

DILSON NOVAIS ROCHA

**ASSOCIAÇÃO DE FATORES DE ESTRESSE E MODOS DE
CULTIVO PARA AUMENTO DA PRODUTIVIDADE DE LIPÍDEOS
EM *Scenedesmus* spp.**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2018

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

R672a
2018
Rocha, Dilson Novais, 1981-
Associação de fatores de estresse e modos de cultivo para
aumento da produtividade de lipídeos em *Scenedesmus* spp. /
Dilson Novais Rocha. – Viçosa, MG, 2018.
xv, 92 f. ; 29 cm.

Inclui apêndices.

Orientador: Márcio Arêdes Martins.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Microalgas - Cultura e meios de cultura. 2. Salinidade.
3. Biodiesel. 4. Adubos e fertilizantes. I. Universidade Federal
de Viçosa. Departamento de Engenharia Agrícola. Programa de
Pós-Graduação em Engenharia Agrícola. II. Título.

CDD 22. ed. 631.5

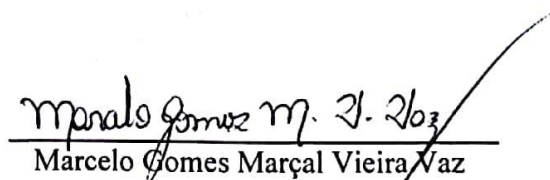
DILSON NOVAIS ROCHA


**ASSOCIAÇÃO DE FATORES DE ESTRESSE E MODOS DE CULTIVO PARA
AUMENTO DA PRODUTIVIDADE DE LIPÍDEOS EM *Scenedesmus* spp.**

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

APROVADA: 29 de agosto de 2018.


Jane Sélia dos Reis Coimbra


Marcelo Gomes Marçal Vieira


Leonardo Brantes Bacellar Mendes
(Coorientador)


Marcio Arêdes Martins
(Orientador)

*“O que vale na vida não é o ponto de
partida e sim a caminhada.*

Caminhando e semeando,

no fim terás o que colher”

Cora Coralina

A toda minha **família** pelo incentivo e confiança durante todos estes anos. A minha **mãe** Eponina (Nena) e ao meu **pai** Nilson (Son) pelo exemplo de vida. As minhas **irmãs** Darlene, Darleide, Conceição e Carol, pelo incentivo. Aos meus **sobrinhos** Daniel, Arnaldo, Benícia, Heitor, Carla e Arthur, pelo carinho. Ao meu **filho** Gabriel, anjo que ilumina o caminho. A minha **querida** Ana Paula, pelo Amor.

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e bênçãos.

A minha família e amigos pelo incentivo e apoio.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Agrícola pela oportunidade de realizar o mestrado com excelência.

Ao Departamento de Engenharia Agrícola por permitir cursar o mestrado.

Especial agradecimento ao meu orientador e chefe imediato, Prof. Marcio Arêdes Martins, o principal responsável por todo esse sonho, pela atenção, experiência, paciência, sabedoria e confiança.

Ao meu coorientador Dr. Leonardo Brantes Bacellar Mendes pelo apoio e auxílio prestado.

Aos Prof. Adriano Nunes Nesi e Wagner Luiz Araújo pelas valiosas contribuições e infraestrutura cedida no Departamento de Biologia Vegetal.

Ao Dr. Marcelo Gomes Marçal Vieira Vaz e a doutoranda Lidiane Covell por todo apoio e contribuições nas análises realizadas na Unidade de Crescimento de Plantas (UCP/DBV).

Aos Prof. Paulo Roberto Cecon e Antônio Galvão do Nascimento pelo apoio e sugestões.

Aos membros da banca examinadora Profa. Jane Sélia dos Reis Coimbra, Dr. Marcelo Gomes Marçal Vieira Vaz e Dr. Leonardo Brantes Bacellar Mendes.

Ao CENPES/Petrobras, especialmente ao Dr. Leonardo Brantes Bacellar Mendes e Eng. Rafael Richard João pela troca de conhecimento na área de produção de microalgas.

Aos professores e técnicos-administrativos do DEA pelo apoio e incentivo.

Aos amigos e amigas do Laboratório de Biocombustíveis: Rúben, Javier, Raquel, Bruno, Victor, Paula, Lorena, Matheus, Gerson, Daniel, Eloiny, André, Andry, Arthur e Tamires por toda a ajuda concedida na execução deste trabalho.

Ao Dr. Mauricio de Oliveira Leite pelo incentivo e valiosas contribuições.

A todos os amigos que, de alguma forma contribuíram para este trabalho e não foram aqui citados, meus sinceros agradecimentos.

BIOGRAFIA

DILSON NOVAIS ROCHA, filho de Nilson Rocha Silva e Eponina Novais Rocha, nasceu em 14 de junho de 1981, na cidade de Jussiape, Estado da Bahia.

Graduou-se em Engenharia Agrônômica pela Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia em agosto de 2006.

Em 2013 foi admitido em concurso público, e desde então desenvolve suas atividades laborais no Laboratório de Biocombustíveis do Departamento de Engenharia Agrícola da UFV, no cargo de técnico em agropecuária.

Em agosto de 2016, iniciou o curso de Mestrado no Programa de Pós-graduação em Engenharia Agrícola na Universidade Federal de Viçosa, concentrando seus estudos na área de Energia, concluindo-o em agosto de 2018.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT.....	xiv
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
1.1. REFERÊNCIAS	5
2. OBJETIVOS	10
2.1. OBJETIVO GERAL	10
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	10
3. ARTIGO I – Alterações na produtividade de lipídios em microalgas do gênero <i>Scenedesmus</i> com adição de micronutrientes e estresse salino em diferentes modos de cultivos	11
3.1. INTRODUÇÃO	12
3.2. MATERIAL E MÉTODOS	14
3.2.1. Linhagens de microalgas.....	14
3.2.2. Condições de cultivo	14
3.2.3. Modos de cultivo.....	15
3.2.4. Caracterização do crescimento dos cultivos.....	16
3.2.5. Quantificação de proteínas hidrossolúveis totais	17
3.2.6. Quantificação de carboidratos neutros totais.....	18
3.2.7. Quantificação de lipídios neutros totais (TAG)	18
3.2.8. Imagem das microalgas pela microscopia de fluorescência.....	20
3.2.9. Extração dos lipídios totais	20
3.2.10. Perfil de ácidos graxos	20
3.2.11. Análise da concentração de micro e macronutrientes	21
3.2.12. Determinação da umidade dos fertilizantes inorgânicos.....	21
3.2.13. Análise estatística.....	21

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
3.3.1. Análise e formulação de meio de cultura a base de fertilizantes.....	22
3.3.2. Efeito da adição de micronutrientes na produtividade de FAMES e no perfil de ácidos graxos	24
3.3.3. Efeito da salinidade e dos modos de cultivo no crescimento de microalgas e na produtividade biomassa.....	27
3.3.4. Efeito da salinidade e modos de cultivo no acúmulo e produtividade de lipídios.....	31
3.3.5. Estimativa do teor de lipídios neutros com vermelho do Nilo	33
3.3.6. Efeito da salinidade e modos de cultivo na composição bioquímica	35
3.4. CONCLUSÕES.....	38
3.5. REFERÊNCIAS	39
4. ARTIGO II – Associação de estresse nutricional e modos de cultivo como estratégia para aumento da produtividade de lipídios em cultivos outdoor em microalgas do gênero <i>Scenedesmus</i> .	46
4.1. INTRODUÇÃO	47
4.2. MATERIAL E MÉTODOS	48
4.2.1. Linhagens de microalgas.....	48
4.2.2. Condições de cultivo	49
4.2.3. Modos de cultivo.....	52
4.2.4. Caracterização do crescimento dos cultivos.....	53
4.2.5. Determinação de pigmentos	54
4.2.6. Quantificação de lipídios neutros totais (TAG)	54
4.2.7. Extração dos lipídios totais	56
4.2.8. Perfil de ácidos graxos	56
4.2.9. Análise estatística.....	56
4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
4.3.1. Efeito das concentrações de N e P e modos de cultivo na produtividade de biomassa	57
4.3.2. Efeito da interação de N e P aos modos de cultivo na produtividade de lipídios.....	60
4.3.3. Efeito de N e P e modos de cultivo nos pigmentos	63
4.3.4. Acúmulo de lipídios neutros	67

4.3.5. Cultivo outdoor em tanque.....	70
4.4. CONCLUSÕES.....	77
4.5. REFERÊNCIAS.....	78
5. CONCLUSÃO GERAL.....	85
6. APÊNDICES.....	87
6.1. APÊNDICE A – Validação da metodologia de fluorescência com o corante vermelho do Nilo.....	87
6.2. APÊNDICE B – Protocolo Ratzlaff Modificado.....	89
6.3. APÊNDICE C – Cromatogramas.....	90

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Curva de crescimento para os tratamentos com e sem adição de micronutrientes	25
Figura 2: Efeito de várias concentrações de NaCl no crescimento de células da microalga <i>Scenedesmus obliquus</i>	28
Figura 3: Efeito de várias concentrações de NaCl no crescimento de células da microalga <i>Scenedesmus bajacalifornicus</i>	28
Figura 4: Produtividade de biomassa (P_{BM}) (A) e (B), produtividade de lipídios neutros (P_{LN}) (C) e (D) e teores de lipídios neutros (%) (E) e (F).	30
Figura 5: Valores de unidade relativa de fluorescência (RFU) normalizada pela densidade ótica a 750 nm (OD_{750}).....	33
Figura 6: Fluorescência de microalgas coradas com o corante vermelho do Nilo.....	34
Figura 7: Composição bioquímica das células de microalgas.	36
Figura 8: (A) Tanque tipo Raceway de 4 m ³ com cultivo de microalgas, (B) planta piloto de produção de microalgas e (C) sistema de monitoramento.	51
Figura 9: Esquema do sistema para produção de gás de combustão, purificação, armazenamento e fornecimento aos cultivos de microalgas.....	51
Figura 10: produtividade de biomassa em microalgas <i>S. obliquus</i>	57
Figura 11: produtividade de biomassa em microalgas <i>S. bajacalifornicus</i>	57
Figura 12: (A) produtividade e (B) teor de lipídios neutros em microalgas <i>S. obliquus</i>	61
Figura 13: (A) produtividade e (B) teor de lipídios neutros em microalgas <i>S. bajacalifornicus</i>	61
Figura 14: (A) Relação entre clorofila total (clorofila a + b) e a razão entre os teores de nitrogênio e fósforo (N:P)	66
Figura 15: Coloração dos cultivos em microplacas de 24 poços na fase final (estacionária).....	67
Figura 16: Unidade relativa de fluorescência (RFU) normalizada pela densidade ótica a 750 nm (OD_{750} , eixo secundário).	68
Figura 17: Unidade relativa de fluorescência (RFU) normalizada pela densidade ótica a 750 nm (OD_{750} , eixo secundário)	69
Figura 18: Curva de crescimento da microalga <i>S. obliquus</i> cultivada em tanque tipo <i>Raceway</i>	71

Figura 19: Valores da máxima e da média radiação fotossinteticamente ativa (PAR) e amplitude de temperaturas máxima e mínima do cultivo.....	72
Figura 20: Teores de lipídios neutros e polares para a linhagem <i>S. obliquus</i>	73
Figura 21: Teores de lipídios neutros totais de microalga utilizada como padrão para validação da metodologia da fluorescência.	88
Figura 22: Cromatograma do óleo de <i>Scenedesmus obliquus</i> , extraído da biomassa produzida em cultivo outdoor em tanque raceway, no modo batelada.....	90
Figura 23: Cromatograma do óleo de <i>Scenedesmus obliquus</i> , extraído da biomassa produzida em cultivo outdoor em tanque raceway, no modo semi-contínuo.	90
Figura 24: Cromatograma do óleo de <i>Scenedesmus obliquus</i> , extraído da biomassa produzida em cultivo indoor, em frascos Erlenmeer, no modo batelada.....	91
Figura 25: Cromatograma de mistura padrão de FAMES.	91
Figura 26: Cromatograma de óleo de soja.....	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Umidade a 65 °C e teor de partículas insolúveis em água dos fertilizantes inorgânicos utilizados na formulação de meios de cultura para cultivo de microalgas.	22
Tabela 2: Concentração dos nutrientes dos fertilizantes inorgânicos e da água utilizada na formulação do meio de cultura.	23
Tabela 3: Concentração de nutrientes nos meios de cultura com e sem adição de micronutrientes.	24
Tabela 4: Composição de ácidos graxos dos óleos de microalgas <i>Scenedesmus obliquus</i> e <i>Scenedesmus bajacalifornicus</i> cultivadas em meios de cultura com e sem adição de micronutrientes.	26
Tabela 5: Taxa específica de crescimento (μ) dos cultivos em diferentes concentrações de NaCl para as microalgas <i>Scenedesmus obliquus</i> e <i>Scenedesmus bajacalifornicus</i>	29
Tabela 6: Coeficientes das equações de regressão polinomial para produtividade de biomassa em função das concentrações de nitrogênio (N) e fósforo (P) para as linhagens <i>S. obliquus</i> e <i>S. bajacalifornicus</i>	58
Tabela 7: Concentrações de nitrogênio para máxima produtividade de biomassa das linhagens <i>S. obliquus</i> e <i>S. bajacalifornicus</i> em função do modo de cultivo.	59
Tabela 8: Coeficientes das equações de regressão polinomial para produtividade de lipídios neutros em função das concentrações de nitrogênio e fósforo para as linhagens <i>S. obliquus</i> e <i>S. bajacalifornicus</i>	62
Tabela 9: Teores de clorofila total (clorofila a + b) e relação entre clorofila a/b	65
Tabela 10: Produtividade de lipídios e biomassa nos modos batelada e semi-contínuo, para a linhagem <i>S. obliquus</i> em cultivo outdoor, e em cultivo indoor.	72
Tabela 11: Composição percentual de ácidos graxos de <i>S. obliquus</i> em cultivo outdoor em tanque <i>raceway</i> , para nos modos de cultivo batelada e semi-contínuo, em comparação com cultivo indoor em batelada. ...	74
Tabela 12: Equações de regressão linear para obtenção da concentração de lipídios neutros totais. y é a unidade relativa de fluorescência e x a concentração de lipídios neutros totais (mg L^{-1}).	87

RESUMO

ROCHA, Dilson Novais, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2018. **Associação de fatores de estresse e modos de cultivo para aumento da produtividade de lipídeos em *Scenedesmus* spp.** Orientador: Marcio Arêdes Martins. Coorientador: Leonardo Brantes Bacellar Mendes.

As microalgas destacam-se como matéria-prima promissora para a produção de biocombustíveis, porém a viabilidade da produção de biodiesel depende da redução do custo de produção de biomassa. Para ser economicamente viável, a produtividade de biomassa, o teor lipídios nas células e a escala de produção devem ser aumentadas. Este trabalho teve como objetivo avaliar estratégias para aumento da produtividade de lipídios das linhagens de microalgas *Scenedesmus obliquus* BR003 e *Scenedesmus bajacalifornicus* BR024. Em escala laboratorial foram avaliados: efeito dos micronutrientes (manganês, zinco, cobalto e molibdênio); interação de diferentes concentrações de NaCl com os modos de cultivo (batelada, dois estágios e semi-contínuo); e a interação de diferentes níveis de nitrogênio e fósforo com os modos de cultivo. Em escala outdoor, visando validar o estudo em aplicações comerciais, o desempenho da linhagem *S. obliquus* BR003 foi avaliado em cultivos em tanques abertos tipo *raceway* com 4000 L de capacidade. A adição de micronutrientes foi responsável pelo aumento de 84 % e 51 % no teor de FAMES para as linhagens *S. obliquus* BR003 e *S. bajacalifornicus* BR024, respectivamente. As maiores produtividades de lipídios obtidas em tratamentos com adição de NaCl foram: (1) 11,58 mg L⁻¹ d⁻¹ para o modo semi-contínuo, linhagem *S. bajacalifornicus* BR024 no tratamento com 5 g L⁻¹ e (2) 10,74 mg L⁻¹ d⁻¹ para o modo batelada, *S. obliquus* BR003 e tratamento com 10 g L⁻¹. Não houve efeito significativo do fósforo para a produtividade de lipídios, e o nitrogênio só foi significativo no modo semi-contínuo. O cultivo outdoor de *S. obliquus* corroborou os resultados em escala laboratorial, nos quais os modos batelada e semi-contínuo apresentaram produtividades de lipídios neutros de 2,87 e 3,35 mg L⁻¹ d⁻¹ (p > 0,05). No entanto, em comparação ao modo batelada, a biomassa extraída com maior frequência no modo semi-contínuo apresentou menores teores de lipídios neutros, resultando em custos mais elevados para operações de coleta, concentração de biomassa, rompimento celular e extração do óleo para produção de biodiesel. O cultivo em tanque aberto, mesmo sob condições de baixa temperatura como observada nos experimentos, mostrou-se uma ótima estratégia para aumento de escala e redução do custo de produção da biomassa.

Além disso *S. obliquus* destacou-se como uma linhagem promissora para produção de lipídios em tanques abertos, com composição de ácidos graxos desejadas para produção de biodiesel.

ABSTRACT

ROCHA, Dilson Novais, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2018. **Association of stress factors and culture modes for increased lipid productivity in *Scenedesmus* spp.** Advisor: Marcio Arêdes Martins. Co-advisor: Leonardo Brantes Bacellar Mendes.

Microalgae stand out as a promising raw material for the production of biofuels, but the viability of biodiesel production depends on the reduction of the cost of biomass production. To be economically viable, the biomass productivity, the lipid content in the cells and the scale of production should be increased. This work aimed to evaluate strategies to increase lipid productivity of the microalgae strains *Scenedesmus obliquus* BR003 and *Scenedesmus bajacalifornicus* BR024. In laboratory scale were evaluated: effect of micronutrients (manganese, zinc, cobalt, and molybdenum); interaction of different concentrations of NaCl with the culture modes (single batch, two stages batch and semi-continuous); and the interaction of different levels of nitrogen and phosphorus with the cultivation modes. In an outdoor scale, aiming to validate the study in commercial applications, the performance of *S. obliquus* BR003 lineage was evaluated in cultures in open raceway type tanks with 4000 L of capacity. The addition of micronutrients was responsible for the increase of 84 % and 51 % in FAME content for *S. obliquus* BR003 and *S. bajacalifornicus* BR024 strains, respectively. The highest lipid yields obtained in treatments with NaCl addition were: (1) 11.58 mg L⁻¹ d⁻¹ for the semi-continuous mode, *S. bajacalifornicus* BR024 line in the treatment with 5 g L⁻¹ and (2) 10.74 mg L⁻¹ d⁻¹ for batch mode, *S. obliquus* BR003 and 10 g L⁻¹ treatment. There was no significant effect of phosphorus on lipid yield, and nitrogen was only significant in the semi-continuous mode. The outdoor cultivation of *S. obliquus* BR003 corroborated the laboratory-scale results, in which the single batch and semi-continuous methods presented neutral lipid yields of 2.87 and 3.35 mg L⁻¹ d⁻¹ ($p > 0.05$). However, in comparison to the single batch mode, the biomass extracted more frequently in the semi-continuous mode presented lower levels of neutral lipids, resulting in higher costs for collection operations, biomass concentration, cell disruption and oil extraction for biodiesel production. Open tank cultivation, even under low-temperature conditions as observed in the experiments, was an excellent strategy to increase scale and reduce the cost of biomass production. In addition, *S. obliquus* has been shown to be a promising

line for lipid production in open tanks, with the desired fatty acid composition for biodiesel production.

1. INTRODUÇÃO GERAL

Estima-se que em 2050, a população mundial atingirá 9,7 bilhões de pessoas, um aumento de 33% em relação à população em 2015 (7,3 bilhões) (ONU, 2015). Para atender a essa demanda, será necessário aumentar a produção de alimentos em 60% (SILVA, 2015). Segundo Ringler e Zhu (2015) no âmbito do "business-as-usual", o atendimento à demanda por alimentos só será possível com a elevação dos preços, reduzindo o acesso dos alimentos aos mais pobres.

A agricultura irrigada é responsável por 40% da produção mundial de alimentos e utiliza 70% da água doce consumida no mundo (FAO, 2015). O Relatório do ano de 2016 do Programa Mundial de Avaliação da Água – WWAP destacou o problema da escassez de água nas próximas décadas, ao considerar que, em 2030 haverá um déficit de 40% entre a procura e a disponibilidade de água doce no mundo e, em 2050, um quinto da população mundial terá acesso a fontes de água impróprias ao consumo humano decorrentes do aumento da demanda bioquímica por oxigênio (DBO) e do excesso de nitrogênio e fósforo na água. Diante do exposto, melhorar a eficiência do uso da água e da gestão com o propósito de recuperar, tratar e reutilizar as águas residuárias, é fundamental para solucionar a escassez de água, reduzindo a sua contaminação, além de apoiar a produção de alimentos e energia (FAO, 2015 e WWAP, 2016).

As mudanças climáticas e o aumento no preço dos combustíveis fósseis têm provocado um crescimento do interesse por novas fontes renováveis de energia. Nesse contexto, os biocombustíveis, como o etanol e o biodiesel, se destacam como potenciais substitutos ao petróleo e seus derivados (PANCHAS; CHOKSHI; MISHRA, 2015a). Atualmente 4 % da energia global no setor de transporte é suprida pelo uso dos biocombustíveis (RULLI et al., 2016). Porém, a produção de biocombustíveis de fontes vegetais, gera competição por terra e água, além da elevação dos preços dos alimentos, sem reduzir a emissão de gases de efeito estufa devido às alterações no uso da terra (SEARLE; MALINS, 2014). Como exemplo, tem-se que a produção mundial de biodiesel é proveniente, principalmente, de quatro culturas oleaginosas: canola, girassol, soja e palma (NICOLÒ et al., 2016), limitando a sua expansão devido à exigência de grandes áreas de cultivos, além da concorrência com o setor de alimentos (SONG et al., 2013). Rulli et al. (2016) verificaram que as atuais áreas agrícolas globais são capazes de alimentar apenas 4,8 bilhões de pessoas e de produzir biocombustíveis para atender a 10 % da demanda do setor de transporte. Com o aumento da produção de biocombustíveis para atender a 20 % e 30 % do setor de transporte, as atuais

áreas agrícolas só seriam capazes de produzirem alimentos para 4,4 e 2,5 bilhões de pessoas respectivamente.

As microalgas têm se apresentado como uma fonte promissora para a produção de biocombustíveis (biodiesel, etanol e metano) (KUO et al., 2015). Posto que apresentam: elevada capacidade de produção de óleo por unidade de área; rápida produção de biomassa quando comparada a outras culturas; e natureza não competitiva com o mercado de alimentos (KLIGERMAN; BOUWER, 2015). Além disso, podem ser cultivadas em diversos ambientes, desde que em condições adequadas de calor e radiação, utilizando águas salobras ou residuárias, impróprias para o cultivo de plantas terrestres, são eficientes na remoção de nutrientes inorgânicos, e tem grande potencial para remediar as emissões de CO₂ de processos antrópicos (XIN et al., 2010). Porém, o alto custo para produção da biomassa de microalgas é o principal entrave na produção de biodiesel (KUO et al., 2015). Em estudo baseado na produção de microalgas em larga escala (100 hectares), Beal et al. (2015) demonstraram que a atividade só é competitiva com uma produtividade de biomassa mínima 25 g m⁻² d⁻¹ e preço máximo de venda do óleo para produção de biocombustíveis de aproximadamente U\$ 2,00.

Segundo Mendes (2017), recentes pesquisas desenvolvidas por universidades brasileiras (UFV, UFRJ, UFRN e Unicamp) em parceria com a Petrobras resultaram em consistentes avanços científicos, dentre eles, a alta produtividade de biomassa de 30 g m⁻² d⁻¹ em cultivos em tanques abertos obtidos na planta piloto no município de Extremoz-RN, com as espécies de *monoraphidium sp.* e *chlamydomonas sp.* Mas estratégias para o aumento no acúmulo de lipídios nas células devem ser estudadas, uma vez que a produtividade de lipídios - que é o produto da produtividade de biomassa e conteúdo lipídico - é uma das características mais importantes e facilmente quantificáveis relacionadas à produção de biodiesel (SONG et al., 2013).

Uma das estratégias mais utilizadas para aumento no acúmulo de lipídios é o estresse nutricional, no qual as microalgas podem elevar a quantidade de lipídios devido a mudanças nas vias metabólicas, induzindo a síntese de lipídios neutros (JI et al., 2018). A limitação no fornecimento de nitrogênio é a estratégia mais utilizada, pois afeta a síntese de proteínas e reduz a taxa de fotossíntese, alterando o metabolismo para síntese de ácidos graxos (ADAMS et al., 2013; SINGH et al., 2015 e MACHADO et al., 2016). O fósforo é um macronutriente importante nos processos metabólicos e sua carência é responsável por aumentar o teor de lipídios neutros, porém isso pode acarretar a redução da produtividade de biomassa (XIN et al., 2010). Alteração na salinidade é outra estratégia que está sendo

bastante estudada para induzir o acúmulo de lipídeos neutros nas células de microalgas (KAEWKANNETRA et al., 2012; SALAMA et al., 2013; PANCHA et al., 2015b e GAN et al., 2016). Porém, o aumento no teor de lipídios em cultivos sob condições de estresse pode diminuir a taxa de crescimento, reduzindo a produtividade de lipídios e resultando no aumento do custo de produção do biodiesel (CHOKSHI et al. 2017). Adicionalmente, o estresse decorrente da limitação de micronutrientes, que normalmente são requeridos em quantidades muito baixas (GHAFARI; RASHIDI; HAZNEDAROGLU, 2016), desempenha papel importante no crescimento e influencia a qualidade e a quantidade dos lipídios das células de microalgas (DOU et al., 2013).

A maioria das informações reportadas na literatura sobre a produção de lipídios em microalgas foi obtida para cultivos em batelada e baseia-se no conteúdo de lipídios na fase estacionária, que é caracterizada pela limitação de nutrientes e de disponibilidade de luz, com taxa de crescimento reduzida (RÍO et al., 2017). Assim, ao se produzir lipídios de microalgas, outro aspecto importante a avaliar é o modo de cultivo (batelada, dois estágios e semi-contínuo), o qual pode afetar fortemente a produtividade de biomassa e de lipídios (BENVENUTI et al., 2016). No cultivo em batelada, a biomassa é colhida na fase estacionária, quando há a redução no crescimento celular devido ao esgotamento de nutrientes e auto sombreamento devido a maior concentração de células (SLOCOMBE; BENEMANN, 2016). No cultivo denominado dois estágios, adaptação do modo batelada, as microalgas são cultivadas primeiramente para aumento da densidade celular e, logo após atingirem a fase estacionária, há a indução do acúmulo de lipídios com fornecimento de meio de cultura sem nitrogênio ou adição de NaCl (XIA et al., 2013). Já no modo de cultivo semi-contínuo, as células nunca atingem a fase estacionária de crescimento e uma quantidade do material é colhido periodicamente ao atingir a concentração de biomassa pré-estabelecida, sendo o volume colhido repostado com meio de cultura (RICHMOND; HU, 2013). O cultivo contínuo, utiliza-se um turbidímetro para leitura em tempo real da concentração de biomassa, que é mantida constante por meio de sistema automatizado, que colhe o material e repõe o meio (SLOCOMBE; BENEMANN, 2016).

Benvenuti et al. (2016) defendem que estudos com microalgas para a produção de biodiesel, sejam realizados em escala piloto ao ar livre, para identificar gargalos técnicos e de processo antes do aumento de escala para exploração comercial. Cultivos em ambiente externo (outdoor) em tanques abertos têm se destacado como os únicos sistemas para produção de biocombustíveis a partir de microalgas com possibilidade de aumento de escala e baixo custo de operação e instalação (BENEMANN, 2013). Porém, em cultivos abertos, a

produtividade de biomassa é menor que cultivos em escala laboratorial ou fotobiorreatores, devido a contaminações e variações na temperatura e radiação (MATHIMANI et al., 2017). Outro aspecto a ser avaliado em cultivos em larga escala é o fornecimento de CO₂, no qual, fornecido na forma de gás com pureza industrial (99,5 % de CO₂), é responsável pelo aumento de 8 a 27% no custo de produção da biomassa (GODOS et al., 2014). O uso de gás de combustão é uma alternativa para fornecimento de carbono aos cultivos de microalgas, contribuindo para redução dos custos de produção e diminuição das emissões de gases do efeito estufa para atmosfera (TAŞTAN et al., 2016).

Em síntese, a compilação de estudos apresentada nesta seção demonstra que a produção de biocombustíveis a partir de microalgas tem-se destacado como uma solução que atende à necessidade energética, sem intensificar os problemas de escassez de água e alimentos no mundo. Neste sentido, este trabalho teve por objetivo contribuir com informações sobre os fatores que de fato implicam em aumento da produtividade de lipídeos e que permitam a redução do custo de produção visando o uso como matéria-prima para biodiesel. Os resultados dessa pesquisa são discutidos nesta dissertação, estruturada em dois capítulos redigidos na forma de artigos científicos:

ARTIGO I – Alterações na produtividade de lipídios em microalgas do gênero *Scenedesmus* com adição de micronutrientes e estresse salino em diferentes modos de cultivos

ARTIGO II – Associação de estresse nutricional e modos de cultivo como estratégia para aumento da produtividade de lipídios em cultivos outdoor em microalgas do gênero *Scenedesmus*

1.1. REFERÊNCIAS

- ADAMS, Curtis et al. Understanding precision nitrogen stress to optimize the growth and lipid content tradeoff in oleaginous green microalgae. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 131, p.188-194, mar. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.12.143>.
- BEAL, Colin M. et al. Algal biofuel production for fuels and feed in a 100-ha facility: A comprehensive techno-economic analysis and life cycle assessment. **Algal Research**, [s.l.], v. 10, p.266-279, jul. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2015.04.017>.
- BENEMANN, John. Microalgae for biofuels and animal feeds. **Energies**, [s.l.], v. 6, n. 11, p.5869-5886, 11 nov. 2013. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/en6115869>.
- BENVENUTI, Giulia et al. Batch and semi-continuous microalgal TAG production in lab-scale and outdoor photobioreactors. **Journal of Applied Phycology**, [s.l.], v. 28, n. 6, p.3167-3177, 7 jul. 2016. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s10811-016-0897-1>.
- CHOKSHI, Kaumeel et al. Salinity induced oxidative stress alters the physiological responses and improves the biofuel potential of green microalgae *Acutodesmus dimorphus*. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 244, p.1376-1383, nov. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.003>.
- DOU, Xiao et al. The effects of trace elements on the lipid productivity and fatty acid composition of *Nannochloropsis oculata*. **Journal of Renewable Energy**, [s.l.], v. 2013, p.1-6, 2013. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/671545>.
- FAO - Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (2015). **Statistical Pocketbook**. Rome, p.216, 2015. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/a-i4691e.pdf>>. Acesso em: 07 de agosto, 2017.
- GAN, Xinyu et al. Simultaneous biological desalination and lipid production by *Scenedesmus obliquus* cultured with brackish water. **Desalination**, [s.l.], v. 400, p.1-6, dez. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.desal.2016.09.012>.

- GHAFFARI, Mohsen; RASHIDI, Behzad; HAZNEDAROGLU, Berat Zeki. Effects of macro and micronutrients on neutral lipid accumulation in oleaginous microalgae. **Biofuels**, [s.l.], v. 9, n. 2, p.147-156, set. 2016. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/17597269.2016.1221644>.
- GODOS, I. de et al. Evaluation of carbon dioxide mass transfer in raceway reactors for microalgae culture using flue gases. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 153, p.307-314, fev. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.11.087>.
- Jl, Xiang et al. The effect of NaCl stress on photosynthetic efficiency and lipid production in freshwater microalga *Scenedesmus obliquus* XJ002. **Science of the Total Environment**, [s.l.], v. 633, p.593-599, ago. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.240>.
- KAEWKANNETRA, Pakawadee et al. The effect of CO₂ and salinity on the cultivation of *Scenedesmus obliquus* for biodiesel production. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, [s.l.], v. 17, n. 3, p.591-597, jun. 2012. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s12257-011-0533-5>.
- KLIGERMAN, Debora Cynamon; BOUWER, Edward J.. Prospects for biodiesel production from algae-based wastewater treatment in Brazil: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [s.l.], v. 52, p.1834-1846, dez. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2015.08.030>.
- KUO, Chiu-mei et al. Cultivation of *Chlorella* sp. GD using piggery wastewater for biomass and lipid production. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 194, p.326-333, out. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.07.026>.
- MACHADO, Mariana et al. Comprehensive metabolic reprogramming in freshwater *Nitzschia palea* strains undergoing nitrogen starvation is likely associated with its ecological origin. **Algal Research**, [s.l.], v. 18, p.116-126, set. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2016.06.003>.
- MATHIMANI, Thangavel et al. Semicontinuous outdoor cultivation and efficient harvesting of marine *Chlorella vulgaris* BDUG 91771 with minimum solid co-precipitation and high floc recovery for biodiesel. **Energy Conversion and Management**, [s.l.], v. 149, p.13-25, out. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.enconman.2017.06.077>.

