



Universidade de Brasília
Doutorado em Biotecnologia e Biodiversidade

Biotecnologia e Biomassa para o Século XXI - Estudo de meios de cultivo para a produção de biomassa de microalgas

Dágon Manoel Ribeiro

Fevereiro/2020



Universidade de Brasília
Doutorado em Biotecnologia e Biodiversidade

**Biotechnology and Biomass for the 21st Century - Study of media for
cultivation for the production of microalgae biomass**

Dágon Manoel Ribeiro

Orientador: Dr. Bruno dos Santos Alves Figueiredo Brasil

Coorientador: Dr. Thomas Christopher Rhys Williams

Tese de doutorado submetida ao programa de pós-graduação em Biotecnologia e Biodiversidade, como um dos requisitos necessários para a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia e Biodiversidade.

Fevereiro/2020

“Existe uma única estrada e somente uma, e essa é a estrada que eu amo. Eu a escolhi. Quando trilho nessa estrada as esperanças brotam, e, o sorriso se abre em meu rosto. Dessa estrada nunca, jamais fugirei.”

Daisaku Ikeda

AGRADECIMENTOS

Agradeço,

Ao Prof. Dr. Bruno dos Santos Alves Figueiredo Brasil, pela orientação, confiança e oportunidade de desenvolver este trabalho e também ao professor Dr. Thomas Christopher Rhys Williams, por ter aceitado o convite de coorientador e sua grande contribuição em diferentes momentos, bem como garantido o avanço da Tese.

Aos meus familiares, minha mãe Vera que sempre me apoiou, meu irmão Thiago que sempre foi um exemplo e que sempre me incentivou, meu avô Oscar que sempre foi um exemplo para mim, minha Tia Marlene, meu Tio Júlio e a minha esposa Brenda Hada que foi super importante na reta final da Tese, pessoas que me ajudaram durante todos esses anos e com isso fizeram com que eu conseguisse ter a minha formação. Este trabalho também é em memória a minha avó Henriqueta, e grande parte das minhas características eu devo a ela.

Aos companheiros de laboratório, pela ajuda, companheirismo e amizade desfrutados nos dias e noites de trabalho, acompanhados sempre de muitas risadas e brincadeiras que me ajudaram muito durante esta caminhada. A pós-graduação já valeu pelas amizades que conquistei.

Aos professores e técnicos que sempre me apoiaram, professores que fizeram de tudo e mais um pouco para que eu aprendesse algo e me desenvolvesse, para me tornar um profissional ainda mais qualificado.

Ao CNPQ, CAPES e a FAPDF pelo apoio financeiro.

À Universidade de Brasília e à Embrapa Agroenergia pela formação profissional proporcionada.

À minha grande organização que pertença, a BSGI, onde todos os dias me ensina a tornar-me um grande valor para a sociedade, a todos os membros da organização, ao Taiyo Ongakutai e ao meu grande mestre da vida, Daisaku Ikeda.

E a todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para realização deste trabalho.

Lista de Tabelas

Tabela 1 Principais nutrientes no cultivo de microalgas.	22
Tabela 2 Comparação entre meio com nutrientes quimicamente definidos e indefinidos.	26
Tabela 3 Principais sistemas de cultivo de microalgas e suas vantagens e desvantagens.	27
Tabela 4 A) Composição Elementar das formulações testadas B) Nutrientes testados, suas concentrações usadas.....	34
Tabela 5 Número de células, taxa de crescimento específico e pH em diferentes pontos de crescimento celular.....	40
Tabela 6 Teor de biomassa, rendimento e compostos de interesse acumulados em <i>Chlorella sorokiniana</i> cultivados nos diferentes meios.....	41
Tabela 7 Metabólitos identificados de <i>Chlorella sorokiniana</i> cultivados em meios de cultura BG11, BGU e BGNIM.....	46
Tabela 8 Comparação entre produtividade e custos dos meios testados.	48
Tabela 9 A identificação molecular das 18 cepas utilizadas neste estudo com base na sequência do marcador nuITS2,.....	51
Tabela 10 Comparação de produtividades de biomassa, produtividades lipídicas e eficiência de remoção de nutrientes obtidas com espécies de microalgas cultivadas em POME sob diferentes condições.....	58
Tabela 11 Caracterização físico-química de POME bruto e em POME antes e após o cultivo de <i>Pseudokirchneriella</i> sp. LBA # 52 por 5, 10 e 15 dias. POME: Efluente da indústria de óleo de palma.	60
Tabela 12 Teor de biomassa, rendimento e compostos de interesse acumulado em <i>Pseudokirchneriella</i> sp. LBA # 52 crescido nos diferentes meios.....	62
Tabela 13 Perfil de carboidratos acumulados em <i>Pseudokirchneriella</i> sp. LBA # 52 crescido nas diferentes mídias.	64
Tabela 14 Perfil de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME) acumulados em <i>Pseudokirchneriella</i> sp. LBA # 52 crescido nas diferentes meios.	66
Tabela 15 Perfil de carotenóides acumulados em <i>Pseudokirchneriella</i> sp. LBA # 52 crescido nas diferentes mídias.	68
Tabela 16 Produtividade estimada entre Bold Basal e POME em diferentes momentos.	70

Lista de Figuras

Figura 1 Visão geral filogenia da linhagem verde e disseminação de genes verdes em outros eucariotos	16
Figura 2 Sistemática de <i>Chlorella</i> mostrando evolução independente em duas linhagens diferentes: as Trebouxiophyceae e as Chlorophyceae	17
Figura 3 Conversão fotossintética de energia solar para a produção de biodiesel.	19
Figura 4 O ciclo de Calvin, mostrando os intermediários do primeiro composto estável de carbono, 3-PGA, à molécula aceitadora de dióxido de carbono, ribulose-1,5-bifosfato e os pontos de saída formam o ciclo nas vias de sacarose, amido e isoprenoides e ácido chiquímico..	20
Figura 5 Visão geral da morfologia celular durante o rearranjo da composição bioquímica; alterações no conteúdo de proteínas e carboidratos à medida que o conteúdo lipídico celular das células aumenta.	24
Figura 6 Microscopia da microalga <i>Chlorella sorokiniana</i> LBA # 39 da coleção de microrganismos da Embrapa Agroenergia. Coletado na Chapada Imperial, Brasília/DF.	33
Figura 7 Esquema do fotobiorreator tubular automatizado com <i>airlift</i>	35
Figura 8 (A) Espectro de absorção de <i>Chlorella sorokiniana</i> LBA # 39 (linha sólida), espectro de emissão dos LEDs usados para iluminar a cultura (linha tracejada) e comprimento de onda usado para monitorar a cinética de crescimento das culturas (linha vertical a 525 nm). (B) Curva de calibração usada nas medições de densidade de algas obtidas com contagem direta de células dentro de uma câmara de Neubauer	36
Figura 9 Dinâmica de crescimento de <i>Chlorella sorokiniana</i> nas três formulações de meios. (A) Densidade de microalgas e (B) valor de pH da cultura.	39
Figura 10 Diferentes fontes e sistemas de transporte de nitrogênio. Amt - Transportador de canais de amônia, Nrt2 / Nar2 - Sistemas de nitratos e nitritos, HANT - Sistema de transportador de nitrogênio de alta afinidade, DUR3 - Transportador ativo de ureia, GS-GOGAT - Glutamina / glutamato sintase.	42
Figura 11 Perfil de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMES) de <i>Chlorella sorokiniana</i> crescidos em meios de cultura BG11, BGU e BGNIM.	44
Figura 12 Lagoas de tratamento de efluentes da indústria de óleo de palma (POME) na agroindústria (DENPASA - Dendê do Pará S / A).	52
Figura 13 Vista esquemática da estrutura do fotobiorreator <i>Flat Plate airlift</i> . (A) vista frontal; (B) Vista lateral.	53
Figura 14 Taxa de crescimento específico de 18 linhagens de microalgas cultivadas em POME.	55
Figura 15 Microscopia da microalga <i>Pseudokirchneriella</i> sp. LBA # 52 da coleção de microrganismos da Embrapa Agroenergia.	55
Figura 16 Dinâmica de crescimento de <i>Pseudokirchneriella</i> sp. LBA # 52.	56
Figura 17 Dinâmica da produção de biomassa (massa seca) da <i>Pseudokirchneriella</i> sp. LBA # 52.	57

Resumo

A biotecnologia e a produção biomassa são temas contemporâneos de grande relevância mundial. Neste contexto, destacam-se as microalgas como fontes promissoras para a produção de alimentos, bioprodutos e energia no século XXI. No entanto, existem diferentes desafios a serem superados para tornar a produção industrial de microalgas economicamente viável, dentre eles o custo do meio de cultivo. Esta tese tem como objetivo apresentar duas estratégias para a produção de biomassa de microalgas verdes (Chlorophyta) utilizando meios de cultivo de baixo custo. A primeira estratégia consiste na formulação de meio quimicamente definido que combina as fontes de nitrogênio (ureia, amônia e nitrato) com o uso de fertilizantes como uma abordagem de baixo custo para o cultivo de *Chlorella sorokiniana*. O meio proposto denominado "Blue Green Nitrogen Mix" (BGNIM), foi capaz de suportar o crescimento de *C. sorokiniana* em níveis semelhantes ao meio sintético padrão BG11, apresentando produtividades entre 47 e 50 mgDW • L⁻¹ • d⁻¹. Adicionalmente, o uso combinado de três fontes de nitrogênio levou a alterações na composição da biomassa. A concentração de proteínas aumentou 7%, de carotenóides 41%, de açúcares solúveis 12%, alanina 370%, serina 350%, valina 180%, mio-inositol 190%, ácido glicérico 230% e ácido glutâmico 220%, quando comparado ao meio padrão BG11. Além disso, uma grande mudança de pH foi detectada durante a fase inicial de crescimento em culturas de BGNIM, abrindo oportunidades para o controle de predadores sensíveis ao pH durante a produção em larga escala. É importante ressaltar que a formulação BGNIM proporcionou uma redução de custo de aproximadamente 95% em comparação com o meio padrão BG11. A segunda estratégia foi a utilização de efluente da indústria de óleo de palma (POME) como meio de cultivo algal quimicamente indefinido. Neste trabalho, a linhagem autóctone de microalga *Pseudokirchneriella* sp. O LBA # 52. Esta foi selecionada dentre 18 linhagens testadas para crescimento em POME. A produtividade da biomassa alcançou 272,13 mgDW • L⁻¹ • d⁻¹ durante o cultivo, usando fotobiorreatores *Flat Plate airlift* de 15 L. Os carboidratos constituíram a maior fração da biomassa das algas, atingindo até 39,73%, enquanto a fração lipídica variou de 8,39% a 11,03% quando o POME é utilizado como meio de cultura. Além disso, o crescimento de algas promoveu reduções de 61,21% do nitrogênio total (TN), 99,99% de amônio e 99,07% de fosfato presentes no POME. Este estudo destaca o potencial do uso de microalgas no tratamento de águas residuais e na produção de biomassa de alto valor agregado, integrada à indústria de óleo de palma.

Abstract

Biotechnology and biomass production are contemporary themes of great worldwide relevance. In this context, microalgae are highlighted as promising sources for the production of food, bioproducts and energy in the 21st century. However, there are different challenges to be overcome to make industrial microalgae production economically viable, including the cost of the medium. This thesis aims to present two strategies for the production of biomass from green microalgae (Chlorophyta) using low cost cultivation media. The first strategy consists of formulating a chemically defined medium that combines nitrogen sources (urea, ammonia and nitrate) with the use of fertilizers as a low-cost approach to the cultivation of *Chlorella sorokiniana*. The proposed medium called "Blue Green Nitrogen Mix" (BGNIM), was able to support the growth of *C. sorokiniana* at levels similar to the standard synthetic medium BG11, presenting productivity between 47 and 50 mgDW • L⁻¹ • d⁻¹. Additionally, the combined use of three nitrogen sources led to changes in the composition of the biomass. Protein concentration increased 7%, carotenoids 41%, soluble sugars 12%, Alanine 370%, Serine 350%, Valine 180%, Myo-inositol 190%, Glyceric acid 230% and Glutamic acid 220%, when compared to standard medium BG11. In addition, a large pH change was detected during the initial growth phase in BGNIM cultures, opening up opportunities for the control of pH sensitive predators during large-scale production. It is important to note that the BGNIM formulation provided a cost reduction of approximately 95% compared to the standard BG11 medium. The second strategy was to use effluent from the palm oil mill (POME) as a chemically indefinite algal culture medium. In this work, the indigenous microalgae *Pseudokirchneriella* sp. LBA # 52 was selected from 18 strains tested for growth in POME. Biomass productivity reached 272.13 mgDW • L⁻¹ • d⁻¹ during cultivation, using 15 L *Flat Plate* photobioreactors. Carbohydrates constituted the largest fraction of algae biomass, reaching up to 39.73%, while lipid fraction varied from 8.39% to 11.03% when POME is used as a culture medium. In addition, algae growth promoted reductions of 61.21% of total nitrogen (TN), 99.99% of ammonium and 99.07% of phosphate present in POME. This study highlights the potential of using microalgae in the treatment of wastewater and in the production of high added value biomass, integrated with the palm oil industry.

Sumário

Prelúdio	10
A Biotecnologia e o século XXI	10
1. Introdução.....	12
1.1. Histórico da produção de biomassa algal.....	12
1.2. Algas	15
1.3. Fotossíntese	17
1.4. Nutrientes.....	21
1.5. Estudo sobre meio de cultivos	23
1.6. Fotobiorreator	Erro! Indicador não definido.
2. Objetivo	29
2.1 Objetivos Específicos.....	29
3. Uma abordagem de baixo custo para a produção de <i>Chlorella sorokiniana</i> através do uso combinado de fertilizantes à base de ureia, amônia e nitrato.	30
3.1. Materiais e Métodos	33
3.1.1 Cepa de microalgas.....	33
3.1.2 Meio de cultura	33
3.1.3 Fotobiorreatores	35
3.1.4 Experimentação.....	37
3.1.5 Análise da composição da biomassa de algas no meio quimicamente definido	37
3.1.6 Análise de dados.....	38
3.2 Resultados e discussão	39
3.2.1 Crescimento celular e produtividade de biomassa	39
3.2.2 Alterações no pH durante o crescimento em diferentes meios.....	41
3.2.3 Alterações bioquímicas	43
3.2.4 Alterações no perfil metabólico	45
3.2.5 Avaliação de custo e produtividade	47
4. Seleção e cultivo de microalgas em efluentes da indústria de óleo de palma para remoção de nutrientes e produção de biomassa de algas	49
4.1 Materiais e métodos	50
4.1.1 Cepas de microalgas	50
4.1.2 Efluente da indústria de óleo de palma.....	51
4.1.3 Triagem de microalgas para crescimento em POME	52
4.1.4 <i>Pseudokirchneriella</i> sp. Cultivo de cepacepas LBA # 52.....	52
4.1.5 Cultivo de microalgas em fotobiorreatores Flat Plate airlift	53
4.1.6 Determinação da composição do POME.....	53
4.1.7 Análise da composição bioquímica da biomassa.....	53
4.1.8 Análise estatística.....	54
4.2 Resultados e discussão	54
4.2.1 Triagem de linhagens de microalgas para crescimento em POME.....	54
4.2.2 Crescimento de algas em POME.....	56
4.2.3 Efeito do cultivo de algas na composição do POME	59
5. Considerações finais	71
6. Conclusão.....	72
7. Referências	73

Prelúdio

A Biotecnologia e o século XXI

O século XXI está sendo construído com tecnologias e perspectivas de sociedades nunca antes imaginadas. Hoje a globalização é uma realidade e o acesso a informação é ilimitado. Neste contexto, algumas áreas terão grande importância na construção de uma nova era no mundo, como áreas ligadas a tecnologia da informação, nanotecnologia e a biotecnologia.

Utilizar a biodiversidade para desenvolvimento de produtos para adquirir vantagens, sejam elas ligadas à produção de alimentos, energia ou a cuidados com o corpo e a mente, foi determinante para a construção da sociedade que hoje conhecemos. Registros de mais de dez mil anos indicam que já existia seleção das plantas mais produtivas, existiam também, a seleção de animais mais domesticáveis que auxiliaram na proteção e no desenvolvimento da sociedade. Assim, a sobrevivência esteve sempre ligada à dominação da tecnologia, onde a mistura entre o conhecimento e o uso da biodiversidade para o desenvolvimento de processos e produtos, deu origem ao que conhecemos hoje por biotecnologia.

Fazendo uma analogia, é possível imaginar quem eram as pessoas que faziam fermentações, extratos de plantas e animais, reações e transformações com todo o tipo de substância da natureza, conhecido como um alquimista da biodiversidade, talvez os primeiros biotecnologista. Mesmo sendo algo tão presente desde o início da civilização humana, o termo “Biotecnologia” só foi citado e amplamente difundido a partir de 1960, quando a identificação, a tradução e a manipulação da informação genética foi descoberta.

Paul Berg, bioquímico e ex-professor/pesquisador da Universidade de Stanford, foi quem deu início as tecnologias de DNA recombinante. Foi premiado com o prêmio Nobel de química em 1980 por seus estudos fundamentais sobre a bioquímica dos ácidos nucleicos, a gênese da tecnologia do DNA recombinante juntamente com Walter Gilbert e Frederick Sanger, que tiveram importantes contribuições na determinação de sequências de bases em ácidos nucleicos.

E com os avanços da tecnologia do DNA recombinante surgiram empresas voltadas para essa área, conhecidas como *Biotech*, e com isso o termo começa a se popularizar. Mas mesmo diante de tantos avanços, grandes debates frente a perspectiva

da utilização da biotecnologia e biodiversidade no século XXI ainda geram conflitos éticos na sociedade.

Entretanto, o termo biotecnologia foi ganhando notoriedade com o passar dos tempos e é cada vez mais presentes nos projetos e nos avanços científicos em todo o mundo. Definido como a utilização da biodiversidade, como organismos vivos e suas moléculas, no desenvolvimento de produtos, processos e serviços para o homem e o ambiente. Hoje a biotecnologia é uma das principais ferramentas para enfrentar problemas ambientais, gerar bens de consumo e produzir biomassa para alimento e energia. Analogamente com o crescimento da biotecnologia, a bioeconomia se torna cada vez mais relevante em muitos países, apresentando uma nova forma de valorização de sua biodiversidade e de seus produtos.

O século XXI é o século do domínio e do entendimento dos macro e micros organismos e de suas moléculas com uma precisão nunca antes imaginadas. Novos processos, produtos e organismos serão desenvolvidos, e nesse novo mundo os microrganismos serão responsáveis por grande parte dos meios de produção. A bioquímica da fotossíntese será mais bem compreendida e com apenas luz, água, ar e alguns poucos nutrientes será possível causar uma transformação em nossa forma de sobrevivência. Os organismos fotossintetizantes como plantas e algas sempre foram a maior fonte de nutrição dos seres humanos e animais, portanto, a evolução, a otimização e o profundo entendimento dos processos de captura de carbono para a transformação em biomassa é uma tecnologia essencial para a sustentabilidade de muitas cadeias produtivas e o combate das mudanças climáticas no mundo.

1. Introdução

É indispensável à busca de sistemas de produções de biomassa que possam suprir as diferentes aplicações da sociedade neste século XXI, afinal, o fato é que água, oxigênio, alimento e energia serão sempre necessários. Com isso, diferentes sistemas de produção de biomassa vegetal já mostraram sua efetividade. No entanto, a produção de biomassa de microalgas possui vantagens potenciais como (i) elevada absorção de CO₂; (ii) crescimento rápido e exponencial comparado a plantas terrestres; (iii) alto teor de compostos de interesse, como lipídios, proteínas e carboidratos; (iv) capacidade de crescimento em águas salinas, salobras ou contaminadas por resíduos municipais ou agroindustriais; (v) necessidade de pouca área em relação às culturas tradicionais como milho e cana de açúcar, podendo-se aproveitar terras impróprias para a agricultura (Chisti, 2008; Oncel, 2013; Raheem et al., 2018).

1.1. Histórico da produção de biomassa algal

Pesquisadores em todo o mundo buscam desenvolver método para conseguir fazer com que a produção de biomassa algal se torne economicamente viável, afinal, os gargalos continuam os mesmos há décadas: Precisamos de cepas mais produtivas, meios de cultivo de baixo custo, fotobiorreatores mais eficientes e automatizados e sistemas de colheita com menores perdas de biomassa e gasto energético.

Essa história começa após a segunda guerra mundial, onde a ideia de cultivo de microalgas em grande escala, especialmente espécies do gênero *Chlorella* para a utilização como alimento, começa a ser considerada por pesquisadores da Instituição Carnegie de Washington nos anos de 1947 e 1948. H. A. Spoehr e Harold W. Milner fizeram os estudos preliminares e desde o início conseguiram constatar que microalgas realmente tem um grande potencial de crescimento e acúmulo de compostos de interesse, pois diferente das plantas superiores, as microalgas seriam muito flexíveis nos diferentes acúmulos de carboidratos, proteínas e lipídios e sugere que o próximo passo seria o envolvimento com as pesquisas aplicadas e engenharia (Spoehr and Milner, 1949).

Em 1948, pesquisadores de Stanford são contratados para realização de um estudo sobre os fatores necessários para a concepção de uma planta piloto para a produção de biomassa de microalgas, estudo que termina em 1950 sem muitos resultados conclusivos sobre a real possibilidade da viabilização econômica

(Borowitzka and Moheimani, 2013). E então, em 1950 a corporação americana de pesquisa e desenvolvimento de Massachusetts se interessou pela ideia de produção de biomassa através do cultivo de algas e fez uma revisão cuidadosa dos aspectos econômicos sobre o assunto com base nas experiências da pesquisa realizada pelos pesquisadores de Stanford. Eles concluíram que ainda existiam muitas incertezas se realmente o cultivo de microalgas seria viável. Mas naquele momento o trabalho foi importante, pois era desejável que encontrassem quais seriam os principais problemas que impediriam o cultivo em larga escala de microalgas (Burlew, 1953).

Mas muitos pesquisadores da época estavam de acordo, que era necessária a construção de uma unidade maior para poder entender como seria o real comportamento das microalgas e produzir quantidades maiores de microalgas para que o potencial dessa nova indústria fosse avaliado. E com esse objetivo a Corporação Carnegie de Nova York juntamente com a Arthur D. Little, Inc uma organização de pesquisa e desenvolvimento de consultoria em Cambridge, Massachusetts iniciam os trabalhos para a construção da primeira planta piloto de cultivo de *Chlorella* (Burlew, 1953).

Em julho de 1953 uma publicação organizada por John S. Burlew intitulada “*Algal Culture from Laboratory to Pilot Plant*” mostrando os principais fundamentos e aplicações do cultivo de microalgas que possibilitou então o início de diversos outros projeto e colaborações na área e em razão disso tem sido considerado um marco no início da produção em larga escala de biomassa algal (Benemann, 2013).

Com a crise do petróleo em 1970, o governo americano voltou a dar atenção as fontes de biocombustíveis renováveis e investiu, entre 1978 e 1996, em um programa de pesquisa especialmente para o estudo do potencial das microalgas para produção de biocombustíveis. Investimento semelhante foi realizado pelo governo japonês entre 1990 e 2000. Ambos os programas concluíram que a produção de microalgas é tecnicamente viável, porém são necessários aperfeiçoamentos tecnológicos importantes para que se atinja a alta produtividade requerida (Walz et al., 2009).

O interesse na produção de energia a partir de algas ressurgiu e vultosos investimentos foram realizados, nos anos de 2007 a 2009 teve um aumento de cerca de 400% tanto públicos como privados nos Estados Unidos (Stephens et al., 2010). Estados Unidos, China e países europeus são os que lideram as buscas para o aperfeiçoamento dos sistemas de cultivo de biomassa e as ferramentas biotecnológicas que é o que deverá fazer diferença neste século (Walz et al., 2009; Chisti and Yan, 2011; Raheem et al., 2018).

O avanço da biotecnologia tem uma relação direta com o aumento da produção desses microrganismos fotossintetizantes. Em 2010 o Departamento de Energia dos Estados Unidos concedeu US\$48,6 milhões para pesquisas na área de Biotecnologia de Microalgas que foram realizadas por uma aliança nacional (*National Alliance for Biofuels and Bioproducts* – NAABB) que foi constituída por laboratórios nacionais, universidades e indústrias de todo os Estados Unidos com o objetivo de avançar na domesticação das microalgas e assim estimular novos investimentos e projetos criando um novo setor econômico e gerando novos empregos (Richardson and Johnson, 2015).

A indústria de microalgas tem potencial para possibilitar a produção de uma biomassa algal em larga escala em várias regiões do mundo. Vivemos uma época onde ainda existem conflitos por energia e alimento e a existência de terras que não podem ser aproveitadas para agricultura convencional. Assim, o avanço dessa biomassa de alta tecnologia, automatizada e com possibilidade de produção vertical, pode dar a possibilidade de que diversos países possam a vir a se tornar autossuficientes em produção de um alimento rico em proteínas e óleos essenciais e uma fonte energética limpa e renovável, podendo assim garantir maior sustentabilidade urbana (Stephens et al., 2010; Elrayes, 2018; Ling and Chiang, 2018).

Em todos os países, a geração de energia é algo crucial, e existe uma grande dependência de combustíveis fósseis em todo o mundo. Deste modo, a prospecção de novas soluções no mercado de bioenergia é algo desejável. Diversas são as possibilidades, mas no século XXI, as biomassas que irão se destacar serão derivadas de organismos fotossintetizantes, com capacidade de modificação genética e com diferentes aplicações biotecnológicas (Wijffels and Barbosa, 2010; Moody et al., 2014; Pires, 2017).

Em virtude disso, as microalgas se tornam uma alternativa para melhorar o ambiente em que vivemos, começando pela geração de energia, que possibilitará a produção de mais biomassa para alimentos e diferentes aplicações, desde tratamento de resíduos ao desenvolvimento de novas moléculas e estruturas. E por isso, para a viabilização da produção de biomassa de microalgas é crucial ter um profundo entendimento sobre o organismo, os insumos necessários para seu crescimento, o sistema produtivo, os produtos gerados e seu desenvolvimento sustentável. E neste contexto, esta introdução visa apresentar o que são as microalgas, seus processos bioquímicos e seu grande potencial biotecnológico.

1.2. Algas

O termo Alga foi proposto originalmente por Carolus Linnaeus em seu livro *Species Plantarum* publicado em 1753, hoje considerada uma nomenclatura popular sem significado taxonômico que é utilizado para descrever uma grande variedade de organismos (Bicudo e Menezes, 2017). Estimativas dizem que o número de algas vivas variam de 30.000 a mais de 1 milhão de espécies, que inclui 15 filos e 54 classes que se alteram com o tempo (Guiry, 2012). E atualmente existem mais de 150.000 de algas cadastradas em um banco de dados global de algas (AlgaeBase, 2019).

As algas apresentam uma grande diversidade gênica, fisiológica, morfológica, de formas de reprodução, históricos de vida e ambiente que vivem, compartilham o mesmo ancestral das plantas terrestres, e por esta razão é frequentemente utilizado para estudos que buscam entendimento evolutivo e de funcionamento dos organismos fotossintetizantes, que geram informações relevantes para diferentes campos da ciência (Bicudo e Menezes, 2017; Brodie et al., 2017).

A busca pelo entendimento da origem evolutiva dos eucariotos fotossintéticos é algo constante, pela razão de ter sido um evento importante na história da vida no planeta e conseqüentemente possui relação direta com os organismos terrestres (Kenrick and Crane, 1997). Entretanto, devido a sua grande plasticidade gênica e capacidade de transferência horizontal dos genes, ainda existem diversos organismos que ainda não foram descritos e muitos genes com funções desconhecidas nas microalgas (Brodie et al., 2017).

