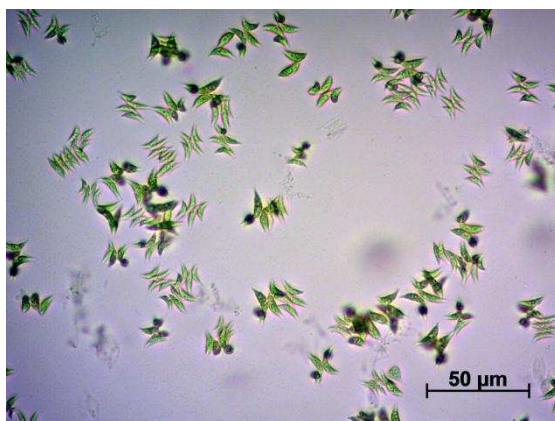
T2



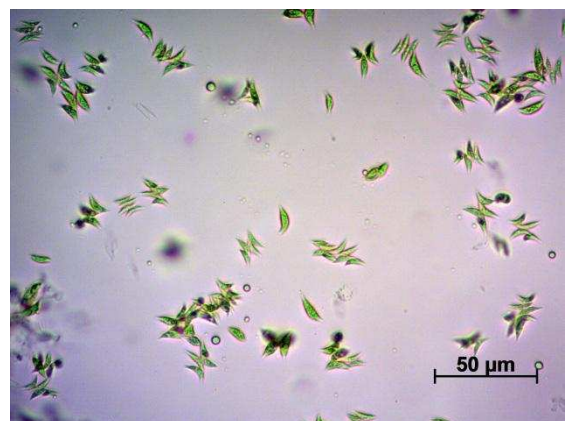
T3



T4

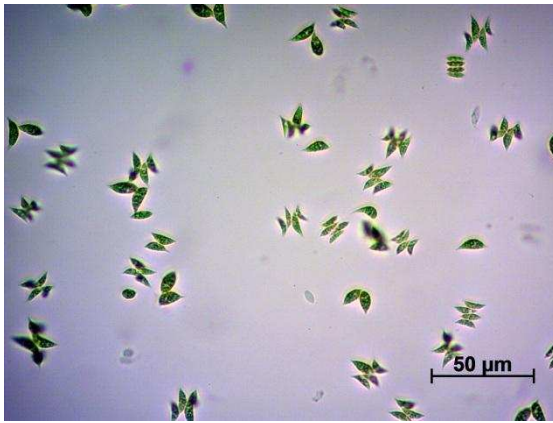


T5

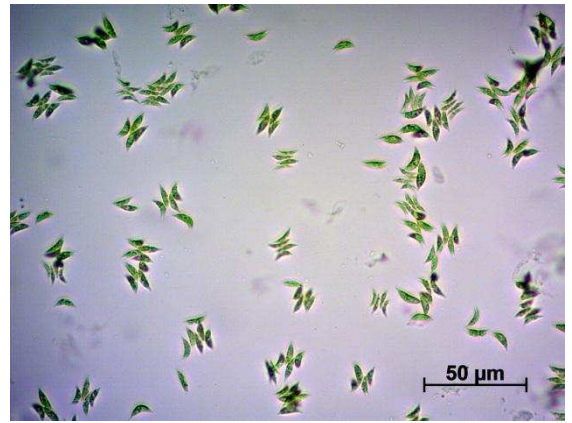


T6

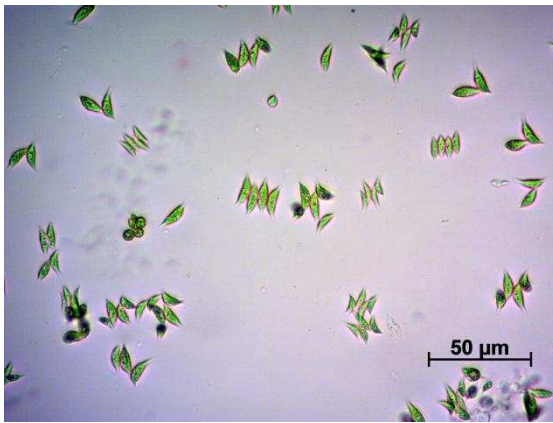
Figura C1 - Padrão de cenóbios em *Scenedesmus* sp. BR003 no último dia de cultivo em diferentes meios de cultura.



