



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI
CURSO DE ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS

**OTIMIZAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE NITROGÊNIO, FÓSFORO E
POTÁSSIO DE UM MEIO BASAL POR DELINEAMENTO CENTRAL
COMPOSTO ROTACIONAL PARA A PRODUÇÃO DE BIOMASSA ALGAL
A PARTIR DE *Chlorella sorokiniana***

Alex Pereira Silva

Orientador: Enio Nazaré de Oliveira Júnior

Ouro Branco
Dezembro/16

OTIMIZAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE NITROGÊNIO, FÓSFORO E
POTÁSSIO DE UM MEIO BASAL POR DELINEAMENTO CENTRAL
COMPOSTO ROTACIONAL PARA A PRODUÇÃO DE BIOMASSA ALGAL
A PARTIR DE *Chlorella sorokiniana*

Alex Pereira Silva

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
em cumprimento às exigências do Curso de
Bacharelado em Engenharia de Bioprocessos
da Universidade Federal de São João delRei.

Orientador: Enio Nazaré de Oliveira Júnior

Ouro Branco
Dezembro/16



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI
CURSO DE ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS

**OTIMIZAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE NITROGÊNIO, FÓSFORO E
POTÁSSIO DE UM MEIO BASAL POR DELINEAMENTO CENTRAL
COMPOSTO ROTACIONAL PARA A PRODUÇÃO DE BIOMASSA ALGAL
A PARTIR DE *Chlorella sorokiniana***

Alex Pereira Silva

A Banca Examinadora, composta pelos membros abaixo, avaliou este TCC:

Enio Nazaré de Oliveira Júnior – Orientador

José Carlos de Magalhães – examinador 1

Katialaine Corrêa de Araújo – examinador 2

Ouro Branco, ____ / ____ / ____

RESUMO

O crescimento acelerado da população mundial ocasiona o aumento da demanda por energia e alimentos, além de contribuir para a geração de resíduos e consequente poluição do ar, solo e corpos hídricos. O desenvolvimento de tecnologias baseadas na diversidade metabólica das microalgas surge, então, como uma alternativa potencial para substituir os meios atuais de produção, buscando mitigar os impactos dessa crescente demanda com concomitante desenvolvimento econômico. Entre as alternativas buscadas para tornar essas tecnologias viáveis está a otimização da composição do meio de cultivo, fator crucial para se obterem altos rendimentos em bioprocessos diversos. O presente trabalho teve como objetivo a otimização das concentrações dos três nutrientes requeridos em maior concentração em meios de cultivo para crescimento autotrófico, nitrogênio [N], fósforo [P] e potássio [K], para produção de biomassa a partir da microalga *C. sorokiniana*. A otimização foi buscada por meio da técnica de superfície de resposta em Delineamento Composto Central Rotacional com dois níveis de concentração para cada nutriente e dois pontos centrais. Os ensaios foram conduzidos em frascos Erlenmeyer de 250 mL preenchidos com 150 mL de meio 18-modificado com concentrações de NPK definidas pelo planejamento experimental. Os cultivos foram incubados por 10 dias a 26 ± 1 °C, $2,08 \pm 0,06$ klux e 180 r.p.m., com inóculo de 5 % e pH inicial de 7,5. As concentrações mássicas obtidas ao final do cultivo foram medidas indiretamente por meio de densidade óptica a 600 nm. O método de padronização é apresentado. Os dados foram ajustados a um modelo quadrático com o auxílio do software Minitab 17. A análise identificou com confiança ($p \leq 0,05$) que a produção de biomassa é influenciada por 5 termos do modelo: N(Q), P(Q), K(Q), - P(L) e N(L).K(L), onde Q e L são termos quadráticos e lineares, respectivamente. O modelo obtido teve validade estatística, e o rendimento teórico máximo foi de $5,3 \text{ g.L}^{-1}$ de biomassa, em concentrações de 20,5 mM de nitrogênio, 0,06 mM de fósforo e 4,00 mM de potássio. Já a análise das superfícies de resposta obtidas mostrou que os níveis escolhidos não mapearam uma região de pontos ótimos, muito provavelmente devido à ampla faixa de concentrações investigada, mas suas inclinações sugeriram o sentido de aumento do rendimento. Com base nas informações levantadas no trabalho o design de um novo experimento com concentrações ajustadas foi proposto.

Palavras chave: microalgas, *Chlorella sorokiniana*, NPK, meio de cultivo, superfície de resposta, Delineamento Central Composto Rotacional, DCCR.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura da clorofila <i>a</i>	12
Figura 2 – Desenho esquemático de um cloroplasto	13
Figura 3 – Heterocistos em <i>Anabaena crassa</i>	16
Figura 4 – <i>Chlorella sorokiniana</i>	25
Figura 5 – (a) Desenho esquemático de reatores tubulares fechados e (b) visão superior de tanque <i>raceway</i> aberto.	27
Figura 6 – Varredura de absorbância de <i>C. sorokiniana</i> entre 400 e 700 nm	35
Figura 7 – Correlação entre D.O. ₆₀₀ e concentração mássica algal, em g.L ⁻¹	36
Figura 8 – Gráfico da distância entre os pontos experimentais e o modelo (resíduos)	37
Figura 9 – Gráfico da distribuição normal de resíduos do modelo quadrático	41
Figura 10 – Diagramas de contorno da concentração de biomassa sobre os planos P:K, P:N e N:K.	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Concentração de NPK em meios para crescimento autotrófico de microalgas	32
Tabela 2 – Códigos e concentrações de NPK em DCCR	33
Tabela 3 – Resultados experimentais de D.O. ₆₀₀ e concentração de biomassa em DCCR	38
Tabela 4 – Coeficientes ajustados para modelo quadrático e suas significâncias estatísticas	39
Tabela 5 – Análise de variância e teste F para o modelo quadrático	40
Tabela 6 – Valores sugeridos para novo planejamento em DCCR	47