Na organização mais moderna as algas verdes, as plantas terrestres e as carófitas são organizadas em uma linhagem geral denominada *Viridiplantae*, o principal grupos de eucariontes fotossintéticos, onde as hipóteses atuais dividem em dois clados, um denominado *Chlorophyta* que inclui principalmente as algas unicelulares e outro *Streptophyta* que inclui as algas verdes carófitas e as plantas terrestres. Divisões que ainda hoje são questionados por ainda existirem muitas questões que persistem, incluindo as ordens de ramificação das linhagens *prasinófitas* as relações entre os principais clados de *Chlorophyta* (*Chlorodendrophyceae*, *Ulvophyceae*, *Trebouxiophyceae* e *Chlorophyceae*) e entre o clado *Streptophyta* (Leliaert et al., 2012). A hipótese atual da divergência filogenética das algas verdes divididas em *Chlorophyta* e *Streptophyta* é apresentada na Figura 1.

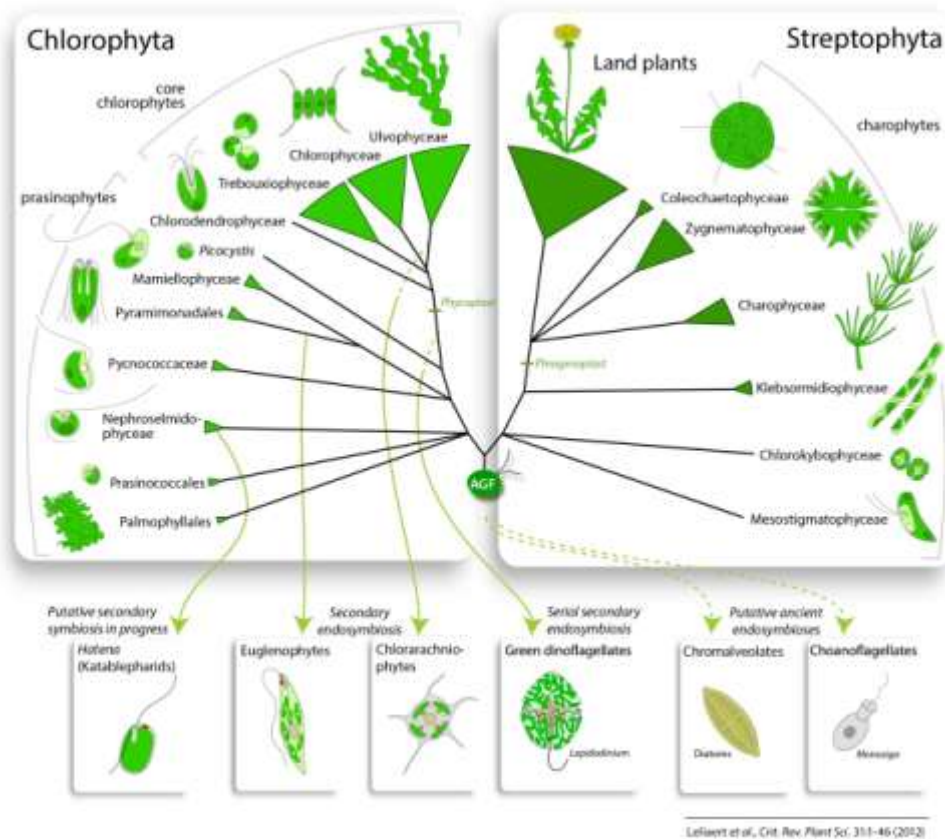


Figura 1 Visão geral filogenia da linhagem verde e disseminação de genes verdes em outros eucariotos adaptada de Leliaert et al. (2012).

Além disso, mesmo com o aprimoramento de diferentes técnicas taxonômicas, ainda não existe unanimidade entre os cientistas a respeito de determinados conceitos e pontos de vistas relacionado as algas (Bicudo e Menezes, 2017), e com isso, se opta por abordagens mais atuais que consistem em combinar técnicas clássicas e modernas, como morfologia, estudos de ciclos de vida com composição e marcadores bioquímicos complementados por análise filogenética (Champenois et al., 2015).

Como por exemplo, a espécie amplamente conhecida como *Chlorella* encontra dificuldade em sua caracterização e são apresentadas dispersas em duas classes de Chlorophyta: a *Trebouxiophyceae* e a *Chlorophyceae*. É possível observar na árvore filogenética proposta por Champenois e colaboradores (2015), a *Trebouxiophyceae* incluiu a espécie tipo *Chlorella vulgaris* (Beyerinck, 1890), *Chlorella minutissima* Fott e Nováková, *Chlorella sorokiniana* (Shihira e Krauss, 1965), *Chlorella ellipsoidea* Gerneck, *Chlorella mirabilis* Andreyeva, *Chlorella saccharophila* (Krüger) Migula, e *C. luteoviridis* Chodat, enquanto *Chlorophyceae* incluiu *C. fusca* e *C. zofingiensis* (Figura 2).

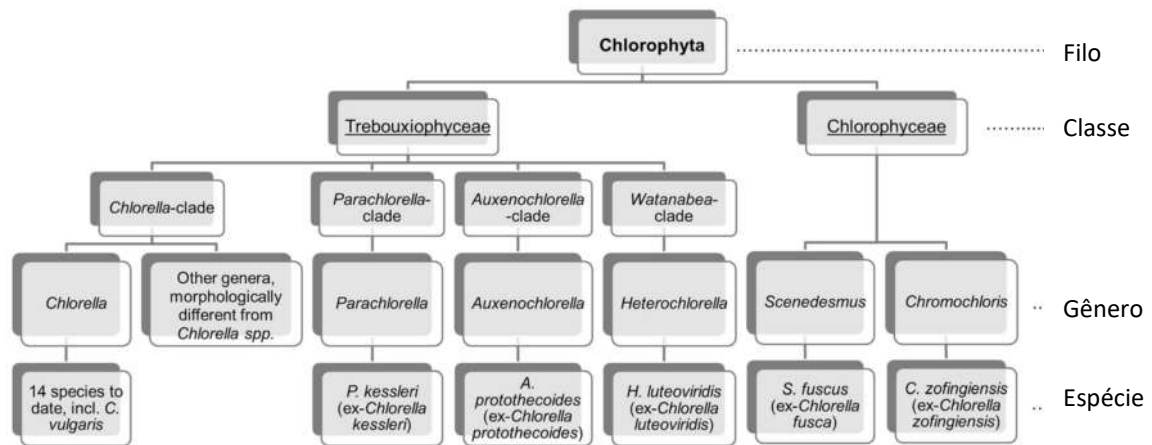


Figura 2 Sistemática de *Chlorella* mostrando evolução independente em duas linhagens diferentes: as Trebouxiophyceae e as Chlorophyceae adaptada de Champenois et al. (2015).

1.3. Fotossíntese

A fotossíntese é a principal reação química na biosfera, consistindo no processo de transformação de energia luminosa, água e dióxido de carbono (carbono inorgânico) em dois produtos indispensáveis para a sobrevivência humana que são os açúcares (carbono orgânico), que é utilizada para produção de energia e alimento, e o oxigênio, molécula essencial para a respiração de todos os seres humanos (Calvin e Massini, 1952; Taiz e Zeiger, 2004; Govindjee et al., 2005). Assim, a compreensão da origem e evolução da fotossíntese é de interesse, pois pode ajudar a explicar ineficiências no processo e apontar os caminhos alternativos para melhorar vários aspectos da agricultura e aplicações de energia. E por esse fato o estudo que visa o aumento da produção de biomassa de formas alternativas e sustentáveis deve ser incentivado.

O crescimento da biomassa algal está relacionado com a eficiência na assimilação do carbono pela fotossíntese. A eficiência fotossintética é um dos parâmetros para quantificar a relação entre a concentração de dióxido de carbono, com a intensidade luminosa e o ganho de biomassa (Papageorgiou e Govindjee, 2014). Zhu e colaboradores (2008) apresentam a eficiência de 4,6% para a fotossíntese em plantas C3 a 30 °C com 380 ppm de CO₂ atmosférico e 6% para a eficiência em plantas C4.

Desde a introdução dos estudos descrevendo a fotossíntese com Warburg, que foi agraciado com o Nobel em 1931, e os estudos de Melvin Calvin em 1961 pela descrição da via redutora de pentose fosfato, a *Chlorella* se torna um dos principais

organismos para estudos da fotossíntese (Burlew, 1953; Raines, 2003). O gênero *Chlorella* é formado por organismos que contem pelo menos um plastídio podendo ser autotrófico ou heterotrófico facultativo e tendo como pigmentos principais as clorofilas *a* e *b* e os carotenoides que auxiliam na proteção contra foto oxidação e auxílio na dispersão de excesso energia (John et al., 2002; Wehr et al., 2015).

Encontrar a maior taxa fotossintética foi a missão de Warburg (Grobbelaar, 2010), onde a maior eficiência fotossintética reportada pelo celebre pesquisador foi de 46.8%, onde outros autores contestam dizendo que o máximo seria 12–13% baseando-se no total de incidência solar. Com produtividade sendo expressa em biomassa seca (DW), a máxima teórica chegaria a 1700 a 1900 mgDW m⁻² d⁻¹ (Weyer et al., 2010) e a maior reportada em sistemas produtivos em larga escala variam entre 330 a 420 mgDW m⁻² d⁻¹ (Laurens, 2017). E nesta busca, a *Chlorella* é uma das principais candidatas para a produção de biomassa de microalgas em larga escala, levando em conta sua alta produtividade, alto teor lipídico, resistência a condições alta intensidade luminosa e condições não naturais de um fotobiorreator (Cazzaniga et al., 2014).

Á relação de energia luminosa e a formação de biomassa, foi descrito como 8 fótons ou 0,125 mol de carbono por 1 quanta de energia luminosa (Grobbelaar, 2013). Chegando a resultados relatados como capacidade de produtividade de 1790 mgDW m⁻² d⁻¹ de biomassa, que pode variar dependendo das condições ambientais de temperatura, umidade e pressão (Grobbelaar, 2010).

A fotossíntese pode ser dividida em duas etapas. A primeira reação ocorre com a fotólise da água pelo fotossistema II liberando oxigênio e prótons energéticos, o transporte linear de elétrons entre H₂O e NADP⁺ resulta na produção de NADPH e O₂ e síntese de ATP através de fotofosforilacao que serão utilizados na segunda etapa de fixação de carbono pelo Ciclo de Calvin (Figura 3). A energia solar capturada pelos sistemas de antenas de proteína de pigmento é transferida como energia de excitação para os centros de reação fotossintética, fotossistema I (PSI) e fotossistema II (PSII) nas membranas tilacóides e então a energia solar gera um gradiente de prótons transmembranar estabelecido através da membrana, impulsionando a formação de ATP. O NADPH, o transportador de elétrons, é formado no PSI usando um elétron derivado, em última análise, da divisão da água e da liberação de oxigênio (Stephenson et al., 2011).

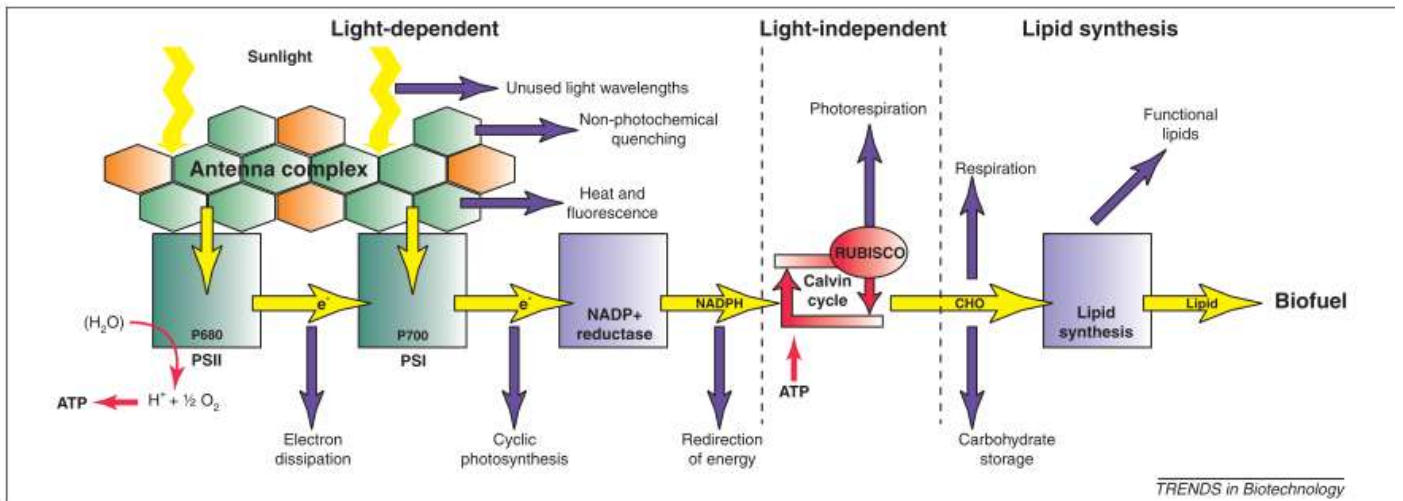


Figura 3 Conversão fotossintética de energia solar para a produção de biodiesel. Os lipídios na forma de triacilglicerídeos (TAGs) são os precursores do biodiesel. A eficiência deste processo é, portanto, determinada pela conversão de energia solar em lipídios. Para melhorar a eficiência da conversão de energia solar, os estágios indicados pelas setas amarelas precisam ser maximizados e os termos de perda indicados pelas setas roxas precisam ser minimizados adaptado de Stephenson et al. (2011).

Na segunda etapa da fotossíntese, os ATP e NADPH produzidos são usados nas reações independentes da luz da fotossíntese para fixar o CO_2 no carboidrato; uma reação catalisada pela ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase oxigenase (RUBISCO) formando composto de três carbonos, o 3-ácido fosfoglicérico (3-PGA) (Taiz e Zeiger, 2004; Stephenson et al., 2011). O carboidrato fixado é então usado para todas as funções celulares, incluindo respiração, geração de biomassa e síntese lipídica, enquanto outras devem ser recicladas para regenerar uma nova molécula receptora de cinco carbonos, reiniciando o ciclo (Figura 4).

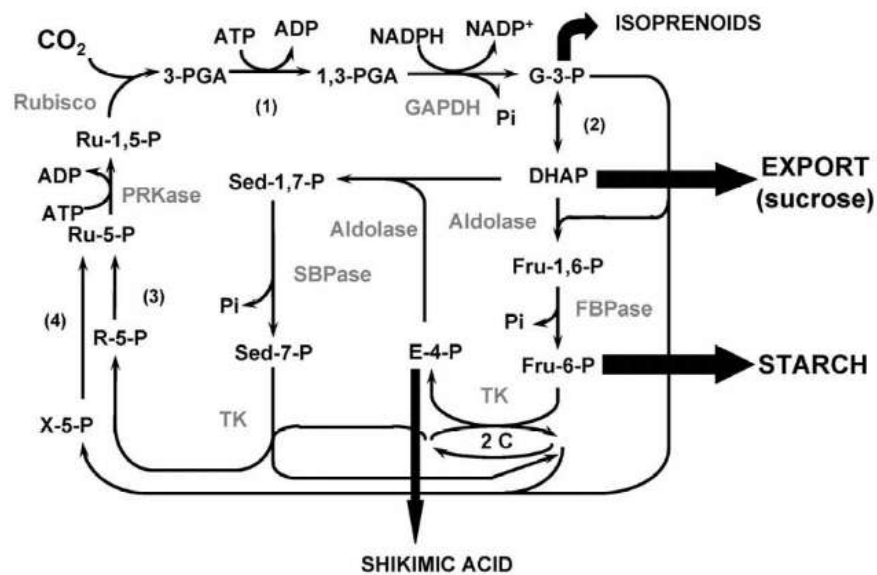


Figura 4 O ciclo de Calvin, mostrando os intermediários do primeiro composto estável de carbono, 3-PGA, à molécula aceitadora de dióxido de carbono, ribulose-1,5-bifosfato e os pontos de saída formam o ciclo nas vias de sacarose, amido e isoprenoides e ácido chiquímico. As reações catalisadas pelas enzimas cujos níveis foram manipulados em plantas transgênicas são mostradas em cinza. O local de função das enzimas (1) 3-fosfoglicerato-quinase (2) triose fosfato isomerase (3) ribose-5-fosfato isomerase e (4) ribulose-5-fosfato epimerase também é indicado adaptada de Raines (2003).

E neste contexto, a otimização da fotossíntese das microalgas está relacionada com produção de biomassa. Levando em conta mais de 1000 isolados, e avaliando a produtividade de biomassa e de compostos de interesse em condição de laboratório, a Aliança Nacional de Biocombustíveis e Bioprodutos dos Estados Unidos da América indica a *Chlorella sorokiniana* como a principal candidata para produção e aplicações biotecnológicas (Olivares, 2014). Após definido a microalga candidata biorrefinaria algas, é possível definir outras questões como o sistema de produção, e controle dos parâmetros de CO₂, temperatura, homogeneidade, uso eficiente da luz e o acúmulo de compostos de interesse, gerados pela assimilação conjunta do carbono pela fotossíntese e o uso de macro e micronutrientes como nitrogênio, fósforo e potássio.

1.4.Nutrientes

Os estudos com microalgas crescem a medida que suas aplicações biotecnológicas se tornam variadas (Borowitzka, 2013; Chew et al., 2017; Odjadjare et al., 2017). Os microrganismos são explorados em diferentes bioprocessos existentes, sendo que as bactérias, fungos e leveduras sempre foram os principais organismos ligados a biotecnologia, e fazem parte da produção de alimentos, energia, de diferentes compostos para as indústrias e tratamentos de resíduos (Lima, U.A.; Aquarone, E.; Borzani, W.; Schmidell, 2001). Superar os desafios para a viabilização da indústria algal tem relação direta com o uso eficiente dos nutrientes e a otimização da fotossíntese (Stephenson et al., 2011; Leu e Lin, 2013).

O entendimento de como os nutrientes são bioconvertidos em biomassa e em diferentes compostos é a chave para viabilizar diferentes bioprocessos. O meio de cultura é um fator determinante para a geração de bioprodutos (Ribeiro et al., 2020), uma formulação de nutrientes simples que possui uma relação complexa entre os diferentes fatores que envolvem substrato, bioquímica, genética e ambiente. Na tabela 1 podem-se observar alguns dos principais nutrientes, sua função na célula, o resultado de sua limitação e sua comum concentração nos meios de cultivo de microalgas.

Tabela 1 Principais nutrientes no cultivo de microalgas.

Nutriente	Fontes principais	Função	Limitação	Concentração
Carbono (C)	CO ₂ , HCO ₃ ⁻ , CO ₃ ²⁻	Suprir C para toda a célula, formação de carboidratos e ácidos graxos, reserva energética	Não há crescimento	1-10 g L ⁻¹
Nitrogênio (N)	NO ₃ ⁻ , ureia, NH ₄ ⁺	Geração de aminoácidos, proteínas, pigmentos, ácidos nucleicos entre outros compostos	Gera acúmulo de lipídios e diminuição da quantidade de proteína e clorofila <i>a</i>	10-2000 mg L ⁻¹
Fósforo (P)	Fosfatos, hidrofosfatos	Incorporado em uma variedade de compostos, incluindo açúcares fosfatos, fosfolipídios e nucleotídeos	Aumento da clorofila <i>a</i> e acúmulo de lipídios	10-500 mg L ⁻¹
Enxofre (S)	Sulfatos	Ligado ao transporte de elétrons por meio dos grupos ferro-enxofre e a várias enzimas e coenzimas, dá origem à cisteína e à metionina	Inibição do Fotossistema II especialmente em produtos primários da fotossíntese (NAPDH), aumento na produção de carotenoides	1-200 mg L ⁻¹
Sais inorgânicos	K, Ca, Na, Mg	Manter estrutura e atividade da celular, clorofila, osmólito.		0,1-100 mg L ⁻¹
Elementos-traço	Fe, Zn, Mn, Pb, Cd	Agir como cofator de enzimas		0,01-10 mg L ⁻¹
Vitaminas	B, C, E	Auxiliar na divisão celular		0,01-1000 µg L ⁻¹

Fonte: (Taiz e Zeiger, 2004; Forján et al., 2007; Zeng et al., 2011; El-kassas, 2014)

1.5. Estudos sobre os meios de cultivo de microalgas

Os estudos de composição da formulação do meio têm como objetivo a redução dos custos ou o acúmulo de algum bicomposto de interesse na biomassa algal. A variação da formulação para redução de custos é uma estratégia que pode ser desenvolvida de várias formas. Além da limitação dos nutrientes, podem ser utilizados macronutrientes de menor custo, como por exemplo, substituir o nitrato por ureia, o fosfato de potássio por uma mistura de fosfato de monoamônio (MAP) e o citrato de ferro por cloreto de ferro (Marrone et al., 2017; Ribeiro et al., 2020).

Estudos mostraram que a privação de nitrogênio resulta em várias alterações fisiológicas, como a redução da taxa de fotossintética. Com a limitação ocorre o aumento da capacidade de assimilação do nitrogênio orgânico que compete com a fixação do carbono e com assimilação inorgânica de nitrogênio para elétrons fotogerados (Hipkin et al., 1983). No entanto, mesmo com a deficiência no crescimento, existe a alteração da composição química que pode usar as reservas de carboidratos e proteínas para acúmulo de lipídios (Negi et al., 2016; Laurens, 2017). Na Figura 5 é possível observar uma visão geral da morfologia celular durante o rearranjo da composição bioquímica.

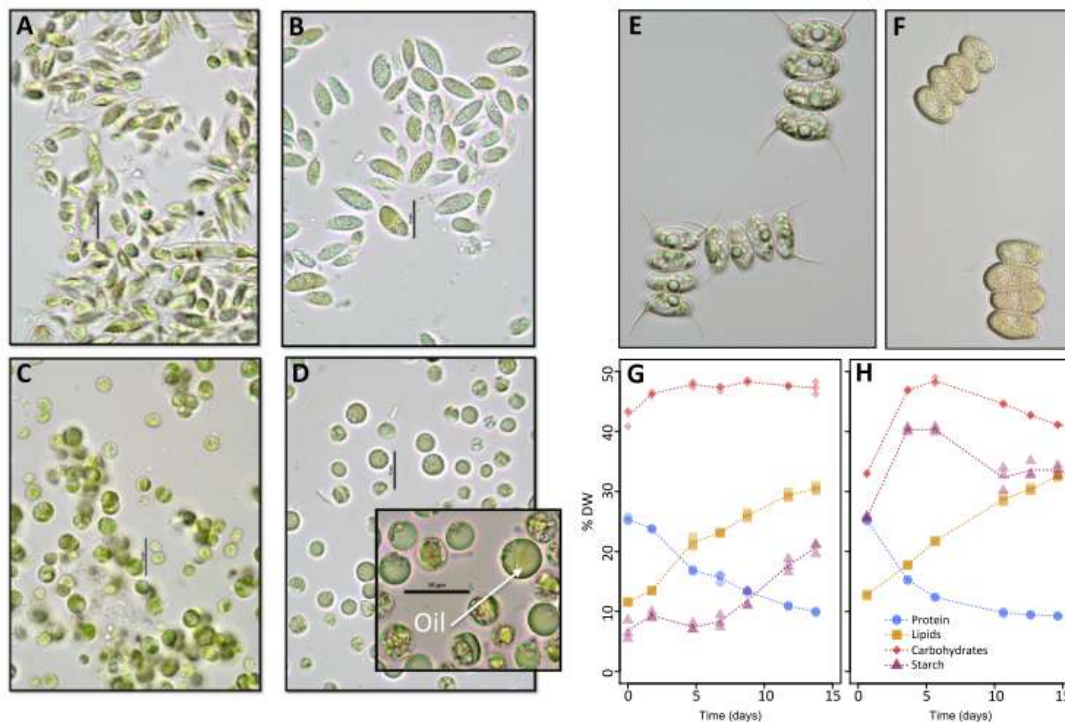


Figura 5 Visão geral da morfologia celular durante o rearranjo da composição bioquímica; alterações no conteúdo de proteínas e carboidratos à medida que o conteúdo lipídico celular das células aumenta. Células de *Scenedesmus acutus* (AB), *Chlorella vulgaris* (CD) e *Desmodesmus armatus* (EF) em condições de repleta de nutrientes e depleção de nutrientes, respectivamente, juntamente com alterações bioquímicas de composição em *Scenedesmus acutus* (G) e *Chlorella vulgaris* (H) em relação a proteínas, lipídios e conteúdo de carboidratos quando as células são mantidas por até 15 dias em meio de esgotamento de nutrientes adaptado de Laurens (2017).

A combinação da limitação de nitrogênio e adição abundante de fósforo tem sido uma estratégia eficaz para alterar a composição de ácidos graxos em cultivo heterotrófico. O suprimento de fósforo excessivamente abundante pode reverter a baixa produtividade de biomassa e manter um alto conteúdo lipídico, resultante do estresse de limitação de nitrogênio (Fu et al., 2017). Em adição, alguns trabalhos também mostram que a limitação de fósforo não afeta negativamente a produtividade e nem os pigmentos de *Chlorella* sp. e *Isochrysis galbana* evidenciando baixa necessidade deste nutriente (Liang et al., 2013; Roopnarain et al., 2014).

Em estudo com concentrações de ureia e FeNa-EDTA, mostrou que suplementação desses nutrientes ocasiona acúmulo de amido nas células de *Chlorella* (Dragone et al., 2011). Além do “stress” de nitrogênio, foi observada a promoção do acúmulo de lipídios em condições de limitação de sulfato e conseqüentemente, resulta na escassez de metabólitos de sulfato, como a L-cisteína, e que a suplementação de sulfato promove o acúmulo de amido (Yamazaki et al., 2018). Além dos macronutrientes,

a otimização no uso de micronutrientes deve ser uma consideração importante, pois podem resultar em melhorias significativas na produtividade de biomassa, lipídios e carboidratos (Hanifzadeh et al., 2018).

Ademais, devido as compreensões pelos usos dos nutrientes, vários pesquisadores indicam a produção de biomassa algal, tanto em meio quimicamente definido ou não, que o sistema de cultivo seja dividido em diferentes etapas, sendo principalmente uma primeira fase de crescimento exponencial e produção de biomassa e uma segunda etapa um direcionamento bioquímico para acúmulo de composto de interesse como óleo, amido ou pigmentos (Dragone et al., 2011; Fan et al., 2014; Hariz et al., 2019).

Por outro lado, a utilização de efluentes para a produção de microalgas tem benefício econômico, pois se trata de um substrato de baixíssimo valor, ao mesmo tempo em que gera benefício ambiental por reduzir a carga tóxica dos efluentes (NAABB, 2014). Entretanto, caso seja necessária a diluição de águas residuais ou o enriquecimento do efluente com nutrientes pode aumentar os custos do uso dos efluentes para produção de biomassa algal (Gupta et al., 2019).

No cultivo de microalgas, existem diferentes formulações de nutrientes descritos na literatura, com diferentes variações e concentrações. Entretanto, o primeiro passo é a escolha de um substrato para a produção de biomassa algal é se será um meio quimicamente definido como BBM, BG11 ou fertilizantes, ou se será quimicamente indefinido como efluentes urbanos ou efluentes agroindustriais como, por exemplo, vinhaça e efluente da indústria de óleo de palma (POME). A comparação desses dois sistemas está descrita na Tabela 2.

Tabela 2 Comparação entre meio com nutrientes quimicamente definidos e indefinidos.