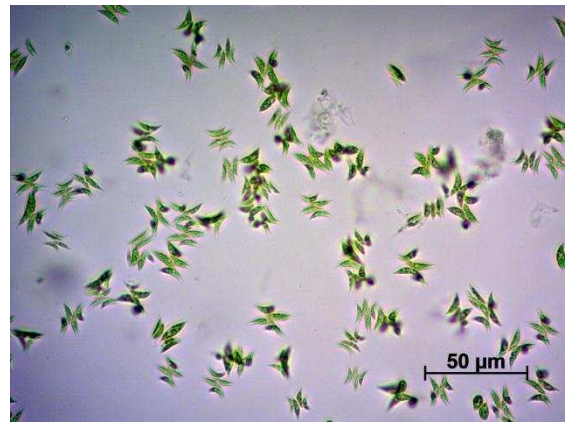
T7



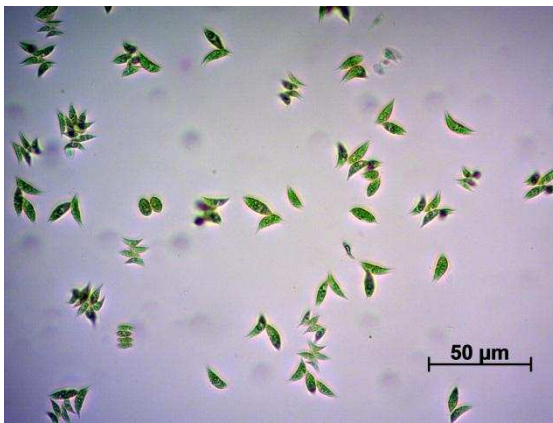
T8



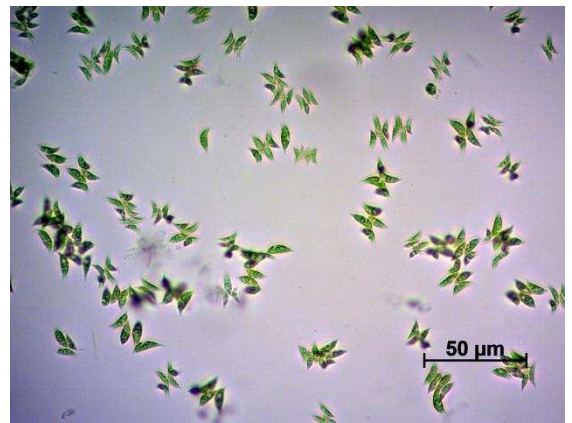
T9



T10

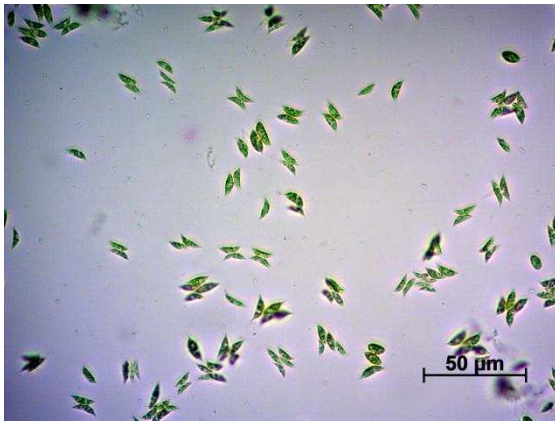


T11

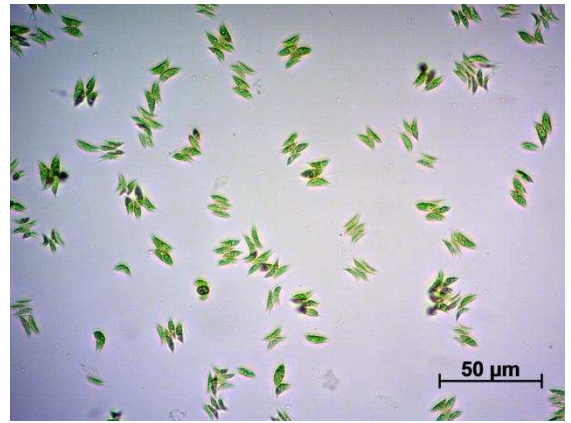


T12

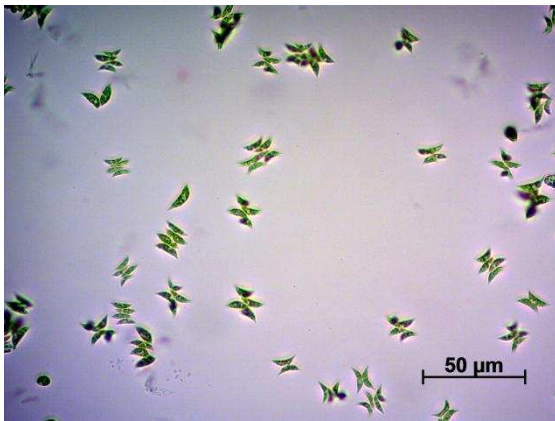
Figura C2 - Padrão de cenóbios em *Scenedesmus* sp. BR003 no último dia de cultivo em diferentes meios de cultura.