SUMÁRIO

1	Introdução	7
2	Objetivos	10
2.1	Objetivo Geral	10
2.2	Objetivos específicos	10
3	Revisão Bibliográfica	11
3.1	A versatilidade metabólica de microalgas	11
3.2	Potencial biotecnológico	18
3.2.1	Mitigação do uso e efeitos de combustíveis fósseis	18
3.2.2	Comercialização da biomassa	20
3.2.3	Biocombustíveis	21
3.2.4	Tratamento de efluentes	23
3.2.5	<i>Chlorella sorokiniana</i>	23
3.3	Cultivo	25
4	Material e Métodos	30
4.1	Microrganismo e meios de cultura	30
4.2	Quantificação indireta de biomassa	30
4.3	Planejamento experimental	31
4.4	Obtenção e análise dos dados experimentais	33
5	Resultados e discussão	35
5.1	Validação de método indireto de quantificação de biomassa	35
5.2	Análise dos dados experimentais	37
6	Conclusão	46
7	Trabalhos futuros	47
8	Referências bibliográficas	48

1 Introdução

O crescimento acelerado da população mundial, associado ao estilo de vida moderno, vem causando diversos problemas sociais, ambientais e econômicos no mundo. A demanda cada vez maior de energia tem sido suprida majoritariamente pela queima de combustíveis fósseis, ocasionando o acúmulo de CO₂ atmosférico, aumento da temperatura média dos ambientes da Terra e aumento do nível do mar. A geração de resíduos em escala global contribui para a poluição sistêmica do ar, de corpos hídricos e do solo. A geração de alimentos terá que aumentar em 70 % até 2050 para suprir a demanda do crescimento populacional predito (NORTHOFF, 2009). Neste contexto, em que é urgente que se desenvolvam formas mais sustentáveis de produzir e crescer economicamente, o desenvolvimento de tecnologias à base de microalgas tem grande potencial de mitigar os impactos das atividades antropogênicas.

Microalgas são organismos fotossintetizantes unicelulares que compreendem as cianobactérias, algas verdes, algas vermelhas, dentre outras. Esses organismos estão amplamente difundidos em mares, rios, lagos e solos, apresentando alta adaptabilidade a condições diversas, e é dessa ampla diversidade que surge o interesse nesses microrganismos. As microalgas são capazes de crescer em meios minerais de baixo custo, fixando CO₂ atmosférico com luz solar por meio da fotossíntese, mas algumas espécies também são capazes de consumir eventuais compostos orgânicos no meio, com ou sem o auxílio de luz, realizando ou não fotossíntese simultaneamente (LEE, 2008). As cianobactérias e algas verdes possuem mecanismos de produção de hidrogênio, cujo sentido reacional pode ser regulado de acordo com as necessidades energéticas das células (APPEL; SCHULZ, 1998). Algumas cianobactérias também são capazes de utilizar energia de compostos químicos para fixar carbono (COHEN; PADAN; SHILO, 1975). As microalgas são capazes de utilizar as mais diversas fontes de nitrogênio, e algumas Cianobactérias ainda são capazes de fixar N₂ (KULASOORIYA; LANG; FAY, 1972).

Do ponto de vista econômico, cada tipo de crescimento pode gerar compostos diferentes e em proporções diferentes nas células, permitindo múltiplas aplicações biotecnológicas da biomassa produzida. Essa biomassa pode ser rica em lipídios, incluindo ácidos graxos poliinsaturados (PUFA), açúcares e proteínas, bem como apresentar teores variados de vitaminas, antioxidantes e corantes. Pelo alto valor nutricional, diversas microalgas vêm sendo utilizadas na alimentação humana ou animal (DERNER *et al.*, 2006). Diversos estudos também vêm buscando

a viabilidade da produção de biodiesel a partir da biomassa algal. O óleo, acumulado em grandes quantidades no interior da célula, pode ser extraído e submetido à transesterificação, processo pelo qual se produz o biodiesel. Além disso, características do crescimento algal, como rápida produção de biomassa, alta produtividade por área e baixo uso de água, quando comparadas a plantas oleaginosas, tornam as microalgas um potencial para resolver o conflito entre a destinação de lavouras para a produção de biocombustíveis em vez de alimento, especialmente por poderem ser cultivadas em terras inférteis (CARDOSO; VIEIRA; MARQUES, 2011). A produção de etanol a partir de açúcares oriundos de reserva energética e paredes celulares também vem sendo avaliada, mas a produção em larga escala da cana-de-açúcar no Brasil torna essa tecnologia demasiadamente cara. Outros biocombustíveis podem ser gerados a partir do processamento da biomassa, como por meio de gaseificação, pirólise, biodigestão e liquefação (CARDOSO; VIEIRA; MARQUES, 2011).

Do ponto de vista ambiental, as microalgas são capazes de fixar carbono atmosférico e mitigar as consequências do efeito estufa (LOPES, 2007). Muitas espécies já se mostraram eficientes no tratamento de efluentes ricos em nutrientes, como fósforo, nitrogênio e potássio, metais pesados, ou alta Demanda Química de Oxigênio, podendo ainda gerar biocombustíveis ou outros co-produtos (MATA; MARTINS; CAETANO, 2010). Apesar do enorme potencial, porém, existem ainda limitações tecnológicas que aumentam o custo de produção em larga escala de biomassa algal, tornando tais produtos e processos pouco competitivos no mercado. Desafios como iluminação eficiente de biorreatores, alto custo das etapas de *downstream* e compreensão mais aprofundada de mecanismos bioquímicos e de processo ainda devem ser superados. Diversas estratégias de barateamento dessas tecnologias vêm sendo buscadas, como a otimização dos métodos de cultivo, identificação e engenharia genética de cepas com características desejáveis, associação de processos ambientais à produção de energia e biorrefinaria de produtos (CHISTI, 2007; HENA; FATIMAH; TABASSUM, 2015; LOPES, 2007; YEN; BRUNE, 2007).