Característica	Nutrientes	
	Definido (BBM, BG11 ou Fertilizantes)	Indefinido (Efluentes, Vinhaça ou POME)
Pureza da Biomassa	Alta	Baixa
Custo para obtenção	Alto	Baixo
Custo de Transporte	Baixo	Alto
Uso de água potável	Alta	Baixo
Previsibilidade de Produção	Alta	Baixa
Contaminação	Baixa	Alta
Inibição	Baixa	Alta
Impacto ambiental positivo	Baixa	Alta
Produtividade de biomassa	Alta	Alta

Fonte: (Brennan e Owende, 2010; Park et al., 2011)

1.6. Sistema de produção de microalgas

O sistema de produção de biomassa de microalgas, além da cepa da microalga, da luz, da água e dos nutrientes, utiliza reatores biológicos ou como também conhecidos pela influência da luz, fotobiorreatores. O fotobiorreator escolhido para o sistema produtivo é determinante para toda a construção da estrutura de uma biorrefinaria algal. Existem diferentes tipos de fotobiorreatores (*open pounds*, *flat plate* ou tubular), tipos de materiais usados (lona, acrílico, vidro, metal) e tipo de operação (batelada, batelada alimentada e sistema contínuo). Entretanto, no sistema de produção de biomassa de microalgas a escolha entre sistemas fechados, como, por exemplo, *Flat Plate*, tubular ou em sistemas abertos, como, por exemplo, *open pounds* e *raceway*, é determinante para viabilidade de todo sistema. Na Tabela 3 é apresentado as principais vantagens e desvantagens dos fotobiorreatores abertos e fechados.

Tabela 3 Principais sistemas de produção de microalgas e suas vantagens e desvantagens.

Sistema de Produção	Vantagens	Desvantagens
Tanques Abertos (<i>Open Ponds, Raceway</i>)	<ul style="list-style-type: none"> - Relativamente baixos investimentos e custo de operação - Fácil de limpar e manter - Baixo custo de operação - Fácil de escalonamento - Tecnologia comprovada em escala relativamente grande 	<ul style="list-style-type: none"> - Baixa produtividade de biomassa - Requer área relativamente grande - Pobre de mistura, luz e utilização de CO₂ - Baixo grau de controle - Perdas de água elevadas - Elevada dependência do tempo (temperatura, chuva, etc.) - As culturas são facilmente contaminadas - Baixa eficiência de recuperação da biomassa - Baixa homogeneização
Fotobiorreatores fechados (Tubular, <i>Flat Plate</i> , Coluna de bolhas e agitação mecânica)	<ul style="list-style-type: none"> - Boa absorção de luminosidade - Alta produtividade de biomassa - Baixo risco de contaminação - Boa homogeneização - Controle do processo - Possibilidade de construção de estruturas horizontais - Baixa perda de água - Melhor uso de CO₂ e O₂ - Melhor controle dos parâmetros como concentração de CO₂, temperatura e homogeneidade. 	<ul style="list-style-type: none"> - Alto custo de instalação - Alto custo energético - Difícil escalonamento - Estresse hidrodinâmico - Alto custo de operação

Fonte: (Brennan e Owende, 2010; Mata et al., 2010)

Dentre os dois tipos apresentados, o sistema fechado é o indicado para estudos laboratoriais e em escala piloto em razão ao melhor controle dos parâmetros e pelo menor risco de contaminação comparada aos cultivos em sistemas abertos. Além disso, é possível proteger o meio ambiente em cultivos com uso de organismos geneticamente modificados (OGM).

Por fim, é essencial considerar a possibilidade da automatização dos sistemas de produção de biomassa, que poderiam funcionar em sistemas interconectados online. E os resultados desses procedimentos podem ser usados para construir e operar grandes biorrefinarias autônomas. Com o objetivo de instalações que possam interagir e gerar energia e biomassa de alto valor agregado (Kazamia et al., 2012; Chew et al., 2017).

2. Objetivo

Desenvolver formulação de meio de cultivo quimicamente definido utilizando a microalga *Chlorella sorokiniana* cepa Embrapa#LBA39 e selecionar e avaliar o crescimento de microalgas verdes (Chlorophyta) em meio de cultivo quimicamente indefinido, o efluente da indústria do óleo de palma (POME).

2.1 Objetivos Específicos

1. Avaliar a formulação de meio de cultivo quimicamente definido buscando a substituição de nutrientes por fertilizantes para a o cultivo da microalga *Chlorella sorokiniana* cepa Embrapa#LBA39 visando um meio padrão de baixo custo cultivada em fotobiorreator tubular automatizado *airlift*.
2. Caracterizar a biomassa da microalga *Chlorella sorokiniana* cepa Embrapa#LBA39 obtida a partir do cultivo no meio definido e estimar a produtividade dos biocompostos.
3. Estimar o custo de produção de biomassa da microalga *Chlorella sorokiniana* cepa Embrapa#LBA39 obtida a partir do cultivo no meio definido
4. Selecionar dentre 18 cepas de microalgas verdes (Chlorophyta), aquela que apresenta maior taxa de crescimento em POME e realizar cultivo em escala piloto com fotobiorreator *Flat Plate airlift*
5. Caracterizar a biomassa cepa algal selecionada para cultivo em POME e estimar a produtividade dos biocompostos.
6. Avaliar a eficiência da remoção de nutrientes e a capacidade de biorremediação do POME após o cultivo de cepa algal selecionada.

3. Uma abordagem de baixo custo para a produção de *Chlorella sorokiniana* através do uso combinado de fertilizantes à base de ureia, amônia e nitrato*.

*Artigo publicado como, Ribeiro DM, Fernando L, Cunha G, Costa L, Jungmann L, Christopher T, Williams R, Alves S, Brasil F (2020) A low-cost approach for *Chlorella sorokiniana* production through combined use of urea , ammonia and nitrate based fertilizers. Bioresour Technol Reports 9.

A produção de biomassa representa uma alternativa importante para o suprimento de matéria-prima para processos industriais no contexto da mitigação de emissões de carbono. A biomassa de algas, em particular, se destaca por suas características biológicas e aplicações biotecnológicas. O termo algas é usado para descrever um conjunto diversificado de organismos fotossintéticos contendo espécies unicelulares e multicelulares com uma enorme diversidade de características morfológicas e fisiológicas (Bicudo e Menezes, 2017).

As algas pertencentes ao gênero *Chlorella* são organismos fotossintéticos eucarióticos, unicelulares e de vida livre, com diâmetro variando de 1 a 20 µm que podem ser esféricos ou elipsoides (Bicudo e Menezes, 2017). São organismos cosmopolitas, encontrados em ambientes marinhos e de água doce, no solo e no ar, e também podem colonizar vários filos de invertebrados, como Protozoários, Porifera, Platyhelminthes, Coelenterata, esponjas ou ascomicetos no líquen (Wehr et al., 2015).

Entre as várias espécies relatadas para o gênero, *Chlorella sorokiniana*, descrita como uma "cepa de *Chlorella* de alta temperatura" foi indicada como uma espécie promissora para processos e aplicações de biotecnologia pela Aliança Nacional para Biocombustíveis e Bioprodutos Avançados (NAABB, 2014). Vários estudos demonstraram que essa espécie possui uma capacidade robusta de produzir biomassa, proteínas, açúcares e altos rendimentos de óleo sob uma variedade de condições e também pode ser manipulada geneticamente (NAABB, 2014). Além disso, a *Chlorella sorokiniana* pode se aclimatar a condições artificiais, incluindo aquelas que envolvem o uso de fontes de luz LED e automatização da aeração, temperatura e controle de pH (Cazzaniga et al., 2014).

Um progresso considerável foi feito na demonstração do potencial de produção em larga escala de biomassa de microalgas, mas ainda existem vários desafios para torná-la economicamente viável. A seleção de cepas mais produtivas, o desenvolvimento de meios de cultura de baixo custo e fotobiorreatores mais eficientes, bem como melhorias na eficiência do uso de nutrientes e na otimização da taxa fotossintética representam alguns desses desafios. Efluentes ou resíduos agroindustriais são uma opção promissora para a formulação de meios de cultura (Santana et al., 2017).

No entanto, variações no conteúdo de macro e micronutrientes, contaminação por metais pesados, bem como a presença de concorrentes e patógenos podem causar produtividade instável ou baixa (Christenson e Sims, 2011).

Nesse contexto, o desenvolvimento de meios de cultura sintéticos à base de fertilizantes representa uma alternativa atraente para diminuir o custo de produção de biomassa de algas. No entanto, embora vários estudos tenham demonstrado a viabilidade dessa abordagem, esses meios são tipicamente restritos ao uso de fertilizantes de nitrogênio, fósforo e potássio (NPK). Além disso, até onde sabemos, nenhum estudo anterior usando fertilizantes para a produção de algas discute a estratégia bioquímica de combinar três fontes diferentes de nitrogênio (ureia, amônia e nitrato), abordando possíveis alterações no metabolismo das algas e na composição da biomassa.

O nitrogênio é o macronutriente mais importante para a cultura de microalgas devido à sua necessidade de síntese de proteínas, pigmentos e ácidos nucleicos. A quantidade e a fonte molecular de nitrogênio (nitrato, amônio ou ureia) utilizadas podem ser manipuladas para otimizar e redirecionar a produção de biomassa e compostos de interesse. Em particular, estratégias que envolvem limitação de nitrogênio geralmente afetam negativamente a maquinaria fotossintética, resultando em clorose e impacto no crescimento de microalgas, e o suprimento adequado desse macronutriente, por outro lado, tende a resultar em aumento da produção de biomassa e compostos de interesse (Li et al., 2016).

Em muitos meios de cultura quimicamente definidos, os sais de nitrato, particularmente o nitrato de sódio, são tipicamente a única ou principal fonte de nitrogênio, como no caso do meio BG11, que é frequentemente usado em pesquisas com a *Chlorella*. A absorção de nitrato é realizada por um transportador específico e, em seguida, reduzida a nitrito pelo nitrato redutase. O nitrito é transportado para os cloroplastos e reduzido a amônio pelo nitrito redutase, que por sua vez é incorporada aos aminoácidos pelo ciclo GS-GOGAT (Caspi et al., 2016).

As algas também podem usar amônio no meio como fonte de nitrogênio que é transportado para a célula pelo gradiente de prótons transmembranar (Gutierrez et al., 2016). O uso de amônio como única fonte de nitrogênio nos meios de cultura pode resultar em toxicidade, no entanto, isso pode ser mitigado usando cepas com alta atividade de GS-GOGAT (Wang et al., 2019). Além disso, o amônio é a principal fonte

de nitrogênio nas águas residuais, e o controle de sua toxicidade representa um grande desafio no tratamento de águas residuais (Yu et al., 2019).

A ureia também foi relatada como uma fonte promissora de nitrogênio para a cultura de microalgas. A ureia é uma fonte de nitrogênio disponível comercialmente usada na agricultura para o cultivo de culturas devido à sua disponibilidade e acessibilidade universal (Arumugam et al., 2013). Além disso, a molécula de ureia contém uma porcentagem mais alta de nitrogênio do que outras fontes, pode ser obtida a baixo custo e tem se mostrado eficiente na nutrição de plantas. Durante o seu metabolismo por microalgas, a ureia é transportada para a célula pelo transportador DUR3 (Pinton et al., 2016) e hidrolisada por duas enzimas, a ureia carboxilase e a alofanato hidrolase, liberando duas moléculas de amônio (NH_4^+) e uma molécula de carbono dióxido de carbono (CO_2) em um processo que requer ATP, Mg^{2+} e K^+ (Caspi et al., 2016).

O uso de fontes separadas de nitrogênio já foi estudado anteriormente e misturas como ureia e nitrato ou amônio e nitrato também foram testadas (Lin e Lin, 2011; Soares et al., 2018). No entanto, um estudo detalhado do cultivo de *Chlorella* em uma mistura das três fontes de nitrogênio ainda não foi realizada. Melhorar nossa compreensão da eficiência do uso de nitrogênio é um grande desafio e o estudo das interações recíprocas entre ureia, amônia e nitrato pode fornecer uma base para entender o uso de fontes de N e otimizar sua assimilação (Pinton et al., 2016) e, conseqüentemente, influenciar a assimilação de carbono (Lu et al., 2018).

Neste artigo, relatamos o desenvolvimento de um meio de cultura sintético de baixo custo baseado em fertilizantes comerciais, usando uma combinação de três fontes de nitrogênio (ureia, amônia e nitrato) denominadas “Blue Green Nitrogen Mix” (BGNIM). A hipótese foi de que a ativação de diferentes vias de assimilação de nitrogênio levaria a alteração na produção de compostos contendo nitrogênio. O desempenho do cultivo de algas e as características deste meio foram estudados usando uma análise detalhada do crescimento em fotobiorreatores automatizados e composição química da biomassa. Os resultados obtidos usando BGNIM foram comparados com os obtidos com o meio padrão BG11, bem como com uma versão modificada do BG11, onde a fonte original de nitrogênio foi substituída pela ureia (BGU). Finalmente, é apresentada uma comparação entre a produtividade dos meios avaliados e os custos associados.

3.1. Materiais e Métodos

3.1.1 Cepas de microalgas

A microalga *Chlorella sorokiniana* LBA # 39 (acesso GenBank - KM061456.1) (Figura 6), uma cepa tropical isolada do Cerrado brasileiro e identificada por Hadi et al. (2016), foi utilizada para um estudo comparativo de diferentes meios. Essa cepa foi depositada na Coleção de Microrganismos e Microalgas para Agroenergia e Biorrefinarias da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa (Brasília-DF) e preservada através dos protocolos descritos por Fernandes et al., (2019). As culturas foram armazenadas em meio BG11 líquido e mantidas em câmara de crescimento sob temperatura constante de 25 °C, com fotoperíodo de 12h / 12h.



Figura 6 Microscopia da microalga *Chlorella sorokiniana* LBA # 39 da coleção de microrganismos da Embrapa Agroenergia. Coletado na Chapada Imperial, Brasília/DF.

3.1.2 Meio de cultura

Foram utilizadas três formulações de meio de cultura para o crescimento de *Chlorella sorokiniana* (Tabela 4), como segue: i) *Blue Green* 11 (BG11) como meio padrão descrito por Stanier et al., (1971), ii) um meio semelhante ao BG11 em que a fonte de nitrogênio (nitrato de sódio) foi substituído pela quantidade equivalente de nitrogênio na forma de ureia, a seguir denominada "*Blue Green Urea*" (BGU) e iii) um meio semelhante à formulação BG11 baseada em um fertilizante comercial para plantas com uma combinação de três fontes de nitrogênio (ureia, amônia e nitrato), respeitando a composição elementar de N, P, K, Mg e Ca encontrada no BG11 (Tabela 4a) - a seguir denominada "*Blue Green Nitrogen Mix*" (BGNIM) - composta de 510 mg / L de ureia, 35 mg / L de fosfato monoamônico, 75 mg / L de sulfato de magnésio hepta-hidratado, 40 mg / L de nitrato de cálcio e 100 mg / L de mistura de micronutrientes (REXOLIN, YaraTera, Brasil). Todos os nutrientes utilizados são apresentados na Tabela 4b.

Tabela 4. A) Composição elementar das formulações testadas B) Nutrientes testados, suas concentrações usadas.

A)

Elementos	Formulação		
	BG 11 mg/L	BGU mg/L	BGNIM mg/L
N	247.59	247.62	249.00
H	6.60	42.17	40.37
C	6.49	112.49	102.00
O	946.00	240.12	232.30
S	9.79	9.79	11.04
Fe	1.28	1.28	2.66
Cl	7.12	7.12	-
K	11.49	11.49	11.60
Mg	7.40	7.40	7.40
Na	252.60	5.40	-
P	9.10	9.10	9.42
Zn	0.05	0.05	3.38
Co	0.01	0.01	-
Cu	0.02	0.02	0.36
Mn	0.50	0.50	2.48
Mo	0.15	0.15	0.04
Ca	9.81	9.81	9.77
B	0.50	0.50	2.10

B)

Macronutrientes	Formula Química	BG 11 (mg/L)	BGU (mg/L)	BGNIM (mg/L)
Nitrato de Sódio	NaNO ₃	1500	-	-
Ureia	CH ₄ N ₂ O	-	530	-
Ureia – Fertilizante	CH ₄ N ₂ O	-	-	510
Di-hidrogenofosfato de potássio	KH ₂ PO ₄	40	40	-
Fosfato Monoamônico (MAP) - Fertilizante	NH ₄ H ₂ PO ₄	-	-	35
Sulfato de magnésio hepta-hidratado	MgSO ₄ ·7H ₂ O	75	75	-
Sulfato de Magnésio Hepta-hidratado – Fertilizante	MgSO ₄ ·7H ₂ O	-	-	75
Cloreto de cálcio di-hidratado	CaCl ₂ ·2H ₂ O	36	36	-
Nitrato de cálcio – fertilizante	Ca (NO ₃) ₂	-	-	40
Carbonato de Sódio	Na ₂ CO ₃	20	20	-
Micronutrientes				
Ácido etilenodiaminotetraacético dissódico desidratado	EDTA NA ₂	1	1	-
Hexa-hidrato de nitrato de cobalto (II)	Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	0,05	0,05	-
Molibdato de sódio di-hidratado	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,39	0,39	-
Ácido bórico	H ₃ BO ₃	2,86	2,86	-
Sulfato de cobre (III) penta-hidratado	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,08	0,08	-
Cloreto de manganês tetra-hidratado	MnCl ₂ ·4H ₂ O	1,81	1,81	-
Sulfato de zinco hepta-hidratado	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,22	0,22	-
Citrato férrico verde de amônio	C ₆ H ₈ FeNO ₇	6	6	-
Ácido Cítrico	C ₆ H ₈ O ₇	6	6	-
Micronutrientes - Rexolin – Fertilizante	Micronutrientes	-	-	100

3.1.3 Fotobiorreatores

Os experimentos com as três formulações do meio foram realizadas em paralelo, usando três fotobiorreatores automatizados em triplicata. Um desenho esquemático do aparelho é ilustrado na Figura 7 e os detalhes são descritos a seguir. Cada reator consiste em uma garrafa de vidro de boca larga Duran GLS 80 (com diâmetro de 101 mm e capacidade de um litro), um agitador magnético, um painel de LED, um sensor de luz e uma tampa de rosca. O painel de iluminação é formado por uma faixa com 300 LEDs brancos SMD 5050 5000K colados dentro de um tubo de PVC de 200 mm de diâmetro, proporcionando uma distribuição de luz muito homogênea, até uma iluminação máxima de 4000 lux no interior do tubo.

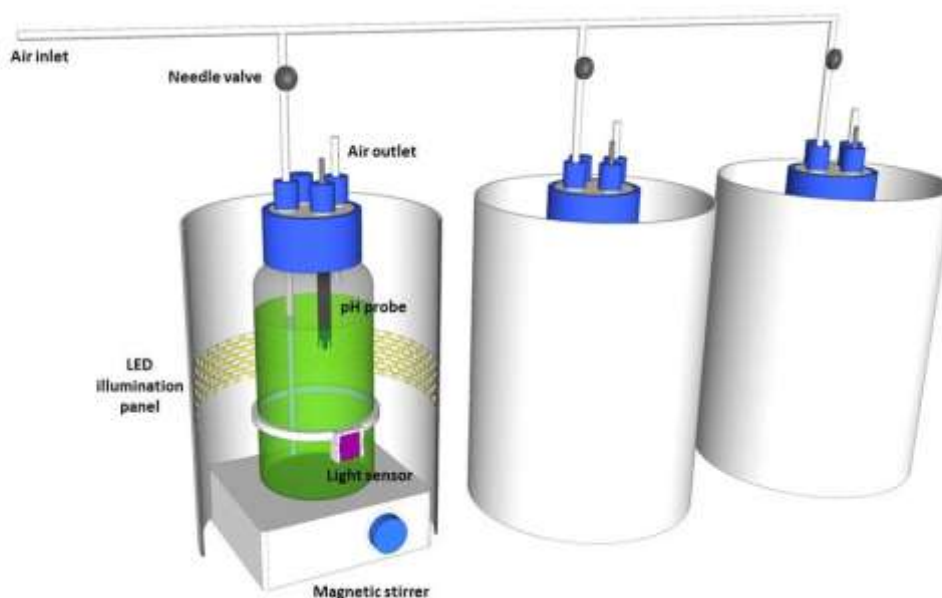


Figura 7 Esquema do fotobiorreator tubular automatizado com *airlift*. Cada fotobiorreator continha um litro de cultura de microalgas em uma garrafa de vidro iluminada por uma tira de LED branco neutro (5000 K) conectada a um tubo de PVC. Um sensor de luz conectado a cada parede da garrafa fornece a irradiância da luz espalhada pela cultura. Cada tampa contém uma sonda de pH e é conectada a uma linha de gás.

O espectro de emissão do painel é ilustrado no painel A da Figura 8. Além de servir como fonte de luz para cultivo, o painel também foi usado para medir indiretamente a densidade de microalgas através da irradiância da luz dispersa pela cultura quando iluminada pelo painel com uma iluminação específica. Essa irradiância foi medida através de um sensor TCS34725 ancorado fora da parede do frasco. Este sensor é capaz de medir individualmente a irradiância incidente em três comprimentos

de onda: 465 nm azul, 525 nm verde e 615 nm vermelho. Do espectro de absorção de *Chlorella sorokiniana* LBA # 39, foi possível identificar que o verde de 525 nm está fora dos picos de absorção dos pigmentos ativos (ver painel A da Fig. 8) e, portanto, esse comprimento de onda foi usado para a medição proxy da densidade de microalgas. A leitura do sensor nesse comprimento de onda foi então relacionada à densidade das microalgas através de uma curva de calibração obtida com a contagem direta de microalgas com uma câmara de Neubauer (consulte o painel B da Fig. 8). Anexado à tampa de rosca de cada reator, há uma sonda de pH e dois tubos para entrada e saída de ar.

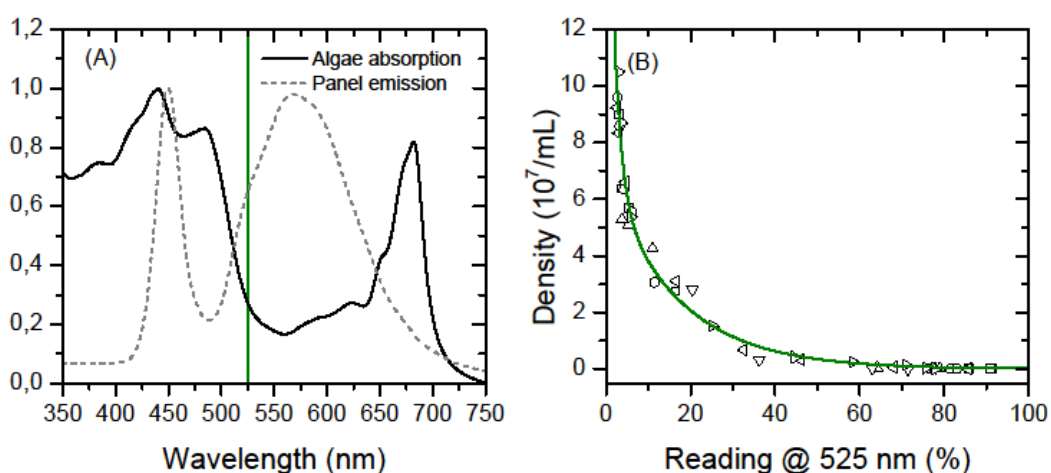


Figura 8 (A) Espectro de absorção de *Chlorella sorokiniana* LBA # 39 (linha sólida), espectro de emissão dos LEDs usados para iluminar a cultura (linha tracejada) e comprimento de onda usado para monitorar a cinética de crescimento das culturas (linha vertical a 525 nm). (B) Curva de calibração usada nas medições de densidade de algas obtidas com contagem direta de células dentro de uma câmara de Neubauer. Símbolos diferentes representam a contagem de células obtidas sob diferentes experiências / reatores.

O ar que circula pela cultura é fornecido por um compressor de ar conectado a um reservatório de ar. Um sensor NDIR de dióxido de carbono (CO_2) foi colocado dentro do reservatório e, via feedback, aciona uma válvula solenoide que conecta o reservatório a um cilindro de CO_2 , para que a concentração de CO_2 no interior do reservatório possa ser mantida constante. Todo o sistema (painéis de iluminação, sensores de luz, sensores de pH, compressor de ar e válvula solenoide) é interconectado através de uma placa de microcontrolador Arduino Mega e software de controle.

3.1.4 Experimentação

A dinâmica de crescimento de *Chlorella sorokiniana* nos três meios foi realizada em paralelo nos três reatores, o experimento foi repetido três vezes para obter replicas biológicas independentes, todos os quais foram inicialmente inoculados com uma concentração inicial semelhante de 2×10^5 células / mL e pH 6,8. Ao longo dos experimentos, todos os três meios de cultura foram mantidos em um fotoperíodo de 16h / 8h (com 1500 lux no período de luz), temperatura de 28 ± 1 ° C e elevação do ar com 2 L / min de ar atmosférico contendo 0,1% (v / v) de CO₂ (1000 ppm). A cada 5 minutos, o sistema registrava a densidade de microalgas e o pH em cada reator. Cada experimento foi iniciado com o inóculo adaptado às condições do experimento, foi realizado durante 8 dias e em triplicata biológica. Após 8 dias, todo o volume de cada fotobiorreator foi centrifugado a 5000 g por 10 min. A biomassa recuperada foi submersa em nitrogênio líquido e depois liofilizada, e pesada para calcular a produtividade da biomassa de algas.

3.1.5 Análise da composição da biomassa de algas no meio quimicamente definido

As análises da composição da biomassa de algas foram realizadas utilizando a biomassa liofilizada dos triplicados biológicos do experimento. Os pigmentos foram extraídos através da incubação de 10 mg de biomassa de algas com 10 mL de acetona, contendo 0,1% (v / v) de hidroxitolueno butilado (BHT) durante a noite. As clorofilas *a* e *b* e o conteúdo total de carotenóides foram determinados de acordo com Lichtenthaler e Wellburn (1983).

Os teores de carbono, nitrogênio e hidrogênio foram medidos a partir de amostras de 2 mg de biomassa de algas liofilizadas, usando um analisador elementar CHNS / O (PE2400 série II PerkinElmer). O fator de conversão 4,78, específico para microalgas, foi utilizado para estimar a abundância de proteínas a partir do teor de nitrogênio.

Os açúcares solúveis foram extraídos com etanol a 80%, a partir de 10 mg da amostra de biomassa. O amido remanescente no material insolúvel após a extração foi quantificado pelo método enzimático descrito por Amaral et al., (2007). Após a remoção dos hidrolisados de amido, foi adicionado 1 mL de ácido sulfúrico concentrado às amostras para hidrolisar os açúcares estruturais. Os monossacarídeos (trioses, pentoses e hexoses) obtidos em cada etapa foram quantificados complexando o grupo aldeído livre com MBTH (3-metil-2-hidrazona benzotiazolinona) e usando a

metodologia de quantificação espectrofotométrica descrita por Van Wychen e Laurens, (2016). A extração e derivatização das amostras para perfil de metabólitos (aminoácidos e ácidos orgânicos) foram realizadas pelo método metanol-ribitol (Lisec et al., 2006), utilizando 10 mg de biomassa de algas e analisadas por GC / MS.

Os perfis de ácidos graxos foram determinados de acordo com Van Wychen et al., (2013), após tratamento de 10 mg de biomassa para transesterificação com 0,2 mL de clorofórmio: metanol (2: 1, v / v) e 0,3 mL de HCl 0,6 M em metanol aquecido a 85 ° C em dri-block por 1 hora . Após aquecimento, foi utilizado 1 mL de hexano para extrair os ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMES). As FAMES foram separadas por cromatografia em fase gasosa usando um cromatógrafo da Agilent Technologies (Agilent Technologies, Califórnia, EUA), acoplado a um detector de ionização de chama (FID) e uma coluna capilar de sílica fundida (100 m x 250 µm x 0,2 µm, Supelco SP). Os parâmetros operacionais foram definidos da seguinte forma: temperatura do detector, temperatura da coluna de 260 °C, 140 °C por 5 minutos, programada para aumentar 4 ° C / min, até 240 °C, com um tempo de execução final de 48 minutos. O gás de arraste foi Hélio a 1,2 mL • min⁻¹, com injeção de 1 mL de amostra. Os tempos de retenção dos ácidos graxos foram comparados aos dos ésteres metílicos padrão (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Os tempos de retenção e as porcentagens da área do pico foram calculados automaticamente pelo ChemStation Software. As quantificações de ácidos graxos (FA) foram realizadas utilizando o éster metílico do ácido nonadecanoato (Sigma-Aldrich, EUA) como padrão interno.