- MENDES, Leonardo Brantes Bacellar. Recent advances of microalgal biotechnology in Brazil. **Journal of Aquaculture & Marine Biology**, [s.l.], v. 5, n. 5, p.1-3, 7 jun. 2017. MedCrave Group, LLC. <http://dx.doi.org/10.15406/jamb.2017.05.00135>.
- NICOLÒ, M. S. et al. Biodiesel from microalgae. **Consequences of Microbial Interactions with Hydrocarbons, Oils, and Lipids: Production of Fuels and Chemicals**. Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology, p.1-20, 2016. Springer Nature. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-31421-1_210-1.
- ONU - Organização das Nações Unidas, Department of Economic and Social Affairs, Population Division (2015). **World Population Prospects: The 2015 Revision, Key Findings and Advance Tables**. Working Paper No. ESA/P/WP.241.
- PANCHA, Imran et al. Salinity induced oxidative stress enhanced biofuel production potential of microalgae *Scenedesmus* sp. CCNM 1077. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 189, p.341-348, ago. 2015(b). Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.04.017>.
- PANCHA, Imran; CHOKSHI, Kaumeel; MISHRA, Sandhya. Enhanced biofuel production potential with nutritional stress amelioration through optimization of carbon source and light intensity in *Scenedesmus* sp. CCNM 1077. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 179, p.565-572, mar. 2015(a). Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.12.079>.
- RICHMOND, Amos; HU, Qiang. **Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology**. Second Edition. New Delhi, India: Wiley-Blackwell, 2013. 719 p.
- RINGLER, Claudia; ZHU, Tingju. Water resources and food security. **Agronomy Journal**, [s.l.], v. 107, n. 4, p.1533-1538, 2015. American Society of Agronomy. <http://dx.doi.org/10.2134/agronj14.0256>.
- RÍO, Esperanza del et al. Microalgae for oil. Assessment of fatty acid productivity in continuous culture by two high-yield strains, *Chlorococcum oleofaciens* and *Pseudokirchneriella subcapitata*. **Algal Research**, [s.l.], v. 23, p.37-42, abr. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2017.01.003>.

- RULLI, Maria Cristina et al. The water-land-food nexus of first-generation biofuels. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 6, p.1-10, 3 mar. 2016. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/srep22521>.
- SALAMA, El-sayed et al. Biomass, lipid content, and fatty acid composition of freshwater *Chlamydomonas mexicana* and *Scenedesmus obliquus* grown under salt stress. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, [s.l.], v. 36, n. 6, p.827-833, 15 fev. 2013. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00449-013-0919-1>.
- SEARLE, Stephanie; MALINS, Chris. A reassessment of global bioenergy potential in 2050. **Gcb Bioenergy**, [s.l.], v. 7, n. 2, p.328-336, 8 fev. 2014. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/gcbb.12141>.
- SILVA, J. G. **Addressing Food Security Challenges under Increasing Demand for Land, Soil and Energy**. In: Global Forum for Food and Agriculture, 2015, Berlin. Federal Ministry of Food, Agriculture and Consumer Protection (BMEL). Berlin: BML, 2015. Disponível em: <<http://www.fao.org/about/who-we-are/director-gen/faodgstatements/detail/en/c/275129/>>. Acesso em: 15/12/2016.
- SINGH, Poonam et al. Investigation of combined effect of nitrogen, phosphorus and iron on lipid productivity of microalgae *Ankistrodesmus falcatus* KJ671624 using response surface methodology. **Biochemical Engineering Journal**, [s.l.], v. 94, p.22-29, fev. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2014.10.019>.
- SLOCOMBE, Stephen P.; BENEMANN, John R.. **Microalgal Production for Biomass and High-Value Products**. Boca Raton, Fl: Crc Press, 2016. 335 p.
- SONG, Mingming et al. Evaluation of the potential of 10 microalgal strains for biodiesel production. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 141, p.245-251, ago. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.02.024>.
- TAŞTAN, Burcu Ertit et al. Enhancement of microalgal biomass production and dissolved inorganic C fixation from actual coal flue gas by exogenous salicylic acid and 1-triacontanol growth promoters. **Energy**, [s.l.], v. 103, p.598-604, maio 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.energy.2016.03.020>.

WWAP - United Nations World Water Assessment Programme. 2016. **The United Nations World Water Development Report 2016: Water and Jobs**. Paris, UNESCO.

XIA, Ling et al. Photoautotrophic outdoor two-stage cultivation for oleaginous microalgae *Scenedesmus obtusus* XJ-15. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 144, p.261-267, set. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.06.112>.

XIN, Li 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**, [s.l.], v. 101, n. 14, p.5494-5500, jul. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.02.016>.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Desenvolver estratégias operacionais para o cultivo de microalgas do gênero *Scenedesmus* em tanques abertos para aumentar a produtividade de lipídeos visando a produção de biodiesel.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a produtividade de lipídios das linhagens *Scenedesmus obliquus* BR003 e *Scenedesmus bajacalifornicus* BR024 em cultivos fotoautotróficos;
- Avaliar o efeito dos micronutrientes no acúmulo e perfil de ácidos graxos;
- Otimizar os teores de nitrogênio e fósforo do meio de cultura formulado a base de fertilizantes inorgânicos, utilizando ureia como fonte de nitrogênio e o monoamônio fosfato como fonte de fósforo;
- Avaliar o efeito de diferentes concentrações de NaCl na produtividade de lipídeos;
- Avaliar e selecionar dentre os modos de cultivo: batelada, dois estágios e semi-contínuo o que apresentar maior produtividade de lipídeos;
- Validar as estratégias operacionais de cultivo definidas em escala laboratorial em cultivo outdoor em tanque aberto tipo *raceway*;
- Desenvolver sistemas de armazenamento e injeção de CO₂ provenientes de fontes residuais, como gases de incineração.

3. ARTIGO I – Alterações na produtividade de lipídios em microalgas do gênero *Scenedesmus* com adição de micronutrientes e estresse salino em diferentes modos de cultivos

RESUMO

As microalgas destacam-se como matéria-prima promissora para produção de biocombustíveis, sobretudo biodiesel, bioetanol e metano. Entretanto, a produção em larga escala enfrenta alguns entraves, em parte, devido as baixas produtividades de lipídios obtida nos cultivos. No presente estudo foram avaliados o efeito dos micronutrientes (manganês, zinco, cobalto e molibdênio) e a interação de diferentes concentrações de NaCl (0, 5, 10, 15 e 20 g L⁻¹) com o modo de cultivo (batelada, dois estágios e semi-contínuo) para a produtividade de lipídios em duas linhagens de microalgas do gênero *Scenedesmus*. A adição dos micronutrientes manganês, zinco, cobalto e molibdênio foi responsável pelo aumento de 84 % e 51 % no teor de FAMES para as linhagens *Scenedesmus obliquus* BR003 e *Scenedesmus bajacalifornicus* BR024 respectivamente. As maiores produtividades de lipídios obtidas em tratamentos com adição de NaCl foram: (1) 11,58 mg L⁻¹ d⁻¹ para o modo semi-contínuo, linhagem *S. bajacalifornicus* no tratamento com 5 g L⁻¹ e (2) 10,74 mg L⁻¹ d⁻¹ para o modo batelada, linhagem *S. obliquus* e tratamento com 10 g L⁻¹. Porém, em comparação ao modo batelada, a biomassa coletada no modo semi-contínuo apresentou menores teores de lipídios neutros, resultando em custos mais elevados para operações de coleta, concentração da biomassa, rompimento celular e extração do óleo para produção de biodiesel. Além de fornecer informações sobre as respostas fisiológicas e bioquímicas ao estresse salino e interação com os modos de cultivo, os resultados deste trabalho mostram que a produtividade de lipídios neutros nas espécies *S. obliquus* e *S. bajacalifornicus* podem ser aumentadas para produção de biodiesel.

Palavras-chave: *Scenedesmus obliquus*; *Scenedesmus bajacalifornicus*; produtividade de lipídios; biodiesel; vermelho do Nilo;

3.1. INTRODUÇÃO

As microalgas têm se apresentado como uma fonte promissora para a produção de biocombustíveis, como biodiesel, bioetanol e metano (KUO et al., 2015). Dentre as principais vantagens desses microrganismos, destacam-se a elevada capacidade de produção de óleo por unidade de área, rápida produção de biomassa, e natureza não competitiva com o mercado de alimentos (KLIGERMAN; BOUWER, 2015).

Atualmente cerca de 15 espécies são cultivadas para fins comerciais (SLOCOMBE; BENEMANN, 2016), dentre elas, o gênero *Scenedesmus* destaca-se como uma espécie promissora para produção de biodiesel, devido as altas taxas de crescimento e elevado teor de lipídios nas células (PANCHHA et al., 2014). Além disso, é resistente a contaminações microbianas e invasão de outras espécies, e apresenta altas taxas de crescimento em cultivos em tanques abertos (BENEMANN, 2013; FENG et al., 2014). Rocha et al. (2017) verificaram em estudo realizado com microalgas de água doce, que as linhagens *Scenedesmus obliquus* BR003 e *Scenedesmus bajacalifornicus* BR024 tem um grande potencial para produção de biomassa e biodiesel.

A principal limitação na produção de biodiesel a partir de microalgas é o seu alto custo (KUO et al., 2015). Para que os produtos de baixo valor como biocombustíveis sejam economicamente viáveis, a produtividade de biomassa e de lipídios devem ser aumentadas (PANCHHA; CHOKSHI; MISHRA, 2015a). Adicionalmente, deve-se desenvolver tecnologias de cultivo com custos fixos competitivos, como tanques abertos, com estratégias de operação que impliquem em aumento na produtividade de lipídios e menor ociosidade de equipamentos (BENVENUTI et al., 2016). Tais medidas colaboram para a redução do custo de investimento e conseqüentemente contribuem para a viabilidade da produção de biocombustíveis de microalgas (TAN et al., 2018).

A nutrição das microalgas desempenha um papel importantíssimo para o crescimento e acúmulo de lipídios nas células. Soares et al. (2017) verificaram que os custos de produção podem ser reduzidos com o uso de fertilizantes agrícolas, para fornecimento dos macronutrientes. Notavelmente, os macronutrientes, principalmente o nitrogênio, fósforo e enxofre, são essenciais para síntese de aminoácidos, fosfolipídios e enzimas de fotossíntese (GHAFARI; RASHIDI; HAZNEDAROGLU, 2016). Além dos macronutrientes, as microalgas requerem micronutrientes, em quantidades muito pequenas, indispensáveis em vários processos metabólicos (PROCHÁZKOVÁ et al., 2013), além disso, o excesso ou ausência de micronutrientes no meio pode influenciar na qualidade e a quantidade de lipídios

nas células de microalgas (DOU et al., 2013). Porém, há poucos estudos sobre o efeito dos micronutrientes para a produtividade de lipídios.

O cultivo de microalgas de água doce em águas salobras e salinas, tem sido reportado como estratégia para induzir o acúmulo de lipídeos neutros (KAEWKANNETRA et al., 2012; SALAMA et al., 2013; PANCHHA et al., 2015b e GAN et al., 2016). Porém, o aumento no teor de lipídios em cultivos sob condições de estresse contínuo pode diminuir a taxa de crescimento, reduzindo a produtividade de lipídios e resultando no aumento do custo de produção do biodiesel (CHOKSHI et al. 2017). Dessa forma é necessário um conhecimento aprofundado dos efeitos do estresse salino e a interação com os modos de cultivo. Porém a maioria das informações reportadas na literatura sobre a produção de lipídios em microalgas foram obtidas para cultivos em modo batelada e baseia-se no conteúdo de lipídios na fase estacionária, que é caracterizada pela limitação de nutrientes e disponibilidade de luz, com taxa de crescimento reduzida (RÍO et al., 2017).

Ao se produzir lipídios de microalgas, um aspecto importante a avaliar é o modo de cultivo (batelada, dois estágios e semi-contínuo e contínuo), pois pode afetar fortemente a produtividade de biomassa e de lipídios (BENVENUTI et al., 2016). No cultivo em batelada no qual a biomassa é coletada na fase estacionária, onde se observa maior concentração de células (SLOCOMBE; BENEMANN, 2016). No cultivo denominado dois estágios, adaptação do modo batelada, no qual as microalgas são cultivadas primeiramente para aumento da densidade celular e logo após atingirem a fase estacionária, há a indução do acúmulo de lipídios com fornecimento de meio de cultura sem nitrogênio ou adição de NaCl (XIA et al., 2013). Já no modo de cultivo semi-contínuo, no qual as células nunca chegam à fase estacionária de crescimento e uma quantidade do material é coletado periodicamente ao atingir a concentração de biomassa pré-estabelecida, sendo o volume coletado repostado com meio de cultura (RICHMOND; HU, 2013). O cultivo contínuo é mais complexo e não foi objeto de estudo deste trabalho, pois utiliza-se um turbidímetro para leitura em tempo real da concentração de biomassa, que é mantida constante por meio de sistema automatizado, que colhe o material e repõe o meio (SLOCOMBE; BENEMANN, 2016).

Com o exposto, o presente trabalho avaliou a influência de fatores de estresse combinados sobre a produtividade de lipídios e composição de ácidos graxos. Além da concentração de micronutrientes e de sal, foi avaliado também o efeito dos modos de cultivo (batelada, dois estágios e semi-contínuo) na produtividade de lipídeos das espécies de microalgas *S. obliquus* BR003 e *S. bajacalifornicus* BR024.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1. Linhagens de microalgas

Duas linhagens de microalgas foram utilizadas, *Scenedesmus obliquus* BR003 e *Scenedesmus bajacalifornicus* BR024 pertencentes à Coleção de Microalgas do Laboratório de Biocombustíveis do Departamento de Engenharia Agrícola da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

O inóculo foi obtido após aclimatação das linhagens, nas mesmas condições ambientais dos experimentos (meio de cultura, luz, temperatura e agitação), coletado na fase exponencial de crescimento, após aproximadamente 60 horas de luz com fotoperíodo de 12:12 h (luz:escuro). Logo após a coleta, o cultivo foi centrifugado a 3.939 xg, por 5 minutos a 4 °C, o sobrenadante descartado e as células ressuspensas com o meio de cultura (MORSCHETT et al., 2017).

3.2.2. Condições de cultivo

A influência dos micronutrientes cobalto, molibdênio, manganês e zinco sobre o acúmulo de lipídios pelas células de microalgas foi avaliado em cultivos em frascos Erlenmeyer com volume útil de 150 mL, com dois tratamentos para cada linhagem: com adição de micronutrientes e sem adição de micronutrientes.

O efeito do estresse salino e da interação com os modos de cultivo (batelada, dois estágios e semi-contínuo) sobre a produtividade de lipídios foram avaliados em experimento com delineamento inteiramente casualizado, com 5 concentrações de NaCl (0 g L⁻¹, 5 g L⁻¹, 10 g L⁻¹, 15 g L⁻¹ e 20 g L⁻¹) em cultivos realizados em microplacas de 24 poços. Após a seleção da concentração de NaCl que levou ao maior valor de produtividade de lipídios, para cada modo de cultivo, foram realizados cultivos em frascos Erlenmeyer com volume útil de 150 mL para análise dos parâmetros de crescimento e dos compostos bioquímicos.

Meio de cultura

Em todos os experimentos foram utilizados o meio de cultura L4-m proposto por Covell (2015) e modificado pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Biocombustíveis. O meio de cultura foi formulado com fertilizantes inorgânicos utilizando 171,12 mg L⁻¹ de ureia (Heringer, Brasil), 44,36 mg L⁻¹ de monoamônio fosfato – MAP (Yara Brasil Fertilizantes, Brasil), 176,33 mg L⁻¹ de cloreto de potássio (Heringer, Brasil), 45,96 mg L⁻¹ de sulfato de magnésio heptahidratado (Multitécnica, Brasil) e 15,65 mg L⁻¹ de sulfato de ferro monohidratado (Pigminas, Brasil). Reagentes de grau analítico foram utilizados para

fornecimento dos micronutrientes conforme solução A5 proposto por Rippka (1979), com concentração final no meio de cultura de 2,86 mg L⁻¹ H₃BO₃, 1,81 mg L⁻¹ MnCl₂.4H₂O, 0,22 mg L⁻¹ ZnSO₄.7H₂O, 0,08 mg L⁻¹ CuSO₄.5H₂O, 0,02 mg L⁻¹ NaMoO₄.2H₂O e 0,05 mg L⁻¹ Co(NO₃)₂.6H₂O. Os meios de cultura foram esterilizados em autoclave a 1 atm e 121 °C por 20 minutos (ANDERSEN, 2005).

Cultivo em microplaca

Os cultivos foram realizados em microplacas de 24 poços (K12-024, KASVI, China) com volume útil do cultivo de 2 mL. A metodologia de triagem utilizada seguiu os procedimentos propostos por Han et al. (2012), Van Wageningen et al. (2014), Abdelaziz et al. (2014), Morschett et al. (2016) e Morschett et al. (2017) com algumas adaptações. As microplacas foram acondicionadas em sacos plásticos transparentes e herméticos, com atmosfera enriquecida com CO₂ na concentração de 10 % (v v⁻¹). Para evitar vazamentos e contaminação entre as unidades experimentais, a microplaca foi fechada com a tampa. Os cultivos foram mantidos em condições fotoautotróficas sob agitação em incubadora com fotoperíodo e agitação orbital (430-RFPDE, Nova Ética, Brasil) à 120 rpm, com temperatura de 25 ± 2 °C, fotoperíodo de 12:12 h (luz:escuro), e irradiância média de 114 μmols m⁻² s⁻¹ proveniente de 6 lâmpadas fluorescentes brancas de 14 W. Para esterilizar as microplacas, estas foram expostas a luz UV por 15 minutos.

Cultivos em frascos

Os cultivos em frascos foram realizados em Erlenmeyer de 250 mL, com volume útil de 150 mL, mantidos em condições fotoautotróficas sob agitação em incubadora com fotoperíodo e agitação orbital (430-RFPDE, Nova Ética, Brasil) a 120 rpm, com temperatura de 25 ± 2 °C, fotoperíodo de 12:12 h (luz:escuro), e irradiância média de 114 μmols m⁻² s⁻¹ proveniente de 6 lâmpadas fluorescentes brancas de 14 W. O carbono foi fornecido diariamente na forma de bicarbonato de sódio na quantidade de 0,7 g L⁻¹ de cultivo, e o pH mantido entre 6,5 e 7,5, controlado pela adição de soluções de HCl 2 M. Os cultivos foram realizados com três repetições para cada tratamento.

3.2.3. Modos de cultivo

Foram avaliados os modos de cultivo em batelada, dois estágios, semi-contínuo com coleta em 1 dia e semi-contínuo com coleta em 2 dias, com monitoramento diário da concentração de biomassa realizada por densidade ótica a 750 nm, com leituras de absorvâncias realizadas em espectrofotômetro (multiskan GO, Thermo scientific, Alemanha).

Estudos preliminares de caracterização da curva de crescimento, definiu o tempo de cultivo em 8 dias para modo batelada, e 12 dias para o modo dois estágios em microplaca. Em cultivos em Erlenmeyer o tempo foi de 13 dias para o modo batelada e 17 dias para o modo dois estágios. Durante o cultivo em batelada não foi realizada nenhuma intervenção. O modo de cultivo dois estágios foi dividido em duas fases: primeiro houve o aumento na concentração de biomassa no intervalo de tempo igual ao tempo de cultivo do modo batelada; no segundo estágio, a biomassa foi separada por meio de centrifugação (5.000 g por 5 minutos), o sobrenadante descartado e o meio de cultura sem nitrogênio adicionado, e cultivado por um período adicional de 4 dias, para aumentar acúmulo de lipídios nas células.

No modo semi-contínuo o intervalo de tempo de cultivo foi de 8 dias para cultivos em microplaca e de 13 dias para cultivo em frascos Erlenmeyer. No modo com frequência de coleta em 2 dias, a biomassa foi coletada na quantidade de 30 a 50 % do volume do cultivo, já com frequência de coleta de 1 dia, a quantidade de biomassa coletada diariamente foi de 10 – 30 % do volume do cultivo. O volume de cultivo coletado foi repostado com meio de cultura fresco, para manter o mesmo volume. O volume coletado depende da concentração inicial desejada para o próximo ciclo, que deve ser igual a concentração inicial do ciclo anterior.

3.2.4. Caracterização do crescimento dos cultivos

O crescimento das microalgas foi monitorado com leitura diária da absorbância do cultivo no comprimento de onda 750 nm, utilizando espectrofotômetro (multiskan GO, Thermo scientific, Alemanha). A absorbância é usada frequentemente como medida rápida e não destrutiva para estimar a concentração de biomassa em cultivos de microalgas. Griffiths et al. (2011) observaram que o comprimento de onda 750 nm é o mais recomendado.

Nos cultivos em frascos Erlenmeyer uma alíquota foi retirada e a absorbância foi lida em microplacas de 96 poços, já para os cultivos em microplacas de 24 poços, a absorbância foi lida diretamente nas placas de cultivo. A biomassa seca livre de cinzas foi determinada conforme metodologia proposta por Griffiths et al. (2011). As equações abaixo representam a relação entre a absorbância no comprimento de onda 750 nm e a concentração de biomassa seca livre de cinzas (g L^{-1}). Para as leituras em microplacas de 24 poços, utilizaram as equações 1 e 2, enquanto que para as leituras realizadas em microplacas de 96 poços, utilizaram as equações 3 e 4 para as linhagens *S. obliquus* e *S. bajacalifornicus*, respectivamente:

$$y = 0,6464 x + 0,1600 \quad (R^2 = 0,9962) \quad (1)$$

$$y = 0,5857 x + 0,1609 \quad (R^2 = 0,9966) \quad (2)$$

$$y = 0,5794 x - 0,0059 \quad (R^2 = 0,9955) \quad (3)$$

$$y = 0,5566 x - 0,0213 \quad (R^2 = 0,9982) \quad (4)$$

em que:

y é o valor da absorbância (OD_{750nm});

x é o valor da biomassa seca livre de cinzas ($g L^{-1}$);

R^2 é o coeficiente de correlação.

A taxa específica de crescimento (μ) foi calculada conforme equação 5, descrita por Andersen (2005). No modo batelada o intervalo de tempo utilizado para calcular a taxa específica de crescimento foi de 8 dias, no modo dois estágios 12 dias, enquanto no modo semi-contínuo 2 dias o intervalo foi de 2 dias e 1 dia para o modo com frequência de coleta de 1 dia. Nos modos semi-contínuo os resultados apresentados referem-se às médias dos ciclos de cultivo:

$$\mu = \frac{\ln C_f - \ln C_i}{t_f - t_i} \quad (5)$$

em que:

μ é a taxa específica de crescimento (dia^{-1});

$\ln C_i$ é o logaritmo natural da concentração inicial de biomassa do cultivo ($g L^{-1}$);

$\ln C_f$ é o logaritmo natural da concentração final de biomassa do cultivo ($g L^{-1}$);

$t_f - t_i$ é o intervalo de tempo (dias).

A produtividade de biomassa dos cultivos foi calculada conforme a equação 6. No modo batelada o intervalo de tempo utilizado para calcular a produtividade de biomassa foi de 8 dias, no modo dois estágios 12 dias, enquanto no modo semi-contínuo 2 dias o intervalo foi de 2 dias e 1 dia para o modo com frequência de coleta de 1 dia. Nos modos semi-contínuo os resultados apresentados referem-se às médias dos ciclos de cultivo:

$$P_B = \frac{C_f - C_i}{t} \quad (6)$$

em que:

P_B é a produtividade de biomassa ($mg L^{-1} dia^{-1}$);

C_i é a concentração inicial de biomassa do cultivo ($mg L^{-1}$);

C_f é a concentração final de biomassa do cultivo ($mg L^{-1}$);

t é o intervalo de tempo (dias).

3.2.5. Quantificação de proteínas hidrossolúveis totais

As proteínas hidrossolúveis foram extraídas de acordo com Meijer e Wijffels (1998),

em que 2 mL de amostras foram coletadas de cada unidade experimental, em triplicata, e centrifugadas a 11.000 rpm por 10 minutos. Após a centrifugação, as amostras foram ressuspendidas em água deionizada, homegeinizadas 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 seco (Labnet, D1200, EUA) 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 foi coletado para quantificação das proteínas hidrossolúveis, utilizando o método de Lowry et al., (1951) adaptado por Lucarini e Kilikian (1999). Foi adicionado ao sobrenadante 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, Alemanha) a 750 nm. Em paralelo, uma curva-padrão foi preparada utilizando diferentes concentrações de albumina de soro bovino (BSA) (Albumina Bovina fração V em pó, Sigma-Aldrich, EUA).

3.2.6. Quantificação de carboidratos neutros totais

O teor de carboidratos neutros totais (g L⁻¹) foi medido utilizando o método fenol-ácido sulfúrico de Dubois et al. (1956) adaptado para microplacas por Masuko *et al.*, (2005). A absorvância da amostra foi medida em 490 nm (espectrofotômetro multiskan GO, Thermo scientific, Alemanha). Para a quantificação, uma curva-padrão foi preparada utilizando diferentes concentrações de glicose (D-(+)-Glicose Anidra, Sigma-Aldrich, EUA). Para evitar a degradação dos carboidratos, logo após a coleta das amostras foi realizado tratamento térmico, aquecendo as amostras até 80 °C por 30 minutos e posterior resfriamento.

3.2.7. Quantificação de lipídios neutros totais (TAG)

A quantificação de lipídios neutros pelo método gravimétrico demanda muito tempo e requerem grandes volumes de amostra e solventes. Diante disso, devido à grande quantidade

de unidades amostrais e pequeno volume de amostras nos cultivos em microplaca, utilizou-se do método da fluorescência com o corante vermelho do Nilo, segundo Singler et al. (2012) com adaptações para determinar os lipídios neutros intracelulares.

A concentração da amostra do cultivo foi ajustada entre 0,05 e 0,06 OD_{750nm}, ou seja, cerca de 100 mg L⁻¹. Uma alíquota de 2 mL dessa amostra diluída foi centrifugada a 11.000 xg por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e ao centrifugado foi adicionado 2 mL de etanol 30 % (v v⁻¹). Alíquotas de 200 µL do extrato foram pipetados em triplicata para microplaca de 96 poços com fundo preto (Ref 353376, Falcon, Alemanha) e foram adicionados 4 µL da solução de vermelho do Nilo (50 µg mL⁻¹ em etanol). A concentração final do corante na amostra foi de 1 µg mL⁻¹. A microplaca foi então incubada por 10 minutos a 40 °C com agitação de 400 rpm. A intensidade de fluorescência do corante foi medida em fluorímetro (Victor X5, Perkin Elmer, EUA), utilizando filtros de 485 nm para excitação e 595 nm para emissão. O fluorímetro utilizado pertence a Unidade de Crescimento de Plantas da UFV. Para quantificação dos lipídios neutros, utilizou-se a trioleína (Glyceryl trioleate, Sigma-Aldrich, EUA) como padrão. Inicialmente a trioleína foi diluída em solução de isopropanol e clorofórmio (19:1), obtendo solução estoque com concentração de 1 mg mL⁻¹ conforme proposto por Alonzo e Mayzaud (1999). A partir dessa solução, foi obtida uma curva padrão com concentração de 0 a 20 mg L⁻¹ de trioleína em etanol 30 % (v v⁻¹).

A metodologia analítica foi validada pela utilização de amostras de microalgas com teores de TAG conhecidos em todas as análises. O detalhamento dessa validação, assim como as equações de regressão linear utilizadas para converter a intensidade de fluorescência em concentração de lipídios neutros, encontram-se no Apêndice A.

A produtividade de lipídeos neutros foi calculada conforme a equação 7:

$$P_{LN} = P_{BM} \times T \quad (7)$$

em que:

P_{LN} é a produtividade de lipídeos neutros (mg L⁻¹ dia⁻¹);

P_{BM} é a produtividade de biomassa (mg L⁻¹ dia⁻¹);

T é o teor de lipídeos neutros na biomassa (decimal).

A unidade relativa de fluorescência (RFU) foi medida para ambas linhagens de microalgas cultivadas em salinidade e modos de cultivo diferentes, e normalizada pela absorvância da amostra no comprimento de onda 750 nm (OD₇₅₀). O quociente do RFU e OD₇₅₀ é um valor normalizado que permite expressar a intensidade de fluorescência em todos os tratamentos, permitindo comparações de forma independente da densidade celular.

3.2.8. Imagem das microalgas pela microscopia de fluorescência

Para obtenção das imagens de microscopia das células de microalgas coradas com o corante vermelho do Nilo, utilizou-se a metodologia proposta por Terashima et al. (2014), com adaptações, em que as amostras de microalgas foram centrifugadas (10.000 xg por 5 minutos), o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em solução tampão fosfato-salino contendo 0,011 % de Triton X-100. Logo após, foi adicionado o corante vermelho do Nilo para obter concentração final de 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a partir de uma solução estoque com concentração de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em etanol. Então, as amostras foram agitadas por 15 minutos no escuro em vórtex. Após esse tempo, 10 μL da suspensão de células foram colocados em lâmina de vidro para visualização ao microscópio de fluorescência (BX50, Olympus, Japão) do Laboratório de Associações Micorrízicas do Instituto de Biotecnologia Aplicada a Agropecuária (BIOAGRO) da Universidade Federal de Viçosa. Foi utilizado o filtro WB2 com comprimento de onda de excitação de 460 a 490 nm e emissão de 520 nm, e as imagens das células de microalgas foram capturadas pela câmera digital acoplada (Q-color 3, Olympus, Japão).

3.2.9. Extração dos lipídios totais

A extração e quantificação dos lipídios totais foi realizada pelo método J:Schmid-Bondzynski-Ratzlaff (INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION, 1986), modificado pelo grupo de pesquisa em microalgas do Laboratório de Biocombustíveis (DEA/UFV) em parceria com a Petrobras, e apresentado em detalhes no apêndice B.

3.2.10. Perfil de ácidos graxos

Para obtenção do perfil de ácidos graxos dos lipídios das linhagens em estudo, as amostras de óleo foram convertidas em ésteres metílicos (FAMES), seguindo a metodologia proposta por Ichihara e Fukubayashi (2010). Amostras de óleo de microalgas foram diluídas em solução de clorofórmio:metanol (2:1) e os lipídios transesterificados com a adição de solução de HCl a 8% (v/v) em metanol, seguido de incubação a 100 °C por 1 h. Os FAMES foram extraídos usando hexano, que foi coletado da fase superior após centrifugação e injetado em cromatógrafo a gás com Detector por Ionização de Chamas (GC-FID) (Shimadzu, GC-2010, Japão) equipado com coluna capilar de 100 m x 0,25 mm (SP-2560, Sigma-Aldrich, EUA). A análise foi feita por injeção direta de 1 μL da amostra. O gás hélio foi utilizado como gás de arraste e mantido em vazão constante e pressão de 363 kPa. Os FAMES foram separados utilizando uma rampa de aquecimento linear de 60 °C para 330 °C

a uma taxa de aquecimento de 20 °C min⁻¹, e alta velocidade linear para melhor resolução de picos. A identificação dos picos foi confirmada pela comparação com a mistura padrão de FAMES (SupleCo 37 FAME mix).

3.2.11. Análise da concentração de micro e macronutrientes

A concentração dos macro e micronutrientes (Na, K, Ca, P, S, Mg, Fe, Zn, Mn, B, Mo, Cu e Co) da água e dos fertilizantes inorgânicos utilizados na formulação dos meios de cultura foi determinada em Espectrômetro de Emissão Óptica em Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-OES) (Optima 8300 ICP-OES, PerkinElmer, Estados Unidos), do Laboratório de Espectroscopia de Absorção Atômica do Departamento de Solos da Universidade Federal de Viçosa. As amostras foram condicionadas com adição de solução de ácido nítrico a 4 % (v v⁻¹). A extração das amostras foi realizada conforme metodologia adaptada do MAPA (2014) para quantificação de elementos solúveis em água, em que se filtrou 1,0 g do fertilizante, previamente seco em estufa a 105 °C, em papel filtro qualitativo (Whatman nº1) com porosidade média de 11 µm, até obter 250 mL do extrato. O material retido no filtro foi quantificado para determinar o teor de partículas insolúveis em água.

O teor de nitrogênio total dos fertilizantes nitrogenados foi determinado pelo método de Kjeldahl no Laboratório de Fertilizantes do Departamento de Solos da Universidade Federal de Viçosa.

3.2.12. Determinação da umidade dos fertilizantes inorgânicos

A umidade dos fertilizantes inorgânicos a 65 °C foi determinada conforme metodologia do MAPA (2014).

3.2.13. Análise estatística

Os valores de concentrações e produtividade de biomassa dos cultivos, teores de lipídios intracelulares e produtividade de lipídios foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade. Para determinar o efeito da salinidade e dos modos de cultivo entre as linhagens sobre a produtividade de biomassa e de lipídios dos cultivos, utilizou-se o teste de agrupamento de Scott-Knott. O Scott-Knott é um método de comparação múltipla baseado em análise de agrupamento univariada que separa as médias estudadas em diferentes grupos homogêneos.

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1. Análise e formulação de meio de cultura a base de fertilizantes

A umidade dos fertilizantes inorgânicos a 65 °C (Tabela 1) foi maior no fertilizante sulfato de magnésio (20,43 %), já os menores valores de umidade foram obtidos com os fertilizantes ureia e cloreto de potássio, 0,89 % e 0,53 % respectivamente.

Os fertilizantes fosfatados apresentaram maiores teores de partículas insolúveis em água, 23,47 % e 9,15 % para superfosfato simples e fosfato monoamônico - MAP, respectivamente. Fertilizantes fosfatados são oriundos de rochas fosfáticas, que durante a acidulação liberam impurezas insolúveis, proveniente de outros minerais (MULLINS e SIKORA, 1994). Bartos et al. (1992) e Mullins e Sikora (1994) verificaram que compostos insolúveis não afetaram o desempenho dos fertilizantes fosfatados.

Tabela 1: Umidade a 65 °C e teor de partículas insolúveis em água dos fertilizantes inorgânicos utilizados na formulação de meios de cultura para cultivo de microalgas.