O grande potencial das microalgas, no que tange à mitigação de CO₂ atmosférico, diz respeito à sua habilidade de crescer autotroficamente, em meio de cultivo basal, sem adição de carbono orgânico e com o uso de luz solar. WANG *et al.* (2014) pontuaram que o meio de cultivo está entre os parâmetros mais importantes na obtenção de biomassa em cultivos autotróficos. BANERJEE *et al.* (2016) confirmaram, ainda, o efeito positivo que os fertilizantes agrícolas ricos

nos macronutrientes N, P e K têm sobre o crescimento de *Nannochloropsis* sp.. Entretanto, não foram feitas variações das concentrações desses nutrientes entre si, tendo o autores se limitado ao uso dos fertilizantes comerciais em sua concentração de 10:26:26 em todos os cultivos. CAMACHO-RODRÍGUEZ *et al.* (2013) variou as concentrações de N e P, mas não o fez simultaneamente, ignorando um possível efeito entre as duas variáveis. Ainda, pouco é discutido sobre a atuação do potássio nos cultivos, e autores que avaliaram diferentes combinações de concentrações de macronutrientes sobre cultivos de microalgas negligenciaram K (CHENG *et al.*, 2013; FENG *et al.*, 2012).

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Testar a influência que diferentes concentrações de nitrogênio, fósforo e potássio (NPK) no meio de cultivo têm sobre o crescimento da microalga *Chlorella Sorokiniana* e identificar as concentrações ou faixa de concentrações que geram maior rendimento em biomassa.

2.2 Objetivos específicos

- i) Revisar a importância do meio de cultivo na produção de biomassa algal, na utilização de microalgas em processos ambientais e na produção de biomoléculas de interesse comercial;
- ii) Construir curva padrão para medição indireta de biomassa a partir de valores de densidade óptica;
- iii) Selecionar e codificar níveis de concentrações de NPK para planejamento experimental com o intuito de obter superfície de resposta em Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR).

3 Revisão Bibliográfica

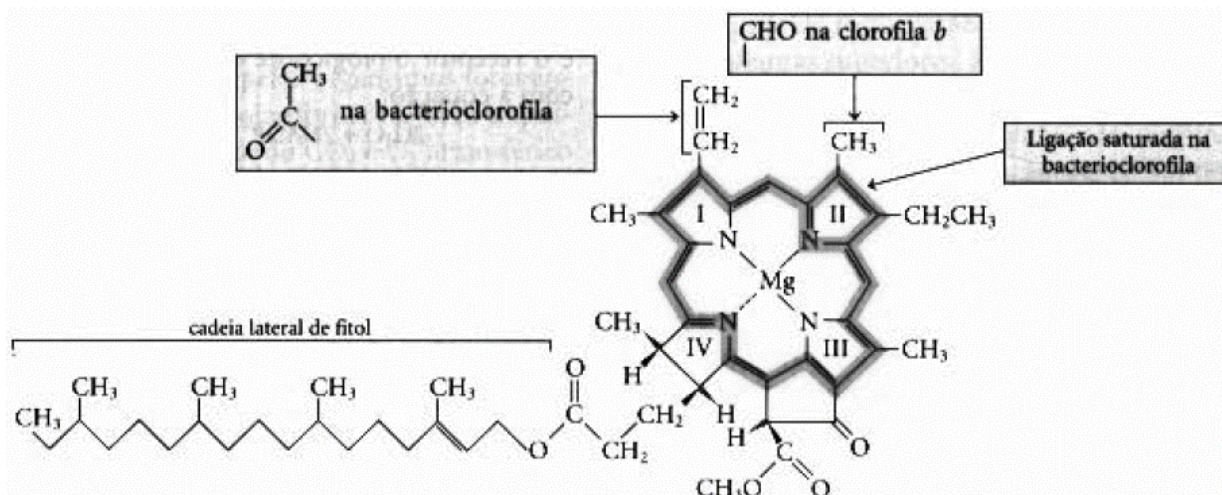
3.1 A versatilidade metabólica de microalgas

Como revisado por DERNER *et al.* (2006), microalga é um termo genérico atribuído a microrganismos unicelulares capazes de realizar fotossíntese que apresentam clorofila e outros pigmentos. As microalgas possuem representantes procarióticos, como as Cyanophytas (cianobactérias) e Prochlorophytas, e eucarióticos, nas divisões Chlorophyta, Heterokontophyta (diatomáceas, xantofíceas e crisofíceas), Rhodophyta, Euglenophyta, Prymnesiophyta, Cryptophyta e Dinophyta (BELL; HEMSLEY, 2000; LEE, 2008). Trata-se, portanto, de um grupo metabolicamente diverso, tanto pela diversidade de espécies que o constitui como pela vasta gama de rotas metabólicas que certas espécies podem apresentar.

A fotossíntese é o processo que plantas e algas utilizam para converter energia luminosa em energia química, na forma de ATP e NADPH, e assimilar carbono inorgânico, na forma de carboidratos e outros compostos. A primeira etapa desse processo consiste em reações dependentes de luz, também chamada de fase clara, enquanto a segunda, por vezes chamada erroneamente de fase escura, consiste nas reações de fixação de carbono.

As clorofilas são os pigmentos primários de absorção de luz para a fotossíntese, em especial a clorofila *a*, presente em todas as algas fotossintetizantes e plantas superiores (BELL; HEMSLEY, 2000; LEE, 2008). Além da clorofila *a*, cuja estrutura é mostrada na Figura 1, existem ainda as clorofilas *b*, *c*₁, *c*₂, *d*, *f* e as bacterioclorofilas, todas constituídas por uma cadeia lateral de fitol esterificada a uma porfirina contendo um íon de Mg²⁺ ao centro, diferindo entre si apenas por ligações e grupos funcionais pontuais. A ressonância gerada na região de ligações duplas alternadas da porfirina, destacada na Figura 1, interage com a luz nas faixas do azul e do vermelho e reflete o verde, razão da cor desses pigmentos. A clorofila *a*, especificamente, tem seus picos de absorção em 663 nm e 430 nm (LEE, 2008).