3.1.6 Análise de dados

A taxa de crescimento específico (μ) e a produtividade de biomassa de algas ($\text{mgDW}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) foram calculadas usando a equação descrita por Kishi e Toda, (2018) com os dados do número de células e biomassa coletada no final do experimento. O custo do meio foi calculado como a soma do custo de cada quantidade de reagente usada em sua preparação. O custo para a produção de 1 kg de biomassa de algas secas, baseado apenas no custo do meio de cultura, foi calculado como o custo de um litro de meio dividido pela biomassa obtida neste volume. Os dados de composição da biomassa foram submetidos à análise de variância (ANOVA) com 5% de probabilidade, seguida de teste de Tukey, utilizando o software Action Stat versão 3.5.

3.2 Resultados e discussão

Os cultivos foram realizados com fotobiorreatores automáticos, em ciclo claro / escuro de 16h / 8h a 28 °C e aeração constante com 0,1% (v / v) de CO₂ por 8 dias. A Figura 9 mostra a dinâmica de crescimento das culturas de *Chlorella sorokiniana* LBA # 39 nos meios BG11, BGU e BGNIM, conforme monitorado pela densidade de microalgas e pelo pH da cultura ao longo do tempo. Ambas as variáveis foram registradas a cada 5 minutos. Cada valor na série temporal apresentada na Figura 9 representa o valor médio das três réplicas biológicas do experimento naquele momento.

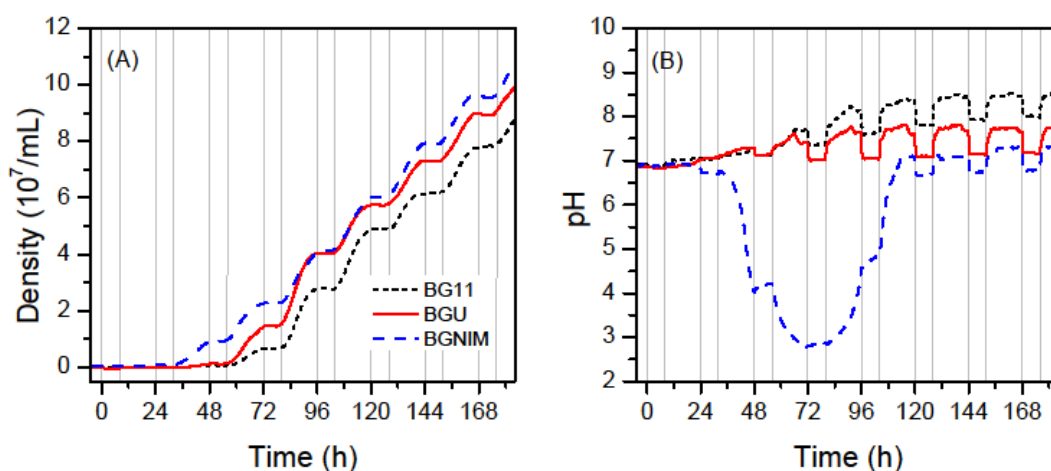


Figura 9 Dinâmica de crescimento de *Chlorella sorokiniana* nas três formulações dos meios de cultura. (A) Densidade de microalgas e (B) valor de pH da cultura.

* Os resultados mostrados são a média dos triplicados biológicos do experimento (n = 3).

3.2.1 Crescimento celular e produtividade de biomassa

A produtividade de biomassa variou entre 47 e 50 mg • L⁻¹ • d⁻¹, em BGNIM e BGU, respectivamente (Tabela 6). Esses valores estão abaixo do potencial máximo de produção de biomassa para *Chlorella*, estimado em 196 mg • L⁻¹ • d⁻¹ (Weyer et al., 2010), mas acima dos rendimentos de biomassa em larga escala relatados na literatura, que variam de 30 a 42 mg • L⁻¹ • d⁻¹ (Weyer et al., 2010; Laurens, 2017). Além disso, as produtividades observadas neste estudo são comparáveis àquelas obtidas quando as águas residuais são usadas como meio de cultivo. De fato, foram relatadas produtividades de biomassa variando de 12 a 68 mg • L⁻¹ • d⁻¹ para cepas de *C. sorokiniana* cultivadas em águas residuais de estações de tratamento municipais, hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar e outras águas residuais (Park et al., 2011; De Lourdes et al., 2017; Manzoor et al., 2019). No entanto, o uso de biomassa produzida em efluentes pode ser limitado, pois existe o risco de acúmulo de metais pesados ou

contaminantes em potencial, reduzindo sua adequação à nutrição humana, animal ou vegetal.

Tomados em conjunto, os resultados apresentados aqui indicam que o crescimento de *Chlorella sorokiniana* LBA # 39 é semelhante nos meios BG11, BGU e BGNIM (Tabela 5), indicando que todas essas três formulações fornecem os nutrientes necessários para obter uma produtividade equivalente de biomassa (Tabela 6) durante oito dias de cultivo.

Tabela 5 Número de células, taxa de crescimento específico e pH em diferentes pontos de crescimento celular.

Meio de cultivo	Número de células final (cell/mL)	Taxa de crescimento específico (μ)	pH em		
			0h	75h	192h
Blue Green 11 (BG11)	$8,34 \times 10^7 (\pm 0.22)^a$	$1,36 (\pm 0.29)^a$	6,8	7,4	8,5
Blue Green Ureia (BGU)	$9,23 \times 10^7 (\pm 0.12)^a$	$1,34 (\pm 0.15)^a$	6,8	7	7,7
Blue Green Nitrogen Mix (BGNIM)	$6,79 \times 10^7 (\pm 0.54)^a$	$1,35 (\pm 0.11)^a$	6,8	2,8	7,3

*Os resultados são apresentados como média \pm erro de barras, mostrando o desvio padrão das experiências em triplicado (n = 3). As médias seguidas pela mesma letra não diferem na ANOVA unidirecional seguida pelo teste de Tukey no nível de probabilidade de 5% ($p \leq 0,05$).

Tabela 6 Teor de biomassa, rendimento e compostos de interesse acumulados em *Chlorella sorokiniana* cultivados nos diferentes meios.

<i>Chlorella sorokiniana</i> /LBA#39	BG11	BGU	BGNIM
Produtividade da biomassa (mgDW • L ⁻¹ • d ⁻¹)	50.90 (±3.19) ^a	48.81 (±1.74) ^a	47.93 (±3.35) ^a
Carbono (%)	48.57 (±0.93) ^a	49.32 (±0.69) ^a	49.63 (±0.47) ^a
Nitrogênio (%)	7.43 (±0.23)^b	7.62 (±0.12)^{ab}	7.85 (±0.21)^a
Hidrogênio (%)	8.71 (±0.22)^b	9.32 (±0.14)^a	9.33 (±0.07)^a
Proteína (%)	41.67 (±1.11)^b	44.57 (±0.06)^a	44.63 (±1.04)^a
Rendimento proteico (mgDW • L ⁻¹ • d ⁻¹)	21.22 (±1.25) ^a	21.76 (±2.07) ^a	21.39 (±2.30) ^a
Açúcares solúveis (%)	12.68 (±0.51)^b	13.93 (±0.5)^{ab}	14.26 (±0.48)^a
Açúcares de Reservatório - Amido (%)	4.55 (±0.47) ^a	4.87 (±0.59) ^a	4.70 (±1.08) ^a
Açúcares estruturais (%)	5.16 (±1.92) ^a	3.82 (±0.72) ^a	5.57 (±0.93) ^a
Teor de carboidratos Total (%)	22.41 (±2.70) ^a	22.64 (±1.03) ^a	24.55 (±1.38) ^a
Rendimento de carboidratos (mgDW • L ⁻¹ • d ⁻¹)	11.41 (±1.19) ^a	11.05 (±0.45) ^a	11.77 (±1.29) ^a
FA total (%)	6.50 (±0.01) ^a	6.50 (±0.01) ^a	6.20 (±0.01) ^a
Rendimento de FA (mgDW • L ⁻¹ • d ⁻¹)	3.30 (±0.32) ^a	3.20 (±0.38) ^a	3.00 (±0.23) ^a
Clorofila a (%)	2.30 (±0.01)^b	2.60 (±0.04)^a	1.70 (±0.10)^c
Clorofila b (%)	1.10 (±0.01)^b	1.30 (±0.06)^a	0.60 (±0.05)^c
Clorofila Total (%)	3.60 (±0.02)^b	3.90 (±0.10)^a	2.30 (±0.15)^c
Razão clorofila a / b	2.09 (±0.01)^b	1.97 (±0.06)^b	2.63 (±0.03)^a
Carotenóides (%)	0.43 (±0.01)^b	0.58 (±0.02)^a	0.61 (±0.01)^a
Rendimento de carotenóides (mgDW • L⁻¹ • d⁻¹)	0.22 (±0.01)^b	0.28 (±0.01)^a	0.29 (±0.01)^a

* Os resultados são apresentados como média ± erro de barras, mostrando o desvio padrão das experiências em triplicado (n = 3). As médias seguidas pela mesma letra não diferem da ANOVA unidirecional com teste de Tukey no nível de probabilidade de 5% (p≤0,05).

3.2.2 Alterações no pH durante o crescimento em diferentes meios

Os dados ilustrados na Figura 9 mostram diferenças entre a dinâmica de crescimento associada às três formulações do meio. Embora as variações nas densidades celulares ao longo do tempo sigam padrões semelhantes (Figura 9A). No cultivo com meio BGNIM, a fase de lag é mais curta impulsionada pelo fotoperíodo do experimento, terminando aproximadamente 24 horas mais cedo do que nos outros dois meios. Além disso, enquanto as variações de pH no BG11 e no BGU são aparentemente motivadas pelo fotoperíodo como consequência da fotossíntese e da respiração, o final da fase lag do cultivo com o meio BGNIM foi associado a uma queda significativa no pH de 7 para 2,8 nos próximos dois fotoperíodos, antes da recuperação para pH 7 nos dois fotoperíodos seguintes. A partir deste ponto, a curva de pH da formulação BGNIM começou a seguir um padrão regular semelhante ao obtido para os meios BG11 e BGU (Figura 9B).

O uso de fotobiorreatores automatizados proporcionou medições contínuas e precisas da dinâmica de crescimento da cultura. Essa abordagem permitiu a identificação de uma característica do meio BGNIM, ou seja, uma forte queda de pH (Figura 9B), provavelmente devido à absorção eletrogênica de amônio (Scherholz e Curtis, 2013). A acidificação do meio de cultura é causada pela extrusão celular de H^+ , como também é conhecido por ocorrer durante a acidificação do solo quando as plantas assimilam amônio. De fato, essa variação de pH não é observada em culturas usando meio BGU, que não possui fosfato de amônio em sua composição, mas a ureia como fonte de nitrogênio (Figura 9B).

Na presença de diferentes fontes de nitrogênio, *Chlorella* tende a absorver amônio (NH_4^+) primeiro pelo transportador de canal de amônia (NH_3) (Amt) liberando o H^+ , causando acidificação. Nitratos (NO_3^-) e nitritos (NO_2^-) são absorvidos pelos sistemas I e II (Nrt2 / Nar2) ou pelo sistema Transportador de Nitrato de Alta Afinidade (HANT), enquanto a ureia (CH_4N_2O) é absorvida pelo Transportador de Ureia Ativa (DUR3) (Figura 10). A principal via de assimilação de nitrogênio é o GS-GOGAT e seu principal produto é a glutamina, um componente básico para a síntese de aminoácidos e proteínas, como pode ser visto na Figura 10.

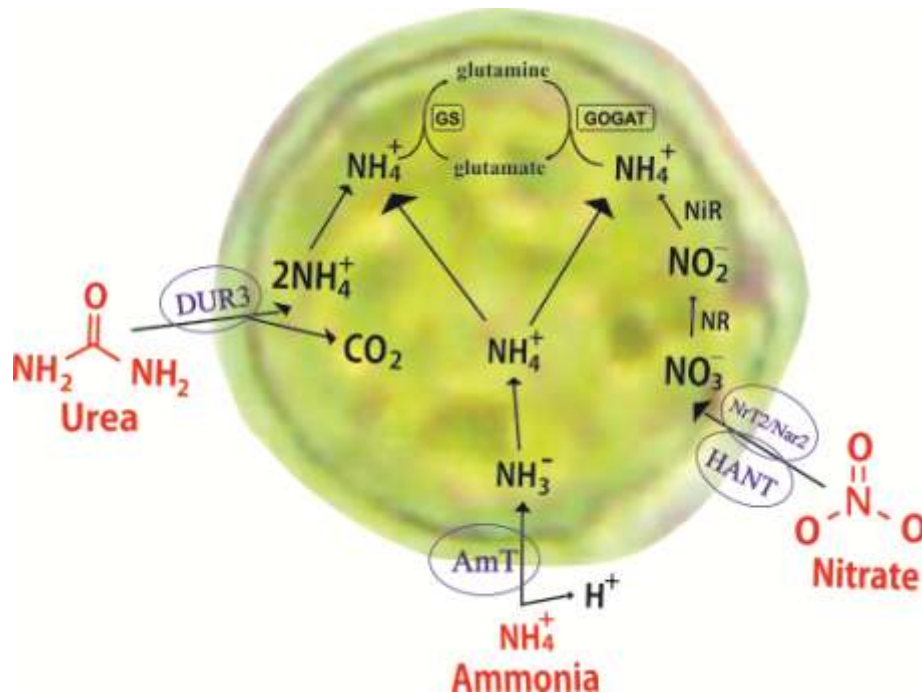


Figura 10 Diferentes fontes e sistemas de transporte de nitrogênio. Amt - Transportador de canais de amônia, Nrt2 / Nar2 - Sistemas de nitratos e nitritos, HANT - Sistema de transportador de nitrogênio de alta afinidade, DUR3 - Transportador ativo de ureia, GS-GOGAT - Glutamina / glutamato sintase.

Neste estudo, a redução transitória do pH não pareceu afetar o crescimento de *Chlorella sorokiniana*. De fato, o crescimento celular ocorreu no BGNIM durante o período de acidificação e a fase log neste meio foi reduzida em comparação ao BG11 e BGU, indicando que essa cepa de *Chlorella* parece ser tolerante a essa condição. Essa característica pode ser vantajosa ao considerar a defesa contra predadores que não resistem à acidificação, um método descrito para o controle de rotíferos e cladoceros e também pode representar um método para o controle da contaminação ciliada (Ashraf et al., 2011). É sabido que as quedas de cultura devido à contaminação por predadores representam uma grande ameaça para a produção em larga escala de algas, especialmente em lagoas abertas, e devem ser adequadamente gerenciadas (Lammers et al., 2017; Ribeiro et al., 2019a).

3.2.3 Alterações bioquímicas

Como mostrado nas Tabelas 5 e 6, nenhuma diferença estatística foi observada no rendimento de número de células, taxas de crescimento específicas e rendimento de biomassa entre os três meios testados. Os rendimentos totais de carboidratos e ácidos graxos transesterificáveis também foram semelhantes, independentemente do meio de crescimento, enquanto foram observadas diferenças significativas nos teores de nitrogênio, hidrogênio, proteínas, açúcares solúveis, clorofila *a* e *b* e carotenóide (Tabela 6). As algas cultivadas nos meios BGNIM e BGU apresentaram um conteúdo ligeiramente mais alto de proteína, açúcar solúvel e carotenóide do que as cultivadas com meio BG11 (Tabela 6). Por outro lado, as culturas de BGU apresentaram maior acúmulo de clorofila *a* e clorofila *b* que BG11 e BGNIM (Tabela 6). Não foi observada diferença estatística nos perfis de ácidos graxos de *Chlorella sorokiniana* cultivados nos diferentes meios (Figura 11). O ácido alfa-linolênico poliinsaturado (C18:3n3) foi o principal componente, seguido pelo ácido palmítico (C16) e pelo ácido linoleico (C18:2n6) (Figura 11).

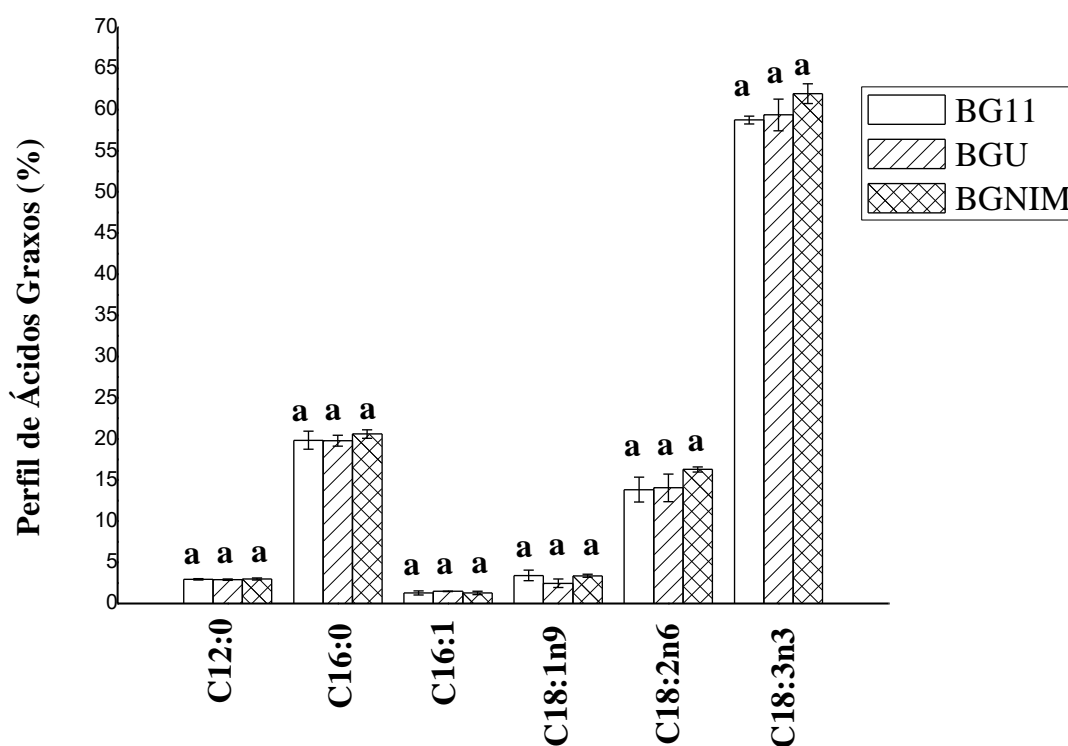


Figura 11 Perfil de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMES) de *Chlorella sorokiniana* crescidos em meios de cultura BG11, BGU e BGNIM. Todos os experimentos foram conduzidos em três repetições independentes (n = 3). Os resultados são apresentados como médias das réplicas ± as barras de erro mostram o desvio padrão.

* As médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste de Tukey no nível de 5% de probabilidade.

Amônio e ureia são fontes de nitrogênio que podem ser tóxicas para as microalgas, como também podem ser para plantas vasculares. Por outro lado, se empregado em concentrações apropriadas, seu uso pode levar ao acúmulo de componentes de biomassa de interesse (Ikarán et al., 2015). Aqui, ambos os meios contendo ureia (BGU e BGNIM) promoveram o acúmulo de concentrações mais altas de proteínas, açúcares solúveis e carotenoides, que são componentes importantes da biomassa de algas (Tabela 6). As proteínas são uma das frações mais valiosas da biomassa de algas ao considerar o uso como ração animal e alimento humano (Odjadjare et al., 2017).

Enquanto os açúcares solúveis foram maiores no meio BGNIM, os carboidratos totais e os ácidos graxos totais não mostraram diferença estatística entre os três meios testados. A combinação de diferentes fontes de nitrogênio não afetou significativamente o perfil de ácidos graxos após oito dias de crescimento de *Chlorella sorokiniana* LBA # 39. Recomenda-se a quantificação e caracterização do conteúdo

lipídico e perfis de ácidos graxos para entender as vias utilizadas pelas microalgas para acumular esses compostos de interesse, bem como para avaliar a adequação potencial do óleo para a produção de biocombustíveis. *Chlorella sorokiniana* LBA # 39 apresentou perfis semelhantes de ácidos graxos nos três meios (Figura 11). O ácido poliinsaturado alfa-linolênico (C18:3n3) foi o principal componente do perfil de ácidos graxos em todos os meios (Figura 11), como visto em outros relatórios para *Chlorella sorokiniana* cultivada sob diferentes condições de aeração e / ou fonte de carbono (Zheng et al., 2017).

A abundância e a eficiência dos complexos fotossintéticos estão relacionadas à disponibilidade de diferentes nutrientes e cofatores minerais que, além dos pigmentos (clorofilas e carotenoides), também incluem manganês, cálcio, cloreto, ferro, cobre e quinonas. A biomassa de algas produzida usando o meio BGNIM produziu menor teor de clorofila do que o BG11 e o BGU, mas um maior teor de carotenóides quando comparado ao BG11. É importante ressaltar que os carotenóides estão entre os compostos mais valiosos obtidos a partir da biomassa de algas (Borowitzka, 2013). As espécies de *Chlorella* representam um forte candidato à produção comercial de carotenóides de algas e, além de seu valor econômico, os carotenoides desempenham um papel importante na robustez das microalgas à foto-oxidação (Patias et al., 2017).

A diminuição das clorofilas e o aumento de carotenoides no meio BGNIM podem ser um resultado da foto-oxidação causada por processos de fotorrespiração e fotoquímicos que geram espécies reativas de oxigênio (ROS), causando danos ao aparelho fotossintético (Srinivasan et al., 2018) e resultantes em uma diminuição na fixação de carbono. Um paralelo entre a captação de oxigênio e a captação de nitrogênio foi descrito e esse fenômeno pode refletir-se na alteração de pigmentos (Tabela 6) e perfil metabólico (Tabela 7) observados na cultura com meio BGNIM.

3.2.4 Alterações no perfil metabólico

Os perfis metabólicos da biomassa de *Chlorella sorokiniana* produzidos nos meios de cultura BG11, BGU e BGNIM são apresentados na Tabela 7. Foram identificados açúcares, aminoácidos e ácidos orgânicos. No cultivo usando meio BGNIM, uma abundância maior de metabólitos foi detectada quando comparada ao BG11, pois a alanina aumentou 370%, serina 350%, valina 180%, mio-inositol 190%, ácido glicérico 230% e ácido glutâmico 220% (Tabela 7)

Tabela 7 Metabólitos identificados de *Chlorella sorokiniana* cultivados em meios de cultura BG11, BGU e BGNIM.

nº	Metabólitos	BG11	BGU	BGNIM
1	Ácido treônico	1.0 (±0.08)^a	0.7 (±0.24)^b	0.9 (±0.03)^a
2	Alanina	1.0 (±0.18)^b	4.5 (±0.22)^a	4.7 (±0.17)^a
3	Beta-Alanina	1.0 (±0.04) ^a	1.0 (±0.09) ^a	1.2 (±0.63) ^a
4	Ácido fumárico	1.0 (±0.02) ^a	1.0 (±0.07) ^a	0.9 (±0.44) ^a
5	Ácido glicérico	1.0 (±0.07)^b	1.2 (±0.19)^b	3.3 (±0.37)^a
6	Glicerol-3-fosfato	1.0 (±0.03) ^a	0.9 (±0.20) ^a	0.8 (±0.25) ^a
7	Mio-inositol	1.0 (±0.06)^b	0.9 (±0.05)^b	2.9 (±0.01)^a
8	Lumicromo	1.0 (±0.08) ^a	1.2 (±0.07) ^a	1.2 (±0.32) ^a
9	Ácido málico	1.0 (±0.03)^b	0.8 (±0.09)^c	1.1 (±0.02)^a
10	Ácido glutâmico +	1.0 (±0.05)^b	0.9 (±0.12)^b	3.2 (±0.02)^a
11	Sacarose	1.0 (±0.02)^a	0.1 (±0.31)^c	0.5 (±0.39)^b
12	Serine	1.0 (±0.01)^c	1.1 (±0.03)^b	4.5 (±0.03)^a
13	Ácido succínico	1.0 (±0.01) ^a	1.5 (±0.12) ^a	0.9 (±0.08) ^a
14	Treonina	1.0 (±0.01) ^a	0.6 (±0.20) ^a	0.9 (±0.38) ^a
15	Valine	1.0 (±0.02)^b	0.7 (±0.31)^b	2.8 (±0.39)^a

* Os resultados são apresentados como média ± erro de barras, mostrando o desvio padrão das experiências em triplicado (n = 3). As médias seguidas pela mesma letra não diferem na ANOVA unidirecional seguida pelo teste de Tukey no nível de probabilidade de 5% (p≤0,05). + detectado como ácido piro-glutâmico

O perfil de metabólitos revelou diferenças nas concentrações de alguns compostos entre a biomassa produzida nos meios avaliados. Aumentos no ácido glutâmico usando o meio BGNIM provavelmente refletem alterações na operação do ciclo GS-GOGAT e reações de transaminação como resultado do uso das três fontes diferentes de nitrogênio. Altos níveis de alanina já foram detectados em *Chlorella* como resultado da absorção de ureia e amônio (Baker e Thompson, 2008). De fato, a alanina é o principal aminoácido produzido em *Chlorella* sob alta tensão de oxigênio e sob condição de limitação de enxofre, que também está ligada à absorção de amônio. Conexões entre o metabolismo da alanina e a biossíntese lipídica foram propostas anteriormente para *Chlorella* (Chen et al., 2017).

Aumentos no ácido glicérico, no ácido málico e nos aminoácidos serina e valina são indicações de alterações em vários processos metabólicos do *Chlorella sorokiniana* LBA # 39 quando cultivados no meio BGNIM, particularmente aqueles associados à glicólise e ao metabolismo do piruvato (Cecchin et al., 2018). O uso da ureia também pode fornecer CO₂ adicional para o metabolismo das algas e pode ativar

vias metabólicas que não foram ativadas no cultivo com apenas nitrato de sódio como fonte de nitrogênio. De fato, as algas adotam uma estratégia de assimilação da PEP carboxilase quando cultivadas com acetato, e a expressão dos genes do PEPcase aumenta em altos níveis de CO₂ (Cheng et al., 2017). A foto-oxidação e absorção de amônia também estão relacionadas à via do PEPcase (Giordano et al., 2003). Por fim, são necessárias experiências específicas de marcação isotópica estável para determinar o destino do CO₂ liberado pela ureia durante sua decomposição e para investigar mais os efeitos da fonte alterada de nitrogênio no metabolismo celular.

3.2.5 Avaliação de custo e produtividade

Análises dos custos dos diferentes meios indicam que a substituição da fonte de nitrogênio pela ureia (BG11 → BGU) tem o potencial de reduzir o custo do meio em 65% (Tabela 8). Além disso, quando todos os componentes da formulação são derivados de fertilizantes comerciais (BG11 → BGNIM), o custo é reduzido em aproximadamente 95% (Tabela 8). Considerando a produtividade de biomassa determinada neste estudo, o uso de meio BGU reduziria o custo de produção de 1 kg de biomassa de algas em 64% em comparação com o meio BG11, enquanto o uso de meio BGNIM reduziria os custos em 96%.

A produção de biomassa, proteínas, carboidratos, ácidos graxos, bioetanol e biodiesel por ano foi estimada e é mostrada na Tabela 8. É importante ressaltar que, enquanto a otimização da produção de biomassa está sendo buscada, novas aplicações para a biomassa de algas são identificadas e desenvolvidas, para gerar uma maior sustentabilidade econômica para as biorrefinarias de algas (Chew et al., 2017).