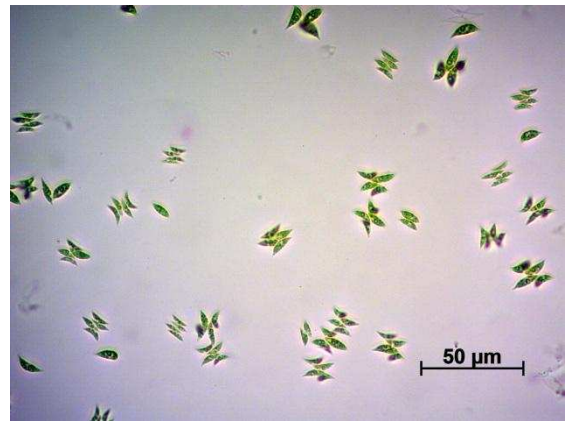
T13



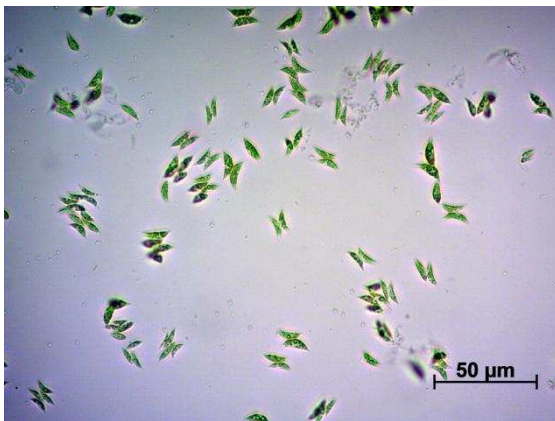
T14



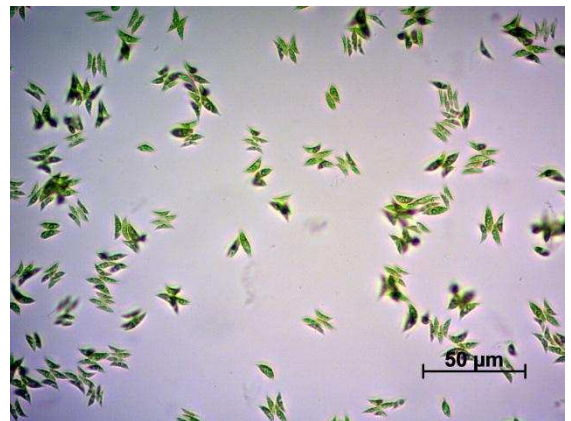
T15



T16

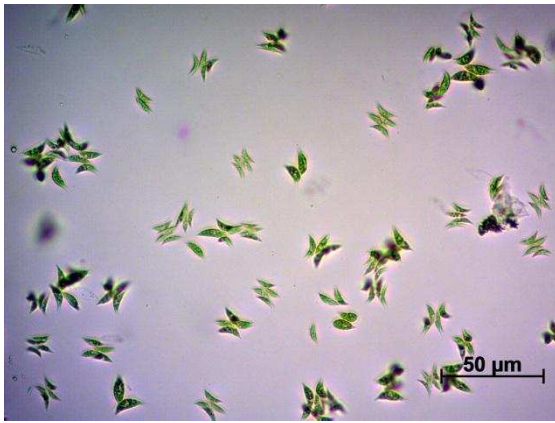


T17



T18

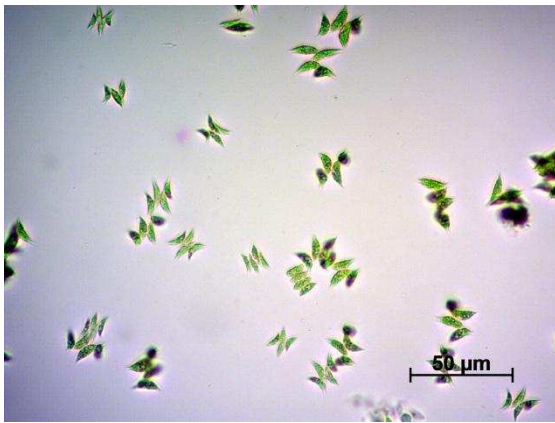
Figura C3 - Padrão de cenóbios em *Scenedesmus* sp. BR003 no último dia de cultivo em diferentes meios de cultura.