Figura 1 – Estrutura da clorofila *a* com indicação das estruturas da clorofila *b* e bacterioclorofila *a*

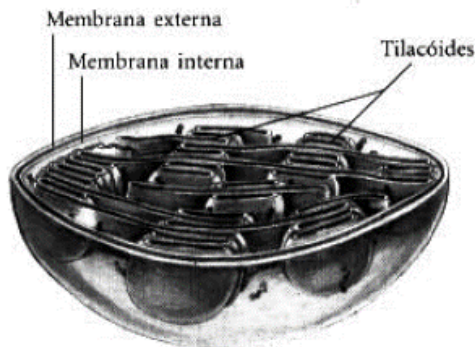


Fonte: Adaptado de NELSON & COX (2002), p. 542.

Associados às clorofilas frequentemente estão os pigmentos secundários, como os carotenóides, que ampliam o espectro de absorção luminosa e, consequentemente, a eficiência fotossintética do organismo. Alguns organismos apresentam, ainda, estruturas complexas formadas por ficobiliproteínas, tais como a ficocianina, de coloração azulada, e a ficoeritrina, de cor avermelhada. Cada microalga possui uma combinação única de pigmentos, que são organizados em estruturas lipoprotéicas funcionais denominadas fotossistemas (BELL; HEMSLEY, 2000; LEE, 2008; NELSON; COX, 1995). Os fotossistemas se encontram ancorados às membranas dos tilacóides, estruturas fotossintéticas geralmente encontradas em forma de pilhas, ou granas, formadas a partir de invaginações da face interna da membrana plasmática, em organismos procariotos, ou contidas em cloroplastos, em eucariotos (BELL; HEMSLEY, 2000).

Os cloroplastos são organelas delimitadas por uma membrana externa, permeável a alguns íons e moléculas, e uma membrana interna, bastante seletiva. Possuem DNA e síntese própria de certas proteínas, assemelhando-se aos procariotos fotossintetizantes (NELSON; COX, 1995). BOYLE & MORGAN (2009) demonstraram a relevância dessas organelas em algas verdes ao identificar que quase a metade dos metabólitos e enzimas presentes em células de *Chlamydomonas reinhardtii* pode ser encontrada nos cloroplastos. Um desenho esquemático dessa organela é apresentado na Figura 2.

Figura 2 – Desenho esquemático de um cloroplasto. Os tilacóides são dispostos na forma de pilhas (granas) e contém os fotossistemas responsáveis pela fase clara da fotossíntese

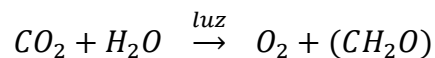


Fonte: Adaptado de Nelson & Cox (2002), p. 541.

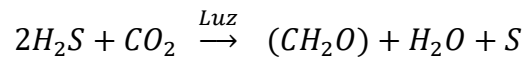
A maioria das microalgas apresenta dois fotossistemas: o fotossistema I (FSI), que absorve comprimentos de onda de até 700 nm, e o fotossistema II (FSII), que absorve comprimentos de onda abaixo de 680 nm (LEE, 2008). A excitação luminosa captada pelo FSII causa a liberação de elétrons por clorofilas no centro de reação do fotossistema. A água sofre fotólise para reduzir novamente a clorofila, liberando oxigênio molecular e prótons, enquanto os elétrons desprendidos são transportados em cadeia até o citocromo *b6f*, com bombeamento dos prótons do interior do tilacóide (lúmen) para o estroma. Quando o citocromo *b6f* reduz, enfim, o FSI, os elétrons transferidos ganham potencial devido à excitação luminosa desse fotossistema, passando por outro transporte em cadeia que culmina na redução do NADP^+ a $\text{NADPH} + \text{H}^+$. O gradiente eletroquímico gerado pelo bombeamento de prótons para o estroma causa a movimentação de H^+ através da ATP sintase, culminando na produção de ATP (NELSON; COX, 1995).

O principal mecanismo de fixação de carbono em algas verdes e plantas superiores acontece no estroma do cloroplasto, pela via denominada ciclo de Calvin. A entrada de CO_2 nesse ciclo se dá pela incorporação de três carbonos inorgânicos a três moléculas de ribulose-1,5-bisfosfato, formando seis moléculas de 3-fosfoglicerato. Essa reação inicial é catalizada pela enzima *ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxidase*, também chamada de RUBISCO, provavelmente a enzima mais abundante na Terra. As moléculas de 3-fosfoglicerato formadas são convertidas a gliceraldeído-3-fosfato e entram em equilíbrio com seu isômero, a diidroxiacetona. Essa segunda etapa que requer o gasto de ATP e NADPH, produzidos na fase clara. Essas trioses

fosfato, juntamente com a frutose-6-fosfato, que pode ser gerada a partir da fusão entre elas, são metabólitos chave do metabolismo fotossintético, podendo entrar em rotas catabólicas e anabólicas diversas, como síntese de amido, glicogênio ou sacarose, ou ainda retornar ao ciclo de Calvin. As reações da terceira e última etapa do ciclo consistem na regeneração de 3 moléculas de ribulose-1,5-bisfosfato a partir de 5 das 6 trioses fosfato geradas na segunda etapa. Cada ciclo gera, portanto, um saldo líquido de uma triose fosfato, cujo custo energético é de seis moléculas de NADPH e nove de ATP (BELL; HEMSLEY, 2000). A equação global da fotossíntese, então, é:



Algumas bactérias púrpuras e azuis realizam fotossíntese sem a formação de O₂, também chamada de fotossíntese anoxigênica ou anaeróbia. Esses organismos não possuem FSII, e geralmente utilizam sulfeto de hidrogênio como doador de elétrons para FSI, gerando enxofre ou tiosulfato como subproduto (LEE, 2008), de acordo com a reação:



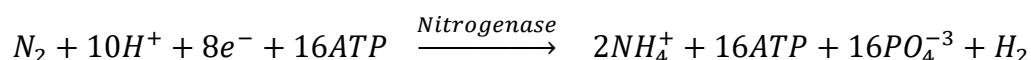
Há, ainda, as cianobactérias fotoautotróficas anaeróbias facultativas, capazes de realizar fotossíntese oxigênica, em condições de aerobiose, e anoxigênica, em anaerobiose. COHEN *et al.* (1975) demonstraram que *Oscillatoria limnetica* é capaz de se adaptar a condições de anaerobiose e realizar fotossíntese anoxigênica independente de FSII, com redução de Na₂S a enxofre. No verão, porém, quando as concentrações de oxigênio nos lagos é alta, essa microalga é capaz de ajustar seu metabolismo para realizar fotossíntese oxigênica e continuar povoando o ambiente.