Tabela 8 Comparação entre produtividade e custos dos meios testados.

Estimativas	BG11	BGU	BGNIM
Produtividade da biomassa ($\text{mgDW} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)	50.93	48.81	47.93
Produtividade de biomassa ($\text{ton} \cdot \text{ano}^{-1}$)^a	2.40	2.30	2.30
Produtividade total de proteínas ($\text{ton} \cdot \text{ano}^{-1}$)	1.01	1.04	1.02
Produtividade total de carboidratos ($\text{ton} \cdot \text{ano}^{-1}$)	0.54	0.53	0.56
Produtividade total de FA ($\text{ton} \cdot \text{ano}^{-1}$)	0.15	0.15	0.14
Produtividade do bioetanol ($\text{L} \cdot \text{ano}^{-1}$)^b	328.70	318.30	338.90
Produtividade de biodiesel ($\text{kg} \cdot \text{ano}^{-1}$)^c	158.90	152.30	142.60
Custo 1 L de meio (USD)^d	0.17	0.06	0.01
Custo para 1 kg de biomassa (USD)^d	470.41	171.22	19.37

^aEstimativas durante o ano considerando $200 \text{ m}^3 \cdot \text{d}^{-1}$ com 240 dias úteis por ano, ^bEstimada com base na taxa de conversão de 0,6 L por kg de carboidratos totais, ^cEstimada com base na taxa de conversão de 1 kg de ácido graxo em 1 kg de biodiesel (Cabanelas et al., 2013; Santana et al., 2017), ^dUSD = United States Dollar.

Finalmente, existem oportunidades para integrar o conceito de biorrefinaria de algas nos sistemas existentes (Brasil et al., 2017), com vários autores indicando o potencial das algas na produção de produtos de maior valor agregado nos alimentos, ração, fertilizantes, bioacumulação oleoquímica e compostos nutracêuticos (Laurens, 2017; Deprá et al., 2018; Ribeiro et al., 2019b; Ribeiro et al., 2019a). Além do potencial das microalgas para mitigar a poluição do ar e da água, as microalgas podem ser uma fonte importante de matéria-prima para o alcance dos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável propostos pela Assembléia Geral das Nações Unidas (2015).

4. Seleção e cultivo de microalgas em efluentes da indústria de óleo de palma para remoção de nutrientes e produção de biomassa de algas

*Artigo submetido para publicação no periódico *Algal Research* em Janeiro de 2020. Ribeiro D.M.; Cerejio, C.R.; Santana H.; Nascimento, R.C.; Calsing, L.C.G.; Siqueira, F.G.; Brasil, B.S.A.F. Selection and cultivation of microalgae in palm oil industry effluent for nutrient removal and algal biomass production.

A segurança da água, alimentos e energia, em um contexto de mudanças climáticas, são os principais desafios mundiais para o século XXI. Portanto, o avanço da produção de biocombustíveis e a integração de processos industriais nas biorrefinarias serão fundamentais para fornecer energia, produtos químicos e materiais de maneira sustentável (Brasil et al., 2017). Entre as diferentes matérias-primas disponíveis para a produção de biocombustíveis, o óleo de palma é uma das culturas mais eficientes em relação ao uso e à produtividade da terra (Mat Yasin et al., 2017). A produção mundial de óleo de palma ultrapassa 55 milhões de toneladas anualmente, compreendendo um mercado de mais de US \$ 34 bilhões por ano (Center For International Development At Harvard University, 2019; Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2019). Por outro lado, a produção industrial de 1 tonelada de óleo de palma bruto requer cerca de 5 a 7,5 toneladas de água, levando à geração de águas residuais na forma de efluente da indústria de óleo de palma (POME) (Ahmad et al., 2016).

O POME é composto por 95-96% de água, 0,6-0,7% de óleo residual e 4-5% de sólidos totais (Ahmad et al., 2005). Possui altas demandas de oxigênio químico e bioquímico e um conteúdo significativo de nitrogênio e fósforo e, portanto, pode causar poluição severa ao meio ambiente (Ahmad et al., 2016). Geralmente, as indústrias de óleo de palma usam sistemas baseados em lagoas de estabilização para tratar águas residuais de POME. Esse tipo de tratamento é particularmente comum em condições tropicais devido às altas temperaturas, radiação solar, presença de oxigênio e fitoplâncton que ajudam a estabilizar o efluente (Nery et al., 2013; Glaz et al., 2016). As principais vantagens são a alta eficiência na remoção de matéria orgânica e sólida e o baixo custo de implementação e manutenção. No entanto, os sistemas de lagoas exigem grandes áreas e não eliminam completamente a carga orgânica e inorgânica das águas residuais (Von Sperling, 2015).

Por outro lado, o POME pode ser um substrato potencial para o cultivo de microalgas, permitindo a produção integrada de biomassa de alto valor agregado na indústria de óleo de palma (Ahmad et al., 2016; Khalid et al., 2019). De fato, há um

crescente interesse mundial no uso de microalgas como fonte alternativa de biomassa, devido às suas amplas aplicações biotecnológicas na produção de alimentos, ração animal, energia e materiais renováveis (Khan et al., 2018), sua flexibilidade de cultivo (Davis et al., 2011), bem como sua sustentabilidade e contribuição para a redução das emissões de gases de efeito estufa (Elrayies, 2018). No entanto, desafios relacionados à seleção de linhagens produtivas, desenvolvimento de sistemas de cultura de baixo custo e melhorias na eficiência do uso de nutrientes ainda precisam ser superados antes que a produção em larga escala de microalgas se torne economicamente viável (Bhujade et al., 2017). Nesse contexto, a disponibilidade de águas residuais e resíduos industriais oferecem oportunidades promissoras para a formulação de meios de cultura de algas (Santana et al., 2017).

Estudos anteriores demonstraram a viabilidade do cultivo de microalgas em POME diluído em escala laboratorial (Hariz et al., 2019). Além disso, o uso de pré-tratamento com ácido ou antibiótico para controlar contaminantes também foi proposto (Nwuche, 2014). No entanto, o cultivo bem-sucedido de algas em escala piloto em fotobiorreatores usando 100% de POME não foi relatado até o momento. Além disso, os compostos químicos presentes na biomassa de microalgas produzidos em POME não foram caracterizados em detalhes. Neste trabalho, as microalgas com maior taxa de crescimento quando cultivadas em POME foram avaliadas, a cepa *Pseudokirchneriella* sp. LBA # 52 foi selecionada e avaliada sua eficiência na biorremediação de POME. Além disso, foi determinada a produção de biomassa de algas e a composição química, incluindo perfis de carboidratos, lipídios e carotenóides.

4.1 Materiais e métodos

4.1.1 Cepas de microalgas

Dezoito (18) linhagens de microalgas da Coleção de Microrganismos e Microalgas para Agroenergia e Biorrefinarias da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa (Brasília-DF) (Hadi et al., 2016; Fernandes et al., 2019) foram utilizadas neste estudo. (Tabela 9). As cepas de microalgas foram mantidas em Erlenmeyers contendo 150 mL de volume de trabalho de meio Bold Basal (BBM) a 26 ± 1 ° C, aeração de 5 L / h de ar atmosférico, intensidade de luz de $50 \mu\text{Em}^{-2} \text{ s}^{-1}$ às 12 / 12h claro / escuro. A identificação molecular das cepas foi baseada no sequenciamento de marcadores Internal Transcript Sequence 2 (ITS2) seguindo os protocolos descritos por Hadi e colaboradores (2016).

Tabela 9 A identificação molecular das 18 cepas utilizadas neste estudo com base na sequência do marcador nuITS2,

Cepa	GenBank code	Espécies de correspondência mais próxima	Relação	GenBank code
<i>Embrapa</i> LBA#8	KT308046	<i>Chlamydomonas</i> sp.	97.36%	KY303743
<i>Embrapa</i> LBA#13	KT308051	<i>Coelastrrella</i> sp.	98.39%	MH176129
<i>Embrapa</i> LBA#32	KT308068	<i>Micractinium</i> sp.	99.59%	KM820919
<i>Embrapa</i> LBA#35	KT308071	<i>Desmodesmus</i> sp.	99.60%	LR215742
<i>Embrapa</i> LBA#36	KT308072	<i>Desmodesmus</i> sp.	100.00%	EU502836
<i>Embrapa</i> LBA#37	KT308073	<i>Chlamydomonas applanata</i>	92.34%	MK239987
<i>Embrapa</i> LBA#38	KT308074	<i>Chlamydomonas starrii</i>	92.47%	AB983644
<i>Embrapa</i> LBA#39	KT308075	<i>Chlorella sorokiniana</i>	100.00%	MK764925
<i>Embrapa</i> LBA#40	KT308076	<i>Chlamydomonas</i> sp.	95.06%	MH683945
<i>Embrapa</i> LBA#41	KT445863	<i>Chlamydomonas</i> sp.	97.33%	KY303743
<i>Embrapa</i> LBA#45	KT308081	Chlamydomonadales sp.	77,98%	MF483442
<i>Embrapa</i> LBA#46	KT308082	<i>Uronema trentonense</i>	99.60%	HF920659
<i>Embrapa</i> LBA#47	KT308083	<i>Chlorococcum diplobionticum</i>	84.62%	LT594567
<i>Embrapa</i> LBA#48	MF346373	<i>Chlorococcum macrostigmatum</i>	93.22%	KX147341
<i>Embrapa</i> LBA#49	KT308084	<i>Chlamydomonas</i> sp.	91.13%	MH068693
<i>Embrapa</i> LBA#50	KT308085	<i>Chlorella sorokiniana</i>	95.20%	KY229196
<i>Embrapa</i> LBA#51	KT308086	<i>Chlorococcum macrostigmatum</i>	93.16%	KX147341
<i>Embrapa</i> LBA#52	KX397295	<i>Pseudokirchneriella</i> sp.	85.78%	MH010851

4.1.2 Efluente da indústria de óleo de palma

O efluente da indústria de óleo de palma (POME) usado neste estudo foi coletado na saída da lagoa anaeróbica do POME em uma planta industrial de óleo de palma no estado do Pará, Brasil (Dendepasa -Dendê do Pará S / A) (Figura 12). O sistema de tratamento usado nesta planta industrial consiste em um sistema conectado composto por duas lagoas sequenciais, uma anaeróbica e a segunda aeróbica (Von Sperling, 2015). Antes da experimentação, o POME foi preparado por centrifugação a 4800 RCF por 5 minutos para remover sólidos em suspensão e esterilização em autoclave a 121 °C por 15 minutos e depois armazenado a 4 °C até o uso.

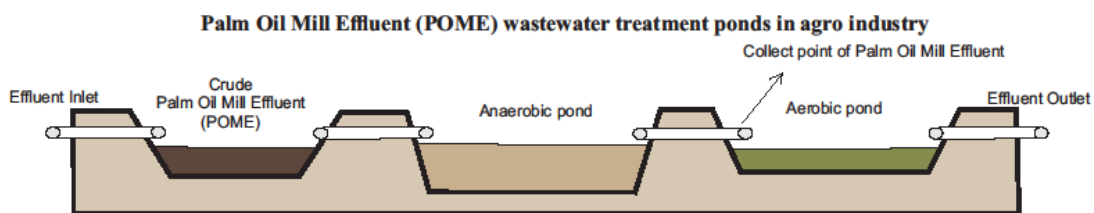


Figura 12 Lagoas de tratamento de efluentes da indústria de óleo de palma (POME) na agroindústria (DENPASA - Dendê do Pará S / A).

4.1.3 Triagem de microalgas para crescimento em POME

A triagem de microalgas foi realizada utilizando frascos de Erlenmeyer de 500 mL contendo 250 mL de POME como meio de cultura. O cultivo foi conduzido independentemente para cada uma das 18 cepas (Tabela 9) em aeração constante de 5 L / h de ar atmosférico, a 26 ± 1 ° C, intensidade luminosa de $100 \mu\text{Em}^{-2} \text{ s}^{-1}$, às 12 / 12h regime claro / escuro. O crescimento das microalgas foi monitorado através de medidas periódicas de absorvância a 680nm e inspeção microscópica das amostras de cultura durante 10 dias de cultivo. As absorvâncias inicial e final foram usadas para calcular a taxa de crescimento basal (μ).

4.1.4 *Pseudokirchneriella* sp. Cultivo de cepa LBA # 52

A cepa *Pseudokirchneriella* sp. LBA # 52 foi submetida ao cultivo em 250 mL de POME ou BBM (controle) sob diferentes condições: i) cultivo axênico (autoclavado antes do experimento) usando BBM em regime 12/12 h claro / escuro; ii) cultura axênica usando 100% de POME às 12/12 h regime claro / escuro; iii) 100% de POME axênico cultivado no escuro; iv) 100% de POME não-axênico (sem autoclavagem antes do experimento) usando às 12/12 h regime claro / escuro; v) 50% de POME não axênico em 12/12 h regime claro / escuro. O cultivo foi realizada em frascos erlenmeyer de 500 mL, arejados com 5 L / h de ar atmosférico, a $26 \text{ °C} \pm 1$ ° C, com intensidade luminosa de $100 \mu\text{Em}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (se aplicável). A cinética de crescimento das algas foi avaliada através da contagem de células usando uma câmara de Neubauer, enquanto a produtividade de biomassa foi medida gravimetricamente, conforme descrito por Santana e colaboradores (2017).

4.1.5 Cultivo de microalgas em fotobiorreatores Flat Plate airlift

Para os experimentos em escala piloto, a cepa *Pseudokirchneriella* sp. LBA # 52 foi cultivada em fotobiorreatores *Flat Plate airlift* acrílica de 15 L, com volume de 13 L de meio de cultivo, aeração de 60 Lh^{-1} e suplementação de CO_2 ajustada a 5% do fluxo de ar, com fotoperíodo de 12h / 12h, a 35.000 Lux de intensidade de luz e temperatura de 25°C durante o período escuro e 35°C durante o período claro (Figura 13). O peso seco da biomassa foi determinado conforme descrito por Santana e colaboradores (2017).

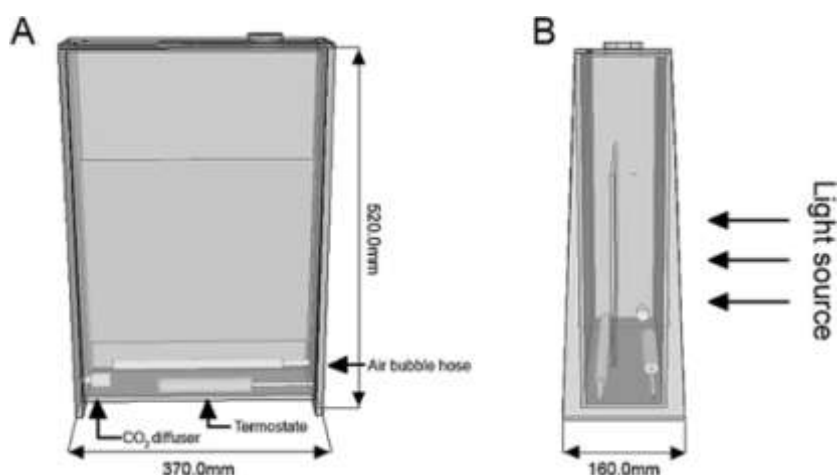


Figura 13 Vista esquemática da estrutura do fotobiorreator *Flat Plate airlift*. (A) vista frontal; (B) Vista lateral.

4.1.6 Determinação da composição do POME

A composição do POME no início (dia 0) e no final (dia 5, 10 e 15) do cultivo de microalgas em fotobiorreator *Flat Plate airlift* foi determinada. As amostras foram coletadas, centrifugadas por 10 min. a 4800 RCF e o sobrenadante usado para análise. Os métodos utilizados foram: SM5210B - Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO); QAM.IT.FQ.16A - Demanda de oxigênio químico (COD); SM 4500-O / D - Carbono orgânico total; SM 4500-NO2-B - Nitrito (NO_2^-); SM4500-NH3 - nitrogênio amoniacal (NH_4^+); SM 4500-P E - Fosfato (PO_4^{3-}) e Fósforo total; SM 3500-K B - Potássio total (K^+), NBR 12620 - Nitrato (NO_3^-) (Santana et al., 2017).

4.1.7 Análise da composição bioquímica da biomassa

Após o cultivo, a biomassa de algas foi colhida, centrifugada a 5000 g e liofilizada. Os sólidos totais e as cinzas foram quantificados seguindo o protocolo descrito por Van Wychen e Laurens (2016). O conteúdo total de proteínas foi medido através da quantificação de nitrogênio usando microKjeldahl e calculado usando o fator

de conversão específico de microalgas de 4,78 (Laurens, 2015). O teor e as frações de carboidratos foram determinados de acordo com a metodologia descrita por Van Wychen e Laurens (2016). A fração lipídica foi obtida por Ankom XT15 por Determinação de Extrato Etéreo (EE) extraído com éter de petróleo a 90 ° C por 90 minutos e a caracterização do perfil de ácidos graxos foi realizada por cromatografia gasosa (Van Wychen et al., 2013).

4.1.8 Análise estatística

A taxa de crescimento específico (μ) e a produtividade de biomassa de algal ($\text{mgDW.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$) foram calculadas usando a equação descrita por Kishi e Toda (2018). Os dados de composição da biomassa foram submetidos à análise de variância (ANOVA) com 5% de probabilidade, seguida de teste de Tukey, utilizando o software Action Stat versão 3.5.

4.2 Resultados e discussão

4.2.1 Triagem de linhagens de microalgas para crescimento em POME

A seleção de cepas robustas adaptadas ao crescimento de águas residuais e com alta produção de biomassa é uma etapa crucial para a viabilidade do sistema de cultivo (Brasil et al., 2017; Santana et al., 2017). Neste estudo, dezoito (18) linhagens de microalgas foram avaliados quanto ao crescimento usando 100% de POME como substrato (Figura 14). As cepas utilizadas foram originalmente coletadas de biomas tropicais distintos, incluindo não apenas ambientes naturais, mas também antropizados, como águas residuais rurais, águas residuais de cana-de-açúcar e lagoas de estabilização de POME (Hadi et al., 2016). A linhagem LBA # 52 apresentou a maior taxa de crescimento específico (0,37) entre as linhagens de microalgas testadas. Somente cepas de *Chlamydomonas* sp. LBA # 41, *Chlorococcum diplobionticum* LBA # 47 e *Chlorococcum macrostigmatum* LBA # 48 não apresentaram crescimento (Figura 14).

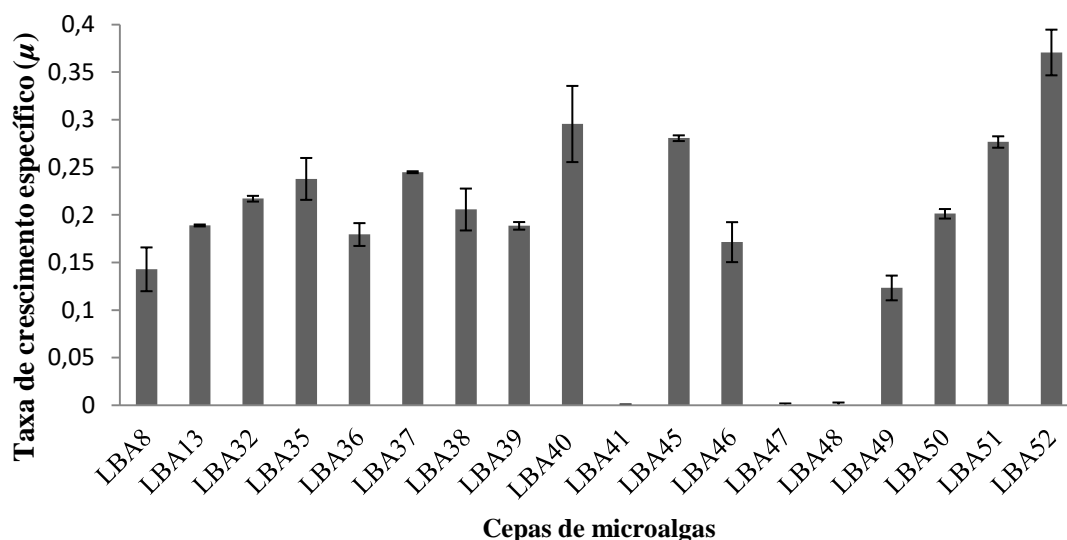


Figura 14 Taxa de crescimento específico de 18 linhagens de microalgas cultivadas em POME. Em frascos de Erlenmeyer de 500 mL contendo 250 mL de POME, com aeração constante de 5 L / h de ar atmosférico, a 26 ± 1 ° C, intensidade luminosa de $100 \mu\text{Em}^{-2} \text{s}^{-1}$, às 12 / 12h claro / escuro. Os resultados mostrados são a média de triplicados biológicos do experimento (n = 3). POME: Efluente da indústria de óleo de palma.

A cepa LBA # 52 foi originalmente coletada de uma lagoa de estabilização do POME de uma planta de óleo de palma localizada no estado do Pará (Brasil), na mesma planta onde foi recolhido o POME. Portanto, a alta taxa de crescimento apresentada por essa cepa no POME provavelmente está relacionada à sua ocorrência autóctone nesse ambiente (Burnap e Vermaas, 2012). A identificação molecular baseada no sequenciamento do Espaçador Transcrito Interno 2 do rDNA nuclear (nuITS2) atribuiu a cepa LBA # 52 ao gênero *Pseudokirchneriella* (Tabela 9). As espécies de *Pseudokirchneriella* possuem um arquétipo em meia-lua, foice ou feijão (Krienitz et al., 2011), como é possível visualizar na Figura 15, microalga considerada um organismo modelo para uso em testes de toxicidade (Berthet, 2015).

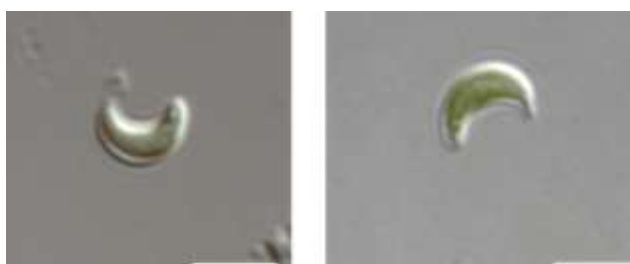


Figura 15 Microscopia da microalga *Pseudokirchneriella* sp. LBA # 52 da coleção de microrganismos da Embrapa Agroenergia. Coletado na Lagoa de estabilização de POME, em Santo Antônio Tauá/PA.

4.2.2 Crescimento de algas em POME

A cepa *Pseudokirchneriella* sp. LBA # 52 foi cultivada em frascos Erlenmeyer aerados contendo POME sob diferentes condições para caracterizar o efeito da luz e a presença de contaminantes microbianos no crescimento de algas. *Pseudokirchneriella* sp. LBA # 52 mostrou padrões de crescimento semelhantes no meio padrão BBM ou em 100% ou 50% do POME, usando regimes de 12h / 12h claro / escuro. Por outro lado, não foi detectado crescimento de algas na ausência de luz (Figura 16).

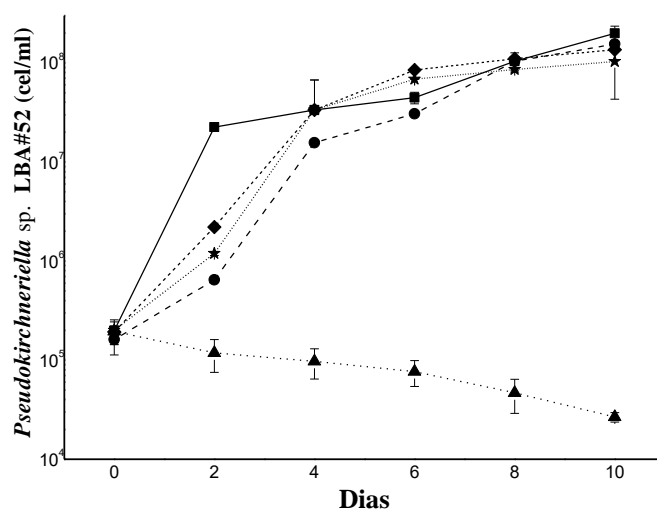


Figura 16 Dinâmica de crescimento de *Pseudokirchneriella* sp. LBA # 52. Meio Bold Basal (—■—), 100% POME axênico (autoclavado antes do experimento) 12h / 12h claro / escuro (--●--), 100% POME axênico em regime escuro (·▲·), 100% POME axênico (não autoclavado antes do experimento) 12h / 12h claro / escuro (-◆-), 50% de POME não axênico, 12h / 12h claro / escuro (·★·). Em frascos de Erlenmeyer de 500 mL contendo 250 mL de POME ou BBM, com aeração constante de 5 L / h de ar atmosférico, a 26 ± 1 ° C, intensidade luminosa de $100 \mu\text{Em}^{-2} \text{s}^{-1}$, às 12 / 12h claro / escuro. Os resultados mostrados são a média de triplicados biológicos do experimento (n = 3). POME: Efluente da indústria de óleo de palma.

Em seguida, foi realizado o escalonamento do cultivo de *Pseudokirchneriella* sp. LBA # 52 em POME em fotobiorreator *Flat Plate airlift* de capacidade de 15L, com aeração constante do ar atmosférico enriquecido com 5% de CO₂ (Figura 17). O escalonamento do cultivo é uma etapa essencial para a aplicação em larga escala. Além disso, a geometria da placa plana (*Flat Plate*) é um dos principais tipos de fotobiorreatores disponíveis para a produção de microalgas (Raslavičius et al., 2018).

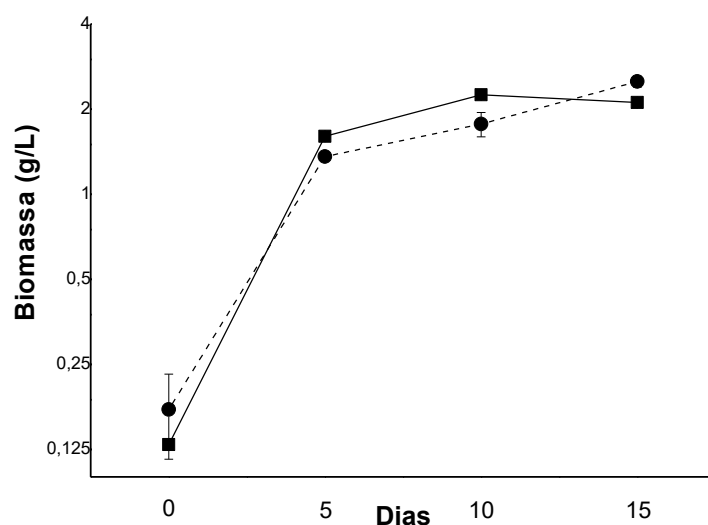


Figura 17 Dinâmica da produção de biomassa (seca) da *Pseudokirchneriella* sp. LBA # 52. No meio Bold Basal (—■—) e POME (--●--), em fotobiorreatores *Flat Plate airlift* em acrílica com capacidade de 15 L, e volume de trabalho de 13 L com aeração de 60 Lh⁻¹, suplementados com 5% de CO₂ do fluxo de ar, com fotoperíodo de 12h / 12h, a 35.000 Lux de intensidade luminosa e temperatura de 25 ° C durante o período escuro e 35 ° C durante o período claro. Os resultados mostrados são a média de triplicados biológicos do experimento (n = 3). POME: Efluente da indústria de óleo de palma.