Fertilizante	Umidade a 65°C	Insolúveis
	% (m m ⁻¹)	
Ureia	0,89	0,00
Superfosfato Simples	7,80	23,47
Fosfato monoamônico (MAP)	5,06	9,15
Cloreto de Potássio	0,53	2,52
Sulfato de Ferro Monohidratado	6,88	7,37
Sulfato de Magnésio Heptahidratado	20,43	0,00

A umidade dos fertilizantes é um importante parâmetro para determinar o fator a ser multiplicado pela massa do material em base seca e assim obter a quantidade de fertilizante, armazenado em condições de temperatura e umidade ambiente, a ser utilizado nos cultivos (MAPA, 2014).

Devido a agitação do cultivo, as partículas insolúveis presentes nos fertilizantes, ficam em suspensão, e no processo de colheita e concentração, aglomerar à biomassa, resultando no aumento do teor de cinza. Desta forma, os fertilizantes inorgânicos a serem utilizados em cultivos de microalgas, principalmente os fertilizantes fosfatados e o sulfato de ferro, devem ser filtrados para retirada das partículas insolúveis.

A análise dos elementos dos fertilizantes e da água (Tabela 2), evidenciou que há traços de micronutrientes em todos os materiais, reduzindo a quantidade de micronutrientes a serem fornecidos aos cultivos de microalgas.

Tabela 2: Concentração dos nutrientes nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio, enxofre, cobre, ferro, zinco, manganês, boro, sódio, cobalto e molibdênio, nos fertilizantes inorgânicos e na água utilizada na formulação do meio de cultura.

Fertilizante	Marca	N	P	K	Ca	Mg	S	Cu	Fe	Zn	Mn	B	Na	Co	Mo
		% (m m ⁻¹)													
Ureia	Heringer	45,000	nd	0,064	nd	nd	1,127	nd	nd	0,010	nd	nd	nd	nd	nd
Super Fosfato Simples	Heringer	nd	8,145	0,324	17,950	0,105	9,927	0,004	0,012	0,005	0,035	nd	0,074	nd	nd
Fosfato monoamônico (MAP)	Yara	9,000	18,035	0,039	0,313	0,204	1,465	nd	0,006	nd	0,030	0,002	0,101	nd	nd
Cloreto de Potássio	Heringer	nd	nd	44,150	0,558	0,078	0,328	nd	nd	nd	nd	0,488	1,601	nd	nd
Sulfato de Ferro Monohidratado	Pigminas	nd	nd	nd	nd	nd	14,645	0,002	25,540	0,040	0,190	nd	nd	nd	nd
Sulfato de Magnésio Heptahidratado	Multiécnica	nd	nd	nd	nd	15,602	18,665	nd	nd	nd	0,033	nd	nd	nd	nd
Água		mg L ⁻¹													
Deionizada	-	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Rede pública de abastecimento	-	-	nd	3,978	7,243	1,724	3,295	nd	nd	nd	nd	nd	5,133	nd	nd

nd = valor não detectado

3.3.2. Efeito da adição de micronutrientes na produtividade de FAMES e no perfil de ácidos graxos

Para avaliar o efeito da adição dos micronutrientes na produtividade de FAMES (ésteres metílicos de ácidos graxos) e no perfil de ácidos graxos, dois meios de cultura foram formulados conforme composição na Tabela 3. O meio sem adição de micronutrientes utilizou-se água da rede pública de abastecimento, a fim de avaliar se os micronutrientes presentes na água são suficientes para atender a demanda das microalgas. Já o meio com micronutrientes utilizou-se água deionizada e adição da solução de micronutrientes A5. Ambos os meios foram formulados com fertilizantes agrícolas, exceto a solução A5, que foi elaborada com reagentes com grau de pureza analítica.

No meio de cultura sem adição de micronutrientes observaram-se traços de potássio, enxofre, magnésio, sódio e cálcio proveniente da água da rede pública de abastecimento, além de traços dos micronutrientes boro e cobre oriundos dos fertilizantes (Tabela 3).

Tabela 3: Concentração em mg L⁻¹ de nutrientes nos meios de cultura com e sem adição de micronutrientes.

Nutriente	Solução A5 (mg L ⁻¹)	Meio de cultura (mg L ⁻¹)	
		Sem micro	Com micro
N	0,00	81,00	81,00
K	-	81,98	78,00
S	0,03	26,69	23,43
Mg	-	9,12	7,40
Na	0,00	13,47	8,34
Ca	-	14,72	7,48
P	-	8,00	8,00
Fe	-	4,00	4,00
B	0,5000	0,7030	1,2030
Cl	0,6485	nd	0,6485
Mn	0,5025	nd	0,5025
Cu	0,0204	0,0660	0,0864
Zn	0,0500	nd	0,0500
Co	0,0101	nd	0,0101
Mo	0,0088	nd	0,0088

nd: não detectável

Nos dois tratamentos, as linhagens de microalgas *S. obliquus* BR003 e *S. bajacalifornicus* BR024 apresentaram comportamento similar em relação ao crescimento, não havendo diferença significativa ($p > 0,05$) nos valores de concentração de biomassa

seca livre de cinzas após 13 dias de cultivo em modo batelada (Figura 1). A produtividade de biomassa, quociente da biomassa final pelo número de dias do cultivo, também não apresentaram diferença ($p > 0,05$) entre os tratamentos. Em relação ao teor de FAMES, no cultivo com adição de micronutrientes houve um aumento de 84 % em *S. obliquus* e 51 % em *S. bajacalifornicus*.

Para a produtividade de FAMES, não houve diferença entre as duas linhagens ($p > 0,05$). Nos cultivos que utilizaram o meio de cultura com adição de micronutrientes, as produtividades de FAMES foram de 8,12 e 7,06 $\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$, aumento de 78 % e 58 %, quando comparado ao meio sem adição de micronutriente para *S. obliquus* e *S. bajacalifornicus*, respectivamente.

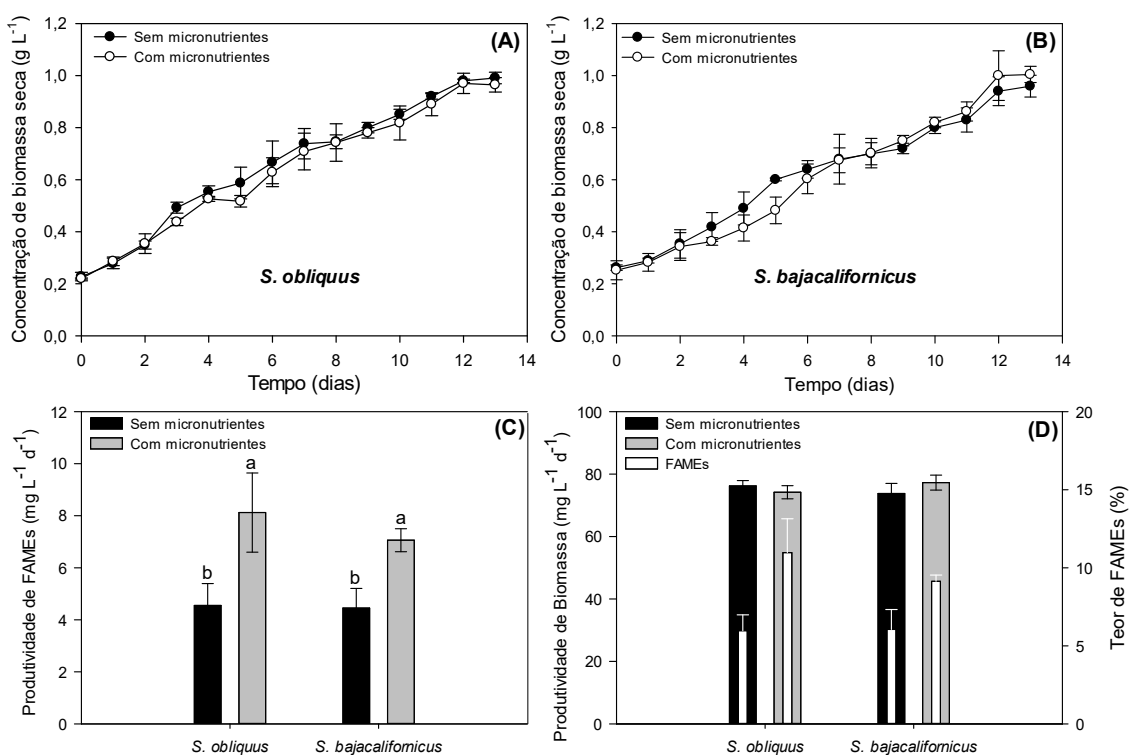


Figura 1: Curva de crescimento em cultivos no modo batelada para os tratamentos com e sem adição de micronutrientes para as linhagens de (A) *S. obliquus* e (B) *S. bajacalifornicus*. (C) Produtividade de FAMES e (D) produtividade de biomassa e teor de FAMES para os tratamentos com e sem adição de micronutrientes para as linhagens *S. obliquus* e *S. bajacalifornicus*. As barras indicam o erro padrão. As médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%).

A composição de ácidos graxos (Tabela 4) foi alterada em resposta aos níveis de micronutrientes. Os tratamentos com adição de micronutrientes apresentaram uma redução nos teores de ácidos graxos saturados de 15 % e 33 % para as linhagens *S. obliquus* e *S. bajacalifornicus*, respectivamente. Também foi observado um aumento acentuado de 59 % nos teores de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) no tratamento

com adição de micronutrientes, para a linhagem *S. bajacalifornicus*. Não foram observadas grandes variações nos teores de ácidos graxos monoinsaturados (MUFAs) para as duas linhagens.

Tabela 4: Composição de ácidos graxos dos óleos de microalgas *Scenedesmus obliquus* BR003 e *Scenedesmus bajacalifornicus* BR024 cultivadas em meios de cultura com e sem adição de micronutrientes.

Ácidos Graxos (%)	<i>S. obliquus</i>		<i>S. bajacalifornicus</i>	
	Sem micro	Com micro	Sem micro	Com micro
C16:0 (Palmítico)	21,34 ± 2,69	17,50 ± 0,77	24,21 ± 6,63	17,29 ± 3,03
C16:1 (Palmitilético)	-	2,39 ± 0,32	1,65 ± 3,24	2,92 ± 2,43
C18:1n9t (Elaídico)	1,76 ± 1,76	2,97 ± 0,24	-	4,57 ± 0,25
C18:1n9c (Oléico)	15,97 ± 0,88	14,12 ± 0,66	23,82 ± 9,98	14,75 ± 7,61
C18:2n6t (Linoelaídico)	10,75 ± 0,66	12,30 ± 0,54	2,65 ± 5,20	10,46 ± 1,35
C18:2n6c (linoléico)	11,65 ± 1,81	10,46 ± 0,30	10,14 ± 3,68	10,74 ± 1,22
C18:3n6c Linolênico	25,15 ± 2,52	24,55 ± 1,10	15,88 ± 0,85	24,40 ± 3,05
C20:0 (Araquídico)	6,99 ± 3,12	6,69 ± 0,64	11,01 ± 8,15	6,16 ± 0,75
C20:X	-	2,10 ± 0,59	-	-
Não identificados	6,38 ± 2,29	3,46 ± 0,56	1,77 ± 3,47	2,18 ± 2,15
Saturados	28,33 ± 5,81	24,19 ± 1,41	35,21 ± 14,78	23,45 ± 3,77
Monoinsaturados	17,74 ± 2,64	19,49 ± 1,23	25,48 ± 13,22	22,24 ± 10,30
Poliinsaturados	47,55 ± 4,99	47,30 ± 1,94	28,67 ± 9,72	45,60 ± 5,62
Saturados / Insaturados	0,43	0,36	0,65	0,35

(*) Média ± erro padrão dos teores (%) de ácidos graxos.

Embora a adição dos micronutrientes tenha contribuído na mudança da composição de ácidos graxos, os dois tratamentos apresentaram óleos com qualidade desejada para produção de biodiesel (Tabela 4), apresentando majoritariamente ácidos graxos C16:0 (Palmítico), C18:1 (Oléico), C18:2 (Linoléico) e C18:3 (Linolênico), considerado como os mais importantes em microalgas (ISLAM; HEIMANN; BROWN, 2017). Óleos com altos teores de ácidos graxos saturados são indesejados para produção de biodiesel, devido à baixa fluidez. Os ácidos graxos poli-insaturados melhoram a fluidez, porém são susceptíveis a oxidação devido a presença de ligações duplas em sua cadeia (KNOTHE, 2007).

Os teores e quantidades de ácidos graxos, assim como toda a composição bioquímica da célula varia em resposta às condições ambientais (DARKI; SEYFABADI; FAYAZI, 2017). Os micronutrientes podem ser explorados como estratégia para regular o metabolismo celular, e induzir a produção de certos metabólicos, como lipídios (PROCHÁZKOVÁ et al., 2013). Darki, Seyfabadi e Fayazi (2017) observaram que o molibdênio e cobalto são os micronutrientes mais importantes para obter um maior teor de lipídios em *Scenedesmus obliquus*. Dou et al. (2013) observaram que a adição de zinco,

manganês e molibdênio em *Nannochloropsis oculata*, foi responsável pelo aumento na produtividade de lipídios em 121,7%, 8,35% e 53,4% respectivamente. O zinco está associado à absorção do fósforo pela célula (PROCHÁZKOVÁ et al., 2013), e em baixa concentração estimula o crescimento celular, porém em alta concentração é responsável pela degradação de lipídeo devido ao aumento de peróxidos de lipídeo em algumas espécies (GHAFARI; RASHIDI; HAZNEDAROGLU, 2016). O cobalto é requerido pelas algas para a síntese da vitamina B12, a limitação do manganês inibe a atividade fotossintética, ao passo que o molibdênio é requerido para assimilação do nitrato e conservação da homeostase (GHAFARI; RASHIDI; HAZNEDAROGLU, 2016).

Os resultados apresentados evidenciaram que a adição de micronutrientes afetou positivamente a produtividade de lipídios e a composição de ácidos graxos para produção de biodiesel. Em relação a produtividade de biomassa, a adição dos micronutrientes: manganês, zinco, cobalto e molibdênio não foi significativo, sugerindo que traços desses elementos no inóculo foi suficiente para manter o metabolismo das células para o aumento da biomassa. Diante do exposto, os meios de cultura para cultivos de microalgas devem ser suplementados com micronutrientes, principalmente, manganês, zinco, cobalto e molibdênio. Logo, todos os experimento a seguir foram preparados com meios de cultura com adição da solução de micronutrientes A5-modificado, com concentração dos elementos ajustados conforme (Tabela 3).

3.3.3. Efeito da salinidade e dos modos de cultivo no crescimento de microalgas e na produtividade biomassa

As microalgas foram inoculadas em meio de cultura com diferentes concentrações de NaCl, e cultivadas em quatro modos de cultivo (batelada, dois estágios e semi-contínuo com coleta diária e semi-contínuo com coleta em 2 dias) para avaliar o efeito no crescimento das células e produtividade de biomassa. O aumento nos teores de NaCl reduziu significativamente a concentração de células em todos os tratamentos ($p < 0,05$).

As linhagens *S. obliquus* e *S. bajacalifornicus* apresentaram comportamento similar em relação às curvas de crescimento (Figura 2 e Figura 3). Nos modos de cultivo batelada e dois estágios observou-se uma fase de adaptação de curta duração (fase Lag) seguida de uma fase de crescimento exponencial até o 6º dia para *S. obliquus* e 5º dia para *S. bajacalifornicus*. Nos modos de cultivo semi-contínuo, com intervalos de coleta de 1 e 2 dias, as células permaneceram sempre na fase exponencial de crescimento. Neste modo

de cultivo, as células de microalgas estão em constante divisão celular, e, portanto, nunca chegam à fase estacionária (Figuras 2C, 2D, 3C e 3D).

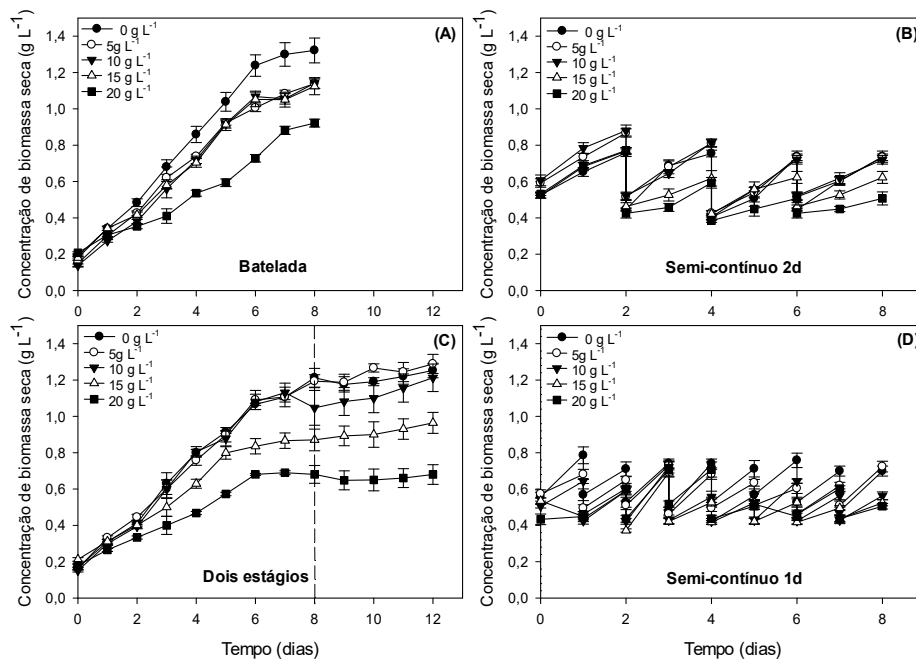


Figura 2: Efeito de várias concentrações de NaCl no crescimento de células da microalga *Scenedesmus obliquus* BR003 nos modos (A) Batelada, (B) Semi-contínuo 2 dias, (C) Dois estágios com barra tracejada indicando o momento de coleta do sobrenadante e reposição de meio sem nitrogênio e (D) semi-contínuo 1 dia. As barras indicam o erro padrão.

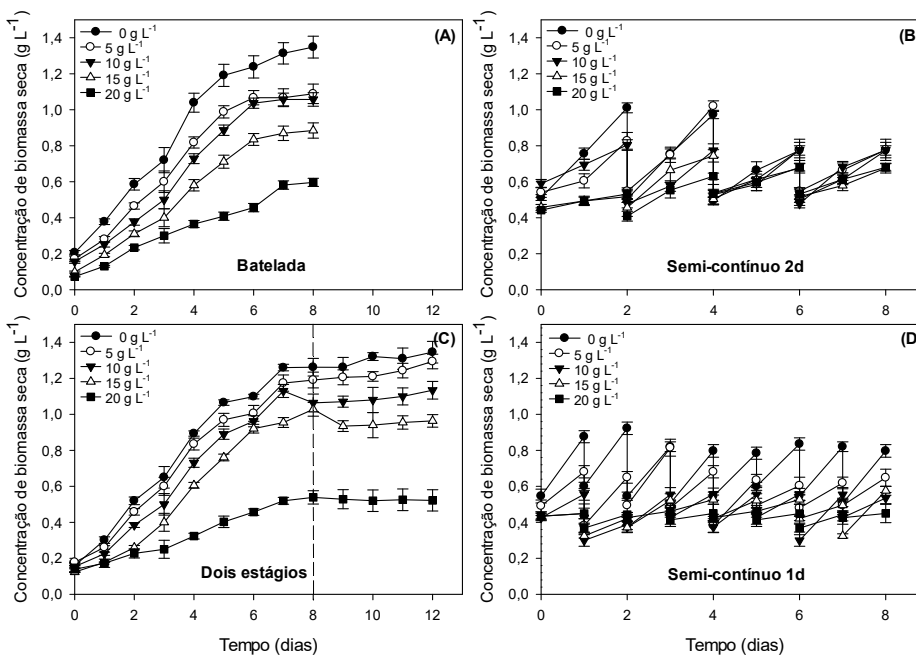


Figura 3: Efeito de várias concentrações de NaCl no crescimento de células da microalga *Scenedesmus bajacaliformicus* BR024 nos modos (A) Batelada, (B) Semi-contínuo 2 dias, (C) Dois estágios com barra tracejada indicando o momento de coleta do sobrenadante e reposição de meio sem nitrogênio e (D) semi-contínuo 1 dia. As barras indicam o erro padrão.

As maiores taxas específicas de crescimento (μ) (Tabela 5) e produtividades de biomassa (P_{BM}) (Figura 4) foram observadas no tratamento controle (0 g L⁻¹ de NaCl), no modo de cultivo semi-contínuo 1 dia com valores de 146,30 mg L⁻¹ d⁻¹ e 0,24 d⁻¹ para *S. obliquus* e 235,92 mg L⁻¹ d⁻¹ 0,31 d⁻¹ para *S. bajacalifornicus*. Com a concentração de 5 mg L⁻¹ de NaCl a redução na P_{BM} foi de 11% na *S. obliquus* e 44% na *S. bajacalifornicus*. Adams et al. (2013) e Ho et al., (2014) também encontraram resultados similares em microalgas *Neochloris oleoabundans* e *Desmodesmus* sp. O modo de cultivo semi-contínuo se destacou por ser uma estratégia para manter as microalgas sempre na fase exponencial e evitar o efeito de sombreamento resultante da alta densidade celular, obtendo assim altas produtividades de biomassa (Ho et al., 2014).

Tabela 5: Taxa específica de crescimento (μ) dos cultivos em diferentes concentrações de NaCl para as microalgas *Scenedesmus obliquus* e *Scenedesmus bajacalifornicus*. Médias seguidas do erro padrão.

Concentração de NaCl (g L ⁻¹)	Taxa específica de crescimento - μ (dia ⁻¹)				
	Batelada	Dois estágios	Semi-contínuo 2d	Semi-contínuo 1d	
<i>S. obliquus</i>	0	0,16 ± 0,0045	0,11 ± 0,0053	0,17 ± 0,0175	0,24 ± 0,0206
	5	0,16 ± 0,0095	0,11 ± 0,0050	0,16 ± 0,0107	0,22 ± 0,0154
	10	0,16 ± 0,0064	0,11 ± 0,0050	0,17 ± 0,0136	0,19 ± 0,0087
	15	0,15 ± 0,0025	0,08 ± 0,0028	0,12 ± 0,0097	0,16 ± 0,0104
	20	0,12 ± 0,0014	0,06 ± 0,0041	0,11 ± 0,0105	0,13 ± 0,0172
<i>S. bajacalifornicus</i>	0	0,15 ± 0,0048	0,11 ± 0,0061	0,21 ± 0,0231	0,31 ± 0,0079
	5	0,14 ± 0,0075	0,10 ± 0,0025	0,17 ± 0,0228	0,22 ± 0,0210
	10	0,14 ± 0,0063	0,10 ± 0,0045	0,14 ± 0,0129	0,18 ± 0,0102
	15	0,14 ± 0,0100	0,09 ± 0,0024	0,11 ± 0,0060	0,15 ± 0,0027
	20	0,11 ± 0,0041	0,05 ± 0,0079	0,07 ± 0,0058	0,07 ± 0,0105

Os cultivos em dois estágios apresentaram as menores P_{BM} e μ em todas as concentrações de NaCl, para as duas linhagens, devido ao aumento no tempo de cultivo em 50%. Porém não houve diferença ($p > 0,05$) na concentração final de biomassa quando comparada ao modo batelada. Pancha et al. (2015b) também observaram que o modo de cultivo dois estágios não afetou a concentração final de células, e pode ser utilizado para estimular o acúmulo de lipídios sem comprometer a produção de biomassa.

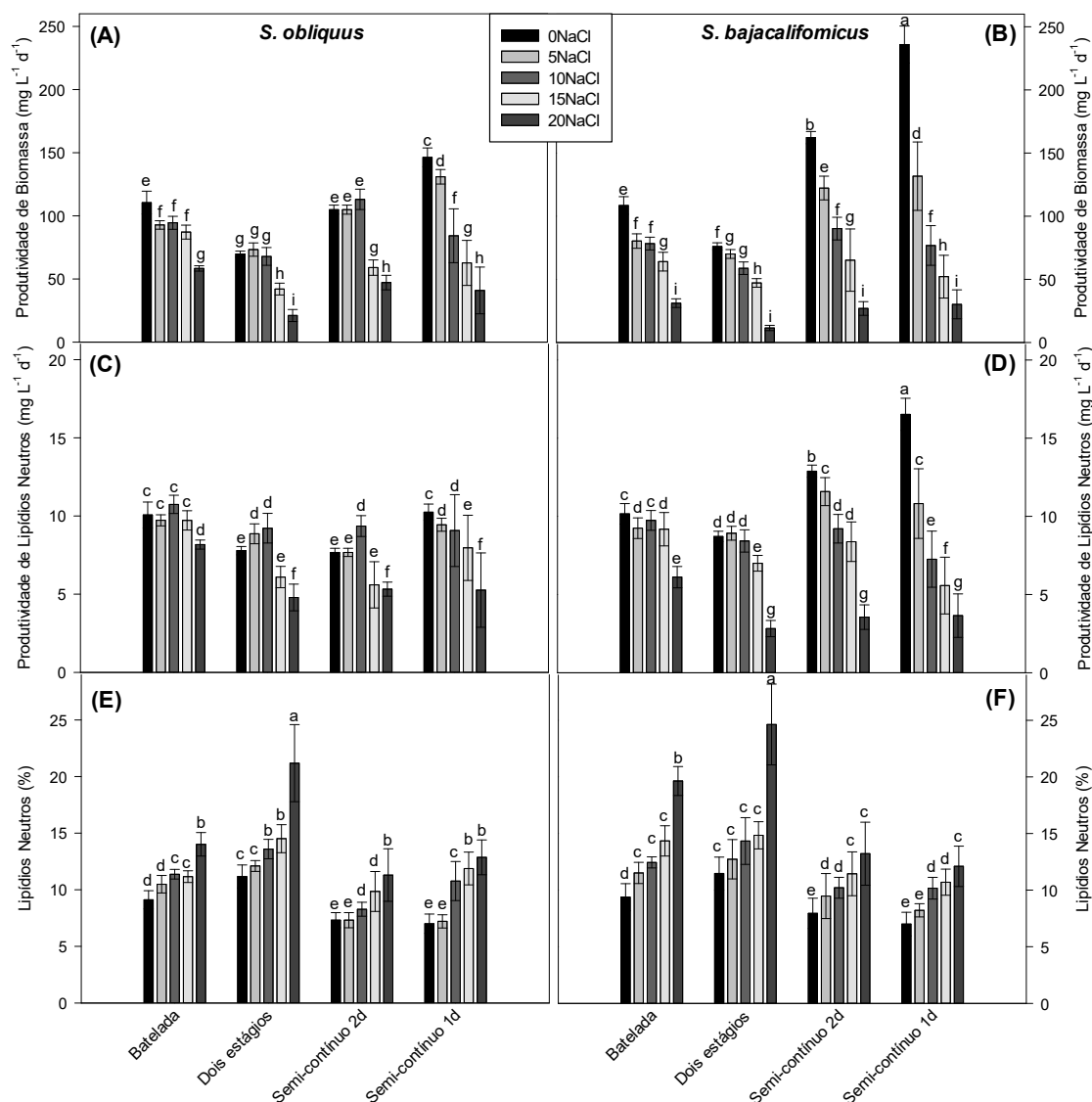


Figura 4: Produtividade de biomassa (P_{BM}) (A) e (B), produtividade de lipídios neutros (P_{LN}) (C) e (D) e teores de lipídios neutros (%) (E) e (F) em microalgas *Scenedesmus obliquus* e *Scenedesmus bajacalifornicus*, em tratamentos em concentrações de NaCl ($g L^{-1}$) e modos de cultivos diferentes. As barras indicam o erro padrão. As médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de agrupamento de Scott-Knott (5%).

A linhagem *S. bajacalifornicus* BR024 apresentou maiores produtividades de biomassa nos tratamentos controle, porém, em tratamentos com adição de NaCl a redução da P_{BM} foi mais acentuada quando comparada a linhagem *S. obliquus* BR003. O tratamento com adição de $10 g L^{-1}$ de NaCl, quando comparado ao controle, foi responsável pela redução de 14 % e 28 % na produtividade de biomassa no modo batelada, 3 % ($p > 0,05$) e 23 % no modo dois estágios, 8 % ($p > 0,05$) e 44 % no modo semi-contínuo 2 dias, 42 % e 67 % no modo semi-contínuo 1 dia para as linhagens *S. obliquus* e *S. bajacalifornicus* respectivamente.

Os resultados apresentados comprovam que o modo de cultivo afetou a produtividade de biomassa, e o aumento na concentração de NaCl no meio de cultura pode ter sido responsável por inibir o crescimento das microalgas. O cultivo em modo semi-contínuo é responsável por maiores produtividades de biomassa quando comparado com o modo batelada (ADAMS et al., 2013; BENVENUTI et al.; 2016 e TAN et al., 2018), pois as células se mantêm sempre na fase exponencial de crescimento (HO et al., 2014). Porém, ao adicionar NaCl no meio, houve redução nas taxas específicas de crescimento. Segundo Ji et al. (2018) meio de cultura com NaCl afeta o metabolismo das células devido ao estresse oxidativo, tal fato ocorre em resposta às condições ambientais desfavoráveis, em que as microalgas produzem vários compostos reativos de oxigênio altamente tóxicos, que danificam proteínas, lipídios, DNA e outras macromoléculas (PANCHHA et al. 2015b). Nesse contexto, a linhagem *Scenedesmus bajacalifornicus* BR024 se revelou mais susceptível ao efeito negativo do NaCl para produtividade de biomassa quando comparada a *S. obliquus*. Entretanto, as duas linhagens do gênero *Scenedesmus* podem ser cultivadas em águas salobras, com salinidade de até 10 g L⁻¹ de NaCl sem grandes reduções nos parâmetros de crescimento em todos os modos de cultivo.

3.3.4. Efeito da salinidade e modos de cultivo no acúmulo e produtividade de lipídios

É possível observar na Figura 4, que o teor de lipídios neutros nas células de microalgas aumentou em resposta à elevação da concentração de NaCl no meio de cultura. O cultivo em dois estágios resultou em maiores teores de lipídios, 21,18 % e 24,63 % para as linhagens *S. obliquus* e *S. bajacalifornicus*, respectivamente. Com a adição de 20 L⁻¹ de NaCl, verificou-se um aumento de 90 % e 115 % nos teores, quando comparado ao tratamento controle. Kaewkannetra et al. (2012), Pancha et al. (2015b) e Gan et al. (2016) também observaram relação positiva entre o teor de lipídios e o aumento da concentração de NaCl em microalgas do gênero *Scenedesmus*. O aumento do conteúdo de lipídios nas células de algas é um mecanismo de adaptação que confere rigidez à membrana celular para reduzir a fluidez e a permeabilidade, o que ajuda a manter o equilíbrio osmótico sob altas concentrações de NaCl (JI et al., 2018). Já os menores teores de lipídios neutros intracelulares foram observados no modo semi-contínuo 2 dias com 6,51 % para a linhagem *S. obliquus* e 7,0 % no modo semi-contínuo 1 dia para a linhagem *S. bajacalifornicus*. Ao serem cultivadas em meio com 20 g L⁻¹ de NaCl, os teores de lipídios aumentaram para 11,3 % e 12,1 % respectivamente.

As maiores produtividades de lipídios neutros ($16,53 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ e $12,89 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) foram verificadas na linhagem *S. bajacalifornicus* no tratamento controle (sem adição de NaCl) e modos de cultivo semi-contínuo 1 dia e 2 dias respectivamente. Essa linhagem e os modos de cultivo semi-contínuo 1 dia e 2 dias também se destacaram em tratamentos com adição de 5 g L^{-1} NaCl, obtendo produtividade de lipídios de $10,82 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ e $11,58 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ($p > 0,05$). Em tratamentos com concentração de 10 g L^{-1} de NaCl o modo batelada se destacou com teores de lipídios neutros de $10,74 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ e $9,74 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ($p > 0,05$) para *S. obliquus* e *S. bajacalifornicus* respectivamente. Não houve diferença significativa entre as produtividades de lipídios obtidas nos modos dois estágios nas duas linhagens e modo semi-contínuo 2 dias e 1 dia para *S. obliquus* (Figura 4 C e D).

A linhagem *Scenedesmus bajacalifornicus* apresentou maiores produtividades de lipídios nos tratamentos controle e com 5 g L^{-1} de NaCl, porém, a redução mais acentuada na produtividade de biomassa em tratamentos com a adição de NaCl resultou em menores produtividades de lipídios quando comparado com a linhagem *S. obliquus* em tratamentos com adição de 10 g L^{-1} de NaCl. Isto sugere uma diferença na resposta celular das microalgas do gênero *Scenedesmus* para condições de estresse induzidas por salinidade. Além disso, a interação do efeito da salinidade e os modos de cultivo interferiu na produtividade de lipídios, com maiores valores obtidos no modo batelada em *S. obliquus* e nos modos batelada e semi-contínuo 2 dias e 1 dia ($p > 0,05$) para *S. bajacalifornicus*, esse último apresentou altas produtividades de biomassa com baixo teor de lipídios, visto que fornecimento frequente de meio com nitrogênio favoreceu o crescimento de células em detrimento da acumulação de lipídios. Assim, o modo batelada apresentou os melhores resultados de produtividade de lipídios para as duas cepas em tratamentos com adição de NaCl. Adams et al. (2013) verificaram com *Neochloris oleoabundans*, que o modo de cultivo batelada foi mais eficaz para obter alta produtividade de lipídio, quando comparado com o modo semi-contínuo. Benvenuti et al. (2016), em trabalho com *Nannochloropsis sp.*, observaram que a produtividade de lipídios no modo semi-contínuo e batelada foram semelhantes, porém o custo para extração do óleo e produção do biodiesel a partir da biomassa obtida no modo semi-contínuo é maior devido a maior quantidade de lipídios polares (estruturais).