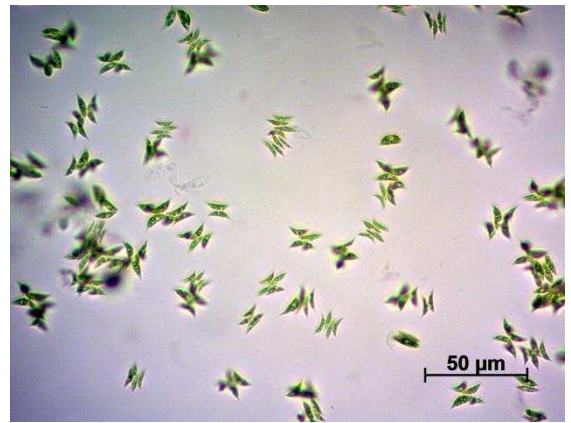
T19



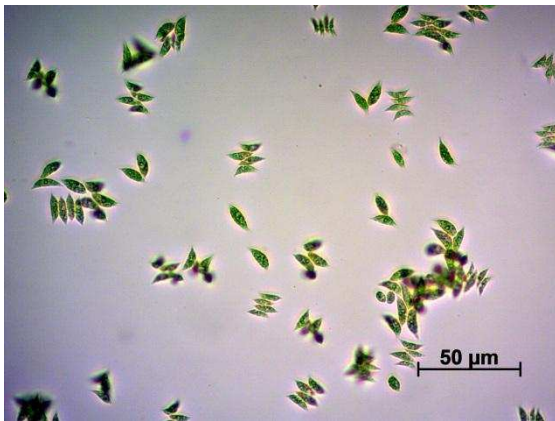
T20



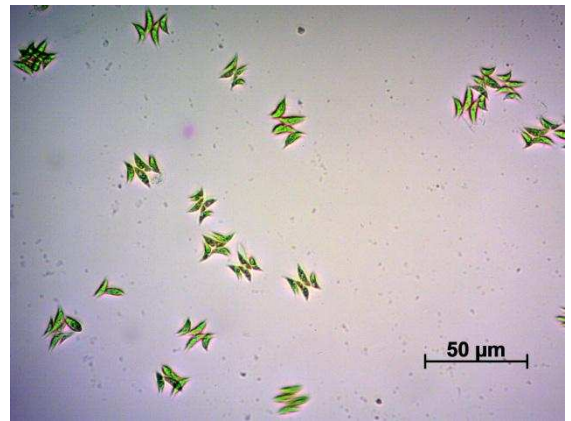
T21



T22

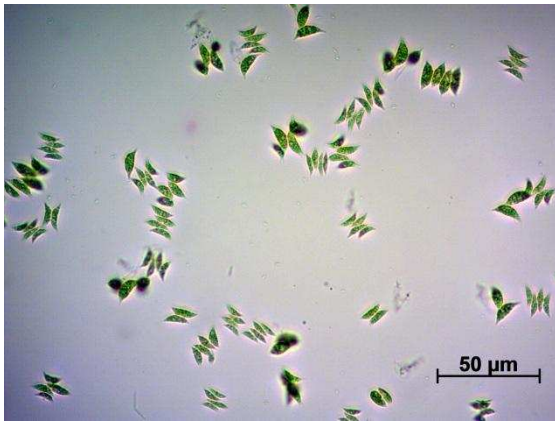


T23

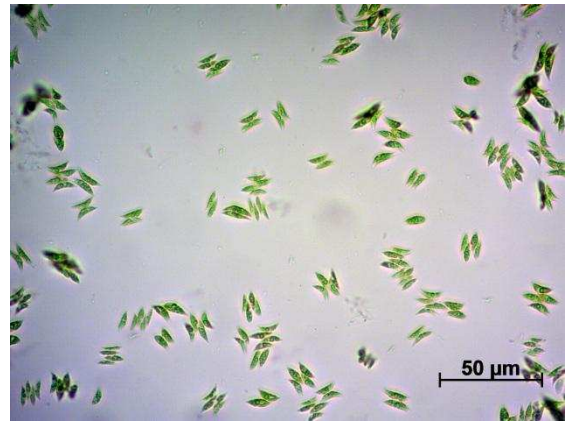


T24

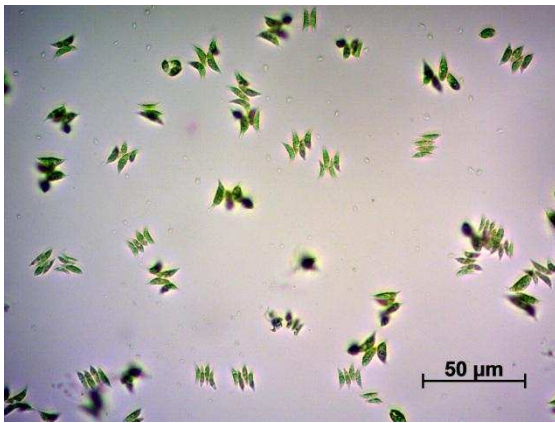
Figura C4 - Padrão de cenóbios em *Scenedesmus* sp. BR003 no último dia de cultivo em diferentes meios de cultura.



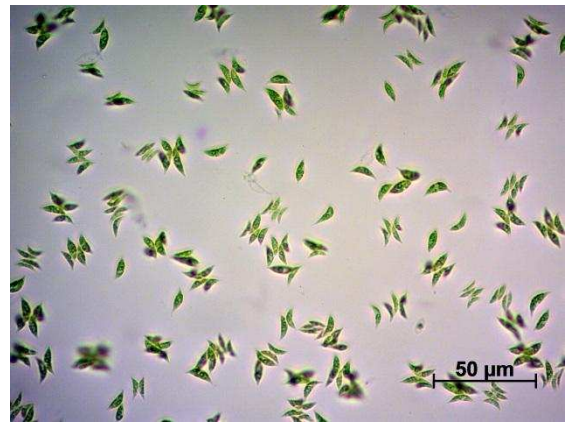
T25



T26



T27



T28

Figura C5 - Padrão de cenóbios em *Scenedesmus* sp. BR003 no último dia de cultivo em diferentes meios de cultura.