Após cinco dias de cultivo, *Pseudokirchneriella* sp. apresentaram produtividades de 320 mgDW • L⁻¹ • d⁻¹ em BBM e 272 mgDW • L⁻¹ • d⁻¹ em 100% POME (Figura 17 e Tabela 10). Khalid e colaboradores, (2018) relataram produtividades mais baixas, de 192 mgDW • L⁻¹ • d⁻¹, ao cultivar *Chlorella* em 100% POME (Tabela 10). Por outro lado, experimentos conduzidos utilizando POME diluído como substrato para o crescimento de algas apresentaram maiores produtividades (Tabela 10). O cultivo de *Chlamydomonas* em 37% de POME diluído em BBM atingiu a produtividade de biomassa de 462 mgDW • L⁻¹ • d⁻¹ (Kamyab et al., 2016), enquanto *Chlorella* sp. O cultivo de UKM2 a 25% de POME atingiu 440 mgDW • L⁻¹ • d⁻¹. (Hariz et al., 2019). No entanto, ambos os estudos foram conduzidos apenas em escala laboratorial (Kamyab et al., 2016; Hariz et al., 2019).

Tabela 10 Comparação de produtividades de biomassa, produtividades lipídicas e eficiência de remoção de nutrientes obtidas com espécies de microalgas cultivadas em POME sob diferentes condições.

Cepa	Condição de cultivo	Produtividade de Biomassa (mgDW.L ⁻¹ .d ⁻¹)	Produtividade de Lipídios (mgDW.L ⁻¹ .d ⁻¹)	Remoção de nutrientes	Referência
<i>Pseudokirchneriella</i> sp. LBA#52	100% de POME da lagoa anaeróbica, suplementada com 5% de CO ₂ no fotobiorreator <i>Flat Plate airlift</i> de 15L.	272,13 (± 9,84)	23,09 (± 2,30)	63.86% de DQO 61.21% de TN 96.07% de TP 99.99% de Amônio 96.72% de Fosfato	Neste estudo
<i>Chlamydomonas incerta</i>	37% de POME da lagoa facultativa e diluído em BBM com DQO de 500 mg / L em frasco de 2 L.	462	197	-	(Kamyab et al., 2016)
<i>Scenedesmus</i> sp. e <i>Chlorella</i> sp. UKM2	84% e 25% de POME da lagoa anaeróbica em sistema integrado suplementado com 10% de CO ₂	460	87	47.45% de DQO 85.67% de TN 84.91% de Fosfato	(Hariz et al., 2019)
<i>Chlorella sorokiniana</i> CY-1	30% de POME diluído em meio BG11 suplementado com 2,5% de CO ₂ em frasco de 1L	150	70	47.09% de DQO 62.07% de TN 30.77% de TP	(Cheah et al., 2018)
<i>Nannochloropsis</i> sp.	10% de POME do tanque aeróbico diluído em meio F **, utilizando células imobilizadas, em frasco de 250 mL	140	-	71% of DQO	(Emparan et al., 2020)
<i>Chlorella</i> sp	20% de POME da lagoa anaeróbica + 40% de nutrientes sintéticos.	104	37	-	(Hadiyanto e Azimatun Nur, 2014)
<i>Chlamydomonas</i> sp <i>UKM 6</i>	16,6% de POME diluído em tanque anaeróbico, suplementado com 2% de CO ₂ em balão de 2L.	101	-	12,61% de DQO 69,39.9% de TN 53.33% de TP 100% de Amônio	(Ding et al., 2016)
<i>Chlorella sorokiniana</i> C 212	75% de POME filtrado e suplementado com 60 mg / L de ureia em frasco de 500 mL.	97	12	63% de DQO	(Nwuche, 2014)
<i>Chlorella sorokiniana</i>	40% de POME do tanque anaeróbico, suplementado com 5% de CO ₂ em frasco de 1L	90	-	64.3 % de Amônio 62.3 % de Fosfato	(Khalid et al., 2018)
<i>Chlorella sorokiniana</i>	40% do POME do tanque anaeróbico, suplementado com 5% de CO ₂ em frasco de 1L	79,2	-	75.75% de TN 100% de TP 93.36% de Amônio 94,50% de Fosfato	(Khalid et al., 2019)
<i>Chlorella</i> sp. (UKM2)	100% de POME do tanque anaeróbico suplementado com 10% de CO ₂ em frasco de 2 L.	64	-	80.9% de TN	(Hariz et al., 2018)

DQO – Demanda Química de Oxigênio, TN – Nitrogênio Total, TP – Fósforo Total, POME - Efluente da Indústria de Óleo da Palma

4.2.3 Efeito do cultivo de algas na composição do POME

As microalgas podem ser usadas para absorver eficientemente compostos inorgânicos e metais pesados presentes nas águas residuais (Manzoor et al., 2019). A presença de nitrogênio e fósforo é um fator determinante que favorece a eutrofização quando o efluente não é descartado adequadamente (Park et al., 2011; Melia et al., 2017). Por outro lado, são nutrientes essenciais para a produção de microalgas e são nutrientes com alta demanda na produção agrícola (Park et al., 2011). Neste trabalho, a composição química do POME antes e depois de cultivo de *Pseudokirchneriella* sp. LBA # 52 foi avaliado. A Tabela 11 mostra que há maior carga orgânica e concentrações de fósforo e potássio, bem como menor nitrogênio e pH total, no POME bruto em comparação com o POME derivado do tanque anaeróbico usado para *Pseudokirchneriella* sp. LBA # 52 neste estudo. As diferenças observadas são resultado da estabilização parcial das águas residuais durante a retenção na lagoa anaeróbica (Figura 12).

Tabela 11 Caracterização físico-química de POME bruto e POME antes e após o cultivo de *Pseudokirchneriella* sp. LBA # 52 por 5, 10 e 15 dias. POME: Efluente da indústria de óleo de palma.

Caracterização Físico-química	POME Bruto	POME	Sobrenadante da cultura após 5 dias de cultivo	Sobrenadante da cultura após 10 dias de cultivo	Sobrenadante da cultura após 15 dias de cultivo
Demanda bioquímica de oxigênio (mg.O₂ / L⁻¹)	45967,20 (± 3603,27)	20,8 (±1,70)a	40,05 (±3,75)b	84,15 (±17,18)c	80,20 (±6,36)c
Demanda química de oxigênio (mg.O₂ / L⁻¹)	145890,00 (± 19643,43)	2175,00 (± 49,50)d	786,00 (±4,24)a	802,00 (±3,46)b	921,50 (±2,12)c
Carbono orgânico total (mg.L⁻¹)	84073,60 (± 1751,36)	3680,70 (±243,39)a	12521,60 (±1751,36)b	17200,00 (±1362,17)b	15686,20 (±1946,24)b
Nitrogênio total (mg.L⁻¹)	18,15 (± 10,11)	79,19 (±6,15)b	30,71 (±0,22)a	29,22 (±2,48)a	32,31 (±0,45)a
Nitrato (mg.L⁻¹)	24,80 (±0,05)	0,72 (±0,01)b	0,59 (±0,04)a	0,70 (±0,03)b	0,66 (±0,01)ab
Nitrito (mg.L⁻¹)	0,45 (±0,05)	0,215 (±0,01)	n.d**	n.d**	n.d**
Nitrogênio amoniacal (mg.L⁻¹)	95,01 (± 15,03)	44,85 (±0,64)	n.d**	n.d**	n.d**
Fosfato (mg.L⁻¹)	630,00 (± 14,14)	56,75 (±2,47)d	1,86 (±0,06)b	1,42 (±0,01)a	5,25 (±0,07)c
Fósforo total (mg.L⁻¹)	180 (± 3,14)	20,13 (±0,88)d	0,79 (±0,08)a	1,28 (±0,03)b	2,40 (±0,03)c
Potássio total (mg.L⁻¹)	3668,50 (± 338,70)	1850,00 (±70,71)a	1833,33 (±152,75)a	1816,67 (± 28,87)a	1801,00 (± 173,21)a
pH	4,59 (± 0,01)	9,17 (±0,01)c	9,08 (±0,02)c	8,56 (±0,01)b	8,06 (±0,12)a

* Os resultados são apresentados como barras de média ± erro de experimentos em triplicado (n= 3). As médias seguidas pela mesma letra não diferem da ANOVA unidirecional com teste de Tukey no nível de probabilidade de 5% (p≤0,05). ** n.d = não detectado

Entretanto, mesmo após o estágio de estabilização anaeróbica, o efluente do POME ainda possui uma alta demanda bioquímica e química de oxigênio residual, além de uma alta concentração de nitrogênio, fósforo e potássio que estão acima dos níveis permitidos pela maioria das políticas e regulamentos ambientais (Hariz et al., 2018). Por outro lado, é possível observar que o crescimento da *Pseudokirchneriella* sp. LBA # 52 em POME leva a uma redução de 63,86% na demanda química de oxigênio (DQO), além de 61,21% de nitrogênio total (TN), 96,07% de fósforo total (TP), 99,99% de amônio e 99,07% de fosfato total após 5 dias de cultivo (Tabela 11).

O uso de microalgas no tratamento de águas residuais oferece uma oportunidade para reduzir a poluição ambiental a baixos custos (Manzoor et al., 2019). Foi relatado que o cultivo de *Chlorella sorokiniana* em POME pode levar a uma redução de 93,36% de amônio e 94,50% de fosfato (Khalid et al., 2019), enquanto o crescimento de *Nannochloropsis* sp. promoveu 71% de redução de DQO (Emparan et al., 2020). No entanto, ambos os estudos alcançaram produtividades de biomassa de algas mais baixas do que as relatadas aqui (Tabela 10).

4.2.4 Análise de composição de biomassa

A assimilação dos nutrientes se traduz na produção de biomassa e biocompostos de algas que são usadas para favorecer a viabilidade econômica do processo em uma estratégia de biorrefinaria (De Francisci et al., 2018). Assim, a biomassa de algas colhida em *Pseudokirchneriella* sp. LBA # 52 cultivadas em POME e BBM usando fotobiorreatores *Flat Plate airlift* de 15 L foram analisadas quimicamente e comparadas (Tabela 12). Os carboidratos totais compreendem a maior fração detectada na biomassa analisada, atingindo 43% nas culturas BBM e 39% nas culturas POME após 5 dias de crescimento de algas (Tabela 12). Além disso, a biomassa de *Pseudokirchneriella* sp. LBA # 52 alcançou seu maior teor de proteínas (23,93%) após 5 dias de cultura em POME (Tabela 12). Por outro lado, foi relatado que a biomassa de *Pseudokirchneriella subcapitata* produzida em meio sintético suplementado com 10 mM de nitrato é composta por aproximadamente 20% de carboidratos e 40% de proteínas (Del Río et al., 2017).

Tabela 12 Teor de biomassa, rendimento e compostos de interesse acumulado em *Pseudokirchneriella* sp. LBA # 52 crescido nas diferentes meios de cultivo.

<i>Pseudokirchneriella</i> sp. LBA#52	Bold Basal 5 dias	Bold Basal 10 dias	Bold Basal 15 dias	POME 5 dias	POME 10 dias	POME 15 dias
Produtividade da biomassa (mgDW • L⁻¹ • d⁻¹)	320,60 (± 10,51) a	224,90 (± 2,25) c	140,68 (± 7,86) e	272,13 (± 9,84) b	177,23 (± 22,97) d	166,90 (± 9,54) de
Proteína (%)	19,60 (± 0,11) c	15,49 (± 0,09) e	16,89 (± 0,53) d	23,93 (± 0,10) a	21,82 (± 0,60) b	19,93 (± 9,54) c
Produtividade proteica (mgDW • L⁻¹ • d⁻¹)	63,07 (± 0,44) a	34,84 (± 2,59) b	23,73 (± 1,98) c	65,13 (± 2,06) a	38,72 (± 0,84) b	33,27 (± 5,65) b
Teor de carboidratos Total (%)	43,63 (± 5,48) a	41,06 (± 2,37) a	38,56 (± 0,76) ab	39,73 (± 0,11) ab	36,22 (± 1,55) ab	31,52 (± 3,12) b
Produtividade de carboidratos (mgDW • L⁻¹ • d⁻¹)	134,67 (± 20,74) a	83,18 (± 3,49) bc	56,58 (± 5,90) cd	108,79 (± 5,80) ab	63,97 (± 3,70) cd	52,73 (± 7,32) d
Lipídios totais (%)	9,66 (± 0,62) cd	11,03 (± 0,20) bc	8,39 (± 0,34) d	8,51 (± 1,06) d	12,47 (± 0,17) ab	13,61 (± 0,37) a
Produtividade lipídica (mgDW • L⁻¹ • d⁻¹)	31,01 (± 2,96) a	24,81 (± 0,66) b	11,81 (± 1,10) c	23,09 (± 2,30) b	22,07 (± 2,57) b	22,71 (± 1,37) b
Cinza (%)	3,94 (± 0,16) c	4,36 (± 0,22) bc	5,55 (± 0,20) b	4,19 (± 0,01) c	4,15 (± 0,18) c	7,86 (± 0,38) a
Clorofila a (%)	0,064 (± 0,01) c	0,018 (± 0,01) d	0,019 (± 0,01) d	0,21 (± 0,02) a	0,12 (± 0,01) b	0,11 (± 0,01) b
Clorofila b (%)	0,33 (± 0,01) c	0,11 (± 0,01) d	0,11 (± 0,01) d	1,03 (± 0,14) a	0,57 (± 0,02) b	0,52 (± 0,04) b
Clorofila Total (%)	0,40 (± 0,01) c	0,13 (± 0,01) d	0,13 (± 0,01) d	1,2 (± 0,17) a	0,69 (± 0,3) b	0,64 (± 0,05) b
Razão clorofila a / b	0,19 (± 0,01) c	0,17 (± 0,01) d	0,17 (± 0,01) d	0,21 (± 0,01) b	0,20 (± 0,01) b	0,22 (± 0,01) a
Carotenóides (%)	0,10 (± 0,01) b	0,03 (± 0,01) d	0,03 (± 0,01) d	0,20 (± 0,02) a	0,11 (± 0,01) b	0,08 (± 0,01) c
Produtividade carotenoides (mgDW • L⁻¹ • d⁻¹)	0,33 (± 0,01) b	0,08 (± 0,01) d	0,04 (± 0,01) d	0,54 (± 0,06) a	0,31 (± 0,01) b	0,13 (± 0,01) c

* Os resultados são apresentados como barras de média ± erro de experimentos em triplicado (n = 3). Os valores com contraste na tabela obtiveram maior conteúdo ou produtividade em comparação aos demais tratamentos. As médias seguidas pela mesma letra não diferem da ANOVA unidirecional com teste de Tukey no nível de probabilidade de 5% (p≤0,05). POME: Efluente da indústria de óleo de palma.

Em relação à fração lipídica, a biomassa de *Pseudokirchneriella* sp. LBA # 52 apresentou seu maior conteúdo (13,61%) após 15 dias de cultivo em POME (Tabela 12). Embora tenham sido relatados maiores teores de lipídios acumulados pelas espécies de *Pseudokirchneriella subcapitata*, atingindo até 19,74% em culturas usando meio fertilizante N: P: K (20: 5: 20) (Ribeiro et al., 2019), as produtividades lipídicas observadas neste estudo são maiores devido à maior produtividade de biomassa obtida (Tabela 12). Além disso, foi possível identificar que a fração de carotenoides na *Pseudokirchneriella* sp. LBA # 52 cultivada em POME (0,20%) é aproximadamente duas vezes maior que a observada durante o cultivo com BBM (0,10%) após 5 dias (Tabela 12).

As microalgas podem ser uma fonte de bioprodutos de alto valor agregado (Chew et al., 2017). Portanto, a identificação do perfil das biomoléculas é um passo importante na caracterização da biomassa de algas. O perfil de carboidratos revelou a presença de mio-inositol, galactose, manose, ribose e glicose em biomassa de *Pseudokirchneriella* sp. LBA # 52 cultivada em POME. A glicose representa a maior fração correspondente a 80% do total de carboidratos (Tabela 13). Tem sido relatado que a biomassa de algas pode ser hidrolisada levando à liberação de glicose, que por sua vez, pode ser usada para a produção de bioetanol (de Farias Silva e Bertucco, 2016).

Tabela 13 Perfil de carboidratos acumulados em *Pseudokirchneriella* sp. LBA # 52 crescido nos diferentes meios.

<i>Pseudokirchneriella</i> sp. LBA#52	Bold Basal 5 dias	Bold Basal 10 dias	Bold Basal 15 dias	POME 5 dias	POME 10 dias	POME 15 dias
Galactose (%)	2,64 (± 0.42)bc	1,66 (± 0.16)d	2,11 (± 0.02)cd	3,55 (± 0.08)a	3,21 (± 0.38)ab	3,17 (± 0.20)ab
Glicose (%)	79,50 (± 1.46)b	82,08 (± 0.37)a	80,69 (± 0.77)ab	79,34 (± 0.48)b	78,98 (± 0.39)b	79,72 (± 0.94)b
Manose (%)	10,31 (± 1.24)a	8,43 (± 0.17)b	8,89 (± 0.32)ab	9,67 (± 0.39)ab	9,63 (± 0.27)ab	9,54 (± 0.22)ab
Mio-inositol (%)	0,86 (± 0.33)ab	0,60 (± 0.02)b	1,07 (± 0.03)ab	0,97 (± 0.04)ab	1,21 (± 0.12)ab	1,34 (± 0.09)a
Ribose (%)	2,69 (± 0.08)ab	2,86 (± 0.11)a	2,62 (± 0.01)ab	2,58 (± 0.12)ab	2,68 (± 0.29)ab	2,34 (± 0.18)b
Outras (%)	4,00 (± 0.56) a	4,37 (± 0.41)a	4,51 (± 0.43)a	3,89 (± 0.04)a	4,29 (± 0.30)a	3,90 (± 0.35)a

* Os resultados são apresentados como barras de média ± erro de experimentos em triplicado (n = 3). As médias seguidas pela mesma letra não diferem da ANOVA unidirecional com teste de Tukey no nível de probabilidade de 5% (p≤0,05). POME: Efluente da indústria de óleo de palma.

Além disso, a análise do perfil de ácidos graxos na biomassa de algas pode fornecer informações sobre a qualidade do biodiesel que pode ser produzido a partir dele. A maior fração lipídica observada na biomassa de *Pseudokirchneriella* sp. LBA # 52 é formada por ácido palmítico e ácido oleico, com uma fração que variam entre 30% a 40%, seguido pelo ácido linoleico, que varia entre 10% a 16% em ambos os meios testados (Tabela 14). Esses ácidos graxos também foram encontrados como frações principais na biomassa de *Pseudokirchneriella subcapitata* em outros trabalhos na literatura (Del Río et al., 2017; Ribeiro et al., 2019).

Tabela 14 Perfil de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME) acumulados em *Pseudokirchneriella* sp. LBA # 52 crescido nas diferentes mídias.

<i>Pseudokirchneriella</i> sp. LBA#52 (FAME)	Bold Basal 5 dias	Bold Basal 10 dias	Bold Basal 15 dias	POME 5 dias	POME 10 dias	POME 15 dias
Caproico (%)	4,83 (\pm 0,26)a	3,38 (\pm 0,19)b	3,20 (\pm 0,06)b	3,76 (\pm 0,36)a	2,84 (\pm 0,28)b	4,04 (\pm 1,26)a
Palmítico (%)	34,05 (\pm 0,38)b	35,08 (\pm 0,18)ab	38,70 (\pm 0,07)a	30,32 (\pm 0,03)b	32,53 (\pm 0,52)ab	35,88 (\pm 0,16)ab
Palmitoléico (%)	2,76 (\pm 1,18)c	2,24 (\pm 0,03)c	1,97 (\pm 0,02)c	5,44 (\pm 0,06)a	3,42 (\pm 0,10)BC	3,46 (\pm 0,16)bc
Estearico (%)	2,37 (\pm 0,05)c	3,98 (\pm 0,02)a	4,20 (\pm 0,05)a	2,57 (\pm 0,01)bc	3,19 (\pm 0,01)a	3,28 (\pm 0,26)ab
Oleico (%)	34,53 (\pm 0,63)b	40,55 (\pm 0,11)a	36,40 (\pm 0,09)a	33,87 (\pm 0,17)ab	34,88 (\pm 0,32)a	31,56 (\pm 1,81)ab
Linoléico (%)	12,62 (\pm 0,12)c	10,44 (\pm 0,06)d	10,92 (\pm 0,04)d	16,66 (\pm 0,06)a	14,51 (\pm 0,26)b	14,40 (\pm 0,42)b
Linolênico (%)	8,84 (\pm 0,11)a	4,33 (\pm 0,05)c	4,60 (\pm 0,03)c	7,38 (\pm 0,06)b	7,15 (\pm 0,16)b	7,37 (\pm 0,40)b
DHA (%)	--	--	--	--	2,21 (\pm 0,19)	--

* Os resultados são apresentados como barras de média \pm erro de experimentos em triplicado (n = 3). As médias seguidas pela mesma letra não diferem da ANOVA unidirecional com teste de Tukey no nível de probabilidade de 5% ($p \leq 0,05$). POME: Efluente da indústria de óleo de palma.

A análise do perfil dos carotenoides de *Pseudokirchneriella* sp. O LBA # 52 mostra que a maior fração detectada é a luteína, variando de 70 a 75% do total de carotenóides (Tabela 15). A luteína é um composto de alto valor agregado com mercados estabelecidos em aves e em suplementos nutricionais humanos (Araya et al., 2014). Além disso, outros carotenóides foram identificados em concentrações mais baixas como astaxantina, alfa e beta caroteno, criptoxantina, cantaxantina, fucoxantina, licopeno e zaexantina (Tabela 15). Estes são poderosos antioxidantes com aplicações na saúde e nutrição humanas e na indústria de cosméticos (Poojary et al., 2016).

Tabela 15 Perfil de carotenoides acumulados em *Pseudokirchneriella* sp. LBA # 52 crescido nas diferentes meios.

<i>Pseudokirchneriella</i> sp. LBA#52	Bold Basal 5 dias	Bold Basal 10 dias	Bold Basal 15 dias	POME 5 dias	POME 10 dias	POME 15 dias
Alfa-caroteno (%)	n.d.	n.d.	n.d.	1,01 (\pm 0,45)a	n.d.	n.d.
Astaxantina (%)	n.d.	7,77 (\pm 0,66)b	6,13 (\pm 0,31)bc	5,34 (\pm 1,41)c	7,82 (\pm 0,12)b	11,27 (\pm 0,43)a
Betacaroteno (%)	n.d.	3,52 (\pm 0,44)d	8,15 (\pm 0,46)b	15,74 (\pm 0,49)a	6,18 (\pm 0,75)c	5,07 (\pm 0,88)cd
Beta criptoxantina (%)	n.d.	2,32 (\pm 0,56)bc	2,24 (\pm 0,38)c	4,22 (\pm 0,69)a	3,00 (\pm 0,21)BC	3,57 (\pm 0,12)ab
Cantaxantina (%)	n.d.	4,57 (\pm 0,35)a	4,89 (\pm 0,33)a	3,10 (\pm 2,32)a	3,82 (\pm 0,23)a	4,06 (\pm 0,38)a
Fucoxantina (%)	n.d.	4,09 (\pm 0,93)ab	2,34 (\pm 0,07)b	4,02 (\pm 0,56)b	6,79 (\pm 1,69)a	4,57 (\pm 0,42)ab
Licopeno (%)	7,75 (\pm 0,91)a	1,85 (\pm 0,05)b	0,88 (\pm 0,27)b	0,71 (\pm 0,06)b	0,68 (\pm 0,607)b	0,65 (\pm 0,05)b
Luteína (%)	81,05 (\pm 1,23)a	69,75 (\pm 1,39)b	72,49 (\pm 1,51)b	63,065 (\pm 3,30)c	68,57 (\pm 0,73)b	67,68 (\pm 0,40)bc
Zeaxantina (%)	11,19 (\pm 1,8)a	6,09 (\pm 0,74)b	2,86 (\pm 3,37)b	2,76 (\pm 0,77)b	3,11 (\pm 0,27)b	3,09 (\pm 0,43)b

* Os resultados são apresentados como barras de média \pm erro de experimentos em triplicado (n = 3). As médias seguidas pela mesma letra não diferem da ANOVA unidirecional com teste de Tukey no nível de probabilidade de 5% ($p \leq 0,05$). POME: Efluente da indústria de óleo de palma.

Por fim, foi estimada a produção de biomassa, de proteínas, de carboidratos, de ácidos graxos, de bioetanol e de biodiesel da microalga *Pseudokirchneriella* sp. LBA # 52 calculados com resultados obtidos neste trabalho nas diferentes condições testadas. As estimativas de produtividade de biomassa do LBA # 52 atingem 13 e 15 toneladas / ha por ano em POME e BBM, respectivamente. Essas estimativas superam a produtividade estimada para *Chlorella sorokiniana* cultivada em meio quimicamente definido (2,4 toneladas) (Ribeiro et al., 2020), bem como a produtividade estimada de 5,69 toneladas / ha para *Chlorella vulgaris* e 13,58 toneladas / ha para *Botryococcus terribilis* cultivadas em águas residuais suplementadas com glicerol (Cabanelas et al., 2013).

Tabela 16 Produtividade estimada entre Bold Basal e POME em diferentes momentos.

Estimativas	Bold Basal 5 dias	Bold Basal 10 dias	Bold Basal 15 dias	POME 5 dias	POME 10 dias	POME 15 dias
Produtividade da biomassa (mg.L⁻¹)	320,60	224,90	140,68	272,13	177,23	166,9
Produtividade de biomassa (ton.ano⁻¹)	15,38	10,79	6,75	13,06	8,5	8,01
Proteína total (ton.ano⁻¹)	3,01	1,67	1,14	3,12	1,85	1,59
Carboidratos totais (ton.ano⁻¹)	6,71	4,43	2,6	5,18	3,08	2,52
FA total (ton.ano⁻¹)	1,49	1,19	0,57	1,11	1,06	1,09
Bioetanol (L.ano⁻¹)	4028,5	2659,5	1562,3	3113,77	1848,74	1515,07
Biodiesel (Kg.ano⁻¹)	1486,6	1190,7	566,5	1111,59	1060,82	1090,32

Estimativas durante o ano considerando 200 m³.d⁻¹ com 240 dias úteis por ano (Cabanelas et al., 2013; Ribeiro et al., 2020)

Estimado com base na taxa de conversão de 0,6 L por kg de carboidratos totais (Cabanelas et al., 2013; Ribeiro et al., 2020)

Estimada com base na taxa de conversão de 1 kg de ácido graxo em 1 kg de biodiesel (Cabanelas et al., 2013; Ribeiro et al., 2020)

POME: Efluente da indústria de óleo de palma.

5. Considerações finais

Esta tese apresenta duas estratégias de produção de microalgas a baixos custos visando à viabilização técnico-econômica de futuras biorrefinarias de biomassa algal. Foram identificadas as cepas *Chlorella sorokiniana* LBA#39 e a *Pseudokirchneriella* sp. LBA#52, mantidas no Laboratório de Biotecnologia de Algas da Embrapa Agroenergia, como cepas superiores para produção de biomassa algal. Foram apresentadas duas configurações de fotobiorreatores fechados em sistemas de cultivo *airlift*: i) fotobiorreator de frasco tubular de 1L com um refinado sistema automatizado; ii) fotobiorreator *Flat Plate airlift* em escala piloto de 15L.

Além disso, é apresentado neste trabalho a formulação do *Blue Green Nitrogen Mix* (BGNIM) para cultivo da *Chlorella sorokiniana* LBA#39. Esta estratégia de uso combinado de fontes de nitrogênio levou a alterações positivas sob o ponto de vista de produção comercial de bioprodutos e abriu oportunidades para o controle de predadores. Adicionalmente, foi estimada uma redução de custo de aproximadamente 95% em comparação com o meio padrão da literatura *Blue Green 11* (BG11).

Em sequência, é apresentada também a oportunidade de criação de biorrefinarias com a indústria do óleo de palma ao utilizar o efluente da indústria (POME) para a produção de biomassa da cepa de microalga autóctone *Pseudokirchneriella* sp. LBA#52. Esta cepa apresentou potencial estimado de produção de 13 toneladas de biomassa algal por hectare/ano, contribuindo para o aumento da viabilidade econômica de todo o sistema.