O cultivo de microalgas do gênero *Scenedesmus* em meio de cultura com até 10 g L^{-1} de NaCl pode ser uma estratégia para aumentar a produtividade de lipídios em todos os modos de cultivo. Os resultados corroboram com o trabalho de Kaewkannetra et al. (2012), que observaram em cultivos de *S. obliquus* com concentrações acima de 15 g L^{-1}

de NaCl não é uma boa estratégia para produtividade de lipídios, pois há uma expressiva redução na concentração de biomassa. Diante disso, a tolerância do gênero *Scenedesmus* ao estresse oxidativo gerado pela salinidade, com conseqüente incremento de teor de lipídeos, indicam vantagens quanto a produção de biocombustível, devido ao aumento nos teores de lipídios neutros (Pancha et al., 2015b).

3.3.5. Estimativa do teor de lipídios neutros com vermelho do Nilo

O acúmulo de lipídios intracelulares em *S. obliquus* e *S. bajacalifornicus* foi investigado pelo método da fluorescência com vermelho do Nilo, como proposto por Siegler et al. (2012), com adaptações conforme descrito na seção material e métodos. O vermelho do Nilo é um corante fluorescente lipofílico que se liga seletivamente ao triacilglicerol (TAG) (SRIVASTAVA; NISHCHAL; GOUD, 2017). A unidade relativa de fluorescência (RFU) normalizada pela densidade ótica a 750 nm (OD_{750}) é apresentada na Figura 5 para os diferentes modos de cultivos e salinidades.

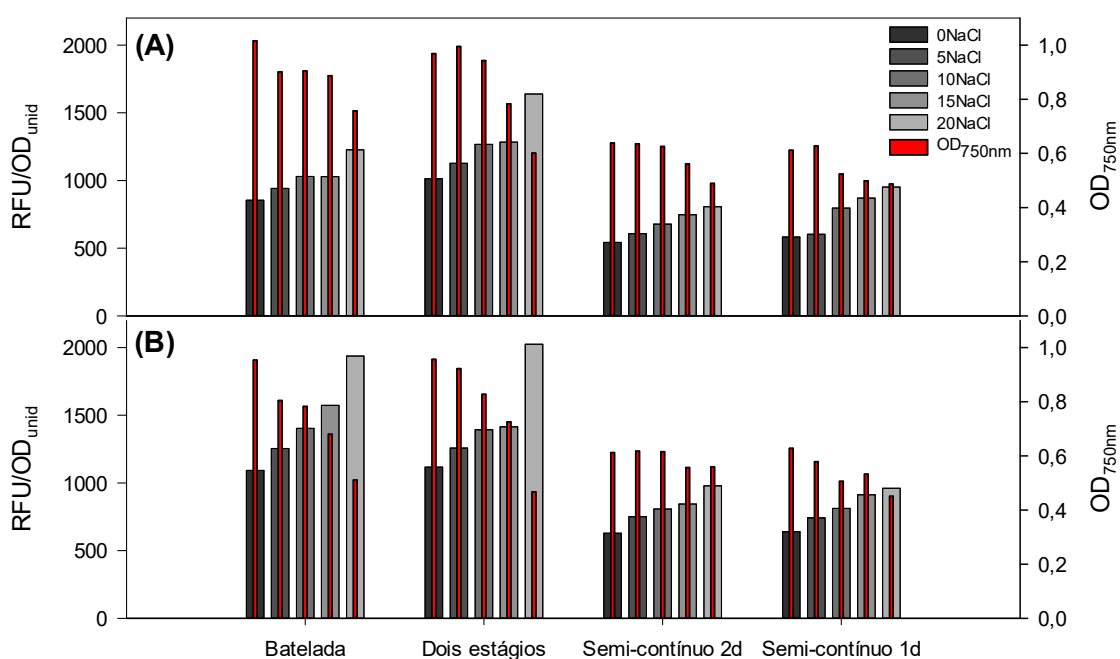


Figura 5: Valores de unidade relativa de fluorescência (RFU) normalizada pela densidade ótica a 750 nm (OD_{750}) da amostra (barras estreitas, eixo secundário), em doses de NaCl e modos de cultivo distintos para as linhagens (A) *Scenedesmus obliquus* e (B) *Scenedesmus bajacalifornicus*.

Na Figura 5 é possível observar que houve maiores intensidades de fluorescência normalizadas com o aumento da salinidade, cujos maiores valores foram observados no cultivo em dois estágios para as duas linhagens. As absorvâncias no comprimento de onda 750 nm para os tratamentos batelada e dois estágios foram próximas. Pancha et al.

(2015b) também observaram que o modo de cultivo dois estágios não afetou a concentração final de células, e pode ser utilizada para elevar o teor de lipídios neutros sem comprometer a produção de biomassa.

Os modos de cultivo semi-contínuo 1 dia e 2 dias apresentaram menores valores de RFU/OD_{unid}, praticamente a metade quando comparadas com o modo de cultivo dois estágios. O acúmulo de lipídios neutros nos modos de cultivo semi-contínuo é menor devido ao fornecimento frequente de nitrogênio. Adams et. al. (2013) observaram que o fornecimento constante de nitrogênio em cultivos semi-contínuos levou a uma maior produtividade de biomassa e com menor teor de lipídios de reserva, ou seja, lipídios neutros como triacilgliceróis.

Imagens de microalgas obtidas em microscópio de fluorescência das linhagens *S. obliquus* e *S. bajacalifornicus* coradas com o vermelho do Nilo são apresentadas na Figura 6, na qual o tratamento controle com 0 g L⁻¹ de NaCl apresentou menor intensidade de fluorescência, obtida na cor vermelha. Já as células cultivadas em meio com 20 g L⁻¹ de NaCl apresentaram maior intensidade da fluorescência.

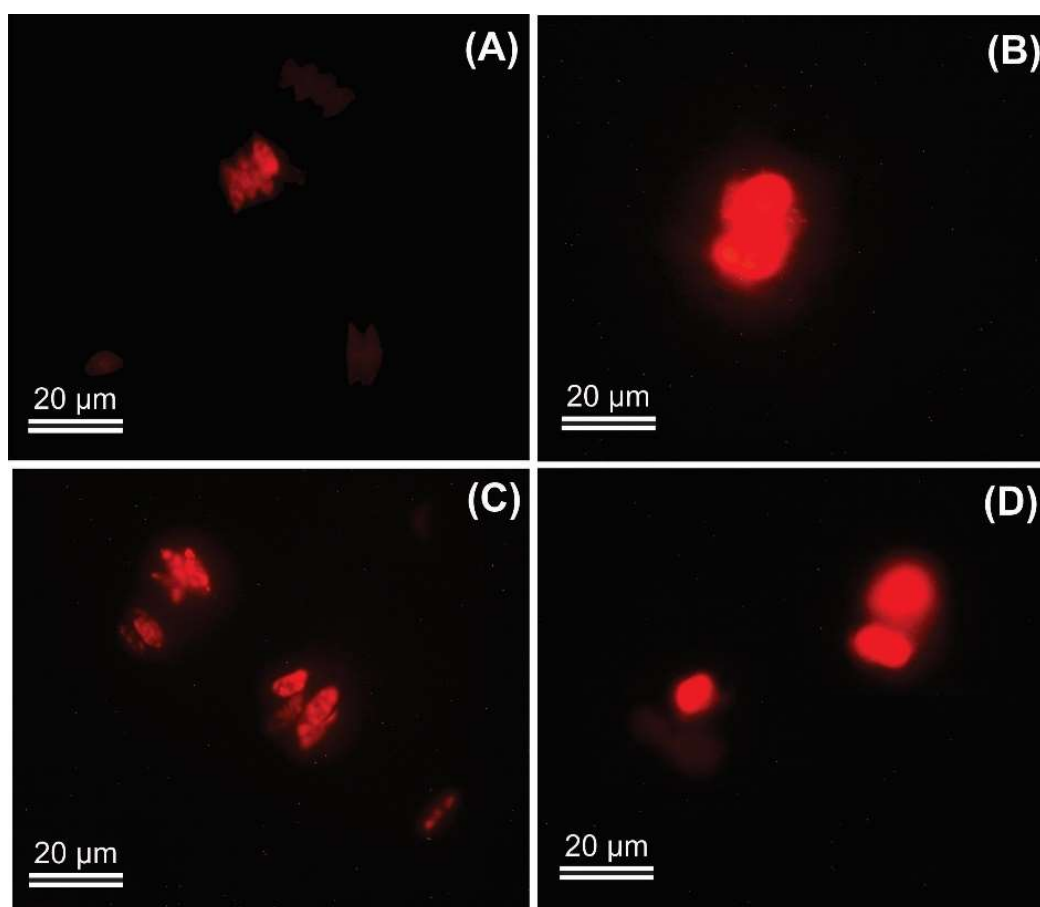


Figura 6: Fluorescência de microalgas coradas com o corante vermelho do Nilo. (A e C) tratamento controle (0 g L⁻¹) de NaCl, (B e D) tratamento com salinidade (20 g L⁻¹) de NaCl, para *S. obliquus* e *S. bajacalifornicus* respectivamente.

A Figura 6 corrobora os dados apresentados na Figura 5, que evidenciou maiores valores de unidade relativa de fluorescência (RFU) em tratamentos com 20 g L⁻¹, quando comparada com o tratamento controle. Adicionalmente, é possível observar mudanças morfológicas nas células cultivadas em meio com 20 g L⁻¹ de NaCl (Figura 6 B e D). Kaewkannetra et al. (2012) também observaram mudanças morfológicas em microalgas da espécie *S. obliquus* em condições de estresse salino.

Ao considerar a frequência de colheita, o modo de cultivo semi-contínuo com coleta realizadas em 2 dias e 1 dia são promissores para se obter maiores quantidades de biomassa, quando comparadas com o modo batelada, com colheitas em 8 dias e dois estágios, com colheita em 12 dias. A análise da fluorescência (Figura 5), por sua vez, sugere que a biomassa extraída com maior frequência nos modos semi-contínuo 1 dia e 2 dias contém aproximadamente 50% a 70% dos lipídios neutros da biomassa colhida nos modos batelada e dois estágios. Os menores teores de TAG obtidos nos modos semi-contínuos provavelmente resultará em custos mais elevados para operações de colheita, concentração da biomassa, rompimento celular e extração do óleo para produção de biodiesel (BENVENUTI et al., 2016). Além disso, os altos teores de lipídios estruturais (fosfolipídios e glicolipídios) dificultam a extração seletiva de lipídios neutros (ISLAM, et al., 2017). Interessantemente, os modos de cultivo em batelada ou em dois estágios produziram biomassa com conteúdo de lipídios de melhor qualidade para produção de biodiesel, ou seja, com maior teor de lipídeos neutros. Esse resultado corrobora com a análise da produtividade de lipídios (Figura 4), em que se utilizou a trioleína como padrão para quantificar os lipídios neutros pelo método vermelho do Nilo.

3.3.6. Efeito da salinidade e modos de cultivo na composição bioquímica

O meio de cultura com concentração de 10 g L⁻¹ de NaCl foi selecionado por destacar como melhor estratégia para aumento da produtividade de lipídios em todos os modos de cultivo para as linhagens *S. obliquus* e *S. bajacalifornicus*. Para quantificação dos compostos bioquímicos das células de microalgas (Figura 7) os cultivos foram realizados em frascos tipo Erlenmeyer com volume útil de 150 mL.

A adição de 10 g L⁻¹ de NaCl foi responsável por reduzir a concentração de biomassa seca livre de cinzas em todos os modos de cultivo quando comparado com o controle (0 g L⁻¹ de NaCl), em ambas linhagens. A maior redução foi de 40%, observada na linhagem *S. obliquus* no modo dois estágios.

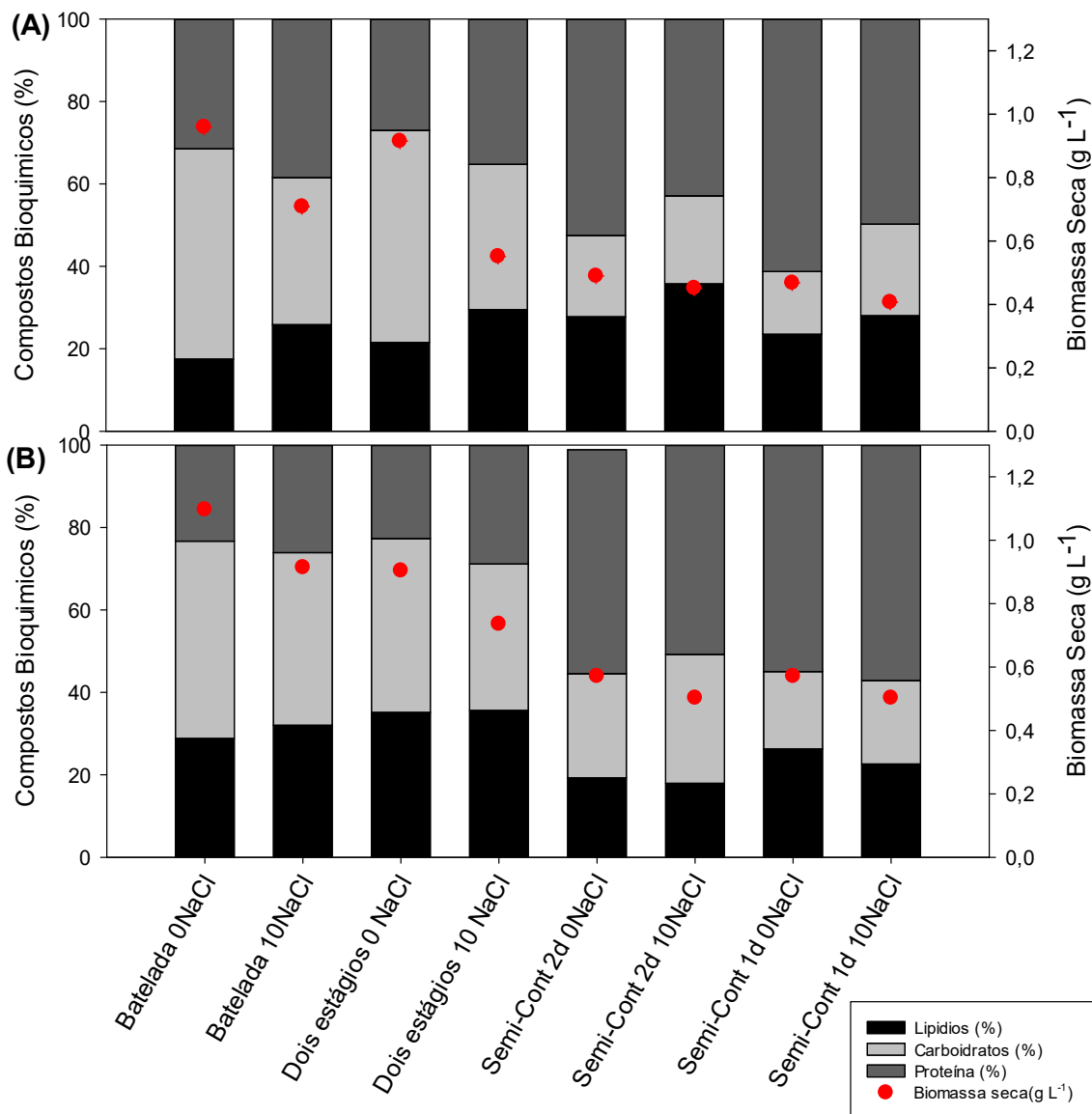


Figura 7: Composição bioquímica e concentração da biomassa seca livre de cinzas das células de microalgas (A) *Scenedesmus obliquus* e (B) *Scenedesmus bajacalifornicus* cultivadas em doses de NaCl e modos de cultivo diferentes.

O teor de lipídios totais, quantificado pelo método modificado de J:Schmid-Bondzynski-Ratzlaff (INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION, 1986), aumentou com a adição do NaCl. A linhagem *S. obliquus* apresentou o maior teor de lipídios (33%), no modo de cultivo semi-contínuo com colheita a cada 2 dias, já a linhagem *S. bajacalifornicus* apresentou 31,7% de lipídios no modo de cultivo em dois estágios. A linhagem *S. obliquus* apresentou maior incremento nos teores de lipídios totais, com valores percentuais variando de 32% a 55%, enquanto na linhagem *S. bajacalifornicus* o incremento foi de 0% a 28%. Pancha et al. (2015b) reportaram que a concentração de 10 g L⁻¹ de NaCl, o teor de lipídios foi de 24,57% para o modo batelada e 24,77% para o cultivo em dois estágios com 3 dias de estresse em *Scenedesmus sp.* Para a cepa *S.*

Bajacalifornicus BR024, foram verificados teores de lipídios de 22% para o modo batelada e 25,6% para dois estágios, com 4 dias de estresse.

Para a linhagem *S. obliquus*, o teor de carboidratos neutros totais aumentou apenas no modo semi-contínuo 1 dia, com elevação de 12% para 19,4% no tratamento com 10 g L⁻¹ de NaCl. Os demais modos de cultivo não houve diferença ($p > 0,05$) para esse metabólito. Para *S. bajacalifornicus* também não houve diferença ($p > 0,05$) entre o tratamento controle e 10 g L⁻¹ de NaCl em todos os modos de cultivo. O modo batelada apresentou o maior teor de carboidrato, 41% para ambas linhagens. O menor teor foi observado no modo de cultivo semi-contínuo com coleta diária, no tratamento controle, com 11,9% e 12,7% para *S. obliquus* e *S. bajacalifornicus* respectivamente.

Os teores de carboidratos estatisticamente iguais e aumento nos teores de lipídios entre as doses de NaCl, pode ter ocorrido devido a síntese de carboidratos e lipídios ocorrerem em paralelo nas células de microalgas (PANCHA et al., 2015b), pois as microalgas inicialmente sintetizam amido como reserva de energia a curto prazo, e depois com o excesso de carbono o lipídio é sintetizado como composto de armazenamento de energia a longo prazo (ZHANG et al., 2018). Ho et al. (2017) e Zhang et al. (2018) demonstraram em trabalhos com *Chlorella sorokiniana* e *Chlamydomonas spp* respectivamente, que o estresse salino foi responsável pela degradação do amido à medida que os níveis lipídicos aumentaram.

Os maiores teores de proteínas hidrossolúveis foram de 48,1% no modo semi-contínuo 1 dia e 56,6% no modo semi-contínuo 2 dias, para *S. obliquus* e *S. bajacalifornicus*, respectivamente. Os menores valores foram obtidos no modo dois estágios com 16,6% e 20,7% para as duas linhagens respectivamente. O tratamento com 10 g L⁻¹ de NaCl apresentou maiores teores de proteína, porém não houve diferença significativa ($p > 0,05$) quando comparado com o tratamento controle. Os resultados apresentados na Figura 5 divergem daqueles verificados por Pancha et al. (2015b) e Chokshi et al. (2017), que observaram uma redução nos teores de proteínas sob o estresse salino em *Scenedesmus sp.* e *Acutodesmus dimorphus* respectivamente. Porém, a alta salinidade pode induzir o acúmulo de proteínas na membrana plasmática, que aumenta a captação de CO₂ e a atividade fotossintética (ISHIKA; MOHEIMANI; BAHRI, 2017).

3.4. CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo sugerem que microalgas das linhagens *S. obliquus* e *S. bajacalifornicus* podem ser cultivadas em meio com concentração de até 10 g L⁻¹ de NaCl, sem redução na produtividade de lipídios neutros, quando comparado com o tratamento controle (0 g L⁻¹ de NaCl). Além disso, observou-se também que o modo de cultivo influenciou a produtividade de lipídios, obtendo melhores resultados nos modos batelada para *S. obliquus* e semi-contínuo para *S. bajacalifornicus*. Porém, em comparação ao modo batelada, a biomassa extraída com maior frequência no modo semi-contínuo apresentou menores teores de lipídios neutros, resultando em custos mais elevados para operações de coleta, concentração da biomassa, rompimento celular e extração do óleo para produção de biodiesel. Neste sentido, conclui-se que o modo batelada é o mais indicado para produzir biomassa em meio salino com conteúdo de lipídios de melhor qualidade para produção de biodiesel. Adicionalmente, verificou-se que a adição de micronutrientes afetou tanto a produtividade de lipídios quanto a composição de ácidos graxos, o que sugere que os meios de cultura para cultivos de microalgas devem ser suplementados com micronutrientes, principalmente manganês, zinco, cobalto e molibdênio.

3.5. REFERÊNCIAS

- ABDELAZIZ, Ahmed E.m. et al. Screening microalgae native to Quebec for wastewater treatment and biodiesel production. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 157, p.140-148, abr. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.01.114>.
- ADAMS, Curtis et al. Understanding precision nitrogen stress to optimize the growth and lipid content tradeoff in oleaginous green microalgae. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 131, p.188-194, mar. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.12.143>.
- ALONZO, F e MAYZAUD, P. Spectrofluorometric quantification of neutral and polar lipids in zooplankton using Nile red. **Marine Chemistry**, v. 67, página 289–301, 1999.
- ANDERSEN, Robert A. (Ed.). **Algal Culturing Techniques**. USA: Elsevier Academic Press, 2005. 589 p.
- BARTOS, J. M. et al. Water-insoluble impurity effects on phosphorus availability in monoammonium phosphate fertilizers. **Soil Science Society of America Journal**, v. 56, n. 3, p. 972-976, 1992.
- BENEMANN, John. Microalgae for biofuels and animal feeds. **Energies**, [s.l.], v. 6, n. 11, p.5869-5886, 11 nov. 2013. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/en6115869>.
- BENVENUTI, Giulia et al. Batch and semi-continuous microalgal TAG production in lab-scale and outdoor photobioreactors. **Journal of Applied Phycology**, [s.l.], v. 28, n. 6, p.3167-3177, 7 jul. 2016. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s10811-016-0897-1>.
- CHOKSHI, Kaumeel et al. Salinity induced oxidative stress alters the physiological responses and improves the biofuel potential of green microalgae *Acutodesmus dimorphus*. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 244, p.1376-1383, nov. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.003>.
- COVELL, Lidiane. **Alterações metabólicas diurnas em microalgas com acúmulo diferencial de reservas em duas fases do crescimento**. 2015. 29 f. Dissertação

(Mestrado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal, Departamento de Biologia Vegetal, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2015.

DARKI, Behrouz Zarei; SEYFABADI, Jafar; FAYAZI, Sima. Effect of nutrients on total lipid content and fatty acids profile of *Scenedesmus obliquus*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, [s.l.], v. 60, p.1-12, 2017. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1678-4324-2017160304>.

DUBOIS, Michel et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.

DOU, Xiao et al. The effects of trace elements on the lipid productivity and fatty acid composition of *Nannochloropsis oculata*. **Journal of Renewable Energy**, [s.l.], v. 2013, p.1-6, 2013. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/671545>.

FENG, Pingzhong et al. Growth and lipid accumulation characteristics of *Scenedesmus obliquus* in semi-continuous cultivation outdoors for biodiesel feedstock production. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 173, p.406-414, dez. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.09.123>.

GAN, Xinyu et al. Simultaneous biological desalination and lipid production by *Scenedesmus obliquus* cultured with brackish water. **Desalination**, [s.l.], v. 400, p.1-6, dez. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.desal.2016.09.012>.

GHAFAARI, Mohsen; RASHIDI, Behzad; HAZNEDAROGLU, Berat Zeki. Effects of macro and micronutrients on neutral lipid accumulation in oleaginous microalgae. **Biofuels**, [s.l.], v. 9, n. 2, p.147-156, set. 2016. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/17597269.2016.1221644>.

GRIFFITHS, Melinda J. et al. Interference by pigment in the estimation of microalgal biomass concentration by optical density. **Journal of Microbiological Methods**, [s.l.], v. 85, n. 2, p.119-123, maio 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2011.02.005>

HAN, Wei et al. A novel miniature culture system to screen CO₂-sequestering microalgae. **Energies**, [s.l.], v. 5, n. 12, p.4372-4389, 1 nov. 2012. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/en5114372>.

- HO, Shih-hsin et al. Exploring the high lipid production potential of a thermotolerant microalga using statistical optimization and semi-continuous cultivation. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 163, p.128-135, jul. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.04.028>.
- HO, Shih-hsin et al. Dynamic metabolic profiling together with transcription analysis reveals salinity-induced starch-to-lipid biosynthesis in alga *Chlamydomonas* sp. JSC4. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 7, n. 1, p.1-11, 4 abr. 2017. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/srep45471>.
- ICHIHARA, Ken'ichi; FUKUBAYASHI, Yumeto. Preparation of fatty acid methyl esters for gas-liquid chromatography. **Journal of Lipid Research**, [s.l.], v. 51, n. 3, p.635-640, 16 set. 2009. American Society for Biochemistry & Molecular Biology (ASBMB). <http://dx.doi.org/10.1194/jlr.d001065>.
- INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. Cheese and processed cheese. Determination of fat content (Schmid-Bondzynski-Ratzlaff method). IDF Provisional Standard 5 B. International Dairy Federation. Brussels, Belgium; 1986.
- ISHIKA, Tasneema; MOHEIMANI, Navid R.; BAHRI, Parisa A.. Sustainable saline microalgae co-cultivation for biofuel production: A critical review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [s.l.], v. 78, p.356-368, out. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2017.04.110>.
- ISLAM, Muhammad Aminul; HEIMANN, Kirsten; BROWN, Richard J.. Microalgae biodiesel: Current status and future needs for engine performance and emissions. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [s.l.], v. 79, p.1160-1170, nov. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2017.05.041>.
- Jl, Xiang et al. The effect of NaCl stress on photosynthetic efficiency and lipid production in freshwater microalga *Scenedesmus obliquus* XJ002. **Science of the Total Environment**, [s.l.], v. 633, p.593-599, ago. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.240>.
- KAEWKANNETRA, Pakawadee et al. The effect of CO₂ and salinity on the cultivation of *Scenedesmus obliquus* for biodiesel production. **Biotechnology and Bioprocess**

Engineering, [s.l.], v. 17, n. 3, p.591-597, jun. 2012. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s12257-011-0533-5>.

KLIGERMAN, Debora Cynamon; BOUWER, Edward J.. Prospects for biodiesel production from algae-based wastewater treatment in Brazil: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [s.l.], v. 52, p.1834-1846, dez. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2015.08.030>.

KNOTHE, Gerhard. Some aspects of biodiesel oxidative stability. **Fuel Processing Technology**, [s.l.], v. 88, n. 7, p.669-677, jul. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fuproc.2007.01.005>.

KUO, Chiu-mei et al. Cultivation of *Chlorella* sp. GD using piggery wastewater for biomass and lipid production. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 194, p.326-333, out. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.07.026>.

LOWRY, Oliver H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of biological chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.

LUCARINI, A.C.; KILIKIAN, B.V.. Comparative study of Lowry and Bradford methods: interfering substances. **Biotechnology Techniques**, [s.l.], v. 13, n. 2, p.149-154, 1999. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1023/a:1008995609027>.

MASUKO, Tatsuya et al. Carbohydrate analysis by a phenol–sulfuric acid method in microplate format. **Analytical Biochemistry**, [s.l.], v. 339, n. 1, p.69-72, abr. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2004.12.001>.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). Manual de métodos analíticos oficiais para fertilizantes e corretivos. 2014.

MEIJER, E.a.; WIJFFELS, R.h.. Development of a fast, reproducible and effective method for the extracion and quantification of proteins of microalgae. **Biotechnology Techniques**, [s.l.], v. 12, n. 5, p.353-358, 1998. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1023/a:1008814128995>.

MORSCHETT, Holger et al. Design and validation of a parallelized microphotobioreactor enabling phototrophic bioprocess development at elevated

throughput. **Biotechnology and Bioengineering**, [s.l.], v. 114, n. 1, p.122-131, 26 jul. 2016. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/bit.26051>.

MORSCHETT, Holger et al. Comparative evaluation of phototrophic microtiter plate cultivation against laboratory-scale photobioreactors. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, [s.l.], v. 40, n. 5, p.663-673, 18 jan. 2017. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00449-016-1731-5>.

MULLINS, G. L.; SIKORA, F. J.. Effect of soil pH on the requirement for water-soluble phosphorus in triple superphosphate fertilizers. **Fertilizer Research**, [s.l.], v. 40, n. 3, p.207-214, 1995. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/bf00750467>.

PANCHA, Imran et al. Nitrogen stress triggered biochemical and morphological changes in the microalgae *Scenedesmus* sp. CCNM 1077. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 156, p.146-154, mar. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.01.025>.

PANCHA, Imran; CHOKSHI, Kaumeel; MISHRA, Sandhya. Enhanced biofuel production potential with nutritional stress amelioration through optimization of carbon source and light intensity in *Scenedesmus* sp. CCNM 1077. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 179, p.565-572, mar. 2015(a). Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.12.079>.

PANCHA, Imran et al. Salinity induced oxidative stress enhanced biofuel production potential of microalgae *Scenedesmus* sp. CCNM 1077. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 189, p.341-348, ago. 2015(b). Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.04.017>.

PROCHÁZKOVÁ, Gita et al. Effect of nutrient supply status on biomass composition of eukaryotic green microalgae. **Journal of Applied Phycology**, [s.l.], v. 26, n. 3, p.1359-1377, 23 set. 2013. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s10811-013-0154-9>.

RICHMOND, Amos; HU, Qiang. **Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology**. Second Edition. New Delhi, India: Wiley-Blackwell, 2013. 719 p.

- RÍO, Esperanza del et al. Microalgae for oil. Assessment of fatty acid productivity in continuous culture by two high-yield strains, *Chlorococcum oleofaciens* and *Pseudokirchneriella subcapitata*. **Algal Research**, [s.l.], v. 23, p.37-42, abr. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2017.01.003>.
- RIPPKA, Rosmarie et al. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. **Microbiology**, v. 111, n. 1, p. 1-61, 1979.
- ROCHA, Renan Paulo et al. Exploring the metabolic and physiological diversity of native microalgal strains (*Chlorophyta*) isolated from tropical freshwater reservoirs. **Algal Research**, [s.l.], v. 28, p.139-150, dez. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2017.10.021>.
- SALAMA, El-sayed et al. Biomass, lipid content, and fatty acid composition of freshwater *Chlamydomonas mexicana* and *Scenedesmus obliquus* grown under salt stress. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, [s.l.], v. 36, n. 6, p.827-833, 15 fev. 2013. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00449-013-0919-1>.
- SIEGLER, H. de La Hoz et al. Improving the reliability of fluorescence-based neutral lipid content measurements in microalgal cultures. **Algal Research**, [s.l.], v. 1, n. 2, p.176-184, out. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2012.07.004>.
- SLOCOMBE, Stephen P.; BENEMANN, John R.. **Microalgal Production for Biomass and High-Value Products**. Boca Raton, Fl: Crc Press, 2016. 335 p.
- SOARES, Jimmy et al. *Scenedesmus* sp. cultivation using commercial-grade ammonium sources. **Annals of Microbiology**, [s.l.], v. 68, n. 1, p.35-45, 8 dez. 2017. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s13213-017-1315-x>.
- SRIVASTAVA, Garima; NISHCHAL; GOUD, Vaibhav V.. Salinity induced lipid production in microalgae and cluster analysis (ICCB 16-BR_047). **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 242, p.244-252, out. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.03.175>.
- TAN, Xin Bei et al. Semi-continuous cultivation of *Chlorella vulgaris* using chicken compost as nutrients source: Growth optimization study and fatty acid composition

analysis. **Energy Conversion and Management**, [s.l.], v. 164, p.363-373, maio 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.enconman.2018.03.020>.

TERASHIMA, Mia et al. A fluorescence-activated cell sorting-based strategy for rapid isolation of high-lipid *Chlamydomonas mutants*. **The Plant Journal**, [s.l.], v. 81, n. 1, p.147-159, 25 out. 2014. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/tpj.12682>.

VAN WAGENEN, Jon et al. Microplate-based method for high-throughput screening of microalgae growth potential. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 169, p.566-572, out. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.06.096>.

XIA, Ling et al. Photoautotrophic outdoor two-stage cultivation for oleaginous microalgae *Scenedesmus obtusus* XJ-15. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 144, p.261-267, set. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.06.112>.

ZHANG, Lijie et al. Salinity-induced cellular cross-talk in carbon partitioning reveals starch-to-lipid biosynthesis switching in low-starch freshwater algae. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 250, p.449-456, fev. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.11.067>.

4. ARTIGO II – Associação de estresse nutricional e modos de cultivo como estratégia para aumento da produtividade de lipídios em cultivos outdoor em microalgas do gênero *Scenedesmus*

RESUMO

A viabilidade da produção de biodiesel a partir de microalgas depende da redução do custo de produção de biomassa. Para ser economicamente viável, a produtividade de biomassa, o teor lipídios nas células e a escala de produção devem ser aumentadas. No presente estudo avaliamos diferentes níveis de nitrogênio e fósforo, assim como a interação com os modos de cultivo (batelada, dois estágios e semi-contínuo) na produtividade de lipídios das espécies de microalgas *Scenedesmus obliquus* BR003 e *Scenedesmus bajacalifornicus* BR024. Visando validar o estudo em aplicações comerciais, o desempenho da linhagem *S. obliquus* BR003 foi avaliado em cultivos em tanques abertos tipo *raceway* com 4000 L de capacidade. As maiores produtividades de lipídios foram alcançadas no modo semi-contínuo para a linhagem *S. obliquus*, com 17,3 mg L⁻¹ d⁻¹, e no modo batelada para a linhagem *S. bajacalifornicus*, com 15,8 mg L⁻¹ d⁻¹, ambos em escala laboratorial. Não houve efeito significativo do fósforo para produtividade de lipídios, e o nitrogênio só foi significativo no modo semi-contínuo. O cultivo outdoor de *S. obliquus* corroborou os resultados em escala laboratorial, em que o modo batelada e semi-contínuo apresentaram produtividades de lipídios neutros de 2,87 e 3,35 mg L⁻¹ d⁻¹ ($p > 0,05$). Porém, em comparação ao modo batelada, a biomassa extraída com maior frequência no modo semi-contínuo apresentou menores teores de lipídios neutros, resultando em custos mais elevados para operações de coleta, concentração da biomassa, rompimento celular e extração do óleo para produção de biodiesel. O cultivo em tanque aberto, mesmo que em condições de baixa temperatura como observada nos experimentos mostrou-se uma ótima estratégia para aumento de escala e redução do custo de produção da biomassa. Além disso *S. obliquus* destacou-se como uma linhagem promissora para produção de lipídios em tanques abertos, com composição de ácidos graxos desejadas para produção de biodiesel.