As bactérias redutoras de sulfatos também fixam CO₂ quimioautotroficamente, oxidando H₂ na presença de O₂ (APPEL; SCHULZ, 1998). Essas bactérias possuem uma hidrogenase citoplasmática e uma periplasmática associada à membrana, ambas capazes de oxidar ou produzir H₂ a partir de H⁺. Assim, a ação conjunta das mesmas coordena a força eletromotriz decorrente do gradiente transmembranar de prótons sem efetivamente transportar H⁺ através da membrana (APPEL; SCHULZ, 1998).

As algas verdes e as cianobactérias são os únicos organismos conhecidos que comportam, ao mesmo tempo, estruturas fotossintéticas e mecanismos de produção de hidrogênio (SCHÜTZ

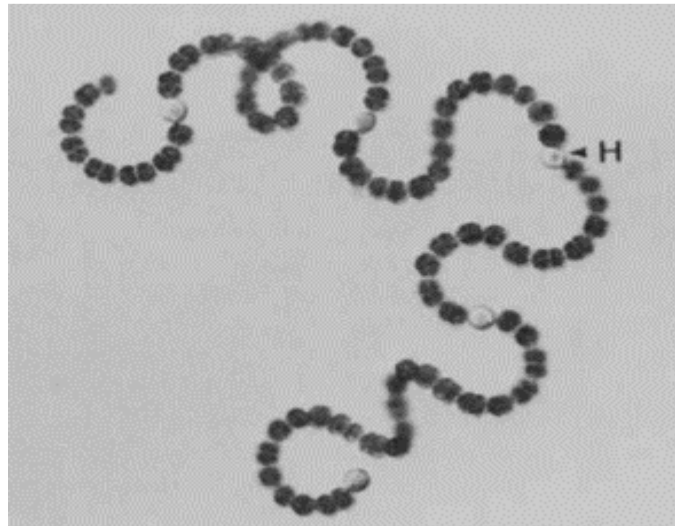
et al., 2004). A produção de H₂ por cianobactérias pode ocorrer como um resultado da fixação de nitrogênio, como será mencionado mais adiante, ou sob condições anaeróbias e no escuro pela ação de diferentes isozimas de hidrogenase (APPEL; SCHULZ, 1998; SCHÜTZ *et al.*, 2004). Em algas verdes, esse processo ocorre fotossinteticamente, por meio da biofotólise direta ou indireta da água, seguida de redução dos prótons gerados (CARDOSO; VIEIRA; MARQUES, 2011). O metabolismo de H₂ representa uma grande vantagem adaptativa, pois pode ser usado tanto para dar um destino a elétrons, em condições redutoras, como para a obtenção de energia, por meio da oxidação de H₂. Essa condição seria impossível sem a presença da hidrogenase (APPEL; SCHULZ, 1998).

Algumas cianobactérias filamentosas possuem o complexo enzimático da nitrogenase e são capazes de fixar nitrogênio, um processo energeticamente oneroso que requer o gasto de 16 mols de ATP para cada mol de N₂ fixado. Esse processo é, também, o mecanismo mais expressivo da produção de H₂ dessas cianobactérias, e se dá pela seguinte reação (NELSON; COX, 1995):



A catálise dessa reação pela nitrogenase requer mecanismos de proteção da enzima, que é altamente sensível ao O₂ e incompatível com a fotossíntese oxigênica. Algumas cianobactérias filamentosas contornam esse problema com a diferenciação de células vegetativas a heterocistos. As células diferenciadas perdem seus tilacóides e FSII, levando à interrupção do seu metabolismo fotossintético e, conseqüente, da produção de O₂. Os heterocistos passam a apresentar alta taxa respiratória, com consumo de O₂, e a entrada de oxigênio nessas células é limitada pela formação de uma espessa parede celular e de um envelope extracelular composto por diversas camadas (KULASOORIYA; LANG; FAY, 1972). A formação de heterocistos próximos uns aos outros é impedida por sinais moleculares, resultando num espaçamento de cerca de 20 células entre eles. A Figura 3 mostra a disposição de heterocistos em *Anabaena crassa*.

Figura 3 – Heterocistos em *Anabaena crassa*. A micrografia de luz revela células vegetativas, mais escuras, e heterocistos (H), de aparência vazia



Fonte: LI; WATANABE; WATANABE, 1997.

Com a depleção de NH_4^+ em lagos eutrofizados, cianobactérias como *Anabaena flos-aquae* são capazes de alterar sua densidade e subir à superfície. A abundância de luz e CO_2 permite que suas células vegetativas realizem fotossíntese, enquanto seus heterocistos fixam o nitrogênio atmosférico (LEE, 2008). Os heterocistos, então, enviam nitrogênio fixado às células vegetativas, na forma de glutamina, e recebem delas carbono fixado, na forma de sacarose (LEE, 2008).