5. CONCLUSÕES GERAIS

A adição de CO₂ ao cultivo proporcionou aumento da biomassa e, conseqüentemente, um aumento na quantidade de lipídios produzidos por litro de cultivo. No entanto, o aumento no teor de lipídios só foi obtido no cultivo com o meio MBM para *Scenedesmus* sp. BR003, aumento este concomitante com a redução no teor de carboidratos.

A tolerância a maiores quantidades de CO₂, gerando aumento de biomassa e de lipídios como resposta, sugere que estas algas têm potencial para cultivo utilizando fontes alternativas de CO₂ (resíduos industriais), que podem reduzir os custos relacionados à adição do CO₂ industrial (90% de pureza).

Com o cultivo de *Chlorella* sp. BR019 realizado no meio Illman foi possível observar que a quantidade de P adicionada ao meio é excessiva, uma vez que as algas absorveram quantidades muito inferiores às disponibilizadas. Quando comparados os resultados obtidos no meio Illman a base de fertilizantes e reagentes, não houve diferença estatística para biomassa e lipídios. O uso de fertilizantes agrícolas mostra-se uma boa alternativa para redução dos custos nesta etapa produtiva, uma vez que gerou uma economia de 77% no custo total do meio de cultura.

No processo de otimização do meio de cultura, para a concentração de biomassa da microalga *Scenedesmus* sp. BR003 somente o N foi estatisticamente significativo no intervalo estudado. O aumento na concentração desse nutriente aumenta o rendimento em biomassa livre de cinzas. Com a alteração da quantidade de sais presentes no meio, o custo do meio de cultura MBM aumentou de R\$ 0,053 L⁻¹ para R\$ 0,055 L⁻¹.

Para lipídios, o N e o N foram estatisticamente significativos no intervalo estudado, influenciando positivamente o teor de lipídios. A quantidade total de lipídios teve um aumento de 105%, quando comparados as maiores e menores concentrações de N e P. É mais vantajoso ter baixas concentrações de N e P no meio de cultura do que um grande número de células. Uma vez que esse grande número de células não gerou maior quantidade de lipídios por litro de meio de cultura. Com a alteração da quantidade de nutrientes presentes no meio proposto, o custo foi reduzido de R\$ 0,053 L⁻¹ para R\$ 0,0337 L⁻¹, gerando uma economia de 37,7 %.

Nas condições estudadas neste trabalho concluiu-se que é mais vantajosa a utilização do meio de cultura obtido pela otimização do teor de lipídios, uma vez que a concentração de lipídios obtida com a maior concentração de biomassa foi inferior a concentração de lipídios obtida com o maior teor de lipídios. Quando considerados os custos dos meios de cultura, os tratamentos que obtiveram maior concentração de

biomassa e maior teor de lipídios, verifica-se que o menor custo por unidade de lipídios (R\$ 88,11 L⁻¹) é obtido onde o teor de lipídios é maior (19,79 %).

Apesar das quantidades de lipídios obtidos ainda não serem suficientes para tornar viável a produção de biodiesel a partir dessa microalga, a manipulação dos nutrientes do meio de cultura mostrou-se uma ótima ferramenta para o aumento do teor de lipídios.

No intervalo estudado, para as duas respostas, produção de biomassa e teor de lipídios, há a necessidade de se estabelecer um novo intervalo para obtenção da condição ótima. Com o objetivo de obter resposta para os fatores K, P e Mg, um novo delineamento deverá ser planejado, utilizando diferentes níveis dos nutrientes, ou suplementação com nutrientes em diferentes fases do cultivo, para que se possam investigar os seus efeitos, bem como os efeitos das suas interações, na produção de biomassa e lipídios.