Palavras-chave: *Scenedesmus bajacalifornicus*; *Scenedesmus obliquus*; CO₂; biodiesel; vermelho do Nilo; fertilizantes;

4.1. INTRODUÇÃO

Pesquisas atuais têm focado no desenvolvimento de biocombustíveis para atender à crescente demanda por energia e mitigar os problemas ambientais causados pelos combustíveis de origem fóssil (PANCHHA; CHOKSHI; MISHRA, 2015). Diante disso, as microalgas têm se apresentado como uma alternativa, devido a elevada capacidade de produção de óleo, rápida produção de biomassa quando comparada a outras culturas, natureza não competitiva com o mercado de alimentos, além do grande potencial para sequestro de carbono da atmosfera e remoção de nutrientes inorgânicos, principalmente fósforo e nitrogênio, de águas residuárias (KLIGERMAN; BOUWER, 2015).

A viabilidade da produção de biodiesel a partir de microalgas está fortemente atrelada ao alto custo de produção de biomassa (KUO et al., 2015). Para ser economicamente viável, a produtividade de biomassa, o teor lipídios nas células e a escala de produção devem ser aumentadas (PANCHHA; CHOKSHI; MISHRA, 2015). Cultivos em ambiente externo (outdoor) são usualmente realizados em tanques abertos, que têm se destacado como um sistema para produção de microalgas com possibilidade de aumento de escala e baixo custo de operação e instalação (BENEMANN, 2013). Porém, em cultivo abertos a produtividade de biomassa é menor que cultivos em escala laboratorial ou fotobiorreatores, devido a contaminações e variações na temperatura e radiação (MATHIMANI et al., 2017)

Rocha et al. (2017) estudaram 10 linhagens de microalgas de água doce e indicaram as espécies *Scenedesmus obliquus* e *Scenedesmus bajacalifornicus* como potenciais para produção de biomassa, biodiesel e bioetanol. As microalgas do gênero *Scenedesmus* também têm se destacado devido à resistência a pragas, doenças e invasão de outras espécies em cultivos em tanques abertos (BENEMANN, 2013).

Em condições de estresse nutricional as microalgas podem elevar a quantidade de lipídio devido a mudanças nas vias metabólica, induzindo a síntese de lipídeos neutros (JI et al., 2018). A limitação no fornecimento de nitrogênio é a estratégia mais utilizada, pois afeta a síntese de proteínas e reduz a taxa de fotossíntese, alterando o metabolismo para síntese de ácidos graxos (ADAMS et al., 2013; SINGH et al., 2015 e MACHADO et al., 2016). O fósforo é um macronutriente importante nos processos metabólicos e sua carência é responsável por aumentar o teor de lipídeos neutros, porém isso pode acarretar a redução da produtividade de biomassa (XIN et al., 2010). Chu et al. (2014) verificaram em cultivos de *Scenedesmus obliquus* que a privação total de nitrogênio na forma de

nitrato e o fornecimento de fósforo em 45 mg L^{-1} na forma de ortofosfato foi responsável pela maior produtividade de lipídeos. Singh et al. (2015) observaram que o nitrogênio foi o fator mais importante para o acúmulo de lipídios, obtendo a máxima produtividade de lipídios em *Ankistrodesmus falcatus* com 0 mg L^{-1} de fósforo e 750 mg L^{-1} de nitrogênio.

Ao se produzir lipídios de microalgas, um aspecto importante a avaliar é o modo de cultivo (batelada, dois estágios e semi-contínuo), pois afeta fortemente a produtividade de biomassa e de lipídios (BENVENUTI et al., 2016). No cultivo em batelada a biomassa é colhida na fase estacionária, quando há a redução no crescimento celular devido ao esgotamento de nutrientes e autosombreamento devido a maior concentração de células (SLOCOMBE; BENEMANN, 2016). No cultivo denominado dois estágios, adaptação do modo batelada, as microalgas são cultivadas primeiramente para aumento da densidade celular e, logo após atingirem a fase estacionária, há a indução do acúmulo de lipídios com fornecimento de meio de cultura sem nitrogênio (XIA et al., 2013). Já no modo de cultivo semi-contínuo, as células nunca atingem a fase estacionária de crescimento e uma quantidade do material é colhido periodicamente ao atingir a concentração de biomassa pré-estabelecida, sendo o volume colhido repostado com meio de cultura (RICHMOND; HU, 2013).

Com o exposto, o presente trabalho avaliou a influência dos fatores dose de nitrogênio e fósforo sobre a produtividade de lipídios e composição de ácidos graxos. Além dos níveis de nitrogênio e fósforo, também foi avaliado a interação dos modos de cultivo (batelada, dois estágios e semi-contínuo), na produtividade de lipídeos das espécies de microalgas *Scenedesmus obliquus* BR003 e *Scenedesmus bajacalifornicus* BR024. Visando validar o estudo em aplicações comerciais, o desempenho da linhagem *S. obliquus* foi avaliado em cultivos em tanques abertos tipo raceway com 4000 L de capacidade.

4.2. MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1. Linhagens de microalgas

Duas linhagens de microalgas foram utilizadas, *Scenedesmus obliquus* BR003 e *Scenedesmus bajacalifornicus* BR024 pertencentes à Coleção de Microalgas do Laboratório de Biocombustíveis do Departamento de Engenharia Agrícola da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

O inóculo foi obtido após aclimação das linhagens, nas mesmas condições ambientais dos experimentos (meio de cultura, luz, temperatura e agitação), coletado na fase exponencial de crescimento, após aproximadamente 60 horas de luz com fotoperíodo de 12:12 h (luz:escuro). Logo após a coleta, o cultivo foi centrifugado a 3.939 xg, por 5 minutos a 4 °C, o sobrenadante descartado e as células ressuspendidas com o meio de cultura (MORSCHETT et al., 2017).

4.2.2. Condições de cultivo

O efeito de diferentes níveis de nitrogênio (10 mg L⁻¹, 50 mg L⁻¹, 100 mg L⁻¹, 150 mg L⁻¹ e 200 mg L⁻¹) e fósforo (5 mg L⁻¹, 25 mg L⁻¹ e 50 mg L⁻¹), e a interação com os modos de cultivo (batelada, dois estágios e semi-contínuo) sobre a produtividade de lipídios foram avaliados em experimento com delineamento inteiramente casualizado, com cultivos realizados em microplacas de 24 poços. Após a seleção dos níveis de nitrogênio e fósforo, e modos de cultivo que apresentaram maiores produtividades de lipídios, as microalgas foram cultivadas em tanque aberto tipo *raceway* para validar as melhores condições de cultivo.

Meio de cultura

Em todos os experimentos foram utilizados o meio de cultura L4-m proposto por Covell (2015) e modificado pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Biocombustíveis. O meio de cultura foi formulado com fertilizantes inorgânicos utilizando 176,33 mg L⁻¹ de cloreto de potássio (Heringer, Brasil), 45,96 mg L⁻¹ de sulfato de magnésio heptahidratado (Multitécnica, Brasil) e 15,65 mg L⁻¹ de sulfato de ferro monohidratado (Pigminas, Brasil). No experimento para avaliar o efeito dos níveis de nitrogênio e fósforo e os modos de cultivos, foram utilizados 5 níveis de nitrogênio (10, 50, 100, 150 e 200 mg L⁻¹) e 3 níveis de fósforo (5, 25 e 50 mg L⁻¹), utilizando a ureia (Heringer, Brasil) como fonte de nitrogênio e o monoamônio fosfato – MAP (Yara Brasil Fertilizantes, Brasil) como fonte de fósforo, ambos fertilizantes inorgânicos.

Os Reagentes de grau analítico foram utilizados para fornecimento dos micronutrientes conforme solução A5 proposto por Rippka (1979), com concentração final no meio de cultura de 2,86 mg L⁻¹ H₃BO₃, 1,81 mg L⁻¹ MnCl₂.4H₂O, 0,22 mg L⁻¹ ZnSO₄.7H₂O, 0,08 mg L⁻¹ CuSO₄.5H₂O, 0,02 mg L⁻¹ NaMoO₄.2H₂O e 0,05 mg L⁻¹ Co(NO₃)₂.6H₂O. Os meios de cultura utilizados em escala laboratorial, foram esterilizados em autoclave a 1 atm e 121 °C por 20 minutos (ANDERSEN, 2005). As desinfecções do tanque e do meio de cultura utilizado no cultivo em escala outdoor, foram

feitas por meio de gás ozônio, utilizando gerador de ozônio (O&L 50.0 RD, Ozone & Life, Brasil).

Cultivo em microplaca

Os cultivos foram realizados em microplacas de 24 poços (K12-024, KASVI, China) com volume útil do cultivo de 2 mL. A metodologia de triagem utilizada seguiu os procedimentos propostos por Han et al. (2012), Van Wageningen et al. (2014), Abdelaziz et al. (2014), Morschett et al. (2016) e Morschett et al. (2017) com algumas adaptações. As microplacas foram acondicionadas em sacos plásticos transparentes e herméticos, com atmosfera enriquecida com CO₂ na concentração de 10 % (v v⁻¹). Para evitar vazamentos e contaminação entre as unidades experimentais, a microplaca foi fechada com a tampa. Os cultivos foram mantidos em condições fotoautotróficas sob agitação em incubadora com fotoperíodo e agitação orbital (430-RFPDE, Nova Ética, Brasil) à 120 rpm, com temperatura de 25 ± 2 °C, fotoperíodo de 12:12 h (luz:escuro), e irradiância média de 114 μmol m⁻² s⁻¹ proveniente de 6 lâmpadas fluorescentes brancas de 14 W. Para esterilizar as microplacas, estas foram expostas a luz UV por 15 minutos.

Cultivo outdoor

O cultivo foi realizado entre os dias 20 de abril e 13 de julho, em tanque tipo *raceway*, com área superficial de 20 m² e volume útil de 4 m³ (altura da lâmina de 20 cm). O tanque foi construído com maior comprimento (10 m) no sentido Sudeste - Noroeste, dentro da Planta Piloto de Produção de Biomassa de Microalgas, Latitude 20° 46' 14,106" S e Longitude 42° 52' 25,084" W, anexo ao Laboratório de Biocombustíveis do Departamento de Engenharia Agrícola da Universidade Federal de Viçosa (Figura 8). A agitação do cultivo foi realizada por meio da injeção de ar produzido por compressor radial (CR-8, IBRAM, Brasil).

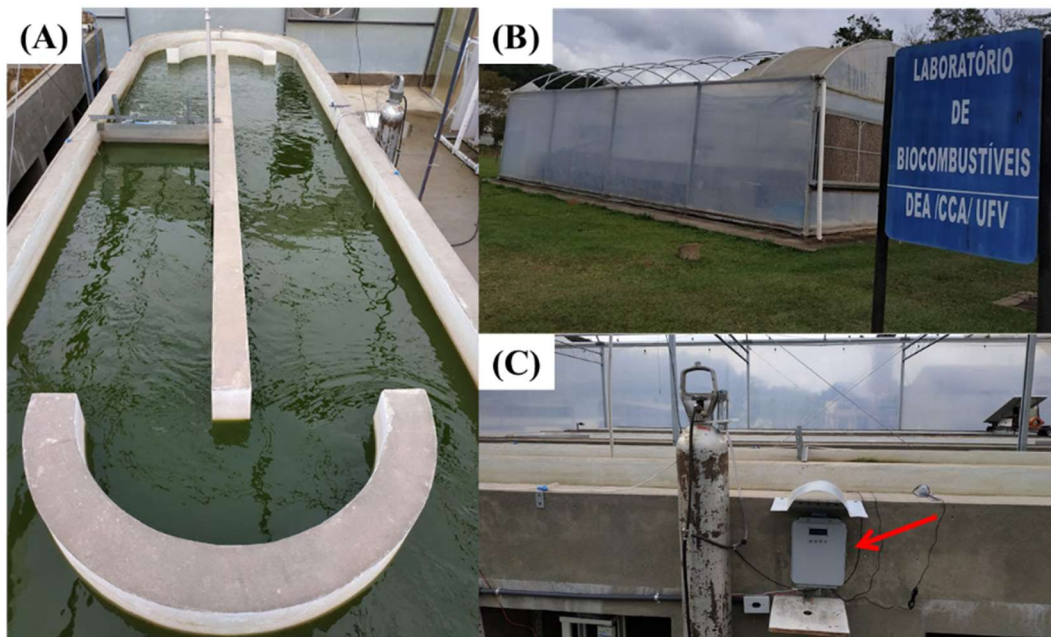


Figura 8: (A) Tanque tipo Raceway de 4 m³ com cultivo de microalgas, (B) planta piloto de produção de microalgas e (C) sistema de monitoramento dos parâmetros (temperatura, pH e radiação) em tempo real, e cilindro de gás para armazenamento do gás de combustão da biomassa.

O carbono foi disponibilizado aos cultivos por meio de gases de combustão de biomassa com concentração de aproximadamente 12 % de CO₂. O gás foi produzido em incinerador, lavado para retirada de compostos ácidos e cinzas, e aplicado ao cultivo por difusores espalhados pelo tanque (Figura 9). O pH do cultivo foi mantido entre 6,5 e 7,5, controlado pela adição de soluções de HCl ou NaOH. O plástico transparente da cobertura da casa de vegetação foi retirado para permitir maior incidência da radiação fotossinteticamente ativa (PAR). Dessa forma, a temperatura do cultivo e o fotoperíodo seguiram as condições naturais apresentados pelo clima local.

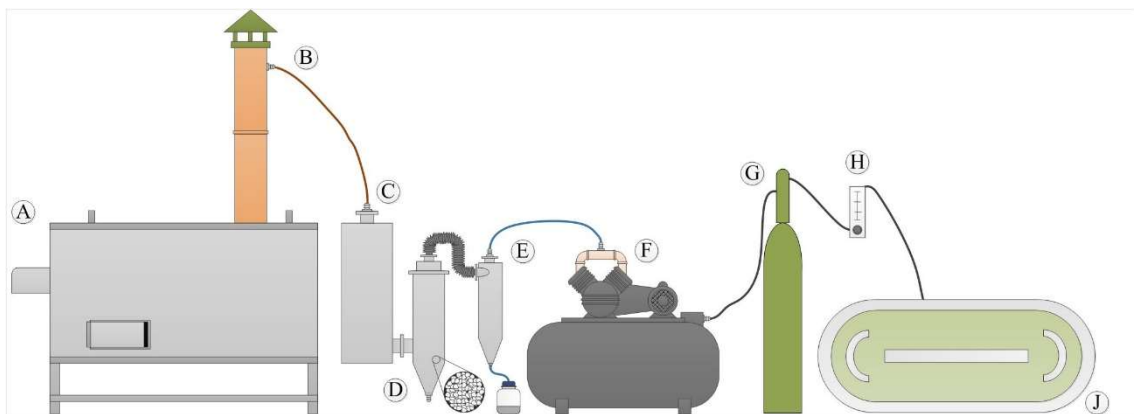


Figura 9: Esquema do sistema para produção de gás de combustão, purificação, armazenamento e fornecimento aos cultivos de microalgas. (A) Incinerador, (B) ponto de coleta do gás, (C) recipiente para resfriamento, (D) filtro para retirada dos compostos ácidos, (E) ciclone para retirada de partículas, (F) compressor, (G) cilindro de armazenamento, (H) rotâmetro para regulagem da vazão e (J) tanque de cultivo de microalgas.

As medidas de radiação fotossinteticamente ativa (PAR), temperatura ambiente, temperatura do tanque, pH e nível da lâmina do cultivo foram armazenadas em intervalos de 60 segundos, em cartão de memória tipo SD do sistema de monitoramento em tempo real, instalado no tanque tipo raceway (Figura 8C), e desenvolvida pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Biocombustíveis do DEA/UFV. Os dados entre os dias de cultivo 20 e 27, foram desconsiderados, pois nesse período foram realizadas as calibrações e ajustes do sistema.

4.2.3. Modos de cultivo

Foram avaliados os modos de cultivo em batelada, dois estágios, semi-contínuo com coleta em 1 dia e semi-contínuo com coleta em 2 dias, com monitoramento diário da concentração de biomassa realizada por densidade ótica a 750 nm, com leituras de absorvâncias realizadas em espectrofotômetro (multiskan GO, Thermo scientific, Alemanha).

Estudos preliminares de caracterização da curva de crescimento, definiu o tempo de cultivo em 8 dias para modo batelada, e 12 dias para o modo dois estágios em microplaca. Em cultivos em Erlenmeyer o tempo foi de 13 dias para o modo batelada e 17 dias para o modo dois estágios. Durante o cultivo em batelada não foi realizada nenhuma intervenção. O modo de cultivo dois estágios foi dividido em duas fases: primeiro houve o aumento na concentração de biomassa no intervalo de tempo igual ao tempo de cultivo do modo batelada; no segundo estágio, a biomassa foi separada por meio de centrifugação (5.000 g por 5 minutos), o sobrenadante descartado e o meio de cultura sem nitrogênio adicionado, e cultivado por um período adicional de 4 dias, para aumentar acúmulo de lipídios nas células.

No modo semi-contínuo o intervalo de tempo de cultivo foi de 8 dias para cultivos em microplaca e de 13 dias para cultivo em frascos Erlenmeyer. No modo com frequência de coleta em 2 dias, a biomassa foi coletada na quantidade de 30 a 50 % do volume do cultivo, já com frequência de coleta de 1 dia, a quantidade de biomassa coletada diariamente foi de 10 – 30 % do volume do cultivo. O volume de cultivo coletado foi repostado com meio de cultura fresco, para manter o mesmo volume. O volume coletado depende da concentração inicial desejada para o próximo ciclo, que deve ser igual a concentração inicial do ciclo anterior.

4.2.4. Caracterização do crescimento dos cultivos

O crescimento das microalgas foi monitorado com leitura diária da absorbância do cultivo no comprimento de onda 750 nm, utilizando espectrofotômetro (multiskan GO, Thermo scientific, Alemanha). A absorbância é usada frequentemente como medida rápida e não destrutiva para estimar a concentração de biomassa em cultivos de microalgas. Griffiths et al. (2011) observaram que o comprimento de onda 750 nm é o mais recomendado.

Nos cultivos em frascos Erlenmeyer uma alíquota foi retirada e a absorbância foi lida em microplacas de 96 poços, já para os cultivos em microplacas de 24 poços, a absorbância foi lida diretamente nas placas de cultivo. A biomassa seca livre de cinzas foi determinada conforme metodologia proposta por Griffiths et al. (2011). As equações abaixo representam a relação entre a absorbância no comprimento de onda 750 nm e a concentração de biomassa seca livre de cinzas (g L^{-1}). Para as leituras em microplacas de 24 poços, utilizaram as equações 8 e 9, enquanto que para as leituras realizadas em microplacas de 96 poços, utilizaram as equações 10 e 11 para as linhagens *S. obliquus* e *S. bajacalifornicus*, respectivamente:

$$y = 0,6464 x + 0,1600 \quad (R^2 = 0,9962) \quad (8)$$

$$y = 0,5857 x + 0,1609 \quad (R^2 = 0,9966) \quad (9)$$

$$y = 0,5794 x - 0,0059 \quad (R^2 = 0,9955) \quad (10)$$

$$y = 0,5566 x - 0,0213 \quad (R^2 = 0,9982) \quad (11)$$

em que:

y é o valor da absorbância ($\text{OD}_{750\text{nm}}$);

x é o valor da biomassa seca livre de cinzas (g L^{-1});

R^2 é o coeficiente de correlação.

A taxa específica de crescimento (μ) foi calculada conforme equação 12, descrita por Andersen (2005). No modo batelada o intervalo de tempo utilizado para calcular a taxa específica de crescimento foi de 8 dias, no modo dois estágios 12 dias, enquanto no modo semi-contínuo 2 dias o intervalo foi de 2 dias e 1 dia para o modo com frequência de coleta de 1 dia. Nos modos semi-contínuo os resultados apresentados referem-se às médias dos ciclos de cultivo:

$$\mu = \frac{\ln C_f - \ln C_i}{t_f - t_i} \quad (12)$$

em que:

μ é a taxa específica de crescimento (dia^{-1});

$\ln C_i$ é o logaritmo natural da concentração inicial de biomassa do cultivo (g L^{-1});

$\ln C_f$ é o logaritmo natural da concentração final de biomassa do cultivo (g L^{-1});

$t_f - t_i$ é o intervalo de tempo (dias).

A produtividade de biomassa dos cultivos foi calculada conforme a equação 13. No modo batelada o intervalo de tempo utilizado para calcular a produtividade de biomassa foi de 8 dias, no modo dois estágios 12 dias, enquanto no modo semi-contínuo 2 dias o intervalo foi de 2 dias e 1 dia para o modo com frequência de coleta de 1 dia. Nos modos semi-contínuo os resultados apresentados referem-se às médias dos ciclos de cultivo:

$$P_B = \frac{C_f - C_i}{t} \quad (13)$$

em que:

P_B é a produtividade de biomassa ($\text{mg L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$);

C_i é a concentração inicial de biomassa do cultivo (mg L^{-1});

C_f é a concentração final de biomassa do cultivo (mg L^{-1});

t é o intervalo de tempo (dias).

4.2.5. Determinação de pigmentos

A determinação dos pigmentos clorofila a e clorofila b, foi feita conforme descrito por Pancha et al. (2014), em que uma amostra de 2 mL do cultivo foi centrifugada a 10.000 rpm por 5 minutos, e o sobrenadante descartado. Posteriormente foi adicionado metanol 99,9% ao pellet, e após agitação para homogeneizar, foi incubado no escuro por 24 horas a 45 °C. Após esse período, foi feita a leitura no espectrofotômetro (multiskan GO, Thermo scientific, Alemanha) nos comprimentos de onda de 470, 652,4 e 665,2. Para reduzir a influência da turbidez, as absorbâncias foram subtraídas do comprimento de 750 nm. O conteúdo dos pigmentos foi determinado pelas equações 14 e 15, proposta por Lichtenthaler (1987):

$$\text{Clorofila a } (\mu\text{g/mL}) = 16,72 \text{ OD}_{665,2} - 9,16 \text{ OD}_{652,4} \quad (14)$$

$$\text{Clorofila b } (\mu\text{g/mL}) = 34,09 \text{ OD}_{652,4} - 15,28 \text{ OD}_{665,2} \quad (15)$$

4.2.6. Quantificação de lipídios neutros totais (TAG)

A quantificação de lipídios neutros pelo método gravimétrico demanda muito tempo e requerem grandes volumes de amostra e solventes. Diante disso, devido à grande quantidade de unidades amostrais e pequeno volume de amostras nos cultivos em microplaca, utilizou-se do método da fluorescência com o corante vermelho do Nilo,

segundo Singler et al. (2012) com adaptações para determinar os lipídios neutros intracelulares.

A concentração da amostra do cultivo foi ajustada entre 0,05 e 0,06 OD_{750nm}, ou seja, cerca de 100 mg L⁻¹. Uma alíquota de 2 mL dessa amostra diluída foi centrifugada a 11.000 xg por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e ao centrifugado foi adicionado 2 mL de etanol 30 % (v v⁻¹). Alíquotas de 200 µL do extrato foram pipetados em triplicata para microplaca de 96 poços com fundo preto (Ref 353376, Falcon, Alemanha) e foram adicionados 4 µL da solução de vermelho do Nilo (50 µg mL⁻¹ em etanol). A concentração final do corante na amostra foi de 1 µg mL⁻¹. A microplaca foi então incubada por 10 minutos a 40 °C com agitação de 400 rpm. A intensidade de fluorescência do corante foi medida em fluorímetro (Victor X5, Perkin Elmer, EUA), utilizando filtros de 485 nm para excitação e 595 nm para emissão. O fluorímetro utilizado pertence a Unidade de Crescimento de Plantas da UFV. Para quantificação dos lipídios neutros, utilizou-se a trioleína (Glyceryl trioleate, Sigma-Aldrich, EUA) como padrão. Inicialmente a trioleína foi diluída em solução de isopropanol e clorofórmio (19:1), obtendo solução estoque com concentração de 1 mg mL⁻¹ conforme proposto por Alonzo e Mayzaud (1999). A partir dessa solução, foi obtida uma curva padrão com concentração de 0 a 20 mg L⁻¹ de trioleína em etanol 30 % (v v⁻¹).

A metodologia analítica foi validada pela utilização de amostras de microalgas com teores de TAG conhecidos em todas as análises. O detalhamento dessa validação, assim como as equações de regressão linear utilizadas para converter a intensidade de fluorescência em concentração de lipídios neutros, encontram-se no Apêndice A.

A produtividade de lipídeos neutros foi calculada conforme a equação 16:

$$P_{LN} = P_{BM} \times T \quad (16)$$

em que:

P_{LN} é a produtividade de lipídeos neutros (mg L⁻¹ dia⁻¹);

P_{BM} é a produtividade de biomassa (mg L⁻¹ dia⁻¹);

T é o teor de lipídeos neutros na biomassa (decimal).

A unidade relativa de fluorescência (RFU) foi medida para ambas linhagens de microalgas cultivadas em salinidade e modos de cultivo diferentes, e normalizada pela absorvância da amostra no comprimento de onda 750 nm (OD₇₅₀). O quociente do RFU e OD₇₅₀ é um valor normalizado que permite expressar a intensidade de fluorescência em todos os tratamentos, permitindo comparações de forma independente da densidade celular.

4.2.7. Extração dos lipídios totais

A extração e quantificação dos lipídios totais foi realizada pelo método J:Schmid-Bondzynski-Ratzlaff (INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION, 1986), modificado pelo grupo de pesquisa em microalgas do Laboratório de Biocombustíveis (DEA/UFV) em parceria com a Petrobras, apresentado em detalhes no apêndice B.

4.2.8. Perfil de ácidos graxos

Para obtenção do perfil de ácidos graxos dos lipídios das linhagens em estudo, as amostras de óleo foram convertidas em ésteres metílicos (FAMES), seguindo a metodologia proposta por Ichihara e Fukubayashi (2010). Amostras de óleo de microalgas foram diluídas em solução de clorofórmio:metanol (2:1) e os lipídios transesterificados com a adição de solução de HCl a 8% (v/v) em metanol, seguido de incubação a 100 °C por 1 h. Os FAMES foram extraídos usando hexano, que foi coletado da fase superior após centrifugação e injetado em cromatógrafo a gás com Detector por Ionização de Chamas (GC-FID) (Shimadzu, GC-2010, Japão) equipado com coluna capilar de 100 m x 0,25 mm (SP-2560, Sigma-Aldrich, EUA). A análise foi feita por injeção direta de 1 µL da amostra. O gás hélio foi utilizado como gás de arraste e mantido em vazão constante e pressão de 363 kPa. Os FAMES foram separados utilizando uma rampa de aquecimento linear de 60 °C para 330 °C a uma taxa de aquecimento de 20 °C min⁻¹, e alta velocidade linear para melhor resolução de picos. A identificação dos picos foi confirmada pela comparação com a mistura padrão de FAMES (SupleCo 37 FAME mix).

4.2.9. Análise estatística

Para determinar o efeito da interação entre as doses de nitrogênio e fósforo e os modos de cultivo, sobre a produtividade de biomassa e de lipídios, utilizou-se o teste de agrupamento de Scott-Knott. O Scott-Knott é um método de comparação múltipla baseado em análise de agrupamento univariada que separa as médias estudadas em diferentes grupos homogêneos. Para avaliar o efeito da interação do nitrogênio e fósforo para produtividade de lipídios, foi realizada a regressão múltipla. ANOVA para verificar a significância das médias.

4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1. Efeito das concentrações de N e P e modos de cultivo na produtividade de biomassa

As microalgas foram cultivadas em diferentes concentrações de nitrogênio e fósforo, em quatro modos de cultivo (batelada, dois estágios e semi-contínuo com coleta diária e semi-contínuo com coleta em 2 dias) para avaliar o efeito no crescimento das células e produtividade de lipídios. A Figura 10 e Figura 11 apresentam a produtividade de biomassa para as linhagens *S. obliquus* e *S. bajacalifornicus*, respectivamente.

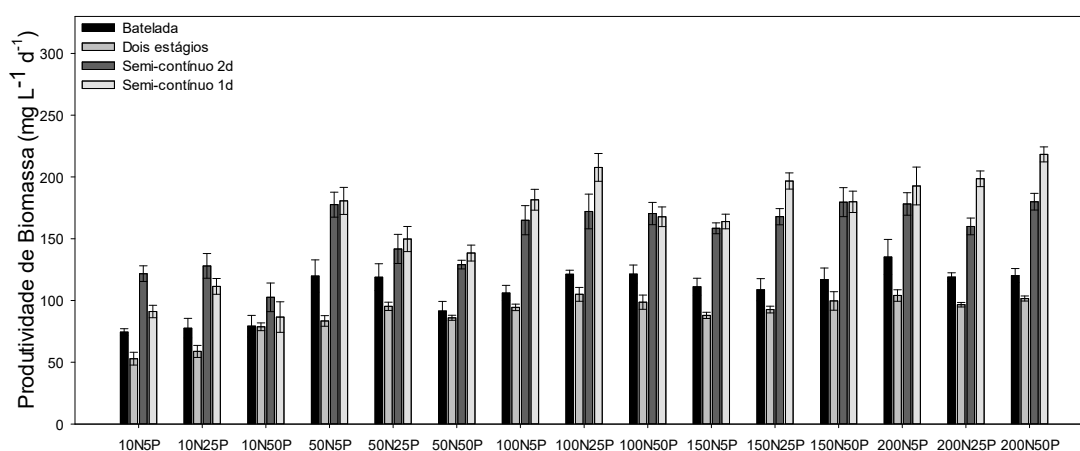


Figura 10: produtividade de biomassa em microalgas *S. obliquus* em tratamentos com 5 níveis de nitrogênio e 3 níveis de fósforo em mg L⁻¹, em 4 modos de cultivos diferentes. As barras indicam o erro padrão.

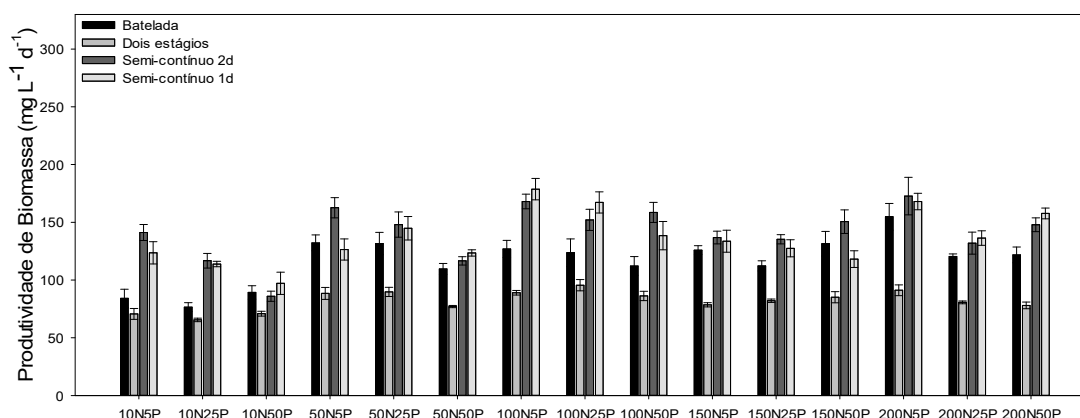


Figura 11: produtividade de biomassa em microalgas *S. bajacalifornicus* em tratamentos com 5 níveis de nitrogênio e 3 níveis de fósforo em mg L⁻¹, em 4 modos de cultivos diferentes. As barras indicam o erro padrão.

A maior produtividade de biomassa P_{BM} foi observada na linhagem *S. obliquus* no modo de cultivo semi-contínuo 1 dia com 218,2 mg L⁻¹ d⁻¹, com as doses de 200 mg L⁻¹ de nitrogênio e 50 mg L⁻¹ de fósforo. Para a linhagem *S. bajacalifornicus* a maior

produtividade foi obtida nos modos de cultivo semi-contínuo 1 dia e 2 dias com 178,7 mg L⁻¹ d⁻¹ com as doses de 100 mg L⁻¹ de nitrogênio e 5 mg L⁻¹ de fósforo e 172,7 mg L⁻¹ d⁻¹ com as doses de 200 mg L⁻¹ de nitrogênio e 5 mg L⁻¹ de fósforo, não havendo diferença estatística entre os valores ($p > 0,05$). No modo batelada as maiores produtividades foram de 135,3 mg L⁻¹ d⁻¹ e 154,7 mg L⁻¹ d⁻¹ para *S. obliquus* e *S. bajacalifornicus*, respectivamente, ambas obtidas com a dose de 200 mg L⁻¹ de nitrogênio e 5 mg L⁻¹ de fósforo. As maiores produtividades no modo dois estágios para as linhagens *S. obliquus* e *S. bajacalifornicus*, foram respectivamente, 105,0 mg L⁻¹ d⁻¹ e 95,5 mg L⁻¹ d⁻¹, obtidas com a dose de 100 mg L⁻¹ de nitrogênio e 25 mg L⁻¹ de fósforo, para ambas as linhagens. A produtividade alcançada no modo dois estágios é aproximadamente metade das maiores produtividades alcançadas no modo semi-contínuo para as duas linhagens.