Estudos futuros poderão demonstrar a produção em larga escala utilizando as algas e os meios descritos neste trabalho. Existem ainda oportunidades para aprofundar o conhecimento sobre a captura de carbono pelas microalgas e para o aumento da eficiência fotossintética através da engenharia genética e evolução adaptativa.

6. Conclusão

Apesar de muitos avanços recentes na produção de microalgas em larga escala, desafios ainda precisam ser superados para se alcançar a viabilidade econômica. Neste estudo, propusemos duas estratégias de cultivo algal de baixo custo baseadas no uso de meios quimicamente definido e indefinido.

O meio quimicamente definido de baixo custo proposto (BGNIM) mostrou potencial para reduzir significativamente os custos de produção de algas. De fato, o uso de BGNIM levou a uma produtividade de biomassa semelhante em comparação com o meio padrão BG11 amplamente utilizado. Além disso, essa abordagem aumentou levemente o acúmulo de proteínas e carotenóides, que são frações comercialmente valorizadas da biomassa de algas, em comparação com o meio padrão BG11. Além disso, a acidificação observada durante a fase inicial de cultivo pode ser usada para controle de predadores durante a produção em larga escala, uma questão importante para o cultivo contínuo em larga escala.

Para o cultivo em meio quimicamente indefinido, foi selecionada a cepa autóctone *Pseudokirchneriella* sp. LBA # 52 que mostrou alta produtividade de biomassa quando cultivada em POME. A carga orgânica das águas residuais pós-cultivo, bem como as concentrações totais de nitrogênio, amônio e fosfato são drasticamente reduzidas pelo crescimento algal, revelando um processo eficiente de biorremediação. Além disso, a biomassa de algas produzida é rica em carboidratos e produz quantidades significativas de lipídios e luteína. Este estudo abre oportunidades para aplicação industrial de microalgas e integração de biorrefinarias de algas em plantas industriais de óleo de palma.

7. Referências

- Ahmad A, Buang A, Bhat AH** (2016) Renewable and sustainable bioenergy production from microalgal co-cultivation with palm oil mill effluent (POME): A review. *Renew Sustain Energy Rev* **65**: 214–234
- Ahmad AL, Bhatia S, Ibrahim N, Sumathi S** (2005) Adsorption of residual oil from palm oil mill effluent using rubber powder. *Brazilian J Chem Eng* **22**: 371–379
- AlgaeBase** (2019) AlgaeBase is a global algal database of taxonomic, nomenclatural and distributional information. <http://www.algaebase.org/>
- Amaral LIV do, Gaspar M, Costa PMF, Aida MPM, Buckeridge MS** (2007) Novo método enzimático rápido e sensível de extração e dosagem de amido em materiais vegetais. *Hoehnea* **34**: 425–431
- Arumugam M, Agarwal A, Arya MC, Ahmed Z** (2013) Influence of nitrogen sources on biomass productivity of microalgae *Scenedesmus bijugatus*. *Bioresour Technol* **131**: 246–249
- Ashraf M, Javaid M, Rashid T, Ayub M, Zafar A, Ali S, Naeem M** (2011) Replacement of expensive pure nutritive media with low cost commercial fertilizers for mass culture of freshwater algae, *Chlorella vulgaris*. *Int J Agric Biol* **13**: 484–490
- Baker JE, Thompson JF** (2008) Metabolism of Urea & Ornithine Cycle Intermediates by Nitrogen-Starved Cells of *Chlorella vulgaris*. *Plant Physiol* **37**: 618–624
- Benemann J** (2013) Microalgae for biofuels and animal feeds. *Energies* **6**: 5869–5886
- Berthet B** (2015) Reference Species. *Aquat Ecotoxicol Adv Tools Deal with Emerg Risks*. doi: 10.1016/B978-0-12-800949-9.00009-7
- Beyerinck MW** (1890) Culturversuche mit Zoochlorellen, Lichenengonidien und anderen niederen Algen. *Bot Zeitung* **47**: 725–739, 741–754, 757–768, 781–785.
- Bhujade R, Chidambaram M, Kumar A, Sapre A** (2017) Algae to Economically Viable Low-Carbon-Footprint Oil. *Annu Rev Chem Biomol Eng* **8**: 335–357
- Bicudo, Carlos Eduardo de Mattos & Menezes M** (2017) Gêneros de Algas de Águas Continentais no Brasil - Terceira Edição.
- Borowitzka MA** (2013) High-value products from microalgae-their development and commercialisation. *J Appl Phycol* **25**: 743–756
- Borowitzka MA, Moheimani NR** (2013) Algae for biofuels and energy. *Algae for Biofuels and Energy* 1–288
- Brasil BSAF, Silva FCP, Siqueira FG** (2017) Microalgae biorefineries: The Brazilian scenario in perspective. *N Biotechnol* **39**: 90–98
- Brennan L, Owende P** (2010) Biofuels from microalgae-A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renew Sustain*

- Brodie J, Chan CX, De Clerck O, Cock JM, Coelho SM, Gachon C, Grossman AR, Mock T, Raven JA, Smith AG, et al** (2017) The Algal Revolution. *Trends Plant Sci* **22**: 726–738
- Burlew JS** (1953) Current status of the large-scale culture of algae.
- Burnap RL, Vermaas WFJ** (2012) Advances in Photosynthesis and Respiration. Volume 33: Functional Genomics and Evolution of Photosynthetic Systems. doi: 10.1007/978-94-007-1533-2
- Cabanelas ITD, Arbib Z, Chinalia FA, Souza CO, Perales JA, Almeida PF, Druzian JI, Nascimento IA** (2013) From waste to energy: Microalgae production in wastewater and glycerol. *Appl Energy* **109**: 283–290
- Calvin M, Massini P** (1952) The path of carbon in photosynthesis - XX. The steady state. *Experientia* **8**: 445–457
- Caspi R, Billington R, Ferrer L, Foerster H, Fulcher CA, Keseler IM, Kothari A, Krummenacker M, Latendresse M, Mueller LA, et al** (2016) The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes and the BioCyc collection of pathway/genome databases. *Nucleic Acids Res* **44**: D471–D480
- Cazzaniga S, Dall'Osto L, Szaub J, Scibilia L, Ballottari M, Purton S, Bassi R** (2014) Domestication of the green alga *Chlorella sorokiniana*: Reduction of antenna size improves light-use efficiency in a photobioreactor. *Biotechnol Biofuels* **7**: 1–13
- Cecchin M, Benfatto S, Griggio F, Mori A, Cazzaniga S, Vitulo N, Delledonne M, Ballottari M** (2018) Molecular basis of autotrophic vs mixotrophic growth in *Chlorella sorokiniana*. *Sci Rep* **8**: 1–13
- Center For International Development At Harvard University** (2019) The Atlas of Economic Complexit.
- Champenois J, Marfaing H, Pierre R** (2015) Review of the taxonomic revision of *Chlorella* and consequences for its food uses in Europe. *J Appl Phycol* **27**: 1845–1851
- Cheah WY, Show PL, Juan JC, Chang JS, Ling TC** (2018) Microalgae cultivation in palm oil mill effluent (POME) for lipid production and pollutants removal. *Energy Convers Manag* **174**: 430–438
- Chen H, Zheng Y, Zhan J, He C, Wang Q** (2017) Comparative metabolic profiling of the lipid-producing green microalga *Chlorella* reveals that nitrogen and carbon metabolic pathways contribute to lipid metabolism. *Biotechnol Biofuels* **1**: 1–20
- Cheng D, Li D, Yuan Y, Zhou L, Li X, Wu T, Wang L, Zhao Q, Wei W, Sun Y** (2017) Improving carbohydrate and starch accumulation in *Chlorella* sp. AE10 by a novel two-stage process with cell dilution. *Biotechnol Biofuels* **10**: 1–14
- Chew KW, Yap JY, Show PL, Suan NH, Juan JC, Ling TC, Lee DJ, Chang JS** (2017) Microalgae biorefinery: High value products perspectives. *Bioresour*

Technol **229**: 53–62

- Chisti Y** (2008) Biodiesel from microalgae beats bioethanol. doi: 10.1016/j.tibtech.2007.12.002
- Chisti Y, Yan J** (2011) Energy from algae : Current status and future trends Algal biofuels – A status report. *Appl Energy* **88**: 3277–3279
- Christenson L, Sims R** (2011) Production and harvesting of microalgae for wastewater treatment , biofuels , and bioproducts. *Biotechnol Adv* **29**: 686–702
- Davis R, Aden A, Pienkos PT** (2011) Techno-economic analysis of autotrophic microalgae for fuel production. *Appl Energy* **88**: 3524–3531
- Deprá MC, dos Santos AM, Severo IA, Santos AB, Zepka LQ, Jacob-Lopes E** (2018) Microalgal Biorefineries for Bioenergy Production: Can We Move from Concept to Industrial Reality? *Bioenergy Res* **11**: 727–747
- Ding GT, Yaakob Z, Takriff MS, Salihon J, Abd Rahaman MS** (2016) Biomass production and nutrients removal by a newly-isolated microalgal strain *Chlamydomonas* sp in palm oil mill effluent (POME). *Int J Hydrogen Energy* **41**: 4888–4895
- Dragone G, Fernandes BD, Abreu AP, Vicente AA, Teixeira JA** (2011) Nutrient limitation as a strategy for increasing starch accumulation in microalgae. *Appl Energy* **88**: 3331–3335
- El-kassas HY** (2014) Growth and fatty acid profile of the marine microalga *Picochlorum* Sp . grown under nutrient stress conditions. *Egypt J Aquat Res* **39**: 233–239
- Elrayies GM** (2018) Microalgae: Prospects for greener future buildings. *Renew Sustain Energy Rev* **81**: 1175–1191
- Emparan Q, Jye YS, Danquah MK, Harun R** (2020) Cultivation of *Nannochloropsis* sp. microalgae in palm oil mill effluent (POME) media for phycoremediation and biomass production: Effect of microalgae cells with and without beads. *J Water Process Eng* **33**: 101043
- Fan J, Cui Y, Wan M, Wang W, Li Y** (2014) Lipid accumulation and biosynthesis genes response of the oleaginous *Chlorella pyrenoidosa* under three nutrition stressors. *Biotechnol Biofuels* **7**: 1–14
- de Farias Silva CE, Bertuccio A** (2016) Bioethanol from microalgae and cyanobacteria: A review and technological outlook. *Process Biochem* **51**: 1833–1842
- Fernandes MS, Calsing LCG, Nascimento RC, Santana H, Morais PB, de Capdeville G, Brasil BSAF** (2019) Customized cryopreservation protocols for chlorophytes based on cell morphology. *Algal Res* **38**: 101402
- Food and Agriculture Organization of the United Nations** (2019) FAOSTAT DATABATE. <http://www.fao.org/faostat/>

- Forján E, Garbayo I, Casal C, Vélchez C** (2007) Enhancement of carotenoid production in *Nannochloropsis* by phosphate and sulphur limitation. 356–364
- De Francisci D, Su Y, Iital A, Angelidaki I** (2018) Evaluation of microalgae production coupled with wastewater treatment. *Environ Technol (United Kingdom)* **39**: 581–592
- Fu L, Cui X, Li Y, Xu L, Zhang C, Xiong R, Zhou D, Crittenden JC** (2017) Excessive phosphorus enhances *Chlorella regularis* lipid production under nitrogen starvation stress during glucose heterotrophic cultivation. *Chem Eng J* **330**: 566–572
- General Assembly of the United Nations** (2015) Resolution adopted by the General Assembly on 25 September 2015. **16301**: 1–35
- Giordano M, Norici A, Forssen M, Eriksson M, Raven JA** (2003) An anaplerotic role for mitochondrial carbonic anhydrase in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* **132**: 2126–2134
- Glaz P, Bartosiewicz M, Laurion I, Reichwaldt ES, Maranger R, Ghadouani A** (2016) Greenhouse gas emissions from waste stabilisation ponds in Western Australia and Quebec (Canada). *Water Res* **101**: 64–74
- Govindjee, Beatty JT, Gest H, Allen JF** (2005) Discoveries in Photosynthesis. *Adv Photosynth Respir*. doi: 10.1007/1-4020-3324-9
- Grobbelaar JU** (2010) Microalgal biomass production: challenges and realities. *Photosynth Res* **106**: 135–144
- Grobbelaar JU** (2013) Mass Production of Microalgae at Optimal Photosynthetic Rates. *Photosynthesis* 357–371
- Guiry MD** (2012) How many species of algae are there? *J Phycol* **48**: 1057–1063
- Gupta S, Pawar SB, Pandey RA** (2019) Current practices and challenges in using microalgae for treatment of nutrient rich wastewater from agro-based industries. *Sci Total Environ* **687**: 1107–1126
- Gutierrez J, Kwan TA, Zimmerman JB, Peccia J** (2016) Ammonia inhibition in oleaginous microalgae. *Algal Res* **19**: 123–127
- Hadi SIIA, Santana H, Brunale PPM, Gomes TG, Oliveira MD, Matthiensen A, Oliveira MEC, Silva FCP, Brasil BSAF** (2016) DNA barcoding green microalgae isolated from neotropical inland waters. *PLoS One* **11**: 1–18
- Hadiyanto, Azimatun Nur MM** (2014) Lipid extraction of microalga *Chlorella* sp. cultivated in palm oil mill effluent (POME) medium. *World Appl Sci J* **31**: 959–967
- Hanifzadeh MM, Garcia EC, Viamajala S** (2018) Production of lipid and carbohydrate from microalgae without compromising biomass productivities: Role of Ca and Mg. *Renew Energy* **127**: 989–997
- Hariz HB, Takriff MS, Ba-Abbad MM, Mohd Yasin NH, Mohd Hakim NIN** (2018)

CO₂ fixation capability of *Chlorella* sp. and its use in treating agricultural wastewater. *J Appl Phycol* **30**: 3017–3027

- Hariz HB, Takriff MS, Mohd Yasin NH, Ba-Abbad MM, Mohd Hakimi NIN** (2019) Potential of the microalgae-based integrated wastewater treatment and CO₂ fixation system to treat Palm Oil Mill Effluent (POME) by indigenous microalgae; *Scenedesmus* sp. and *Chlorella* sp. *J Water Process Eng.* doi: 10.1016/j.jwpe.2019.100907
- Hipkin CR, Thomas RJ, Syrett PJ** (1983) Effects of nitrogen deficiency on nitrate reductase, nitrate assimilation and photosynthesis in unicellular marine algae. *Mar Biol* **77**: 101–105
- Ikaran Z, Suárez-Alvarez S, Urreta I, Castañón S** (2015) The effect of nitrogen limitation on the physiology and metabolism of *Chlorella vulgaris* var L3. *Algal Res* **10**: 134–144
- John DM, Whitton BA, Brook AJ** (2002) The freshwater algal flora of the British Isles: an identification guide to freshwater and terrestrial algae. Cambridge University Press
- Kamyab H, Md Din MF, Ponraj M, Keyvanfar A, Rezania S, Taib SM, Abd Majid MZ** (2016) Isolation and screening of microalgae from agro-industrial wastewater (POME) for biomass and biodiesel sources. *Desalin Water Treat* **57**: 29118–29125
- Kazamia E, Aldridge DC, Smith AG** (2012) Synthetic ecology - A way forward for sustainable algal biofuel production? *J Biotechnol* **162**: 163–169
- Kenrick P, Crane PR** (1997) The origin and early evolution of plants on land. *Nature* **389**: 33–39
- Khalid AAH, Yaakob Z, Abdullah SRS, Takriff MS** (2019) Analysis of the elemental composition and uptake mechanism of *Chlorella sorokiniana* for nutrient removal in agricultural wastewater under optimized response surface methodology (RSM) conditions. *J Clean Prod* **210**: 673–686
- Khalid AAH, Yaakob Z, Abdullah SRS, Takriff MS** (2018) Growth improvement and metabolic profiling of native and commercial *Chlorella sorokiniana* strains acclimatized in recycled agricultural wastewater. *Bioresour Technol* **247**: 930–939
- Khan MI, Shin JH, Kim JD** (2018) The promising future of microalgae: Current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products. *Microb Cell Fact* **17**: 1–21
- Kishi M, Toda T** (2018) Carbon fixation properties of three alkalihalophilic microalgal strains under high alkalinity. *J Appl Phycol* **30**: 401–410
- Krienitz L, Bock C, Nozaki H, Wolf M** (2011) Ssu rRNA gene phylogeny of morphospecies affiliated to the bioassay alga “*Selenastrum capricornutum*” recovered the polyphyletic origin of crescent-shaped chlorophyta. *J Phycol* **47**: 880–893
- Lammers PJ, Huesemann M, Boeing W, Anderson DB, Arnold RG, Bai X, Bhole M, Brhanavan Y, Brown L, Brown J, et al** (2017) Review of the cultivation

program within the National Alliance for Advanced Biofuels and Bioproducts. *Algal Res* **22**: 166–186

- Laurens LML** (2017) State of Technology Review – Algae Bioenergy An IEA Bioenergy Inter-Task Strategic Project.
- Laurens LML** (2015) Summative Mass Analysis of Algal Biomass – Integration of Analytical Procedures Summative Mass Analysis of Algal Biomass – Integration of Analytical Procedures Laboratory Analytical Procedure (LAP).
- Leliaert F, Smith DR, Moreau H, Herron MD, Verbruggen H, Delwiche CF, De Clerck O** (2012) Phylogeny and Molecular Evolution of the Green Algae. *CRC Crit Rev Plant Sci* **31**: 1–46
- Leu JY, Lin YH** (2013) Optimization of nutritional compositions of growth medium for *Chlorella* sp. FJ3 growth kinetics in batch and continuous-flow photoreactors. *Environ Technol (United Kingdom)* **34**: 2845–2855
- Li T, Xu J, Gao B, Xiang W, Li A, Zhang C** (2016) Morphology, growth, biochemical composition and photosynthetic performance of *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae) under low and high nitrogen supplies. *Algal Res* **16**: 481–491
- Liang K, Zhang Q, Gu M, Cong W** (2013) Effect of phosphorus on lipid accumulation in freshwater microalga *Chlorella* sp. *J Appl Phycol* **25**: 311–318
- Lichtenthaler H, Wellburn A** (1983) Determinations of total carotenoids and chlorophylls b of leaf extracts in different solvents. *Biochem Soc Trans* **11**: 591–592
- LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL W** (2001) *Biotechnologia Industrial*, vol. 3. São Paulo
- Lin Q, Lin J** (2011) Effects of nitrogen source and concentration on biomass and oil production of a *Scenedesmus rubescens* like microalga. *Bioresour Technol* **102**: 1615–1621
- Ling T-Y, Chiang Y-C** (2018) Well-being, health and urban coherence-advancing vertical greening approach toward resilience: A design practice consideration. *J Clean Prod* **182**: 187–197
- Lisec J, Willmitzer L, Kopka J, Schauer N, Fernie AR** (2006) Gas chromatography mass spectrometry–based metabolite profiling in plants. *Nat Protoc* **1**: 387–396
- De Lourdes FMM, Dolores Josefina RRM, Ulises MMC, De Jesús MRA** (2017) Tolerance and nutrients consumption of *Chlorella vulgaris* growing in mineral medium and real wastewater under laboratory conditions. *Open Agric* **2**: 394–400
- Lu Q, Chen P, Addy M, Zhang R, Deng X, Ma Y, Cheng Y, Hussain F, Chen C, Liu Y, et al** (2018) Carbon-dependent alleviation of ammonia toxicity for algae cultivation and associated mechanisms exploration. *Bioresour Technol* **249**: 99–107
- Manzoor F, Karbassi A, Golzary A** (2019) Heavy Metal Contaminants Removal from wastewater by using *Chlorella vulgaris*: A Review. *Curr Environ Eng* **06**: 1–13

- Marrone BL, Lacey RE, Anderson DB, Bonner J, Coons J, Dale T, Downes CM, Fernando S, Fuller C, Goodall B, et al** (2017) Review of the harvesting and extraction program within the National Alliance for Advanced Biofuels and Bioproducts. *Algal Res* 0–1
- Mat Yasin MH, Mamat R, Najafi G, Ali OM, Yusop AF, Ali MH** (2017) Potentials of palm oil as new feedstock oil for a global alternative fuel: A review. *Renew Sustain Energy Rev* **79**: 1034–1049
- Mata TM, Martins AA, Caetano NS** (2010) Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renew Sustain Energy Rev* **14**: 217–232
- Melia PM, Cundy AB, Sohi SP, Hooda PS, Busquets R** (2017) Trends in the recovery of phosphorus in bioavailable forms from wastewater. *Chemosphere* **186**: 381–395
- Moody JW, McGinty CM, Quinn JC** (2014) Global evaluation of biofuel potential from microalgae. *Proc Natl Acad Sci* **111**: 8691–8696
- NAABB** (2014) National Alliance for Advanced Biofuels and Bio-products (NAABB) Synopsis. United States Dep Energy; Off Energy Effic Renew Energy; Natl Alliance Adv Biofuels Bio-products 150
- National Alliance For Advanced Biofuels and Bio-products (NAABB)** (2014) Full final report: Section III. 1–39
- Negi S, Barry AN, Friedland N, Sudasinghe N, Subramanian S, Pieris S, Holguin FO, Dungan B, Schaub T, Sayre R** (2016) Impact of nitrogen limitation on biomass, photosynthesis, and lipid accumulation in *Chlorella sorokiniana*. *J Appl Phycol* **28**: 803–812
- Nery V Del, Damianovic MHZ, Pozzi E, De Nardi IR, Caldas VEA, Pires EC** (2013) Long-term performance and operational strategies of a poultry slaughterhouse waste stabilization pond system in a tropical climate. *Resour Conserv Recycl* **71**: 7–14
- Nwuche C** (2014) Use of Palm Oil Mill Effluent as Medium for Cultivation of *Chlorella sorokiniana*. *Br Biotechnol J* **4**: 305–316
- Odjadjare EC, Mutanda T, Olaniran AO** (2017) Potential biotechnological application of microalgae: a critical review. *Crit Rev Biotechnol* **37**: 37–52
- Olivares J.** (2014) NAABB Final Report. 1–38
- Oncel SS** (2013) Microalgae for a macroenergy world. *Renew Sustain Energy Rev* **26**: 241–264
- Papageorgiou GC, Govindjee** (2014) Chlorophyll a Fluorescence - A signature of Photosynthesis. *Igarss 2014*. doi: 10.1007/s13398-014-0173-7.2
- Park JBK, Craggs RJ, Shilton a. N** (2011) Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production. *Bioresour Technol* **102**: 35–42
- Patias LD, Fernandes AS, Petry FC, Mercadante AZ, Jacob-Lopes E, Zepka LQ** (2017) Carotenoid profile of three microalgae/cyanobacteria species with peroxyl

radical scavenger capacity. *Food Res Int* **100**: 260–266

Pinton R, Tomasi N, Zanin L (2016) Molecular and physiological interactions of urea and nitrate uptake in plants. *Plant Signal Behav.* doi: 10.1080/15592324.2015.1076603

Pires JCM (2017) COP21: The algae opportunity? *Renew Sustain Energy Rev* **79**: 867–877

Raheem A, Prinsen P, Vuppaladadiyam AK, Zhao M, Luque R (2018) A review on sustainable microalgae based biofuel and bioenergy production: recent developments. *J Clean Prod.* doi: 10.1016/j.jclepro.2018.01.125

Raines CA (2003) The Calvin cycle revisited. *Photosynth Res* **75**: 1–10

Ribeiro DM, Fernando L, Cunha G, Costa L, Jungmann L, Christopher T, Williams R, Alves S, Brasil F (2020) A low-cost approach for *Chlorella sorokiniana* production through combined use of urea, ammonia and nitrate based fertilizers. *Bioresour Technol Reports* **9**: 100354

Ribeiro DM, Minillo A, Silva CADA, Fonseca GG (2019a) Characterization of different microalgae cultivated in open ponds. *Acta Sci Technol* **41**: 37723

Ribeiro DM, Zanetti GT, Heloisa M, Julião M, Masetto TE, Mary J, Neves L, Fonseca GG (2019b) Effect of different culture media on growth of *Chlorella sorokiniana* and the influence of microalgal effluents on the germination of lettuce seeds. *J Appl Biol Biotechnol* **7**: 6–10

Richardson JW, Johnson MD (2015) Financial Feasibility analysis of NAABB developed technologies. *Algal Res* **10**: 16–24

Del Río E, García-Gómez E, Moreno J, Guerrero MG, García-González M (2017) Microalgae for oil. Assessment of fatty acid productivity in continuous culture by two high-yield strains, *Chlorococcum oleofaciens* and *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Algal Res* **23**: 37–42

Roopnarain A, Gray VM, Sym SD (2014) Phosphorus limitation and starvation effects on cell growth and lipid accumulation in *Isochrysis galbana* U4 for biodiesel production. *Bioresour Technol* **156**: 408–411

Santana H, Cereijo CR, Teles VC, Nascimento RC, Fernandes MS, Brunale P, Campanha RC, Soares IP, Silva FCP, Sabaini PS, et al (2017) Microalgae cultivation in sugarcane vinasse: Selection, growth and biochemical characterization. *Bioresour Technol* **228**: 133–140

Scherholz ML, Curtis WR (2013) Achieving pH control in microalgal cultures through fed-batch addition of stoichiometrically-balanced growth media. *BMC Biotechnol* **13**: 1

Shihira I, Krauss RW (1965) *Chlorella*. Physiology and taxonomy of forty-one isolates. 97

Soares J, Krieger Loterio R, Rosa RM, Santos MO, Nascimento AG, Santos NT, Williams TCR, Nunes-Nesi A, Arêdes Martins M (2018) *Scenedesmus* sp.