Algumas cianobactérias são capazes de fixar N_2 eficientemente sem a formação de heterocistos. Certas algas não filamentosas podem ser condicionadas a realizar separação temporal de metabolismos, fixando nitrogênio no escuro e cessando a produção de nitrogenase de dia, durante a fotossíntese (WEARE; BENEMANN, 1974). Outras cianobactérias filamentosas podem fixar nitrogênio simultaneamente à fotossíntese oxigênica sob microaeração e baixa luminosidade (GIANI; KRUMBEIN, 1986). Estudos com *Oscillatoria* sp. mostraram que esses organismos suportam pressões de até 0,15 % de O_2 sem alteração das taxas de fixação, além de apresentarem alta taxa de síntese de nitrogenase e inativação reversível da mesma sobre pressões de O_2 superiores (STAL; KRUMBEIN, 1985). STAAL *et al.* (2003) modelaram a difusão de O_2 em *Trichodesmium* spp. e concluíram que o ambiente tropical em que habitam favorece a fixação de

N₂, pois altas temperaturas reduzem a solubilidade do oxigênio. A secreção de exopolissacarídeos também foi associada à proteção da nitrogenase (PHILIPPIS; VINCENZINI, 1998).

Além de rotas metabólicas de obtenção de energia luminosa e de compostos inorgânicos, as microalgas também apresentam mecanismos respiratórios, semelhantes aos encontrados em organismos heterotróficos, primariamente destinados ao consumo dos próprios fotossintetatos. Em eucariotos, esse metabolismo ocorre em mitocôndrias, enquanto que em procariotos as estruturas respiratórias são geradas por invaginações da face interna da membrana plasmática (BELL; HEMSLEY, 2000). Para que a energia produzida pela fotossíntese no cloroplasto chegue a outros compartimentos e dê continuidade às outras funções celulares, trioses fosfato são enviadas às mitocôndrias e convertidas normalmente a ATP e NADH por meio da cadeia transportadora de elétrons (BOYLE; MORGAN, 2009). Os únicos metabólitos transportados pelas membranas dos cloroplastos são gliceraldeído-3-fosfato e diidroxiacetona, portanto essas trioses fosfato também são compostos intermediários entre a fotossíntese e a respiração celular (MARSCHNER, 1995).

Portanto, apesar de possuírem diversos mecanismos de produção primária e serem altamente especializadas em utilizar energia luminosa, uma grande maioria das microalgas é capaz de usar moléculas orgânicas exógenas como fonte de nutriente e energia, e maior parte desse metabolismo heterotrófico ocorre nas mitocôndrias, pela cadeia transportadora de elétrons (BOYLE; MORGAN, 2009). Esses compostos podem entrar nas células por osmose, quando se trata de compostos solúveis, ou por fagocitose, por meio do englobamento de partículas complexas em vesículas para posterior digestão, quando então entram em rotas metabólicas diversas, de acordo com sua natureza (LEE, 2008). O crescimento puramente heterotrófico em microalgas só acontece no escuro, já que a fotossíntese é sempre a rota de obtenção energética preferencial desses organismos (HELLEBUST, 1971). Na presença de luz, algumas espécies são incapazes de utilizar quaisquer fontes de carbono do meio, enquanto outras são capazes de consumir matéria orgânica para obtenção de carbono e outros nutrientes utilizando luz como fonte de energia (LEE, 2008). Sabe-se, ainda, que diversas espécies também realizam crescimento mixotrófico, utilizando simultaneamente os sistemas fotossintéticos e as vias metabólicas para substratos orgânicos, embora os mecanismos e regulações desse metabolismo ainda permanecem desconhecidos (LI *et al.*, 2016). BOYLE & MORGAN (2009) demonstraram que o crescimento de *Chlamydomonas reinhardtii* apresenta muito mais rendimento de carbono em condições auto e mixotróficas do que

em heterotróficas. Os autores sugerem que isso seja reflexo do reaproveitamento do CO₂ liberado durante a respiração para realizar fotossíntese, enquanto no crescimento heterotrófico, parte do carbono é usada para geração de energia e perdida na forma de CO₂. Para *Chlorella sorokiniana*, as taxas fotossintéticas em crescimento mixotrófico são dependentes do estágio de crescimento, e não são reguladas da mesma maneira que em cultivos autotróficos, além de serem altamente influenciadas pela concentração de N no meio (LEE *et al.*, 1996; LI *et al.*, 2016). LI *et al.* (2014) observou que o crescimento de *Chlorella* sp. em meio mixotrófico está relacionado a maiores taxas de crescimento e maior rendimento em lipídios. Resultados semelhantes foram observados em três cepas de *Chlorella* sp. por LEESING *et al.* (2013).

3.2 Potencial biotecnológico

3.2.1 Mitigação do uso e efeitos de combustíveis fósseis

O termo “combustível fóssil” se refere ao petróleo e seus derivados, ao carvão ou ao gás mineral, compostos formados por processos geoquímicos de degradação parcial da matéria orgânica ao longo de milhares de anos. Esses combustíveis representam 87 % da matriz energética mundial na atualidade e, em decorrência do aumento contínuo dessa demanda e de políticas de apoio ao uso desses compostos, não há estimativas de mudança desse cenário pelo menos pelos próximos vinte anos (BENETTO *et al.*, 2004; BIRESELIOGLU; YELKENCI, 2016). Em termos práticos, a taxa de regeneração dos combustíveis fósseis extraídos e queimados é nula, por se tratar de um processo que pode levar eras pra acontecer, o que significa que esse grande e crescente volume de material queimado culmina no acúmulo de CO₂ atmosférico, gás de efeito estufa incessantemente associado ao aumento da temperatura média terrestre e elevação do nível do mar (BENETTO *et al.*, 2004).

Por sua habilidade de fixar carbono autotroficamente ou mixotroficamente a taxas relativamente altas, inúmeros trabalhos envolvendo o uso de microalgas vêm sendo desenvolvidos no intuito de sequestrar CO₂ atmosférico e mitigar os impactos das atividades antropogênicas (KAJIWARA *et al.*, 1997; LOPES, 2007; MAEDA *et al.*, 1995). LOPES (2007) identifica que esses esforços tem se resumido em 6 linhas principais de pesquisa: 1) identificação de cepas com alta taxa de remoção de CO₂; 2) design e otimização de configuração de reatores; 3) otimização

dos parâmetros de cultivo; 4) modelagem cinética do crescimento microbiano associado à cinética de fixação de CO₂; 5) estudos de aumento de escala e 6) estudos de viabilidade econômica.