Para determinar o efeito da interação de diferentes níveis de nitrogênio e para a produtividade de biomassa em cada modo de cultivo e linhagem, foi realizada a análise de regressão múltipla polinomial, cujos coeficientes são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6: Coeficientes das equações de regressão polinomial para produtividade de biomassa (P_{BM}) em função das concentrações de nitrogênio (N) e fósforo (P) para as linhagens *S. obliquus* e *S. bajacalifornicus*.

Modos de cultivo		Equação: $P_{BM} = a + bN + cN^2 + dP + eP^2$					
		a	b	c	d	e	r ²
<i>Scenedesmus obliquus</i>	Batelada	78,46	0,5411*	-0,0016 ^{NS}	0,0639 ^{NS}	-0,0026 ^{NS}	0,680048
	Dois estágios	55,61	0,5179*	-0,0017*	0,3389 ^{NS}	-0,0028 ^{NS}	0,771840
	Semi-contínuo 2d	119,08	0,8034**	-0,0026*	-0,4789 ^{NS}	0,0055 ^{NS}	0,747935
	Semi-contínuo 1d	83,47	1,2481**	-0,0036*	1,2956 ^{NS}	-0,0251 ^{NS}	0,827087
<i>Scenedesmus bajacalifornicus</i>	Batelada	97,93	0,5856*	-0,0018 ^{NS}	-0,9893 ^{NS}	0,0132 ^{NS}	0,640630
	Dois estágios	69,82	0,3341**	-0,0014*	0,0153 ^{NS}	-0,0019 ^{NS}	0,584592
	Semi-contínuo 2d	134,14	0,6247*	-0,0023 ^{NS}	-1,4897 ^{NS}	0,0172 ^{NS}	0,579727
	Semi-contínuo 1d	121,15	0,5027 ^{NS}	-0,0016 ^{NS}	-0,3841 ^{NS}	-0,0007 ^{NS}	0,458238

** Significativo a nível de 1% de probabilidade pelo teste t, * Significativo a nível de 5% de probabilidade pelo teste t, NS – Não significativo a nível de 5% de probabilidade pelo teste t.

O modelo de regressão múltipla representa a relação entre a variável dependente (produtividade de biomassa) e as variáveis independentes (concentração de nitrogênio e fósforo). Na tabela 6 os coeficientes *b* e *c* representam o efeito do nitrogênio e interação deste, enquanto os coeficientes *d* e *e* representam o efeito do fósforo e sua interação para a produtividade de biomassa. Pela análise do valor de significância do teste *t* a nível de 5% de probabilidade, constata-se que a concentração de nitrogênio afeta de forma

significativa a produtividade de biomassa em todos os modos de cultivo nas duas linhagens, exceto no modo semi-contínuo 1 dia para a espécie *S. bajacalifornicus*, em que não foi significativo a nível de 5%. No entanto, não foi observado efeito significativo para o fósforo nas concentrações entre 5 e 50 mg L⁻¹ para produtividade de biomassa. O intervalo das concentrações de fósforo estudadas, engloba os principais meios de cultura utilizados para microalgas verdes, como: BG-11 com dose de 7,11 mg L⁻¹ (ANDERSEN *et al.*, 2005); Bold Basal Modificado (BBM) com dose de 38,7 mg L⁻¹ (ANDERSEN *et al.*, 2005).

Para obter os pontos de máxima produtividade de biomassa em função dos níveis de nitrogênio, calculou-se o ponto de máximo pela derivada das equações apresentadas na Tabela 6. A Tabela 7 apresenta as concentrações de nitrogênio calculadas que resultaram na máxima produtividade de biomassa.

Tabela 7: Concentrações de nitrogênio para máxima produtividade de biomassa (P_{BM}) das linhagens *S. obliquus* e *S. bajacalifornicus* em função do modo de cultivo.

Modos de cultivo	Nitrogênio (mg L ⁻¹)	
	<i>S. obliquus</i>	<i>S. bajacalifornicus</i>
Batelada	145,01	170,15
Dois estágios	152,35	122,85
Semi-contínuo 2d	154,50	214,72
Semi-contínuo 1d	171,45	NS

NS – Não significativo a nível de 5% de probabilidade pelo teste t.

Por meio da análise dos resultados da Figura 10, Figura 11 e Tabela 6, pode-se constatar que o modo de cultivo afeta a produtividade de biomassa e que apenas a concentração de nitrogênio foi responsável pelo aumento da mesma. O cultivo de microalgas em modo semi-contínuo é responsável por maiores produtividades de biomassa quando comparado com o modo batelada (ADAMS *et al.*, 2013; BENVENUTI *et al.*, 2016 e TAN *et al.*, 2018), pois as células se mantêm sempre na fase exponencial de crescimento (HO *et al.*, 2014). O modo de cultivo dois estágios apresentou menores valores de produtividade de biomassa devido ao aumento do tempo de cultivo em 50%, não havendo diferença ($p > 0,05$) na concentração final de biomassa quando comparada ao modo batelada. Pancha *et al.* (2015) também observaram que o modo de cultivo dois estágios não afetou a concentração final de biomassa. Em relação ao fósforo, os níveis utilizados nos experimentos não apresentaram efeito significativo. Chu *et al.* (2014) observaram em cultivo de *S. obliquus* que a adição de 3 mg L⁻¹ de fósforo ao meio de cultura foi suficiente para manter a concentração final de biomassa igual ao tratamento

controle (45 mg L^{-1}). Soares et al. (2017) verificaram em estudo com *Scenedesmus obliquus* BR003, que a maior produção de lipídios foi obtida com a dose de $0,6875 \text{ g L}^{-1}$ do fertilizante monoamônio fosfato (MAP), equivalente a $12,4 \text{ mg L}^{-1}$ de fósforo. Desta forma, as maiores produtividades de biomassa podem ser obtidas com o modo semi-contínuo, com a dose mínima de fósforo para as duas linhagens em estudo (5 mg L^{-1}).

4.3.2. Efeito da interação de N e P aos modos de cultivo na produtividade de lipídios

A produtividade de lipídios, produto da concentração da biomassa do cultivo em um intervalo de tempo pelo teor de lipídios, foi maior na linhagem *S. obliquus* (Figura 12A) no modo de cultivo semi-contínuo 2 dias com $17,3 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Para a linhagem *S. bajacalifornicus* (Figura 13A) a maior produtividade foi obtida no modo de cultivo dois estágios com $15,8 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. No modo batelada as maiores produtividades foram de $11,8$ e $12,8 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ para *S. obliquus* e *S. bajacalifornicus*, respectivamente.

Na Figura 12B e Figura 13B é possível observar que o teor de lipídios neutros nas células apresentou valores similares entre as linhagens. Os maiores teores foram observados no modo de cultivo em dois estágios com $23,6 \%$ e $22,4 \%$, representando um aumento de $53,8\%$ e $47,3\%$ quando comparado aos maiores teores encontrados no modo batelada para *S. obliquus* e *S. bajacalifornicus*, respectivamente, que pode ser considerado como um modo de cultivo de referência. Os modos semi-contínuo 2 dias e 1 dia apresentaram os menores teores de lipídios neutros com $11,0 \%$ e $8,71\%$ para *S. obliquus* e $10,5 \%$ e $8,98 \%$ para *S. bajacalifornicus*, uma redução de $28,3 \%$ e $42,7 \%$ para *S. obliquus* e $31,5 \%$ e $40,9 \%$ para *S. bajacalifornicus* em comparação com o modo batelada.

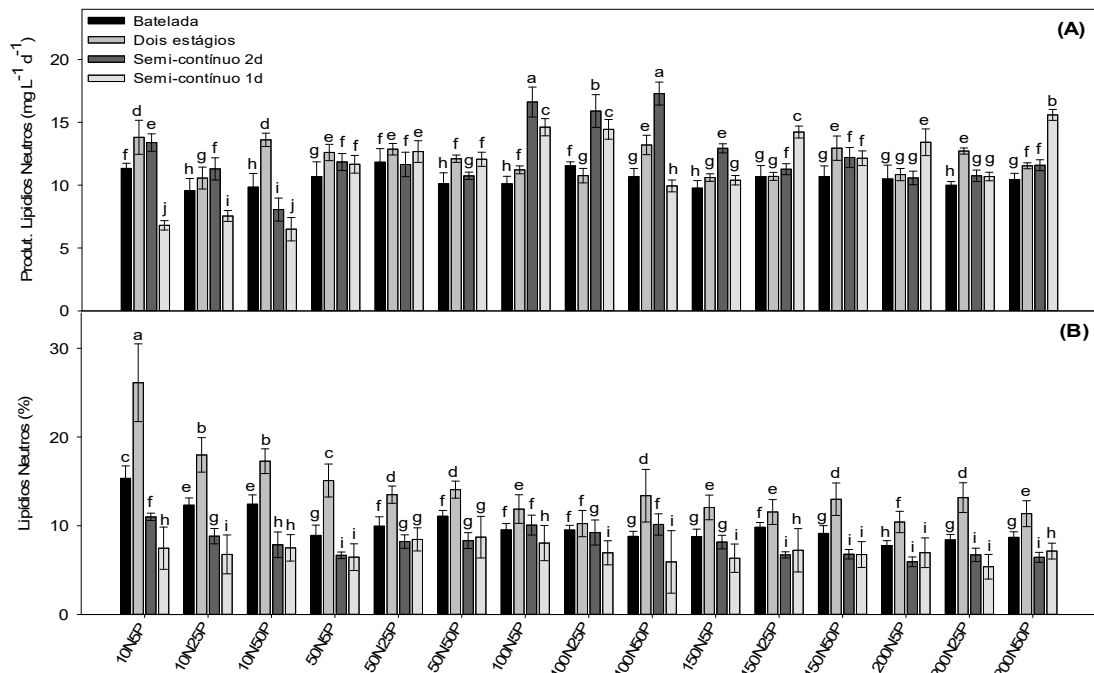


Figura 12: (A) produtividade e (B) teor de lipídios neutros em microalgas *S. obliquus* em tratamentos com níveis diferentes de nitrogênio e fósforo. As barras indicam o erro padrão. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de agrupamento de Scott-Knott (5%).

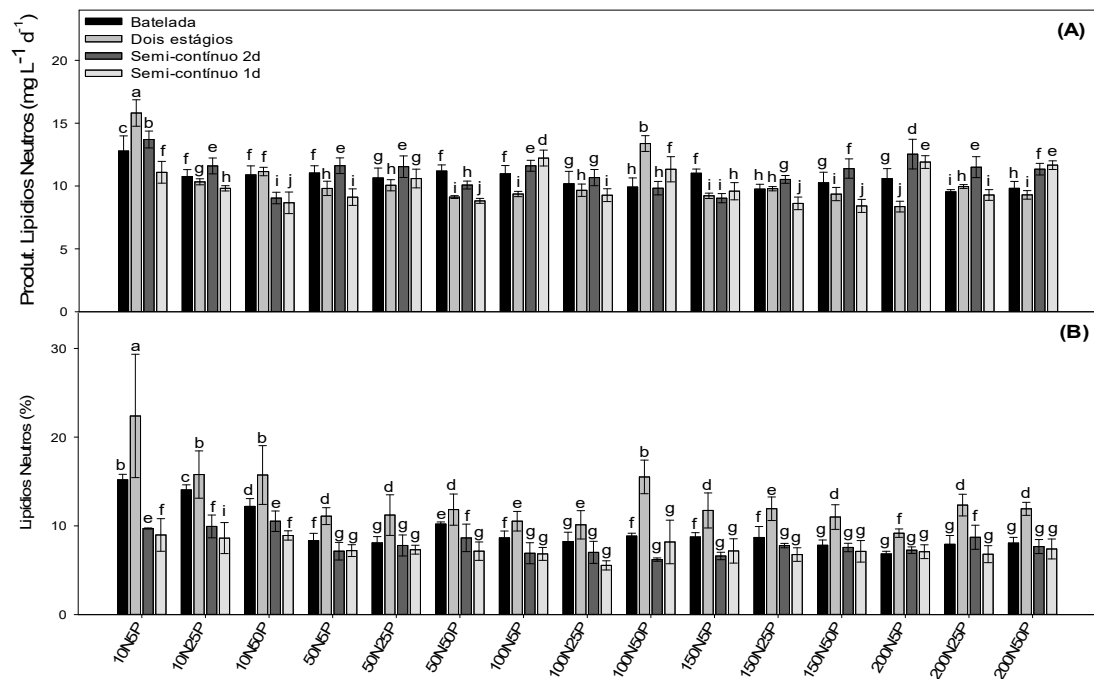


Figura 13: (A) produtividade e (B) teor de lipídios neutros em microalgas *S. bajacalifornicus* em tratamentos com níveis diferentes de nitrogênio e fósforo. As barras indicam o erro padrão. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de agrupamento de Scott-Knott (5%).

Para determinar o efeito dos níveis de nitrogênio e fósforo na produtividade de lipídio em cada modo de cultivo e linhagem, foi realizada a análise de regressão múltipla, obtendo-se as equações descritas na Tabela 8.

Tabela 8: Coeficientes das equações de regressão polinomial para produtividade de lipídios neutros (P_{LN}) em função das concentrações de nitrogênio (N) e fósforo (P) para as linhagens *S. obliquus* e *S. bajacalifornicus*.

Modos de cultivo		Equação: $P_{LN} = a + bN + cN^2 + dP + eP^2$					
		a	b	c	d	e	r ²
<i>Scenedesmus obliquus</i>	Batelada	10,12	0,0097 ^{NS}	-0,00005 ^{NS}	0,0299 ^{NS}	-0,0006 ^{NS}	0,154034
	Dois estágios	13,02	-0,0169 ^{NS}	0,00005 ^{NS}	-0,0553 ^{NS}	0,0013 ^{NS}	0,357993
	Semi-contínuo 2d	10,53	0,0917*	-0,00043*	-0,0696 ^{NS}	0,0008 ^{NS}	0,485696
	Semi-contínuo 1d	6,45	0,0926*	-0,00032 ^{NS}	0,0627 ^{NS}	-0,0012 ^{NS}	0,585239
<i>Scenedesmus bajacalifornicus</i>	Batelada	12,71	-0,0144*	0,00003 ^{NS}	-0,0984**	0,0014**	0,831534
	Dois estágios	12,66	0,0298 ^{NS}	0,00008 ^{NS}	0,0594 ^{NS}	0,0011 ^{NS}	0,292261
	Semi-contínuo 2d	12,60	-0,0257 ^{NS}	0,00012 ^{NS}	-0,0221 ^{NS}	-0,0002 ^{NS}	0,360628
	Semi-contínuo 1d	11,25	-0,0057 ^{NS}	0,00004 ^{NS}	-0,1126 ^{NS}	0,0016 ^{NS}	0,231232

** Significativo a nível de 1% de probabilidade pelo teste t, * Significativo a nível de 5% de probabilidade pelo teste t, NS – Não significativo a nível de 5% de probabilidade pelo teste t.

Pela análise do valor de significância do teste t a nível de 5% de probabilidade, pode-se afirmar que a variação da concentração de nitrogênio afeta a produtividade de lipídios neutros nos modos de cultivo semi-contínuo 2 dias e 1 dia, para a linhagem *S. obliquus*. Os pontos de máxima P_{LN} , calculados pela derivada da equação quadrática (Tabela 8), foram obtidos para as concentrações de nitrogênio de 106,7 e 69,7 mg L⁻¹, respectivamente. A linhagem *S. bajacalifornicus* apresentou, no modo batelada, efeito significativo dos níveis de nitrogênio e fósforo para a produtividade de lipídios, porém a equação da regressão obtida forneceu o ponto de mínima P_{LN} .

Embora sejam espécies do mesmo gênero, as linhagens apresentaram respostas diferentes de produtividade de lipídios neutros nos modos de cultivo. A linhagem *S. obliquus* apresentou maior P_{LN} no modo semi-contínuo 2 dias, enquanto *S. bajacalifornicus* foi mais produtiva no modo dois estágios. Essa discrepância entre o modo de cultivo mais produtivo é resultado da maior produtividade de biomassa da linhagem *S. obliquus*, pois os teores de lipídios neutros foram similares entre as linhagens. Rocha et al. (2017) também observaram que a linhagem *S. obliquus* apresentou maior concentração final de biomassa quando comparado com *S. bajacalifornicus*.

O modo semi-contínuo apresentou altas produtividades de biomassa com baixo teor de lipídios (Figura 10, Figura 11, Figura 12 e Figura 13), visto que o fornecimento frequente de meio de cultura com nitrogênio favoreceu o crescimento de células em detrimento ao acúmulo de lipídios (HO et al., 2014). Por consequência, os menores teores de lipídios neutros obtidos no modo semi-contínuo resultarão em custos mais elevados para operações de coleta, concentração da biomassa, rompimento celular e extração de óleo para produção de biodiesel (BENVENUTI et al., 2016). Além disso, os altos teores de lipídios estruturais polares (fosfolipídios e glicolipídios) dificultam a extração seletiva de lipídios neutros (ISLAM, et al., 2017). Em relação a nutrição das células, não houve efeito significativo da concentração de fósforo para a produtividade de lipídios, embora as concentrações de nitrogênio adotadas afetaram apenas o cultivo de *S. obliquus* em modo semi-contínuo. Adams et al. (2013) verificaram para cultivo de *Neochloris oleoabundans* que altas produtividades de lipídios no modo semi-contínuo podem ser obtidas com maiores doses de nitrogênio.

O modo de cultivo em dois estágios, utilizando a dose mínima de nitrogênio e fósforo, apresenta-se como uma ótima estratégia para atingir altas produtividades de lipídios neutros e menor custo para extração do óleo nas linhagens *S. obliquus* e *S. bajacalifornicus*. Xia et al. (2013) e Ra et al. (2015) também observaram que o modo de cultivo dois estágios é uma estratégia adequada para aumento da produtividade de lipídios.

4.3.3. Efeito de N e P e modos de cultivo nos pigmentos

Os pigmentos foram quantificados ao final dos cultivos em todos os modos e linhagens trabalhadas. A Tabela 9 apresenta os teores de clorofilas totais e a relação entre clorofila a/b. Os maiores teores de clorofilas totais (clorofila a + b) foram encontrados no modo batelada com 34,3 mg g⁻¹ e 23,5 mg g⁻¹, enquanto os menores teores foram obtidos no modo dois estágios com 0,14 mg g⁻¹ e 1,21 mg g⁻¹ para *S. obliquus* e *S. bajacalifornicus*, respectivamente. Rocha et al. (2017) não verificaram diferença significativa nos teores de clorofila a e b entre as linhagens *S. obliquus* e *S. bajacalifornicus*.

É possível observar na Tabela 9 que os menores teores de clorofilas totais foram obtidos nos cultivos com 10 mg L⁻¹ de nitrogênio, assim como a relação clorofila a/b que apresentou menores valores nos cultivos em menores concentrações de nitrogênio, de forma mais pronunciada nos modos batelada e dois estágios na linhagem *S. obliquus*.

A limitação de nitrogênio no meio de cultura é responsável por reduzir os teores de pigmentos nas células de microalgas (MACHADO et al., 2016), esse fenômeno é chamado de “branqueamento” mudando a cor do cultivo de verde para amarelo (MOUSSA et al., 2017). No entanto, a microalga mantém um equilíbrio entre todos os pigmentos para utilização eficiente de carbono e energia (PANCHHA et al., 2014). A relação clorofila a/b indica o estado de estresse da célula, e o aumento dessa razão indica redução na atividade fotossintética (ZHANG et al., 2013). Moussa et al. (2017) observaram em *Tetraselmis marina* uma redução nos teores de clorofila total na fase estacionária, relacionada com a falta de nutrientes, e redução na relação clorofila a/b como estratégia de adaptação às condições de sombreamento.

Tabela 9: Teores de clorofila total (clorofila a + b) e relação entre clorofila a/b em quatro modos de cultivo e tratamentos com 5 níveis de nitrogênio e 3 níveis de fósforo, para as linhagens *S. obliquus* e *S. bajacalifornicus*.

Tratamentos	Relação N:P	Batelada		Dois estágios		Semi-contínuo 2 dias		Semi-contínuo 1 dia		
		Clorofila Total (mg g ⁻¹)	Clorofila a/b (taxa)	Clorofila Total (mg g ⁻¹)	Clorofila a/b (taxa)	Clorofila Total (mg g ⁻¹)	Clorofila a/b (taxa)	Clorofila Total (mg g ⁻¹)	Clorofila a/b (taxa)	
<i>Scenedesmus obliquus</i>	10N5P	2	1,42 ± 0,11	0,71 ± 0,05	0,14 ± 0,09	0,76 ± 0,06	1,57 ± 0,08	1,20 ± 0,05	1,54 ± 0,16	0,91 ± 0,03
	10N25P	0,4	3,81 ± 0,90	1,05 ± 0,16	1,91 ± 0,18	0,91 ± 0,09	3,69 ± 0,92	1,18 ± 0,11	3,56 ± 0,34	1,37 ± 0,00
	10N50P	0,2	4,74 ± 1,88	0,96 ± 0,32	2,18 ± 0,75	0,93 ± 0,26	6,67 ± 1,38	1,15 ± 0,23	6,51 ± 0,25	1,35 ± 0,00
	50N5P	10	10,87 ± 3,01	0,72 ± 0,22	2,59 ± 2,25	0,45 ± 0,11	11,14 ± 0,68	1,31 ± 0,04	8,91 ± 0,47	1,46 ± 0,13
	50N25P	2	12,60 ± 5,59	1,27 ± 0,02	9,04 ± 1,83	0,77 ± 0,19	19,95 ± 6,05	1,47 ± 0,07	12,72 ± 1,38	1,59 ± 0,06
	50N50P	1	11,27 ± 0,19	1,23 ± 0,02	9,73 ± 0,15	1,34 ± 0,07	16,03 ± 4,42	1,55 ± 0,02	13,75 ± 1,81	1,50 ± 0,05
	100N5P	20	25,15 ± 5,56	1,25 ± 0,06	10,83 ± 5,91	0,57 ± 0,18	18,24 ± 2,73	1,50 ± 0,02	15,62 ± 1,20	1,45 ± 0,06
	100N25P	4	21,12 ± 5,78	1,46 ± 0,02	13,86 ± 2,06	0,99 ± 0,20	13,35 ± 2,61	1,51 ± 0,04	12,90 ± 1,00	1,44 ± 0,04
	100N50P	2	14,64 ± 0,71	1,38 ± 0,15	14,72 ± 0,37	1,53 ± 0,10	13,74 ± 5,19	1,46 ± 0,02	9,16 ± 0,62	1,42 ± 0,00
	150N5P	30	31,10 ± 2,19	1,36 ± 0,06	19,98 ± 6,96	0,66 ± 0,06	19,11 ± 3,35	1,39 ± 0,17	22,55 ± 8,27	1,47 ± 0,12
	150N25P	6	25,64 ± 1,75	1,43 ± 0,04	17,30 ± 2,83	0,77 ± 0,13	13,12 ± 1,16	1,50 ± 0,01	16,90 ± 3,11	1,48 ± 0,04
	150N50P	3	18,60 ± 1,30	1,42 ± 0,12	15,46 ± 2,35	1,45 ± 0,17	9,36 ± 1,11	1,43 ± 0,04	10,05 ± 3,34	1,37 ± 0,10
	200N5P	40	34,32 ± 1,17	1,06 ± 0,40	21,22 ± 2,92	0,65 ± 0,36	18,68 ± 1,35	1,41 ± 0,00	15,52 ± 3,60	1,37 ± 0,05
	200N25P	8	27,32 ± 5,53	1,32 ± 0,23	24,35 ± 1,00	0,77 ± 0,02	13,16 ± 2,60	1,43 ± 0,08	15,32 ± 5,07	1,55 ± 0,02
200N50P	4	20,57 ± 0,41	1,39 ± 0,17	16,35 ± 1,88	1,40 ± 0,01	11,41 ± 0,18	1,45 ± 0,08	11,43 ± 1,58	1,42 ± 0,01	
<i>Scenedesmus bajacalifornicus</i>	10N5P	2	2,65 ± 1,10	0,90 ± 0,27	1,21 ± 0,21	1,32 ± 0,44	2,87 ± 1,75	0,92 ± 0,01	3,39 ± 0,35	0,90 ± 0,03
	10N25P	0,4	2,66 ± 0,42	1,38 ± 0,06	2,22 ± 0,75	1,27 ± 0,05	6,66 ± 1,21	1,24 ± 0,20	10,53 ± 1,00	1,31 ± 0,06
	10N50P	0,2	6,59 ± 0,75	1,52 ± 0,03	2,91 ± 0,01	1,36 ± 0,08	7,04 ± 0,71	1,37 ± 0,04	9,92 ± 0,96	0,98 ± 0,05
	50N5P	10	6,51 ± 0,42	1,18 ± 0,15	4,53 ± 0,48	0,99 ± 0,10	13,29 ± 0,07	1,25 ± 0,02	15,10 ± 1,00	1,43 ± 0,11
	50N25P	2	7,58 ± 0,49	1,31 ± 0,01	6,69 ± 0,91	1,33 ± 0,04	14,78 ± 2,09	1,24 ± 0,14	16,39 ± 0,57	1,46 ± 0,18
	50N50P	1	10,46 ± 1,25	1,52 ± 0,04	8,98 ± 1,42	1,52 ± 0,22	14,42 ± 0,19	1,17 ± 0,36	16,94 ± 1,20	1,52 ± 0,11
	100N5P	20	14,48 ± 1,09	1,50 ± 0,04	14,10 ± 0,62	0,91 ± 0,08	18,74 ± 1,49	1,41 ± 0,04	17,76 ± 0,74	1,49 ± 0,06
	100N25P	4	15,09 ± 0,18	1,50 ± 0,09	13,53 ± 1,05	1,27 ± 0,00	16,57 ± 0,94	1,51 ± 0,10	15,78 ± 0,94	1,54 ± 0,16
	100N50P	2	16,56 ± 0,23	1,57 ± 0,06	15,94 ± 1,62	1,43 ± 0,35	17,57 ± 0,55	1,52 ± 0,20	16,01 ± 1,31	1,53 ± 0,10
	150N5P	30	19,80 ± 2,89	1,41 ± 0,01	17,44 ± 0,04	1,02 ± 0,15	19,91 ± 1,34	1,52 ± 0,07	18,08 ± 0,37	1,49 ± 0,07
	150N25P	6	23,54 ± 0,47	1,47 ± 0,03	17,42 ± 0,77	1,43 ± 0,06	18,49 ± 1,50	1,59 ± 0,11	21,83 ± 4,72	1,54 ± 0,16
	150N50P	3	15,36 ± 1,09	1,62 ± 0,12	17,18 ± 0,36	1,65 ± 0,16	17,11 ± 0,42	1,52 ± 0,09	16,61 ± 0,91	1,61 ± 0,09
	200N5P	40	18,25 ± 0,35	1,36 ± 0,02	18,75 ± 0,64	1,20 ± 0,21	21,05 ± 2,48	1,39 ± 0,02	14,85 ± 0,75	1,51 ± 0,18
	200N25P	8	18,79 ± 1,42	1,47 ± 0,08	20,24 ± 1,27	1,47 ± 0,20	18,42 ± 1,83	1,59 ± 0,02	17,20 ± 1,27	1,57 ± 0,06
200N50P	4	17,24 ± 0,62	1,57 ± 0,01	20,80 ± 1,02	1,56 ± 0,15	18,27 ± 2,63	1,55 ± 0,16	17,32 ± 1,39	1,65 ± 0,07	

Vários estudos têm apontado que a razão N:P no meio de cultura é um outro fator que influencia no teor de clorofila (GHOSH et al., 2017 e MOUSSA et al., 2017). A Figura 14 apresenta a relação entre o conteúdo total de clorofila e as taxas de N:P (nitrogênio e fósforo) do meio de cultura no modo batelada. É importante notar que o teor de clorofila total apresentou uma forte relação linear com a relação N:P entre os valores de 1 a 8 ($R^2 = 0,9449$) e de 1 a 6 ($R^2 = 0,9679$) para as linhagens *S. obliquus* e *S. bajacalifornicus*, respectivamente (Figura 14B). Acima desses valores a relação entre clorofila e N:P não apresentou linearidade. O resultado sugere que teores ótimos de clorofila podem ser alcançados dentro da taxa de N:P estabelecida para cada linhagem na Figura 14B. As razões N:P investigadas contém o valor 7,2:1 da fórmula empírica de Stumm para microalgas ($C_{106}H_{263}O_{110}N_{16}P$) (STUMM e MORGAN, 1996). Ghosh et al. (2017) observaram o rendimento máximo em clorofila em *Asterarcys sp.* em cultivos com relação N:P de 8,7:1, enquanto Xin et al. (2010) em estudo com *Scenedesmus sp.* verificou que a ótima taxa de N:P está entre 5:1 e 8:1.

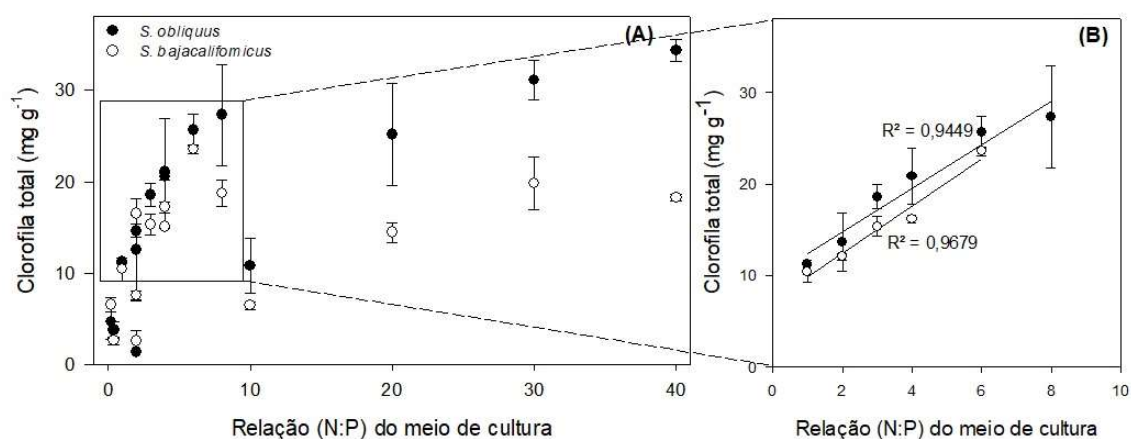


Figura 14: (A) Relação entre clorofila total (clorofila a + b) e a razão entre os teores de nitrogênio e fósforo (N:P) no meio de cultura no modo batelada para as linhagens *S. obliquus* e *S. bajacalifornicus*. (B) Detalhe da regressão linear dos pontos contidos na área destacada no gráfico A (linha pontilhada).

Nos modos de cultivo em dois estágios e semi-contínuos, não houve linearidade entre o conteúdo de clorofila e N:P. Tal constatação deve-se ao fato de ter sido adicionado meio de cultura constantemente nos modos semi-contínuo, e no segundo estágio do modo dois estágios. Além disso, não foi observado relação direta da clorofila com produtividade de biomassa ou lipídio, exceto nos cultivos com 10 mg L⁻¹ de nitrogênio, onde se verificou baixa produtividade de biomassa em todos os modos de cultivo nas duas linhagens. Essa concentração de nitrogênio foi responsável pelos menores valores de clorofilas totais, ocasionando a mudança de cor no cultivo (Figura 15). Este estudo não foi capaz de identificar se a adição de meio de cultura com 10 mg L⁻¹ de nitrogênio a longo prazo pode

comprometer a viabilidade do cultivo, devido ao baixo teor de clorofila e redução da atividade fotossintética.