- cultivation using commercial-grade ammonium sources. *Ann Microbiol* **68**: 35–45
- Von Sperling M** (2015) Waste Stabilisation Ponds. *Water Intell Online*. doi: 10.2166/9781780402109
- Spoehr H a, Milner HW** (1949) the Chemical Composition of Chlorella; Effect of Environmental Conditions. *Plant Physiol* **24**: 120–149
- Srinivasan R, Mageswari A, Subramanian P, Suganthi C, Chaitanyakumar A, Aswini V, Gothandam KM** (2018) Bicarbonate supplementation enhances growth and biochemical composition of *Dunaliella salina* V-101 by reducing oxidative stress induced during macronutrient deficit conditions. *Sci Rep* **8**: 1–14
- Stanier R, Kunisawa R, Mandel M, Cohen-Bazire G** (1971) BG11 (Blue-Green Medium). *Cult Collect Algae Protozoa* **11**: 559001
- Stephens E, Ross IL, King Z, Mussgnug JH, Kruse O, Posten C, Borowitzka MA, Hankamer B** (2010) An economic and technical evaluation of microalgal biofuels. *Nat Biotechnol* **28**: 126–128
- Stephenson PG, Moore CM, Terry MJ, Zubkov M V., Bibby TS** (2011) Improving photosynthesis for algal biofuels: Toward a green revolution. *Trends Biotechnol* **29**: 615–623
- Taiz L, Zeiger F** (2004) *Fisiologia Vegetal*. 719
- Walz E, Energy S, Walz E** (2009) Biotech 's green gold ? *Nat Biotechnol* **27**: 15–18
- Wang Y, Ying H, Yin Y, Zheng H, Cui Z** (2019) Estimating soil nitrate leaching of nitrogen fertilizer from global meta-analysis. *Sci Total Environ* **657**: 96–102
- Wehr JD, Sheath RG, Kociolek JP** (2015) *Freshwater algae of North America: ecology and classification*. Elsevier
- Weyer KM, Bush DR, Darzins A, Willson BD** (2010) Theoretical maximum algal oil production. *Bioenergy Res* **3**: 204–213
- Wijffels RH, Barbosa MJ** (2010) An outlook on microalgal biofuels (vol 10, pg 67, 2008). *Science (80-)* **330**: 913
- Van Wychen S, Laurens LML** (2016) Determination of Total Solids and Ash in Algal Biomass: Laboratory Analytical Procedure (LAP). doi: 10.2172/1118077
- Van Wychen S, Ramirez K, Laurens LM** (2013) Determination of Total Lipids as Fatty Acid Methyl Esters (FAME) by in situ Transesterification. *Contract* **303**: 275–3000
- Yamazaki T, Konosu E, Takeshita T, Hirata A, Ota S, Kazama Y, Abe T, Kawano S** (2018) Independent regulation of the lipid and starch synthesis pathways by sulfate metabolites in the green microalga *Parachlorella kessleri* under sulfur starvation conditions. *Algal Res* **36**: 37–47
- Yu H, Kim J, Lee C** (2019) Nutrient removal and microalgal biomass production from different anaerobic digestion effluents with *Chlorella* species. *Sci Rep* **9**: 1–13

- Zeng X, Danquah MK, Dong X, Lu Y** (2011) Microalgae bioengineering : From CO₂ fixation to biofuel production. *Renew Sustain Energy Rev* **15**: 3252–3260
- Zheng S, He M, Sui Y, Gebreluel T, Zou S, Kemuma ND, Wang C** (2017) Kelp waste extracts combined with acetate enhances the biofuel characteristics of *Chlorella sorokiniana*. *Bioresour Technol* **225**: 142–150
- Zhu XG, Long SP, Ort DR** (2008) What is the maximum efficiency with which photosynthesis can convert solar energy into biomass? *Curr Opin Biotechnol* **19**: 153–159

ANEXOS

1. Derivatização *in situ* para análise por GC-MS de ácidos graxos como seus ésteres metílicos

Equipamentos

- dri-block
- pipetas de vidro
- frascos de vidro (vial) para armazenamento de amostras e análise de GC

Reagentes

- ácido clorídrico (37%)
- hexano (grau GC)
- metanol
- clorofórmio
 - Opcional: padrão interno C11-TAG. Outros padrões TAG, como C17, também são apropriados
 - Opcional: padrões C12 a C26 FAME para curva padrão

Preparo das soluções

HCl a 5% v / v em metanol: adicione 6,8 mL de HCl concentrado (37%) ao balão volumétrico e complete até 50 mL com metanol. Armazenar a 4 °C

Solvente metanol e clorofórmio nas proporções 1: 2 em volume. 10 mL de metanol + 20 mL de clorofórmio. Armazenar a 4 °C

Padrão C11 - TAG: prepare um estoque de 10 mg / mL em 1: 2 (v / v) de metanol: clorofórmio em um frasco de vidro. Armazenar a - 20 °C

PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

1. Pesar 10 mg de biomassa seca em um tubo de vidro com tampa de rosca de 2 mL com vedação
2. Adicione 0,2 mL de solvente pré-embecido em metanol / clorofórmio (1: 2, v / v)
3. Opcional: Adicione 25 µl de padrão C11-TAG (equivalente a 250 µg de padrão) 1
4. Adicione 0,3 mL de HCl a 5% em metanol
5. Feche o tubo firmemente e aqueça a 85 °C em um dri-block por 1 h
6. Arrefecer até à temperatura ambiente (25 ° C) e adicionar 1 mL de hexano
7. Agite suavemente por 1 h em temperatura ambiente sem inverter os tubos
8. Remova a fase superior (não polar) do frasco de vidro usando uma pipeta de vidro Pasteur e armazene a -20 °C ou menos
9. Dilua a amostra antes da análise, se necessário

Notas:

- Um dri-block é preferível a um banho de água; a derivatização é um pouco sensível à água
- Adicione todos os solventes usando uma pipeta de vidro de 1 mL
- Nunca inverta os tubos! Sempre existe o risco de extração de substâncias voláteis das vedações.
- Evite agitação vigorosa dos tubos antes da etapa 6; a biomassa tem uma tendência a grudar nas laterais do tubo.
- O método pode ser usado para derivatizar amostras de óleo puro, embora os volumes de solvente devam ser aumentados de acordo com a quantidade de óleo utilizada (por exemplo, os volumes aqui seriam apropriados para 1-3 mg de óleo).
- Para reduzir a variabilidade entre as amostras pré-misture o padrão C11-TAG e metanol / clorofórmio; adicione 625 µl de padrão a 10 mL de metanol / clorofórmio e adicione 0,425 µl por amostra.
- Certifique-se de preparar uma amostra omitida em branco para identificar qualquer contaminação proveniente de reagentes / tubos etc.
- As amostras devem ser secas (liofilizadas) antes da derivação, embora o método seja tolerado com água até 50% do peso (não testado)
- FAMEs para a curva padrão podem ser compostas em hexano e armazenadas em um freezer em frascos de vidro
- O método pode ser facilmente ampliado para a derivatização de grandes quantidades de material

Fonte

Van Wychen S, Ramirez K, Laurens LM (2013) Determination of Total Lipids as Fatty Acid Methyl Esters (FAME) by in situ Transesterification. Contract 303: 275–3000

2. Carboidratos

Açúcares solúveis totais – AST

Equipamentos

- Pipetas automáticas (100 µl e 1000 µl).
- Eppendorfs (2mL).
- Vortex.
- Travas para eppendorfs.
- Banho-maria.
- Balança analítica.
- Tubos de ensaio.
- Funil.
- Cubetas de vidro.
- Centrífuga.
- Espectrofotômetro.

Reagentes

- Etanol 80% (v / v)
- Solução estoque de Glicose (1 mg/mL)
- Fenol 5% (v / v)
- Ácido sulfúrico (H₂SO₄)

PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Preparação do Material vegetal

1. O material deve ser liofilizado por 48 h e pulverizado em moinho de bola;
2. Pesar 10 mg de pó para cada replica em eppendorfs de 2 mL.
3. Identificar mais eppendorfs para coletar o sobrenadante.

Extração

1. Adicionar 500 µl de Etanol 80% ao eppendorf com a amostra;
2. Agitar no vortex;
3. Incubar no banho-maria a 80°C por 20 minutos;
4. Agitar no vortex ;

5. Centrifugar a 10.000g por 10 minutos;
6. Coletar o sobrenadante;
7. Repetir as etapas de 1 a 6 até completar 2mL (4x).
8. Quantificar os açúcares solúveis e o pellet direcionar para quantificação de amido

Amido

Equipamentos e Materiais

- Pipetas automáticas (100 µl e 1000 µl).
- Vortex.
- Banho-maria
- Eppendorfs
- Cubetas descartáveis ou microplacas de Elisa
- Centrífuga.
- Espectrofotômetro ou Leitor de Elisa
- Travas para eppendorfs

Reagentes

- Enzima 1 – α -amilase termostável do *Bacillus licheniformis* (Megazyme) 120U.mL⁻¹ em tampão fosfato pH 6,5
- Enzima 2 – Amiloglucosidase (AMG) do fungo *Aspergillus niger* (Megazyme) 30U.mL⁻¹ em tampão acetato pH 4,5
- 0,02 M NaH₂PO₄.H₂O (tampão X)
- 0.02 M Na₂HPO₄.7H₂O (tampão Y).
- Tampão Fosfato 10 mM, pH 6,5: para preparar 200 mL tampão, 68.5 mL X + 31.5 mL Y = 100 mL @ pH 6.5. Adicionar 100 mL água.
- Tampão Acetato – acetato de sodio 0,1 M, pH 4,5 (acido acetico);

PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Extração

1. Ligar Banho-maria (75°C e 50°C)
2. Identificar eppendorfs de 2mL contendo biomassa livre de açúcares e solventes
3. Adicionar 0,48mL da enzima 1 ao eppendorf
4. Incubar no banho-maria a 75°C por 30min
5. Repetir as etapas 3 e 4
6. Adicionar 0,48mL da enzima 2 ao eppendorf
7. Incubar no banho-maria a 50°C por 30min
8. Repetir as etapas 6 e 7
9. Adicionar 100 ul de acido perclorico, 0,8 M
10. Centrifugar por a 10.000rpm por 2min
11. Separar o extrato para a quantificação de amido
12. Separar o pellet para a quantificação de açúcares estruturais

Após a remoção dos hidrolisados de amido, foi adicionado 1 mL de ácido sulfúrico concentrado às amostras para hidrolisar os açúcares estruturais presentes no pellet final.

1. Adicione 1 mL de ácido sulfúrico concentrado e deixe reagindo por 5 min em agitação constante
2. Após a extração quantificar o extrato

Quantificação

Os monossacarídeos (trioses, pentoses e hexoses) obtidos em cada etapa foram quantificados complexando o grupo aldeído livre com MBTH (3-metil-2-hidrazona benzotiazolinona) e usando a metodologia de quantificação espectrofotométrica descrita por Van Wychen e Laurens, (2016).

Soluções preparadas logo antes de fazer a análise

MBTH (3mg/mL): Pesar 60 mg de MBTH (3-methyl-2- benzothiazolinone hydrazone) e dissolver em 20mL de água Milli-Q.

DTT (1mg/mL): Pesar 20 mg de DTT (Dithiothreitol) e dissolver em 20mL de água Milli-Q.

HCl 0,25M: Adicionar 100 mL de água Milli-Q foi em balão volumétrico de 200mL, adicionar 4,16 mL de ácido clorídrico ao balão e em seguida completar o 200mL de volume do balão com água Milli-Q.

Solução férrica: Adicionar 200 mg de sulfato de amônio férrico e 200 mg de ácido sulfâmico em 40 mL de solução de HCl 0,25 M.

Solução de trabalho MBTH: 20 mL da solução de MBTH 3 mg/mL foram adicionados à 20 mL da solução de DTT 1 mg/mL.

Equipamentos

Tubos headspace 20mL

Balança analítica

Vortex

Banho ultrassônico termostaticado

Espectrofotômetro Ultravioleta/Visível

Centrífuga de bancada ventilada

Autoclave vertical

Análise Colorimétrica

- a) Retirar 0,5 mL do sobrenadante das amostras a ser analisado e colocar em tubos HeadSpace Nota: Nesse ponto utilizar uma diluição de pelo menos 1:10 porque o excesso de ácido pode ter um efeito na reação, ou seja, diluir 50 μ L do sobrenadante em 450 μ L de água Milli-Q para completar 0,5mL. Se já se sabe que a amostra possui grande quantidade de carboidrato, começar com uma diluição de 1:20, ou seja, 25 μ L do sobrenadante e 475 μ L de água Milli-Q.
- b) Escolher o fator de diluição totalizando 0,5 mL de amostra a ser analisada, assim em um tubo headspace foram adicionados 500 μ L da amostra (diluída), foram adicionados 500 μ L de NaOH 0.5M e 500 μ L de solução de trabalho MBTH em cada tubo. Os tubos, então, foram fechados, vortexados e colocados em banho termostaticado por 15 \pm 1 minutos à 80°C. Observação: Não exceder o tempo de incubação, deve-se trabalhar com pequenos lotes de amostras (<20) e deve-se colocar os tubos no termoreator logo após de ter adicionado as soluções de NaOH e MBTH.

- c) Após os 15 minutos de incubação, desligou-se o termoreator, abriu-se os tubos e adicionou-se 1mL de solução férrica em cada tubo. Uma vez que a solução férrica foi adicionada, os tubos foram retirados do termoreator, fechados com tampa e vortexados (a mistura torna-se verde). Após vortexados, deixou-se as amostras reagindo com a solução por 10-15 minutos até atingirem temperatura ambiente.
- d) Após os tubos atingirem a temperatura ambiente, foram adicionados 2,5mL de água Milli-Q em cada tubo para então serem vortexados. Após vortexados, foi retirado uma alíquota da amostra e realizado a leitura no espectrofotômetro no comprimento de onda de 620nm. Nota: A leitura deve ser feita em até uma hora depois de realizada a reação e o espectrofotômetro deve ser zerado só com água Milli-Q.

A equação obtida na curva analítica foi utilizada para quantificar os carboidratos presentes nas amostras, e, então foi realizado o cálculo de monossacarídeos totais por meio da equação:

$$\text{Monossacarídeos Totais (mg)} = \text{Monossacarídeos (mg/mL)} \times 7,25 \text{ (mL)}$$

Onde:

Monossacarídeos (mg/mL) = concentração obtida através da curva de glicose

7,25 (mL) = Volume total da hidrólise

Curva analítica de glicose

Uma solução estoque de glicose de 0,25mg/mL foi feita utilizando 5mg de glicose padrão dissolvidos em 20mL de água Milli-Q. A curva analítica de glicose foi construída de acordo com a tabela abaixo:

Concentração da solução de estoque (mg/mL)	Diluição Solução estoque + Água	Concentração final (mg/mL)
0,25	0 + 500	0
0,25	20 + 480	0,010
0,25	30 + 470	0,015
0,25	50 + 450	0,025
0,25	75 + 425	0,0375
0,25	100 + 400	0,050

Fonte:

Amaral LIV, Gaspar M, Costa PMF, Aidar MPM, Buckeridge MS (2007) Novo método enzimático rápido e sensível de extração e dosagem de amido em materiais vegetais. Hoehnea 34:425-431.

Van Wychen S, Laurens LML (2016) Determination of Total Solids and Ash in Algal Biomass: Laboratory Analytical Procedure (LAP). doi: 10.2172/1118077

3. Determinação de Sólidos Totais e Cinzas

Equipamentos

- cadinhos
- forno de mufla
- dessecador

PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Sólidos Totais

- Pré-condicionar cadinhos no forno de mufla de 575 ° C durante a noite para remover contaminantes.
- Após o término do condicionamento, retire os cadinhos do forno a 575 ° C, arrefecer até à temperatura ambiente em dessecador para que não fique com umidade (Usar luvas, pinças ou pinças para evitar a adição de peso a partir de óleos de mão).
- Pesar cada cadinho e registrar o peso do cadinho.
- Pesar 100 ± 5 mg de biomassa de algas no cadinho pré-pesado. Registre o peso da biomassa pesada
- Colocar as amostras em estufa de circulação a $60 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$ durante pelo menos 18 horas.
- Após a secagem na estufa retirar as amostras e deixe-as arrefecer até à temperatura ambiente em dessecador. Após a arrefecer pesar o cadinho e a amostra seca em estufa e registrar o peso.

Cinza

- Use a mesma amostra que foi usada para a determinação de sólidos totais para as cinzas
- Levar os forno de mufla
Programa de rampa:
 - Rampa de temperatura ambiente a 105 °C
 - Mantenha a 105 °C durante 12 minutos
 - Rampa até 250 °C a 10 °C/minuto
 - Mantenha a 250 °C durante 30 minutos
 - Rampa para 575 °C a 20 °C/minuto
 - Mantenha a 575 °C durante 180 minutos
- Após o fim da rampa, retirar os cadinhos a uma temperatura de 105 °C e esperar a chegar a temperatura ambiente em dessecador. Pesar o cadinho da amostra e registrar o peso.

Calcular a percentagem de sólidos totais numa base de peso seco como se segue:

$$\% \text{ Sólidos Totais} = (((PA - C) \div A) \times 100)$$

$$\% \text{ Umidade} = (100 - (((PA - C) \div A) \times 100))$$

$$\text{Massa Seca} = ((A \times ST) \div 100)$$

$$\% \text{ Cinzas} = (((PC - C) \div MS) \times 100)$$

PA = Peso do Cadinho + Amostra Seca

C = Peso do Cadinho

A = Peso da Amostra

ST = % de Sólidos Totais

PC = Peso do Cadinho + Cinzas

MS = Massa Seca

Fonte

WYCHEN, S. V.; and LAURENS, L. M. L.; Determination of total Carbohydrates in Algal Biomass. **The National Renewable Energy Laboratory**, 2015. Disponível em: <http://www.nrel.gov/docs/fy16osti/60957.pdf> >. Acesso em: 25 out. 2016.

4. Análise qualitativa e quantitativa de carotenoides

Introdução

Os carotenoides podem ser usados como corantes alimentares, aditivos alimentares, cosméticos, antioxidantes e nutracêuticos, etc. Por esta razão representa um composto de alto valor agregado em uma biomassa. A **análise qualitativa e quantitativa dos carotenoides** é um método para dar informações sobre os diferentes carotenoides e sua quantificação e agregar valor e obter informações sobre o metabolismo dos carotenoides da biomassa analisada.

Preparo de Soluções:

Solução 1 - Acetona/(metanol/etanol) – 7/3 (6 mL por amostra) – com 0,1% de butylated hydroxy toluene – BHT- 250 mL para 40 amostras

- 1 – 175 mL de acetona
- 2 – 37,5 mL de etanol
- 3 – 37,5 mL de metanol
- 4 – 0,25g de BHT

Solução 2 – Éter de Petróleo - com 0,1% de BHT – (6 mL por amostra) - 250 mL para 40 amostras

- 1 – 250 mL de éter de petróleo
- 2 – 0,25g de BHT

Solução 3 - Água Miliq com 10% de NaCl - (3 mL por amostra) – 150 mL para 40 amostras

- 1 – 150 mL de Água Miliq
- 2 – 15 g de NaCl

PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Extração dos carotenoides

- 1 - Pesar 10 mg de biomassa em tubo headspace de 20 mL vedado contra a luz.
 - 2 - Adicionar 2 mL de Solução 1 (Gelado)
 - 3 - Homogeneizar com cuidado para não deixar biomassa na parede e deixar em ultrassom por 20 minutos - após 20 minutos, retirar o sobrenadante com pipeta de Pasteur e passar para headspace vedado com alumínio para estocar a extração.
 - 4 - Adicionar mais 2 mL de Solução 1 (Gelado) para fazer uma nova extração
 - 5 - Homogeneizar com cuidado para não deixar biomassa na parede e deixar em ultrassom por 20 minutos - após 20 minutos, retirar o sobrenadante com pipeta de Pasteur e passar para headspace vedado com alumínio para estocar a extração.
 - 6 - Adicionar mais 2 mL de Solução 1 (Gelado) para fazer uma nova extração
 - 7 - Homogeneizar com cuidado para não deixar biomassa na parede e deixar em ultrassom por 20 minutos - após 20 minutos, retirar o sobrenadante com pipeta de Pasteur e passar para headspace vedado com alumínio para estocar a extração.
- Obs. Pode haver a opção de realizar mais fases de extração, isso está direcionado com o tipo e a quantidade de biomassa.
- 6 - Após realizar todas as extrações com a Solução 1, como a acetona degrada os pigmentos extraídos, os carotenoides devem ser transferidos para éter de petróleo com BHT 1% para evitar a degradação por acetona.
 - 7 - Adicionar 6 mL da solução 2 (para fazer a transferência, deve se adicionar no tubo vedado com o extrato o mesmo volume de éter de petróleo, no caso da extração feita com 6 mL da solução 1 adiciona 6 mL de éter de petróleo com BHT 1%)
 - 8 - Para otimizar a separação das fases adicionar com muito cuidado (para não formar emulsão) 3 mL da Solução 2 (isso fará a transferência dos carotenoides da acetona para o éter etílico).
 - 7 - Retirar a fase superior com os pigmentos (éter + carotenoides) e passar para um balão volumétrico de 10 mL.
 - 8 - perfazer em 10 mL o volume do extrato em balão volumétrico utilizando éter de petróleo.
 - 9 - Com os 10 mL de volume de extrato, 5mL são destinados a leitura no espectrofotômetro para a quantificação dos carotenoides totais e outros 5 mL são destinados para a análise qualitativa em cromatógrafo líquido de ultraperformance (UPLC).

10 - Para Quantificação em espectrofotômetro

10.1 - Dos 5 mL, utilizar 2 mL para leitura em cubeta em espectrofotômetro a 450_{nm}, a concentração de carotenoides totais foi determinada a partir da seguinte equação:

$$\text{Carotenoides totais } \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{g}} \right) = \frac{A_{450\text{nm}} \times y(\text{mL}) \times 10^4}{A_{1\text{cm}}^{1\%} \times m(\text{g})}$$

Onde: A é a absorvância no pico máximo de absorção; y é o volume da solução que deu uma absorvância A a 450 nm; $A_{1\text{cm}}^{1\%}$ é o coeficiente de absorção do β -caroteno em éter de petróleo (2592) e m é o peso da amostra.

11 - Para a determinação do perfil dos carotenoides em UPLC

Soluções UPLC para 40 amostras

Solução 1 – preparação de 500 mL (70% acetoneitrila, 20% metanol e 10% MTBE)

350 mL 70% acetoneitrila

100 mL 20% metanol

50 mL 10% MTBE

Solução 2 – Formiato de amônio 10mM

0,252g de formiato de amônio

400 mL de água

11.1 Os 5 mL restantes são utilizados para a **determinação do perfil dos carotenoides em UPLC**, o extrato é evaporado em evaporador rotativo a temperatura inferior a 40 °C, em ausência de luz. (balão vedado com alumínio), após evaporação do éter de petróleo, o extrato é ressuspendido em 1 mL de fase móvel (70% acetoneitrila, 20% metanol e 10% MTBE) e estocado em *vial* de 1,5 mL.

11.2 A análise em UPLC utiliza a coluna C18 da agilent com o método cadastrado Carotenoides Microalgas

O gradiente do método é

General Misc Data

Solvents

A Ammonium Formate 10

B ACN/MeOH/MTBE 70

C

D No Change

Pressure Limits

Low: 0 psi

High: 15000 psi

Seal Wash Period: 5.00 min

Gradient

	Time	Flow (mL/min)	%A	%B	%C	%D	Curve
1	Initial	0.400	40.0	60.0	0.0	0.0	Initial
2	5.00	0.400	25.0	75.0	0.0	0.0	6
3	12.00	0.400	0.0	100.0	0.0	0.0	6
4	17.00	0.400	0.0	100.0	0.0	0.0	6
5	21.00	0.400	40.0	60.0	0.0	0.0	1
6							
7							
8							
9							
10							
11							
12							
13							
14							
15							

OK Cancel

11.3 – Após a análise os espectros são integrados com os padrões analisados descritos como método integração carotenoides e os dados são exportados em pdf para serem analisados.

Fonte Metodologia adaptada baseada em (de Carvalho et al., 2012; Sarkar et al., 2012; Poojary et al., 2016)

5. Extração para criação de perfil metabólico usando tecido liofilizado: adaptado do documento “Método Fiehn”

Equipamento:

- Banho-maria ou dri-block
- Tubos Eppendorf
- Microcentrífuga
- Vortex

Reagentes

- Metanol, grau analítico, pelo menos 99,9%
- Clorofórmio, grau analítico, pelo menos 99,9%, resfriado a -20 °C (freezer)
- Água Milli-Q, resfriada a 4 °C
- Ribitol (ou outro padrão interno) preparado a 0,2 mg / mL em água

PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

1. Pesar 10 mg de material liofilizado em um Eppendorf de 2 mL. Registre a massa exata
2. Adicione 1,4 mL de metanol + 60 µL de solução de ribitol (NÃO ESQUEÇA - o ribitol pode ser adicionado proporcionalmente ao metanol antes do uso)
3. Agite no vortex por cerca de 10s para suspender o material
4. Aqueça a 70 °C por 10 minutos em banho-maria com agitação ocasional (certifique-se de fechar as tampas e de abrir os tubos rapidamente, à medida que aquecem para evitar excesso de pressão). Como alternativa, use um bloco dri com agitação constante
5. Centrifugar a 10.000 g à temperatura ambiente por 10 minutos para granular o material
6. Transfira 750 µl de sobrenadante para novos tubos
7. Adicione 375 µl de clorofórmio frio
8. Adicione 750 µl de MQH₂O frio
9. Agite no vortex por 10 s (o extrato deve ficar nublado)

10. Centrifugue a 2.200 g a rtp por 10 minutos para separar as fases
11. Transfira a fase superior para um novo tubo
12. Transferir alíquotas de 50 µl e 200 µl para novos tubos
13. Secar as alíquotas de 50 µl e 200 µl em um speed-vac e armazenar (preferencialmente) a -80 °C. Reter o restante da extração congelado como backup

Notas:

- Clorofórmio e metanol são tóxicos - manuseie apenas no exaustor e use luvas corretas
- Os solventes usados devem ser descartados corretamente
- Verifique se novas pontas e tubos são usados - não use componentes plásticos lavados
- Certifique-se de incluir várias amostras em branco para controlar a contaminação proveniente de reagentes e plásticos.

Derivação:**Equipamento:**

- Shaking dri-block
- Inserções, frascos e tampas de vidro
- Microcentrífuga

Produtos químicos:

- MSTFA (observe que, se estiver usando uma mistura padrão de tempo de retenção, ela deverá ser adicionada ao MSTFA)
- Cloridrato de metoxiamina: 20 mg / mL em piridina. Esta solução deve ser preparada imediatamente antes do uso

Procedimento:

1. Coloque as amostras secas no speed-vac a 30 °C por 30 minutos para remover a água acumulada durante o armazenamento
2. Adicione 40 µl da solução de cloridrato de metoxiamina a cada tubo.
3. Tubos de vórtice por 10 s
4. Coloque no bloco dri de agitação por 2 h a 37 °C com agitação.
5. Centrifugue os tubos por 10 s para remover a condensação das tampas

6. Adicione 70 µl de MSTFA a cada tubo
7. Tubos de vórtice por 10 s
8. Coloque em agitação dri-block por 30 minutos a 37 °C com agitação.
9. Tubos de centrifugação por 10 s para remover a condensação das tampas
10. Transfira 100 µl para uma inserção de vidro no frasco do GC e sele o frasco.

Notas:

- Todos os reagentes usados nesta etapa são altamente tóxicos - manuseiam MSTFA e piridina somente dentro do exaustor. Use uma máscara ao pesar o cloridrato de metoxiamina. Certifique-se de que qualquer solvente usado seja descartado corretamente.
- Os reagentes são todos sensíveis à água. Certifique-se de que as garrafas estejam devidamente seladas após o uso. Armazene o cloridrato de metoxiamina com sílica seca.
- O MSTFA é altamente reativo - abra garrafas ou frascos pelo menor tempo possível.
- Se você não tiver um bloco seco com agitação disponível, agite no vórtex a cada tubo por 10 segundos a cada 15 minutos. NÃO use banho-maria.
- Prepare pelo menos uma amostra em branco para cada lote de amostras para controlar a contaminação durante a derivatização.
- As amostras devem ser analisadas o mais rápido possível após a preparação. Enquanto espera para analisar a loja em uma caixa escura à temperatura ambiente.

Análise GC-MS:

Parâmetros do método:

Coluna: HP-5MS, 30 m, diâmetro de 0,25 mm, espessura de filme de 0,25 µm

Injetor: sem divisão, 230 °C,

Programa de temperatura: 70 °C, mantenha por 5 minutos, suba para

Parâmetros MS: temperatura da linha de transferência 250 °C, temperatura quad MS 150 °C, temperatura detector 250 MS. Modo, Digitalizar. Atraso do solvente

Notas:

- As amostras devem ser executadas em ordem aleatória em blocos - por exemplo primeira repetição de todos os tratamentos em ordem aleatória, depois segunda repetição de todos os tratamentos em ordem aleatória etc.

- Execute amostras em branco periodicamente para verificar a transição etc.

- Descartar amostras após a análise.

- Verifique se as amostras não estão sobrecarregando a coluna ou o detector; picos de frente são um sinal claro de sobrecarga de coluna. Coberturas planas a picos indicam saturação do detector - ambos devem ser evitados, se possível, embora algumas amostras possam conter concentrações muito altas de açúcar, tornando isso inevitável.

- Verifique os metabólitos comuns para garantir que o método esteja funcionando: sacarose, glicose, citrato e vários aminoácidos devem ser detectáveis. A falta desses compostos sugere que algo deu errado com o método.

- Considere testar uma amostra representativa de cada tratamento primeiro para garantir que todas as amostras estejam dentro da faixa dinâmica do equipamento;

Fonte

Fernie AR, Lisec J, Willmitzer L, Kopka J, Schauer N (2006) Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. *Nat Protoc* **1**: 387–396