Um objetivo idealizado por diversos autores é o desenvolvimento de um processo integrado em que efluentes gasosos ricos em dióxido de carbono, como os de usinas termoelétricas, sejam injetados diretamente em fotobiorreatores, onde seriam tratados por microalgas com alta capacidade de fixação e convertidos em produtos de alto valor comercial (MAEDA *et al.*, 1995; ONO; CUELLO, 2006; WEISSMAN *et al.*, 1998; ZEILER *et al.*, 1995). Contudo, devido às condições inóspitas de tais efluentes, as linhagens algais utilizadas devem ser capazes de crescer sob altas temperaturas e concentrações de CO₂, além de suportarem concentrações variadas de NO_x e SO_x, subprodutos tóxicos da queima dos combustíveis fósseis. Muitos autores têm relatado cepas algais potenciais para essa aplicação, incluindo algumas do gênero *Chlorella* (KEN-ICHI YOSHIHARA *et al.*, 1996; MAEDA *et al.*, 1995; SAKAI *et al.*, 1995; WEISSMAN *et al.*, 1998; ZEILER *et al.*, 1995).

Embora já existam aplicações comerciais para algumas espécies de microalgas, diversos obstáculos tecnológicos ainda precisam ser superados para que a aplicação desses organismos na remoção de CO₂ atmosférico se torne viável: 1) O crescimento autotrófico é associado ao aumento do pH do meio, decorrente do deslocamento do equilíbrio químico sob remoção de CO₂. Em contrapartida, o pH alto resulta na precipitação de fósforo inorgânico e volatilização do nitrogênio na forma de amônia, nutrientes vitais para o metabolismo; 2) o aproveitamento da luz fornecida ao cultivo é limitado pelo aumento das dimensões do fotobiorreator, que impede que a luz chegue às regiões mais internas, ou quando há crescimento aderido às paredes do reator, ou quando ocorre a formação de flocos devido à alta concentração celular; 3) as etapas de *downstream*, como coleta, secagem e separação de biomoléculas a partir da biomassa aumentam consideravelmente o custo desses processos (CARDOSO; VIEIRA; MARQUES, 2011; LOPES, 2007). Frente a tais desafios, a viabilização do sequestro de CO₂ em fotobiorreatores vem sendo associada à geração de créditos de carbono com produção concomitante de biomoléculas de valor agregado, associação a processos ambientais, como tratamento de efluentes, produção de alimentos e ração animal e produção de biocombustíveis (CARDOSO; VIEIRA; MARQUES, 2011; LOPES, 2007; ONO; CUELLO, 2006).

3.2.2 Comercialização da biomassa

Devido à grande biodiversidade e pluralidade metabólica desse grupo, a composição bioquímica desses organismos é igualmente vasta, decorrente da produção de diversos metabólitos primários e secundários, moléculas de reserva energética e de manutenção do metabolismo e estruturas celulares (VASSILEV; VASSILEVA, 2016). Portanto, grande parte do potencial biotecnológico das microalgas está associada ao uso direto da biomassa ou criação de uma plataforma de processamento e separação dos diversos compostos e insumos produzidos, processo também conhecido como biorrefinaria (GILBERT-LÓPEZ *et al.*, 2015). Dentre os compostos com maior potencial para biorrefino da biomassa estão ácidos graxos poliinsaturados (PUFA), como ômega-6 e ômega-3, ésteres metis de ácido graxo (FAME), vitaminas, esteróis, polissacarídeos, proteínas, pigmentos, corantes e antioxidantes (DERNER *et al.*, 2006; MATA; MARTINS; CAETANO, 2010). A composição da biomassa algal varia de espécie para espécie, e algumas microalgas podem apresentar frações de até 71 % de proteínas, 64 % de lipídios ou 40 % de carboidratos, em relação ao peso seco (TRIVEDI *et al.*, 2015). Ainda, a porção lipídica pode apresentar altos rendimentos em PUFA (60 %) e FAME (43 %) (DERNER *et al.*, 2006; LIN; LIN, 2011).

Nos últimos anos, o uso de biomassa algal vem ganhando espaço na indústria de alimentos funcionais por melhorarem as características nutracêuticas e organolépticas dos alimentos, permitindo, ainda, a sua comercialização como produtos naturais. Microalgas como *Chlorella* Beyerinck, *Arthrospira* Stizenberger, *Dunaliella salina* e *Haematococcus pluvialis* são atualmente aplicadas na produção de massas, pães, iogurte, bebidas, maionese e sobremesas gelificadas (BENAVENTE-VALDÉS *et al.*, 2016; DERNER *et al.*, 2006). Não obstante, a aplicação alimentícia de microalgas não é algo recente, visto que os astecas e alguns povos africanos já utilizavam *Spirulina* spp. como insumo para produção de alimentos há séculos, atividade que ainda é realizada por esses últimos nos dias de hoje (DERNER *et al.*, 2006).

Diversos outros destinos para a biomassa algal e seus insumos vem sendo aplicados ou investigados. CORDERO *et al.* (1996) relatam a suplementação da dieta de salmões com astaxantina extraída de *Haematococcus pluvialis*, para conferir-lhes sua cor característica. BENEMANN *et al.* (2002) relataram o uso de *Spirulina* como fertilizante após ser utilizada para recuperar fósforo e nitrogênio de lixiviado de atividade agrícola, um processo que chamaram de

eutrofização controlada. DERNER *et al.* (2006) ainda sumariza diversos outros produtos obtidos a partir da biomassa de microalgas, como enzimas, toxinas e polímeros. Todavia, devido ao aumento da demanda por energia, um dos maiores potenciais para emprego da biomassa é a produção de biocombustíveis, tratados em conjunto no item a seguir.