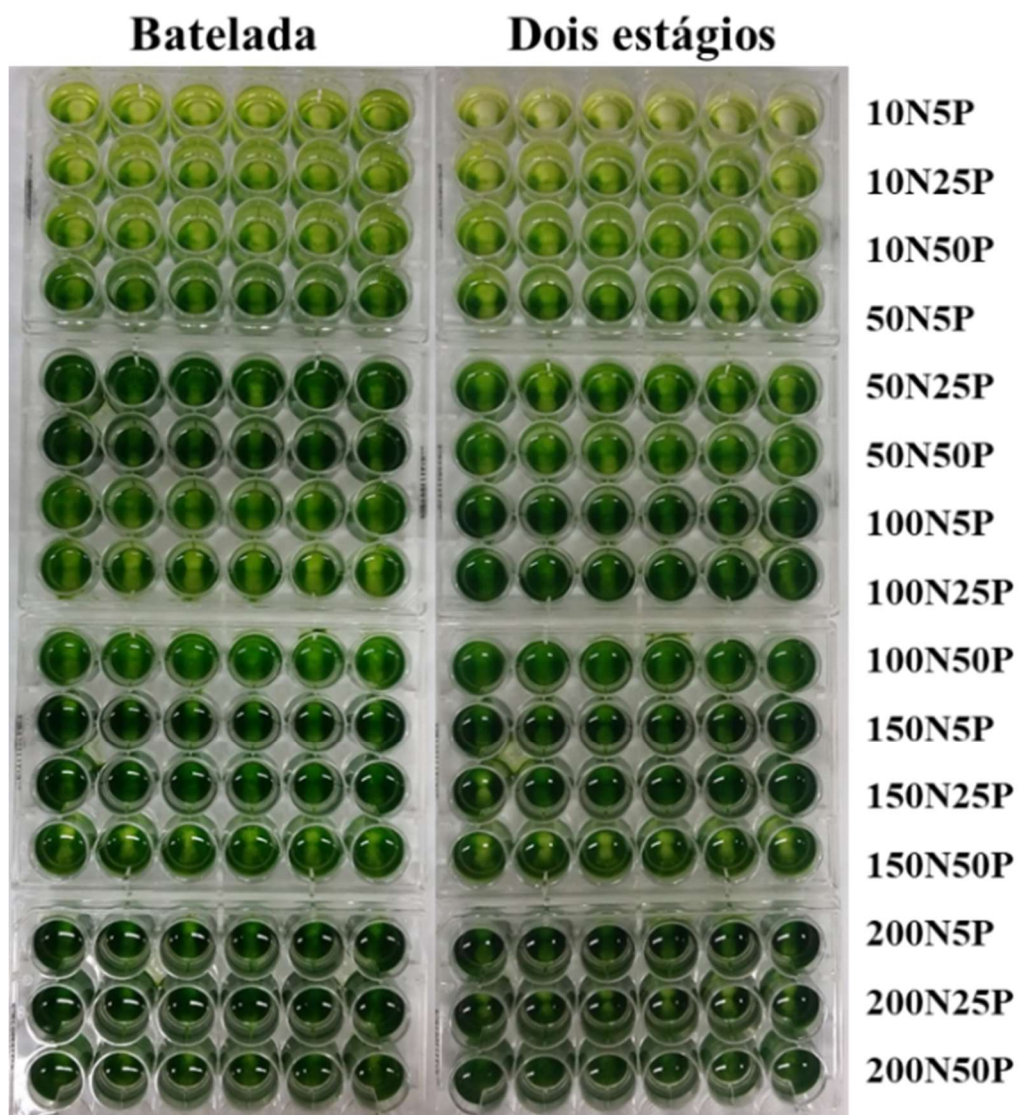


Figura 15: Coloração dos cultivos em microplacas de 24 poços na fase final (estacionária) nos modos batelada e dois estágios, para a linhagem *S. obliquus*.

4.3.4. Acúmulo de lipídios neutros

O acúmulo de lipídios em *S. obliquus* e *S. bajacalifornicus* foi investigado pelo método da fluorescência com vermelho do Nilo, como proposto por Siegler et al. (2012), com as adaptações descritas na seção material e métodos. O vermelho do Nilo é um corante fluorescente lipofílico que se liga seletivamente ao triacilglicerol (TAG) (SRIVASTAVA; NISHCHAL; GOUD, 2017). A unidade relativa de fluorescência (RFU) normalizada pela densidade ótica a 750 nm (OD_{750}) é apresentada na Figura 16 e Figura 17 para as linhagens *S. obliquus* e *S. bajacalifornicus*, respectivamente, para os diferentes modos de cultivo e concentrações de nitrogênio e fósforo. É possível observar

que duas linhagens apresentaram comportamento similar em relação a intensidades de fluorescência normalizadas. Maiores valores dessa relação foram verificados em menores concentrações de nitrogênio nos modos de cultivo em dois estágios e batelada, como esperado. Os modos de cultivo semi-contínuo 1 dia e 2 dias apresentaram menores valores de RFU/OD_{unid}, com pouca variação entre os tratamentos. Interessantemente, o acúmulo de lipídios neutros nos modos de cultivo semi-contínuo é menor devido ao fornecimento frequente de nitrogênio. Adams et al. (2013) observaram que o fornecimento constante de nitrogênio em cultivos semi-contínuos resultou em maior produtividade de biomassa com menor teor de lipídios de reserva, ou seja, lipídios neutros como triacilgliceróis.

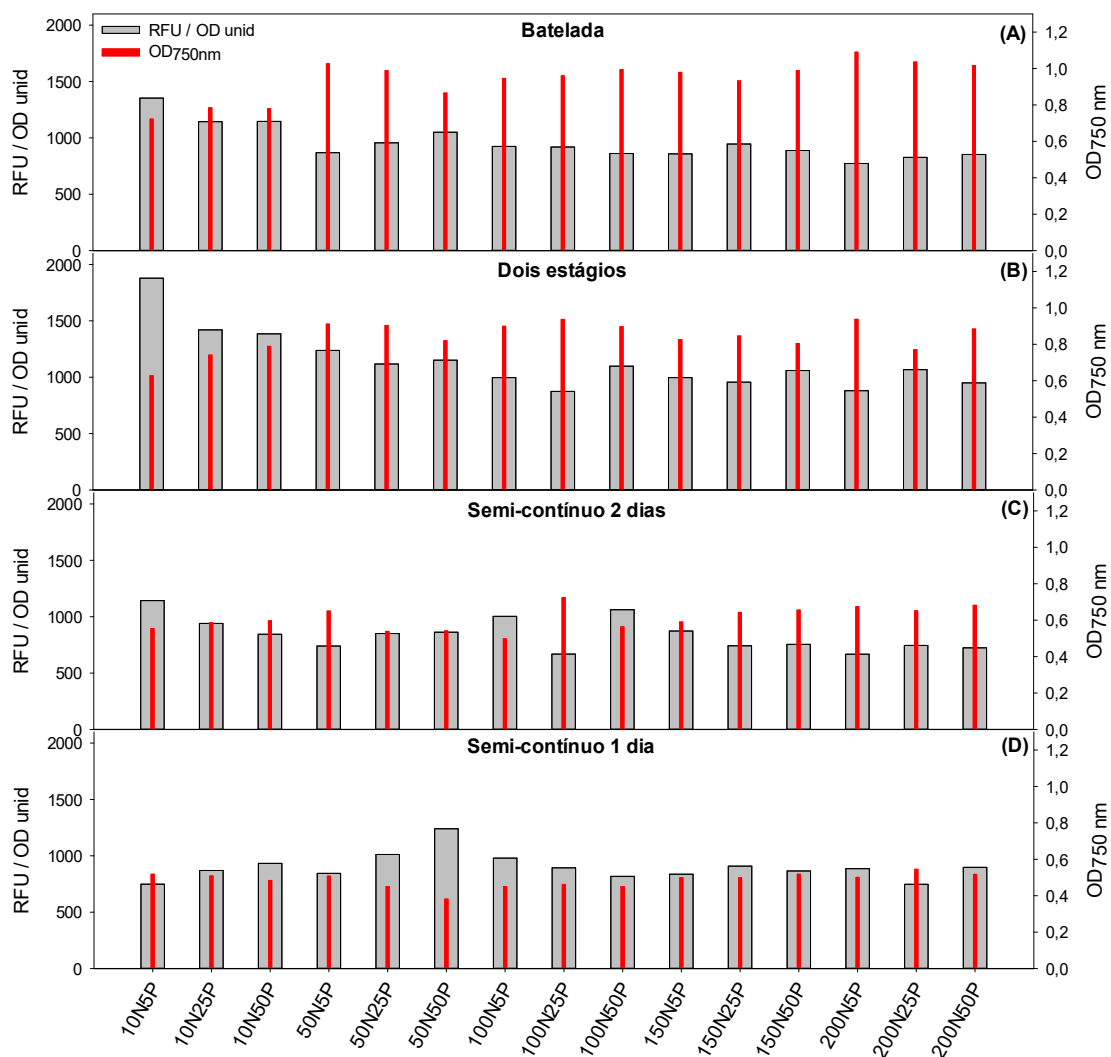


Figura 16: Unidade relativa de fluorescência (RFU) normalizada pela densidade ótica a 750 nm (OD₇₅₀, eixo secundário), para cultivos de *S. obliquus*: (A) batelada, (B) dois estágios, (C) semi-contínuo 2 dias e (D) semi-contínuo 1 dia, em diferentes concentrações de nitrogênio e fósforo.

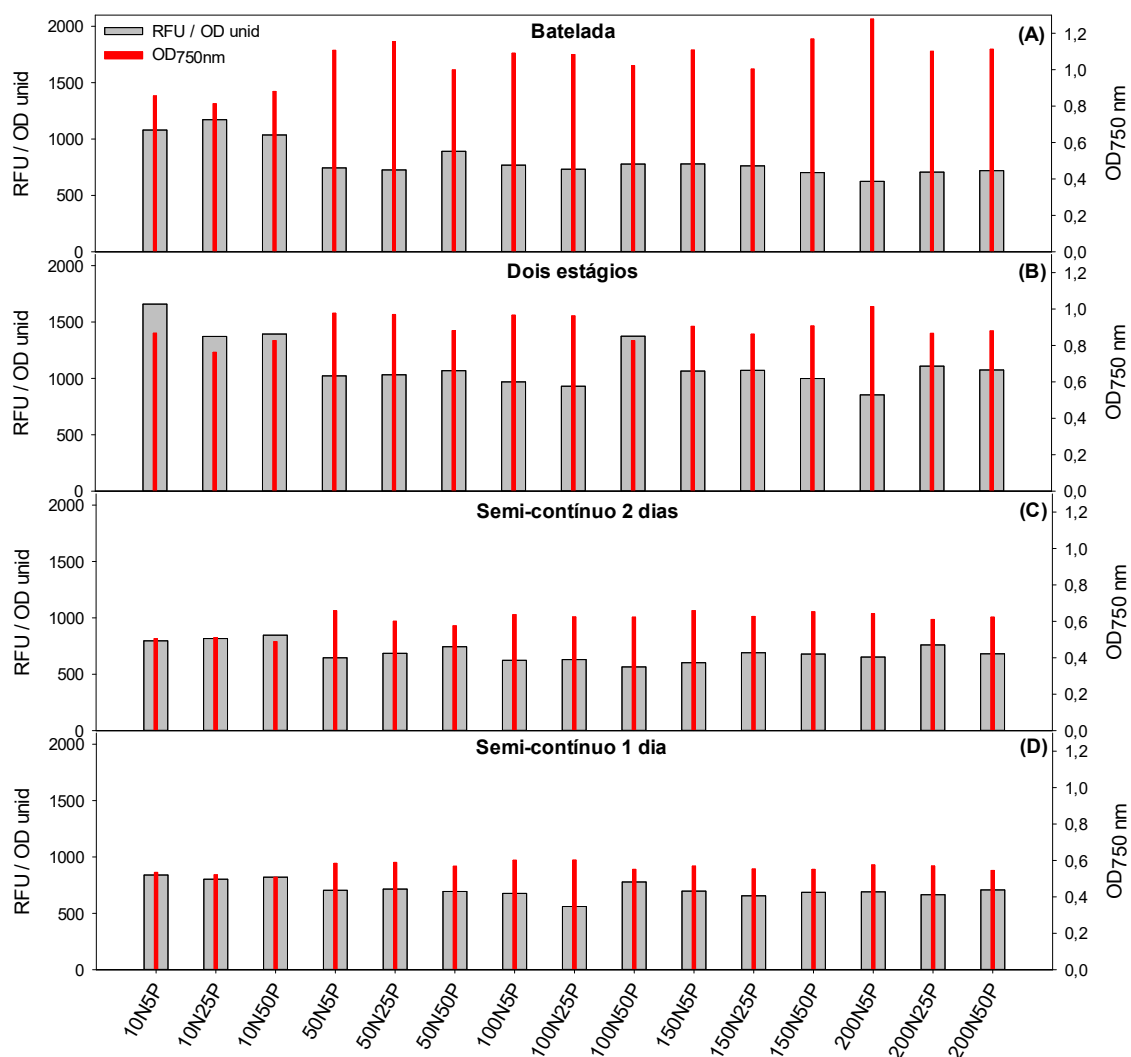


Figura 17: Unidade relativa de fluorescência (RFU) normalizada pela densidade ótica a 750 nm (OD_{750} , eixo secundário), para cultivos de *S. bajacalifornicus*: (A) batelada, (B) dois estágios, (C) semi-contínuo 2 dias e (D) semi-contínuo 1 dia, em diferentes concentrações de nitrogênio e fósforo.

Ao considerar a frequência de coleta, o modo de cultivo semi-contínuo com coleta realizadas em 2 dias e 1 dia são promissores para se obter maiores quantidades de biomassa, quando comparadas ao cultivo em batelada, com coletas em 8 dias e dois estágios, com coleta em 12 dias. A análise da fluorescência (Figura 16 e Figura 17), por sua vez, sugere que a biomassa coletada com maior frequência nos modos semi-contínuos contém 40% a 70% dos lipídios neutros da biomassa colhida nos modos batelada e dois estágios. Os menores teores de TAG obtidos nos modos semi-contínuos provavelmente resultará em custos mais elevados para operações de coleta, concentração da biomassa, rompimento celular e extração do óleo para produção de biodiesel (BENVENUTI et al., 2016). Além disso, os altos teores de lipídios estruturais (fosfolipídios e glicolipídios) dificultam a extração seletiva de lipídios neutros (ISLAM, et al., 2017).

Interessantemente, os modos de cultivo em batelada ou em dois estágios produziram biomassa com conteúdo de lipídios de melhor qualidade para produção de biodiesel, ou seja, com maior quantidade de lipídeos neutros. Esse resultado corrobora com a análise da produtividade de lipídios apresentadas nas Figura 12 e Figura 13, em que se utilizou a trioleína como padrão para quantificar os lipídios neutros pelo método vermelho do Nilo.

4.3.5. Cultivo outdoor em tanque

Para corroborar e validar a estratégia de aumento de produtividade de lipídios neutros pela interação entre estresse nutricional e modos de cultivo, foram realizados cultivos em escala outdoor da linhagem *Scenedesmus obliquus* BR003. Esses cultivos foram efetuados em tanque aberto tipo *raceway*, nos modos batelada e semi-contínuo, utilizando 50 mg L⁻¹ de nitrogênio e 5 mg L⁻¹ de fósforo para o modo batelada e 100 mg L⁻¹ de N e 5 mg L⁻¹ de P para o modo semi-contínuo. O modo semi-contínuo foi escolhido por apresentar a maior produtividade de lipídios nos experimentos em escala laboratorial para *S. obliquus* (Figura 12), no tratamento com 100 mg L⁻¹ de nitrogênio. O cultivo em modo batelada foi utilizado como tratamento controle, com dose de 50 mg L⁻¹ de nitrogênio, que foi responsável por alcançar a maior produtividade de lipídios para este modo em escala laboratorial (Figura 12). Em relação a concentração de fósforo, utilizou-se a dose mínima dos experimentos em escala laboratorial, pois este fator não interferiu na produtividade de lipídios (Tabela 8).

A Figura 18 apresenta as curvas de crescimento dos cultivos outdoor em batelada e semi-contínuo. A duração desses cultivos foi de 19 dias pra cada ciclo no modo batelada, com duas repetições e 7 dias para o ciclo em modo semi-contínuo com cinco repetições. No modo semi-contínuo, ao final de cada ciclo, foram retirados aproximadamente 20 % do volume total do tanque para manter a concentração de biomassa em 55 g m⁻². Ainda na Figura 18, é possível observar uma redução gradativa nas concentrações finais dos cultivos para os dois modos. Os resultados indicam que o aumento no tempo de cultivo é responsável pela redução na produtividade de biomassa e lipídios, devido as condições climáticas variáveis, contaminação do cultivo por microrganismos e danos celulares gerados pelo sistema de agitação, provocando redução na eficiência fotossintética (HE; YANG; HU, 2016).

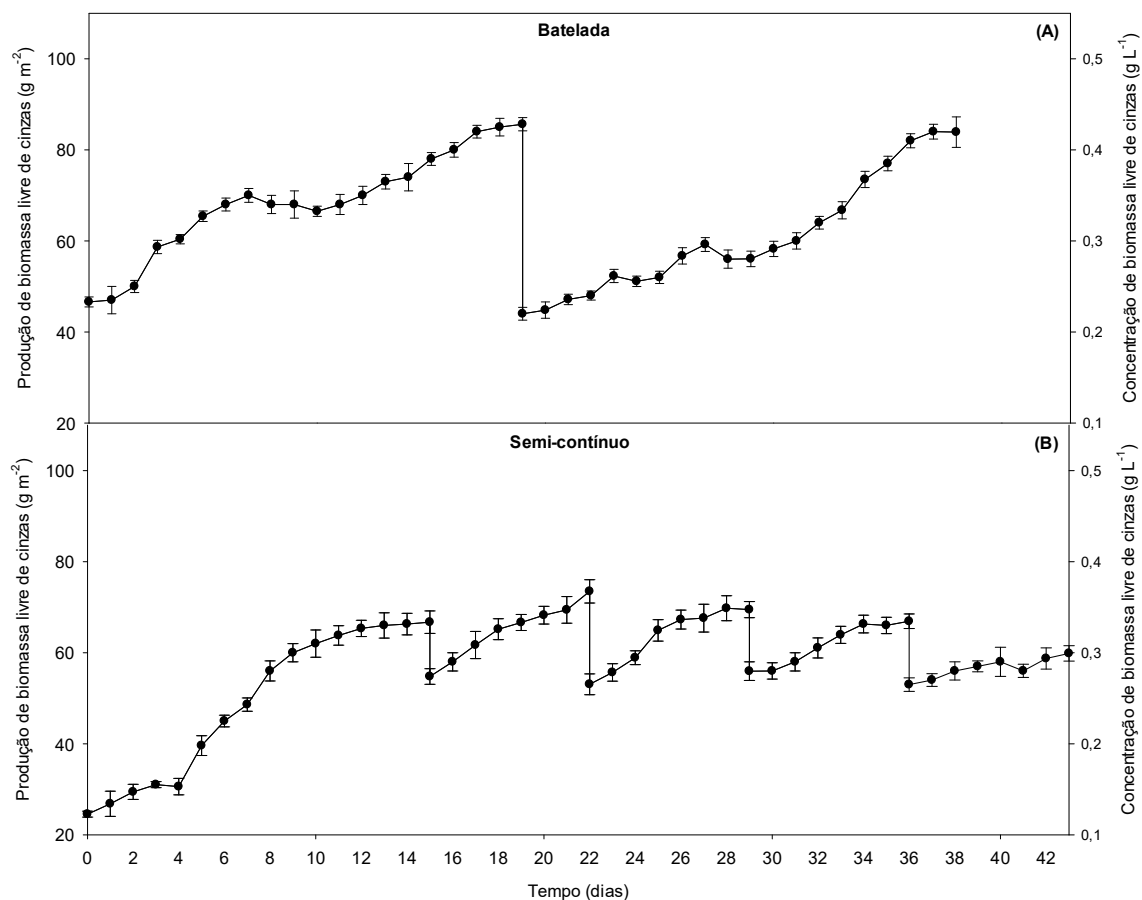


Figura 18: Curva de crescimento da microalga *S. obliquus* cultivada em tanque tipo *Raceway* nos modos (A) batelada e (B) semi-contínuo. Os cultivos em modo batelada foram realizados de 20 de abril a 28 de maio, já os cultivos no modo semi-contínuo foram realizados entre 30 de maio a 13 de julho de 2018.

É possível observar ao longo dos dias de cultivo uma redução nas temperaturas máximas e mínimas, obtidas por sensores instalados no interior do tanque (Figura 19). Essa redução é consequência da diminuição da temperatura na estação do outono e inverno. A Figura 19 apresenta os valores diários de máxima e média radiação fotossinteticamente ativa (PAR), com grandes variações devido a sombras formadas por passagens de nuvens e da redução no fotoperíodo. É possível observar uma correlação entre a concentração de células de microalgas por área do tanque (Figura 18) e a temperatura e radiação (Figura 19).

No modo batelada, entre os dias de cultivo 8 a 10, 23 a 26 e 30 houve quedas na produção de biomassa (Figura 18), no mesmo período (28/04 a 30/04, 13/05 a 16/05 e 20/05) (Figura 19) houve redução na temperatura mínima do cultivo acompanhada de redução nos valores médios da radiação PAR. No modo semi-contínuo foi observado quedas na produção de biomassa nos dias de cultivo 4, 30, 35, 36 e 41, acompanhada de

redução na temperatura mínima do cultivo e/ou queda nos valores médios de radiação PAR.

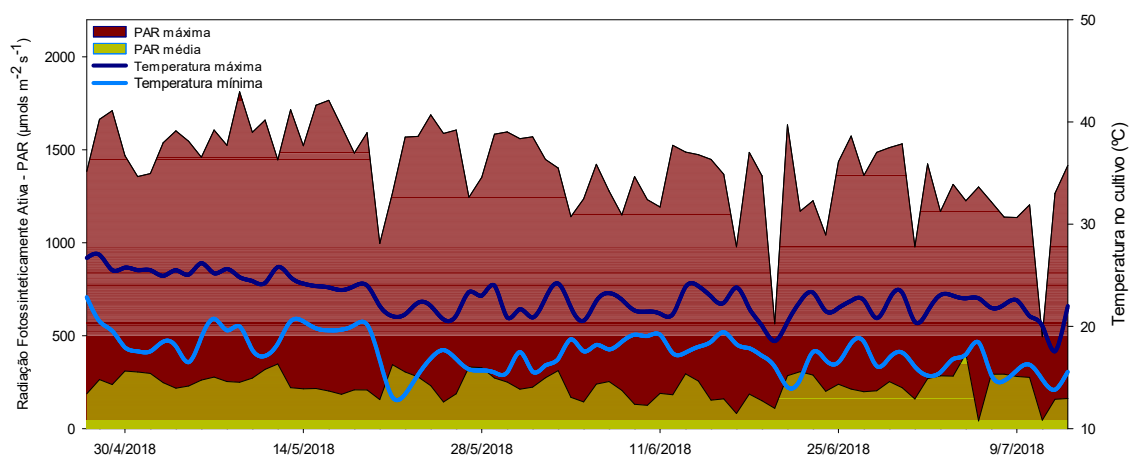


Figura 19: Valores diários da máxima e da média radiação fotossinteticamente ativa (PAR) e amplitude diárias de temperaturas máxima e mínima do cultivo, obtidas com o sistema de monitoramento em tempo real.

A temperatura do cultivo e a intensidade da radiação, são dois fatores importantes na produção de biomassa de microalgas. Elevadas intensidades de radiação provocam fotoinibição, enquanto o contrário reduz a quantidade de metabólitos produzidos (EUSTANCE et al., 2015). Em relação à temperatura, o crescimento de microalgas em sistema fotoautotrófico é pronunciado entre 20 a 25 °C (ROLEDA et al., 2013). A máxima temperatura do cultivo registrada durante a realização dos experimentos foi de 27 °C, e a mínima de 13 °C, sendo verificado valores médios diários entre 15,7 °C e 21,5 °C ao longo dos experimentos. A temperatura ambiente mínima registrada nesse período foi 8,2 °C.

A Tabela 10 apresenta os valores de produtividades volumétrica e por área, de biomassa e lipídios neutros para modos de cultivo batelada e semi-contínuo cultivados em tanques tipo *raceway* (outdoor) e em microplacas de 24 poços, em escala laboratorial (indoor) para a linhagem *S. obliquus*.

Tabela 10: Produtividade de lipídios e biomassa nos modos batelada e semi-contínuo, para a linhagem *S. obliquus* cultivada em tanque *raceway*, em cultivo outdoor, e em microplacas de 24 poços em cultivo indoor. PBM (produtividade de biomassa) e PLN (produtividade de lipídios).

Modos de cultivo	Cultivo outdoor				Cultivo indoor	
	P _{BM} (g m ⁻² d ⁻¹)	P _{LN} (mg L ⁻¹ d ⁻¹)	P _{BM} (mg L ⁻¹ d ⁻¹)	P _{LN} (mg L ⁻¹ d ⁻¹)	P _{BM} (mg L ⁻¹ d ⁻¹)	P _{LN} (mg L ⁻¹ d ⁻¹)
Batelada	4,46 ± 0,09	0,57 ± 0,04	22,3 ± 0,44	2,87 ± 0,19	119,8 ± 13,1	10,7 ± 1,17
Semi-contínuo	8,60 ± 2,12	0,67 ± 0,12	43,0 ± 4,01	3,35 ± 0,59	165,0 ± 11,8	16,6 ± 1,19

O cultivo outdoor apresentou menores valores para produtividade volumétrica de biomassa e lipídios, quando comparada ao cultivo em escala laboratorial (indoor), com redução de 5,4 e 3,8 vezes na produtividade de biomassa e 3,7 e 4,9 vezes na produtividade de lipídios neutros, para os modos batelada e semi-contínuo respectivamente (Tabela 10). A produtividade de biomassa no cultivo outdoor para o modo semi-contínuo foi 1,9 vezes maior que o modo batelada em cultivo outdoor. Em relação a produtividade de lipídios neutros no cultivo outdoor, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os modos batelada e semi-contínuo.

Na Figura 20 é possível observar que os teores de lipídios totais (neutros + polares) foi de 17,4 % para os modos batelada e 16,9 % para o modo semi-contínuo, não havendo diferença significativa ($p > 0,05$). Porém, em relação ao teor de lipídios neutros, o modo batelada apresentou teor 65 % maior quando comparado com o modo semi-contínuo.

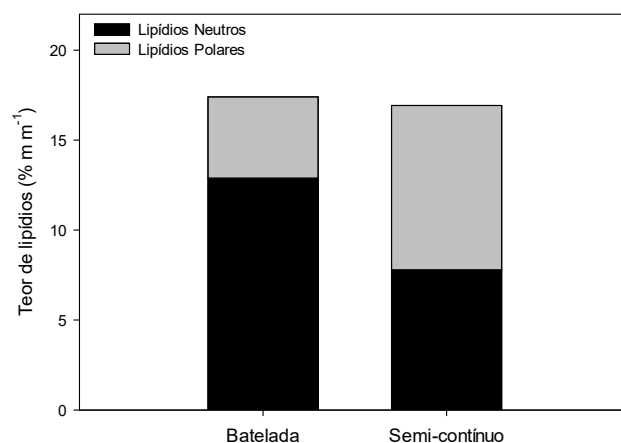


Figura 20: Teores de lipídios neutros e polares obtidos durante o cultivo outdoor em tanque tipo *raceway*, para a linhagem *S. obliquus*, nos modos de cultivo batelada e semi-contínuo.

A conversão a FAMES (ésteres metílicos de ácidos graxos) das amostras de lipídios do modo batelada foi 65 % maior que a conversão dos lipídios obtidos no modo semi-contínuo. Tal resultado corrobora o teor de lipídios neutros (Figura 20), obtido pelo método da fluorescência, utilizando o corante vermelho do Nilo.

A baixa produtividade de biomassa e lipídios em ambos modos de cultivo, quando comparado ao cultivo indoor (Tabela 10), deve-se ao fato do experimento ter sido realizado entre os dias 20 de abril e 13 de julho, durante as estações do outono e inverno, que tem como características as baixas temperaturas e diminuição do fotoperíodo. Além disso, em cultivos abertos, as microalgas não respondem da mesma forma que cultivos em condições controladas com as de laboratório, devido as contaminações e variações

nos parâmetros ambientais (MATHIMANI et al., 2017). Trabalhos publicados mostram que microalgas podem atingir produtividades em torno de 24 e 30 g m⁻² d⁻¹ em tanques abertos tipo *raceway* (MORALES-AMARAL et al., 2015 e MENDES, 2017). Porém, Eustance et al. (2015) encontraram produtividade de biomassa de 2,2 a 3,5 g m⁻² d⁻¹ em *Scenedesmus dimorphus* cultivada em tanques abertos tipo *raceway* durante o inverno.

A Tabela 11 apresenta a composição de ácidos graxos dos lipídios extraídos da biomassa produzida durante o cultivo outdoor, em modos de cultivo batelada e semi-contínuo, em comparação com cultivo realizado em escala laboratorial, no modo batelada. Para comparação, também é apresentado a composição de ácidos graxos do óleo de soja, matéria prima consolidada para produção de biodiesel.

Tabela 11: Composição percentual de ácidos graxos de *S. obliquus* em cultivo outdoor em tanque *raceway*, para nos modos de cultivo batelada e semi-contínuo, cultivo indoor em batelada, e do óleo de soja.

Ácidos Graxos	Cultivo outdoor		Cultivo indoor	Óleo de Soja
	Batelada	Semi-contínuo	Batelada	
C16:0 (Palmítico)	21,65 ± 1,08	24,87 ± 3,77	17,50 ± 0,77	11,12
C16:1 (Palmitiléico)	7,24 ± 0,75	9,12 ± 1,16	2,39 ± 0,32	-
C18:0 (Esteárico)	3,83 ± 4,11	3,21 ± 0,91	-	4,03
C18:1n9t (Elaídico)	4,90 ± 4,10	-	2,97 ± 0,24	-
C18:1n9c (Oléico)	8,72 ± 2,92	12,27 ± 3,14	14,12 ± 0,66	22,36
C18:2n6t (Linoelaídico)	9,52 ± 0,35	10,59 ± 4,19	12,30 ± 0,54	-
C18:2n6c (Linoléico)	7,53 ± 2,24	7,47 ± 0,87	10,46 ± 0,30	55,29
C18:3n3 (Linolénico)	32,85 ± 3,35	23,89 ± 1,43	24,55 ± 1,10	7,20
C20:0 (Araquídico)	-	1,65 ± 0,29	6,69 ± 0,64	-
C20:X	-	4,85 ± 1,28	2,10 ± 0,59	-
C22:0 (Behênico)	3,39 ± 0,16	3,08 ± 0,71	-	-
Não identificados	4,19 ± 0,44	4,44 ± 0,92	3,46 ± 0,56	-
Saturados	28,87 ± 5,35	32,80 ± 5,69	24,19 ± 1,41	15,15
Monoinsaturados	20,86 ± 7,77	21,39 ± 4,29	19,49 ± 1,23	22,36
Poli-insaturados	49,90 ± 5,94	41,95 ± 6,50	47,30 ± 1,94	62,5
Total de C16 e C18	96,24	91,42	84,29	100,0
Saturados / Insaturados	0,41	0,52	0,36	0,18

(*) Média ± erro padrão dos teores (%) de ácidos graxos.

Na Tabela 11 é possível observar que o cultivo outdoor produziu lipídios com maiores teores de ácidos graxos saturados, sobretudo o C16:0 (palmítico), quando comparado com o cultivo indoor. Tal constatação pode ter relação com a qualidade e intensidades da luz, pois, os cultivos outdoor apresentaram maiores intensidades de luz quando comparada com cultivos em escala laboratorial. A radiação (PAR) média durante

os cultivos outdoor variou em torno de $300 \mu\text{mols m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figura 19), enquanto que no cultivo indoor a radiação média foi de $114 \mu\text{mols m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fornecida a partir de lâmpadas fluorescentes brancas. Em condições de baixa intensidade luminosa, as microalgas reduzem a produção de lipídios saturados, em detrimento da produção de poli-insaturados, que são incorporados às estruturas da membrana (FENG et al., 2014).

Ao comparar os modos de cultivo realizados em tanques abertos, verificou-se maiores teores de poli-insaturados e menores teores de saturados no modo batelada em comparação com o modo semi-contínuo. Nayak et al (2016) também observaram esse comportamento em *Scenedesmus* sp., obtendo maiores teores de poli-insaturados em lipídios extraídos na fase estacionária, e maiores teores de ácidos graxos saturados na fase de crescimento exponencial. Tan et al. (2018) verificaram em *Chlorella vulgaris* que o modo semi-contínuo não afetou significativamente a composição de ácidos graxos do lipídio produzido.

A composição majoritária de ácidos graxos de microalgas é formada de C16 e C18, considerados como os componentes mais importantes para conferir alta qualidade ao biodiesel (HE; YANG; HU, 2016). Diante disso, os resultados apresentados na Tabela 11 evidenciam que 96,2 %, 91,4 % e 84,3 % dos ácidos graxos para o modo batelada, semi-contínuo em cultivo outdoor e batelada em cultivo indoor, respectivamente são compostos de C16 e C18, valores muito próximo do óleo de soja que é 100 % composto de C16 e C18. Outro aspecto importante a ser observado é a relação de saturados/insaturados, pois óleos com altos teores de ácidos graxos saturados são indesejados para produção de biodiesel, devido à baixa fluidez. Os ácidos graxos poli-insaturados melhoram a fluidez, porém são susceptíveis a oxidação devido a presença de ligações duplas em sua cadeia (KNOTHE, 2007). Desta forma, óleos com maiores teores de saturados e monoinsaturados tem maior estabilidade oxidativa (Ho et al., 2014). Os valores obtidos de ácidos graxos saturados somado aos monoinsaturados foi, 50 %, 54 % e 44 % para o modo batelada e semi-contínuo (outdoor) e batelada (indoor), respectivamente. Tais resultados seguem que o óleo de *S. obliquus* cultivada em escala laboratorial ou em tanques abertos, apresentam ótima qualidade para produção de biodiesel, devido a sua estabilidade oxidativa, com valores próximos a soma dos ácidos graxos saturados e monoinsaturados do óleo da soja (37,51 %).

O fornecimento de CO₂ oriundo da incineração de biomassa mostrou-se ser eficaz para atender a necessidade de carbono do cultivo, além de reduzir o custo de produção da

microalga. Estudos apontam que a injeção de CO₂ puro em cultivos de larga escala é responsável pelo aumento de 8 a 27% no custo de produção da biomassa (GODOS et al., 2014).

A linhagem *S. obliquus* apresentou produtividade de lipídios neutros com valores de 0,57 e 0,67 g m⁻² d⁻¹ (p > 0,05) quando cultivada nos modos batelada e semi-contínuo, respectivamente. O modo semi-contínuo é uma estratégia de manter o crescimento das células sempre na fase exponencial e evitar o efeito de sombreamento resultante da alta densidade celular, obtendo assim altas produtividades de biomassa (Ho et al., 2014). Porém, para alcançar elevados valores de produtividade de lipídios é necessário fornecimento de uma dose maior de nitrogênio, quando comparada com o modo batelada (ADAMS et al., 2013). O resultado verificado para a linhagem em estudo sugere que a dose maior de nitrogênio no modo semi-contínuo foi responsável pela redução em 40% do teor de lipídios neutros quando comparada com o modo batelada, embora os teores de lipídios totais apresentaram valores iguais (p > 0,05). De forma coerente ao que foi verificado nos cultivos em ambiente controlado, o maior volume de biomassa com menor teor de lipídios neutros, no modo semi-contínuo, resultará em custos mais altos para operações de coleta, concentração da biomassa, rompimento celular e extração do óleo para produção de biodiesel (BENVENUTI et al., 2016). Além disso, os altos teores de lipídios estruturais (fosfolipídios e glicolipídios) dificultam a extração seletiva de lipídios neutros (ISLAM, et al., 2017). Dessa forma, o modo de cultivo batelada pode ser utilizado em tanques abertos para produzir biomassa com maior teor de lipídio e melhor qualidade para produção de biodiesel.

4.4. CONCLUSÕES

Os resultados deste trabalho em escala laboratorial demonstram que a linhagem *Scenedesmus obliquus* BR003 atingiu maior produtividade de lipídios quando comparada com a linhagem *Scenedesmus bajacalifornicus* BR024. A produtividade de biomassa e lipídios não foi influenciada pelos níveis de fósforo investigados. Dessa forma, com o uso da menor dose, 5 mg L⁻¹ de fósforo, foi possível atingir a máxima produtividade de lipídios. Em relação ao nitrogênio, o aumento da dose respondeu de forma positiva no aumento da produtividade de biomassa, porém não houve efeito para a produtividade de lipídios, exceto no modo de cultivo semi-contínuo. Também foi observado que o modo de cultivo afetou na produtividade de lipídios, obtendo maiores valores no modo de cultivo semi-contínuo, porém com baixos teores de lipídios neutros quando comparada ao modo batelada e dois estágios. Desta forma, os modos dois estágios e batelada apresentam-se promissores para atingir elevadas produtividades de lipídios neutros e menor custo para extração do óleo.

Em cultivo outdoor, utilizado para validar as estratégias de aumento da produtividade de lipídios estudadas em escala laboratorial, a linhagem *S. obliquus* BR003 destacou-se como promissora para produção de lipídios em tanques abertos, mesmo que em condições de baixa temperatura, como observada nos experimentos. Nessas condições, não houve diferença nas produtividades de lipídios neutros entre os modos batelada e semi-contínuo. Porém, o modo de cultivo em batelada apresentou maiores teores de lipídios neutros, consolidando como uma ótima estratégia para produção de biomassa com maiores teores de lipídios e melhor qualidade para produção de biodiesel, assim como menores custos para extração do óleo. Também em cultivo outdoor, o uso do gás de incineração mostrou-se uma alternativa viável para fornecimento de CO₂ em cultivos, contribuindo com a redução dos custos de produção.

4.5. REFERÊNCIAS

- ABDELAZIZ, Ahmed E.m. et al. Screening microalgae native to Quebec for wastewater treatment and biodiesel production. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 157, p.140-148, abr. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.01.114>.
- ADAMS, Curtis et al. Understanding precision nitrogen stress to optimize the growth and lipid content tradeoff in oleaginous green microalgae. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 131, p.188-194, mar. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.12.143>.
- ANDERSEN, Robert A. (Ed.). **Algal Culturing Techniques**. Usa: Elsevier Academic Press, 2005. 589 p.
- ALONZO, F e MAYZAUD, P. Spectrofluorometric quantification of neutral and polar lipids in zooplankton using Nile red. **Marine Chemistry**, v. 67, página 289–301, 1999.
- BENEMANN, John. Microalgae for Biofuels and Animal Feeds. **Energies**, [s.l.], v. 6, n. 11, p.5869-5886, 11 nov. 2013. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/en6115869>.
- BENVENUTI, Giulia et al. Batch and semi-continuous microalgal TAG production in lab-scale and outdoor photobioreactors. **Journal of Applied Phycology**, [s.l.], v. 28, n. 6, p.3167-3177, 7 jul. 2016. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s10811-016-0897-1>.
- CHU, Fei-fei et al. Effect of phosphorus on biodiesel production from *Scenedesmus obliquus* under nitrogen-deficiency stress. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 152, p.241-246, jan. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.11.013>.
- COVELL, Lidiane. **Alterações metabólicas diurnas em microalgas com acúmulo diferencial de reservas em duas fases do crescimento**. 2015. 29 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal, Departamento de Biologia Vegetal, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2015.
- EUSTANCE, Everett et al. The effects of cultivation depth, areal density, and nutrient level on lipid accumulation of *Scenedesmus acutus* in outdoor raceway

ponds. **Journal of Applied Phycology**, [s.l.], v. 28, n. 3, p.1459-1469, 10 set. 2015. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s10811-015-0709-z>.

FENG, Pingzhong et al. Growth and lipid accumulation characteristics of *Scenedesmus obliquus* in semi-continuous cultivation outdoors for biodiesel feedstock production. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 173, p.406-414, dez. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.09.123>.

GHOSH, Ashmita et al. Effect of macronutrient supplements on growth and biochemical compositions in photoautotrophic cultivation of isolated *Asterarcys* sp. (BTA9034). **Energy Conversion and Management**, [s.l.], v. 149, p.39-51, out. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.enconman.2017.07.015>.

GODOS, I. de et al. Evaluation of carbon dioxide mass transfer in raceway reactors for microalgae culture using flue gases. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 153, p.307-314, fev. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.11.087>.

GRIFFITHS, Melinda J. et al. Interference by pigment in the estimation of microalgal biomass concentration by optical density. **Journal of Microbiological Methods**, [s.l.], v. 85, n. 2, p.119-123, maio 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2011.02.005>

HAN, Wei et al. A novel miniature culture system to screen CO₂-sequestering microalgae. **Energies**, [s.l.], v. 5, n. 12, p.4372-4389, 1 nov. 2012. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/en5114372>.

HE, Qiaoning; YANG, Haijian; HU, Chunxiang. Culture modes and financial evaluation of two oleaginous microalgae for biodiesel production in desert area with open raceway pond. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 218, p.571-579, out. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.06.137>.

HO, Shih-hsin et al. Exploring the high lipid production potential of a thermotolerant microalga using statistical optimization and semi-continuous cultivation. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 163, p.128-135, jul. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.04.028>.

- ICHIHARA, Ken'ichi; FUKUBAYASHI, Yumeto. Preparation of fatty acid methyl esters for gas-liquid chromatography. **Journal of Lipid Research**, [s.l.], v. 51, n. 3, p.635-640, 16 set. 2009. American Society for Biochemistry & Molecular Biology (ASBMB). <http://dx.doi.org/10.1194/jlr.d001065>.
- INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. Cheese and processed cheese. Determination of fat content (Schmid-Bondzynski-Ratzlaff method). IDF Provisional Standard 5 B. International Dairy Federation. Brussels, Belgium; 1986.
- ISLAM, Muhammad Aminul; HEIMANN, Kirsten; BROWN, Richard J.. Microalgae biodiesel: current status and future needs for engine performance and emissions. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [s.l.], v. 79, p.1160-1170, nov. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2017.05.041>.
- Ji, Xiang et al. The effect of NaCl stress on photosynthetic efficiency and lipid production in freshwater microalga *Scenedesmus obliquus* XJ002. **Science of the Total Environment**, [s.l.], v. 633, p.593-599, ago. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.240>.
- KLIGERMAN, Debora Cynamon; BOUWER, Edward J.. Prospects for biodiesel production from algae-based wastewater treatment in Brazil: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [s.l.], v. 52, p.1834-1846, dez. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2015.08.030>.
- KNOTHE, Gerhard. Some aspects of biodiesel oxidative stability. **Fuel Processing Technology**, [s.l.], v. 88, n. 7, p.669-677, jul. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fuproc.2007.01.005>.
- KUO, Chiu-mei et al. Cultivation of *Chlorella* sp. GD using piggery wastewater for biomass and lipid production. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 194, p.326-333, out. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.07.026>.
- LICHTENTHALER, Hartmut K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. In: **Methods in enzymology**. Academic Press, 1987. p. 350-382.

- MACHADO, Mariana et al. Comprehensive metabolic reprogramming in freshwater *Nitzschia palea* strains undergoing nitrogen starvation is likely associated with its ecological origin. **Algal Research**, [s.l.], v. 18, p.116-126, set. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2016.06.003>.
- MATHIMANI, Thangavel et al. Semicontinuous outdoor cultivation and efficient harvesting of marine *Chlorella vulgaris* BDUG 91771 with minimum solid co-precipitation and high floc recovery for biodiesel. **Energy Conversion and Management**, [s.l.], v. 149, p.13-25, out. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.enconman.2017.06.077>.
- MENDES, Leonardo Brantes Bacellar. Recent advances of microalgal biotechnology in Brazil. **Journal of Aquaculture & Marine Biology**, [s.l.], v. 5, n. 5, p.1-3, 7 jun. 2017. MedCrave Group, LLC. <http://dx.doi.org/10.15406/jamb.2017.05.00135>.
- MORALES-AMARAL, Maria del Mar et al. Outdoor production of *Scenedesmus* sp. in thin-layer and raceway reactors using centrate from anaerobic digestion as the sole nutrient source. **Algal Research**, [s.l.], v. 12, p.99-108, nov. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2015.08.020>.
- MORSCHETT, Holger et al. Comparative evaluation of phototrophic microtiter plate cultivation against laboratory-scale photobioreactors. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, [s.l.], v. 40, n. 5, p.663-673, 18 jan. 2017. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00449-016-1731-5>.
- MORSCHETT, Holger et al. Design and validation of a parallelized micro-photobioreactor enabling phototrophic bioprocess development at elevated throughput. **Biotechnology and Bioengineering**, [s.l.], v. 114, n. 1, p.122-131, 26 jul. 2016. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/bit.26051>.
- MOUSSA, Ines Dahmen-ben et al. Nitrogen or phosphorus repletion strategies for enhancing lipid or carotenoid production from *Tetraselmis marina*. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 238, p.325-332, ago. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.04.008>.
- NAYAK, Manoranjan; THIRUNAVOUKKARASU, Manikkannan; MOHANTY, Rama C.. Cultivation of freshwater microalga *Scenedesmus* sp. using a low-cost inorganic

fertilizer for enhanced biomass and lipid yield. **The Journal of General And Applied Microbiology**, [s.l.], v. 62, n. 1, p.7-13, 2016. Microbiology Research Foundation. <http://dx.doi.org/10.2323/jgam.62.7>.

PANCHA, Imran et al. Nitrogen stress triggered biochemical and morphological changes in the microalgae *Scenedesmus* sp. CCNM 1077. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 156, p.146-154, mar. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.01.025>.

PANCHA, Imran; CHOKSHI, Kaumeel; MISHRA, Sandhya. Enhanced biofuel production potential with nutritional stress amelioration through optimization of carbon source and light intensity in *Scenedesmus* sp. CCNM 1077. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 179, p.565-572, mar. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.12.079>.

RA, Chae Hun et al. Cultivation of four microalgae for biomass and oil production using a two-stage culture strategy with salt stress. **Renewable Energy**, [s.l.], v. 80, p.117-122, ago. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.renene.2015.02.002>.

RICHMOND, Amos; HU, Qiang. **Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology**. Second Edition. New Delhi, India: Wiley-Blackwell, 2013. 719 p.

RIPPKA, Rosmarie et al. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. **Microbiology**, v. 111, n. 1, p. 1-61, 1979.

ROCHA, Renan Paulo et al. Exploring the metabolic and physiological diversity of native microalgal strains (Chlorophyta) isolated from tropical freshwater reservoirs. **Algal Research**, [s.l.], v. 28, p.139-150, dez. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2017.10.021>.

ROLEDA, Michael Y. et al. Effects of temperature and nutrient regimes on biomass and lipid production by six oleaginous microalgae in batch culture employing a two-phase cultivation strategy. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 129, p.439-449, fev. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.11.043>.

- SIEGLER, H. de La Hoz et al. Improving the reliability of fluorescence-based neutral lipid content measurements in microalgal cultures. **Algal Research**, [s.l.], v. 1, n. 2, p.176-184, out. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2012.07.004>.
- SINGH, Poonam et al. Investigation of combined effect of nitrogen, phosphorus and iron on lipid productivity of microalgae *Ankistrodesmus falcatus* KJ671624 using response surface methodology. **Biochemical Engineering Journal**, [s.l.], v. 94, p.22-29, fev. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2014.10.019>.
- SLOCOMBE, Stephen P.; BENEMANN, John R.. **Microalgal Production for Biomass and High-Value Products**. Boca Raton, Fl: Crc Press, 2016. 335 p.
- SOARES, Jimmy et al. *Scenedesmus* sp. cultivation using commercial-grade ammonium sources. **Annals of Microbiology**, [s.l.], v. 68, n. 1, p.35-45, 8 dez. 2017. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s13213-017-1315-x>.
- SRIVASTAVA, Garima; NISHCHAL; GOUD, Vaibhav V.. Salinity induced lipid production in microalgae and cluster analysis (ICCB 16-BR_047). **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 242, p.244-252, out. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.03.175>.
- STUMM, W., Morgan, J.J., 1996. **Aquatic chemistry: chemical equilibria and rates in natural waters**. John Wiley & Sons, New York, NY.
- TAN, Xin Bei et al. Semi-continuous cultivation of *Chlorella vulgaris* using chicken compost as nutrients source: growth optimization study and fatty acid composition analysis. **Energy Conversion and Management**, [s.l.], v. 164, p.363-373, maio 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.enconman.2018.03.020>.
- VAN WAGENEN, Jon et al. Microplate-based method for high-throughput screening of microalgae growth potential. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 169, p.566-572, out. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.06.096>.
- XIA, Ling et al. Photoautotrophic outdoor two-stage cultivation for oleaginous microalgae *Scenedesmus obtusus* XJ-15. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 144,

p.261-267, set. 2013. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.06.112>.

XIN, Li 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**, [s.l.], v. 101, n. 14, p.5494-5500, jul. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.02.016>.

ZHANG, Yun-ming et al. Nitrogen starvation induced oxidative stress in an oil-producing green alga *Chlorella sorokiniana* C3. **Plos One**, [s.l.], v. 8, n. 7, p.1-12, 16 jul. 2013. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0069225>.

5. CONCLUSÃO GERAL

Os resultados do presente estudo sugerem que a salinidade e otimização das doses de nitrogênio e fósforo, assim como a interação com os modos de cultivo, pode contribuir para o incremento na produtividade de lipídios. As microalgas das linhagens *S. obliquus* e *S. bajacalifornicus* podem ser cultivadas em meio com concentração de até 10 g L⁻¹ de NaCl, sem redução na produtividade de lipídios neutros, quando comparado com o tratamento controle (0 g L⁻¹ de NaCl). Além disso, observou-se também que o modo de cultivo influenciou a produtividade de lipídios, obtendo melhores resultados nos modos batelada para *S. obliquus* e semi-contínuo para *S. bajacalifornicus*. Porém, em comparação ao modo batelada, a biomassa extraída com maior frequência no modo semi-contínuo apresentou menores teores de lipídios neutros, resultando em custos mais elevados para operações de coleta, concentração da biomassa, rompimento celular e extração do óleo para produção de biodiesel. Neste sentido, conclui-se que o modo batelada é o mais indicado para produzir biomassa em meio salino com conteúdo de lipídios de melhor qualidade para produção de biodiesel. Adicionalmente, verificou-se que a adição de micronutrientes afetou tanto a produtividade de lipídios quanto a composição de ácidos graxos, o que sugere que os meios de cultura para cultivos de microalgas devem ser suplementados com micronutrientes, principalmente manganês, zinco, cobalto e molibdênio.

Em experimentos em escala laboratorial para otimizar as dose de nitrogênio e fósforo, observamos que a linhagem *Scenedesmus obliquus* atingiu maior produtividade de lipídios quando comparada com a linhagem *Scenedesmus bajacalifornicus*. A produtividade de biomassa e lipídios não foi influenciada pelos níveis de fósforo investigados. Dessa forma, com o uso da menor dose, 5 mg L⁻¹ de fósforo, foi possível atingir a máxima produtividade de lipídios. Em relação ao nitrogênio, o aumento da dose respondeu de forma positiva no aumento da produtividade de biomassa, porém não houve efeito para a produtividade de lipídios, exceto no modo de cultivo semi-contínuo. Também foi observado que o modo de cultivo afetou na produtividade de lipídios, obtendo maiores valores no modo de cultivo semi-contínuo, porém com baixos teores de lipídios neutros quando comparada ao modo batelada e dois estágios. Desta forma, os modos dois estágios e batelada apresentam-se promissores para atingir elevadas produtividades de lipídios neutros e menor custo para extração do óleo.

Em cultivo outdoor, utilizado para validar as estratégias de aumento da produtividade de lipídios estudadas em escala laboratorial, a linhagem *S. obliquus* destacou-se como promissora para produção de lipídios em tanques abertos, mesmo que em condições de baixa temperatura, como observada nos experimentos. Nessas condições, não houve diferença nas produtividades de lipídios neutros entre os modos batelada e semi-contínuo. Porém, o modo de cultivo em batelada apresentou maiores teores de lipídios neutros, consolidando como uma ótima estratégia para produção de biomassa com maiores teores de lipídios e melhor qualidade para produção de biodiesel, assim como menores custos para extração do óleo. Também em cultivo outdoor, o uso do gás de incineração mostrou-se uma alternativa viável para fornecimento de CO₂ em cultivos, contribuindo com a redução dos custos de produção.

6. APÊNDICES

6.1. APÊNDICE A – Validação da metodologia de fluorescência com o corante vermelho do Nilo

Para corroborar os resultados de lipídios neutros totais obtidos com a metodologia de fluorescência utilizando o corante vermelho do Nilo, uma amostra de microalga da espécie *Scenedesmus obliquus*, com teores de lipídios neutros conhecidos, foi utilizada como padrão em todas as leituras realizadas no fluorímetro (Victor X5, Perkin Elmer, EUA). Para quantificação, uma curva padrão foi preparada com trioleína (Glyceryl trioleate, Sigma-Aldrich) em diferentes concentrações, obtendo as equações de regressão linear apresentadas na Tabela 12.

Tabela 12: Equações de regressão linear para obtenção da concentração de lipídios neutros totais. y é a unidade relativa de fluorescência e x a concentração de lipídios neutros totais (mg L⁻¹).

Equações	r ²
$y = 7,0779 x + 5,296$	0,9754
$y = 6,1277 x + 6,352$	0,9579
$y = 9,2383 x + 2,7056$	0,9732
$y = 5,9407 x + 2,2145$	0,9893
$y = 6,3364 x + 1,8785$	0,9855
$y = 6,2523 x + 9,1589$	0,9236
$y = 7,1944 x + 9,2187$	0,9512
$y = 6,8067 x + 3,9145$	0,9898

A quantificação gravimétrica de lipídios neutros da amostra padrão de microalga, foi realizada pelo método modificado de J:Schmid-Bondzynski-Ratzlaff (INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION, 1986). Os lipídios neutros foram extraídos usando hexano, adicionado às amostras de óleo, seguida de agitação em vórtex por 2 minutos e centrifugação (7500 g por 10 minutos). Posteriormente a fase superior foi coletada e transferida para tubos previamente pesados para evaporação e secagem em estufa a 102°C, até a completa secagem do material. Ao resfriarem, os tubos foram novamente pesados. A Figura 21 apresenta o teor de lipídios neutros totais da amostra padrão, e os valores encontrados pela metodologia da fluorescência, utilizando o vermelho do Nilo.

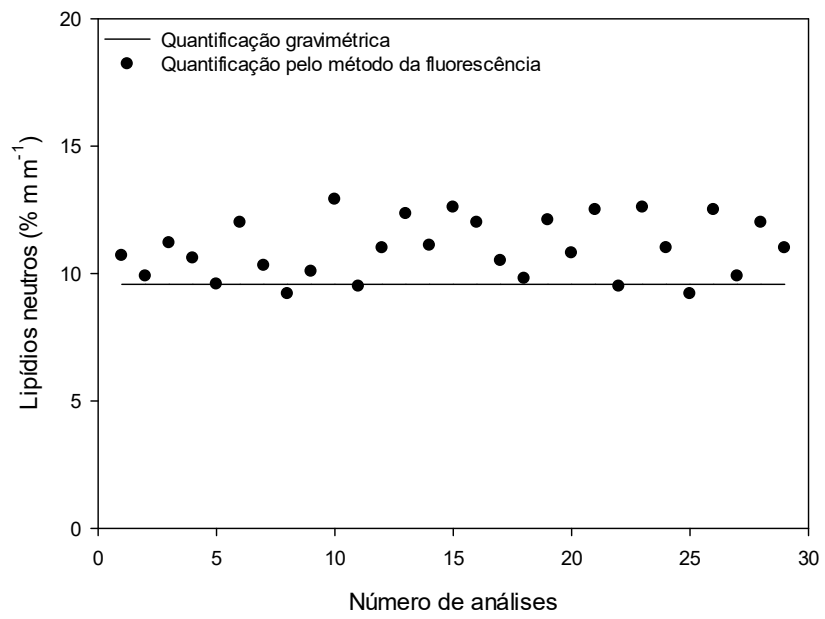


Figura 21: Teores de lipídios neutros totais de microalga utilizada como padrão para validação da metodologia da fluorescência.

6.2. APÊNDICE B – Protocolo Ratzlaff Modificado

Para a extração de lipídeos foi utilizada uma adaptação do método de Schmid-Bondzynski-Ratzlaff. Em tubos de ensaio, previamente secos em estufa a 102°C e resfriados em dessecador, pesou-se volumes de 1,0 g de biomassa liofilizada. A estes tubos adicionou-se 5 mL de HCl 8M, e logo após os tubos foram levados ao banho termostatizado a 70 °C durante 30 minutos. Após o procedimento, adicionou-se 5 mL de álcool etílico, 15 ml de éter etílico e 15 mL de éter de petróleo. O material foi levado em banho de ultrassom durante 5 minutos. Após a homogeneização o material foi vertido em tubos falcon (50 mL) e centrifugado a 1000 rpm durante 5 minutos. A camada sobrenadante foi retirada e transferida para tubos de vidro, previamente secos em estufa, identificados e pesados. Os tubos contendo o material extraído foram mantidos em banho termostatizado para a evaporação dos solventes. O procedimento de extração por éter etílico e éter de petróleo foi repetido por quatro vezes para garantir a remoção dos lipídeos da amostra. Após a evaporação dos solventes os tubos, previamente cobertos, foram transferidos para estufa a 102°C até a completa secagem do material. Ao resfriarem, os tubos foram novamente pesados. O cálculo dos lipídeos totais foi realizado por diferença de peso.

6.3. APÊNDICE C – Cromatogramas

Os cromatogramas para as amostras e padrões utilizados para identificação dos ácidos graxos são apresentados nas Figura 22, Figura 23, Figura 24, Figura 25 e Figura 26.

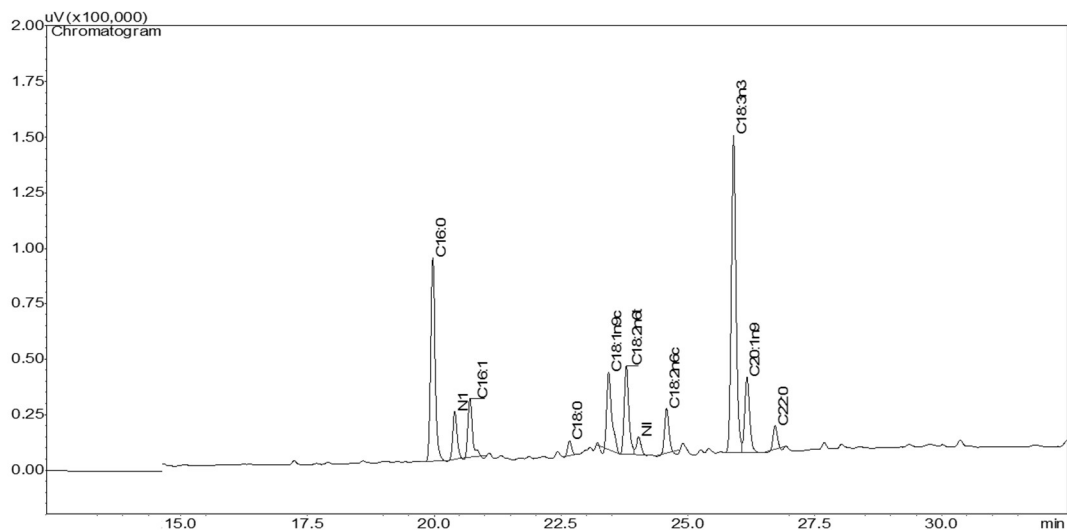


Figura 22: Cromatograma do óleo de *Scenedesmus obliquus*, extraído da biomassa produzida em cultivo outdoor em tanque raceway, no modo batelada.

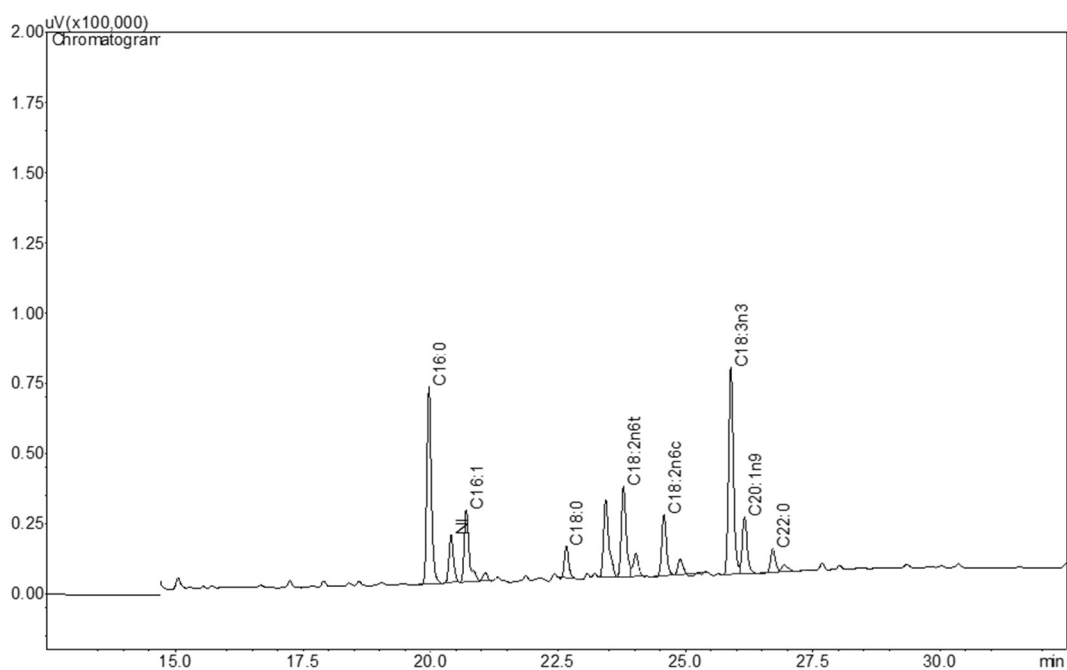


Figura 23: Cromatograma do óleo de *Scenedesmus obliquus*, extraído da biomassa produzida em cultivo outdoor em tanque raceway, no modo semi-contínuo.

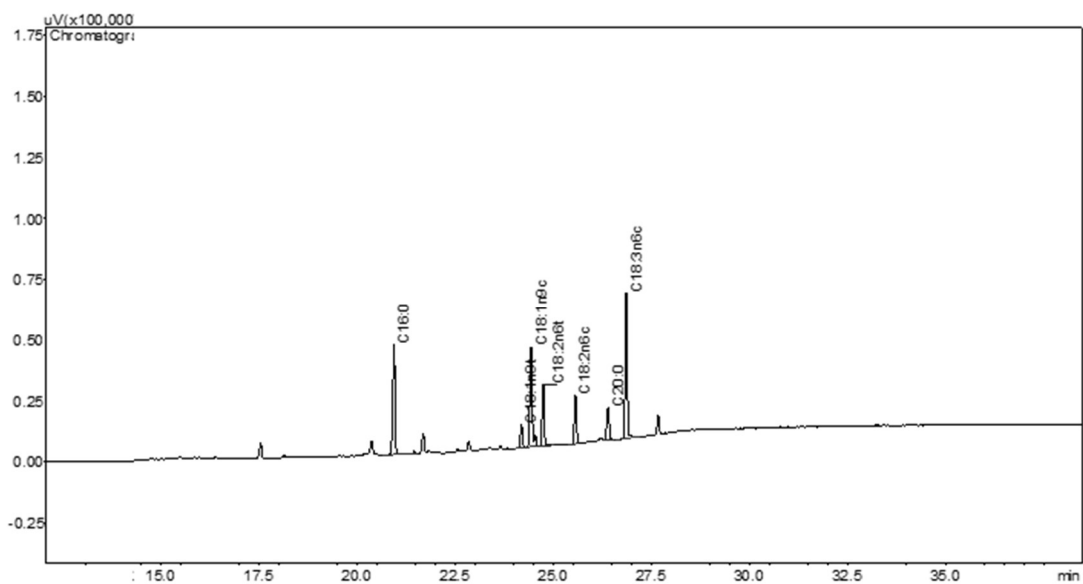


Figura 24: Cromatograma do óleo de *Scenedesmus obliquus*, extraído da biomassa produzida em cultivo indoor, em frascos Erlenmeier, no modo batelada.

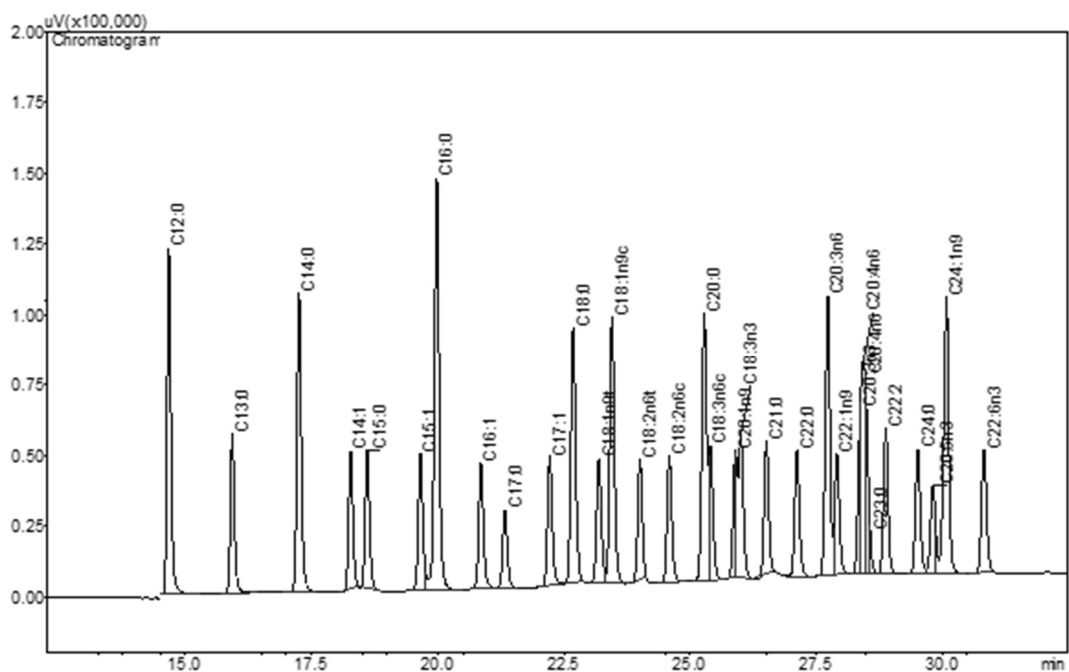


Figura 25: Cromatograma de mistura padrão de FAMES (SupleCo 37 FAME mix, SigmaAldrich, EUA).

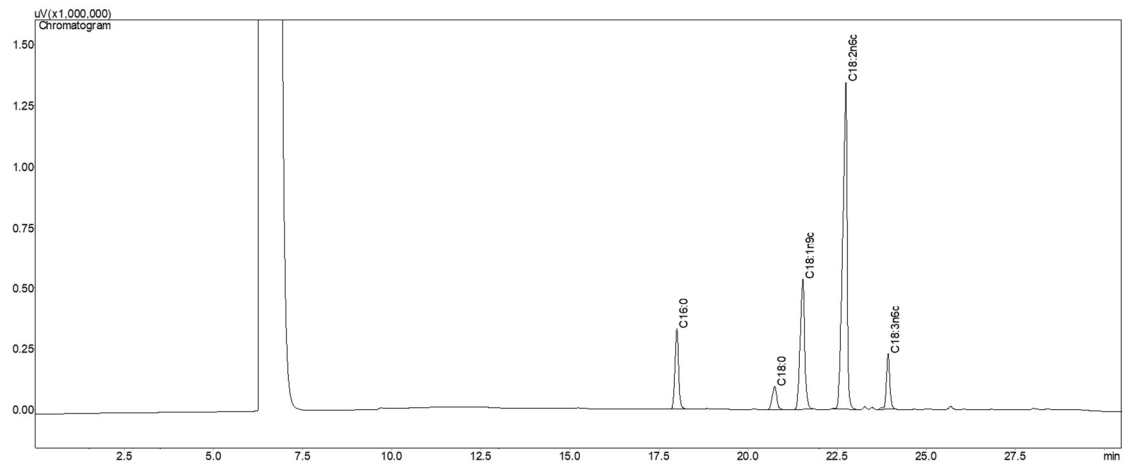


Figura 26: Cromatograma do óleo de soja.