3.2.3 Biocombustíveis

Com base no grande número de trabalhos publicados na área, pode-se dizer que a produção de biocombustíveis é, de longe, a aplicação de maior interesse para a produção de microalgas. Esse interesse parece estar associado ao apelo ambiental desses combustíveis que, ao contrário dos combustíveis fósseis, se integram ao ciclo do carbono. Isso quer dizer que todo o CO₂ emitido pela queima do biocombustível é proveniente de fontes renováveis que foram formadas, direta ou indiretamente, pela fixação do mesmo carbono atmosférico, resultando na ciclagem sem acúmulo dessa matéria.

O biodiesel é um biocombustível constituído de alquilésteres lineares produzidos a partir da transesterificação de óleos ou gorduras com metanol ou etanol na presença de hidróxido de sódio (LÔBO; FERREIRA, 2009). No Brasil, o biodiesel provém majoritariamente de plantas oleaginosas, como soja, palma, girassol, mamona, babaçu e pinhão-manso (LÔBO; FERREIRA, 2009). O etanol anidro é o biocombustível oriundo da fermentação alcoólica de açúcares, mais comumente a sacarose ou hidrolisado de amido, com etapas subsequentes de refinamento. No Brasil, a matéria prima principal é a cana-de-açúcar, e o processo de produção é muito bem estabelecido (LÔBO; FERREIRA, 2009). As microalgas, por sua vez, têm chamado a atenção de diversas indústrias e pesquisadores devido ao fato de que algumas cepas podem apresentar biomassa rica tanto em açúcares quanto em óleos. Embora o etanol algal ainda seja uma realidade bem distante, o biodiesel de microalgas vem sendo largamente estudado.

No Brasil, um interesse particular por essas fontes alternativas de energia é decorrente da política de inserção de biocombustíveis na matriz energética nacional. A Lei nº 13.033 exige que um percentual mínimo de 7 % de biodiesel seja adicionado ao diesel de combustível fóssil, valor que deve chegar a 10 % até Maio de 2019, conforme a Lei nº 13.623/2016. Já o etanol deve ser adicionado em um mínimo de 27 % na gasolina comum e 25 % na gasolina Premium, de acordo com a Portaria nº 75, de 5 de Março de 2015, do Ministério da Agricultura, Pecuária e

Abastecimento (MAPA), e Resolução nº 1, de 4 de março de 2015, do Conselho Interministerial do Açúcar e do Alcool (CIMA).

Apesar de ainda não serem economicamente competitivos, os biocombustíveis de microalgas apresentam grandes vantagens ambientais e potencialmente econômicas sobre aqueles produzidos por fontes vegetais: 1) maior produtividade por área de cultivo; 2) maior eficiência em fixar carbono; 3) composição homogênea da biomassa, enquanto plantas apresentam diferenças bioquímicas entre raiz, caule, folhas e fruto; 4) possibilidade de crescimento em climas extremos; 5) possibilidade de utilização de água do mar ou efluentes agroindustriais; 6) possibilidade de reciclo de água e redução de gasto desse recurso por unidade de massa gerada; 7) não utilização de terra agricultável; 8) sua produção não implica desvio de produção de alimentos, como acontece com as plantas e 9) maior facilidade de melhoramento genético. (CARDOSO; VIEIRA; MARQUES, 2011; COHEN; PADAN; SHILO, 1975; DERNER *et al.*, 2006; MATA; MARTINS; CAETANO, 2010). Em contrapartida, os desafios associados ao alto custo de produção de biomassa algal e as limitações técnicas de cultivo ainda representam os maiores obstáculos para a produção de biocombustíveis a partir microalgas. LÔBO & FERREIRA (2009) notam, ainda, que a composição de óleos extraídos de microalgas é geralmente rica em ácidos graxos e FAME com quatro ou mais insaturações, condição inadmissível para a produção de biodiesel, de acordo com os padrões europeus, americanos e brasileiros. CHISTI (2007) sugere, porém, que essa limitação pode ser facilmente superada com a adição de uma etapa de hidrogenação desses óleos.

A maioria dos estudos com microalgas busca a viabilização de biodiesel e, em menor grau, de bioetanol, por apresentarem processos de produção bem estabelecidos e serem os combustíveis de mais fácil inserção na matriz energética nacional e global. CARDOSO *et al.* (2011) cita, porém, diversos outros biocombustíveis com potencial para serem gerados a partir da biomassa de microalgas: 1) biohidrogênio, produzido a partir de algas verdes e cianobactérias, por ação da enzima hidrogenase; 2) biometano, gerado a partir da biodigestão anaeróbia da biomassa algal com geração concomitante de fertilizante; 3) bio-óleo, produzido a partir da pirólise da biomassa com geração concomitante de biocarvão; 4) gás de síntese por gaseificação da biomassa e 5) bioetanol produzido a partir por meio de liquefação. A produção desses combustíveis ainda encara limitações tecnológicas que aumentam o custo de produção e impedem o seu uso, requerendo ainda mais esforços técnicos e científicos para viabilizá-los.

3.2.4 Tratamento de efluentes

As microalgas também apresentam características interessantes para o tratamento de águas residuárias em geral. Seu rápido crescimento é acompanhado por uma remoção drástica de metais pesados, poluentes e nutrientes do meio, incluindo de N, P e K. Ainda, são capazes de fixar CO₂ atmosférico ou consumir matéria orgânica, se presente. Diversas estratégias de tratamento vêm sendo abordadas para os mais variados tipos de efluentes, frequentemente acopladas à produção de energia e biocombustíveis.

HENA *et al.* (2015) avaliaram a eficiência de um consórcio de 10 espécies selvagens de microalgas verdes no tratamento de efluente de laticínio com alto teor de DBO, teores moderados de fósforo e baixos valores de nitrogênio. O tratamento obteve 98 % de remoção dos nutrientes com produção concomitante de 18 t.ano⁻¹ de óleo com características adequadas à produção de biodiesel. YEN & BRUNE (2007), por sua vez, suplementam o lodo de microalga com papel para aumentar a razão C/N dessa biomassa e otimizá-la para digestão anaeróbia. O tratamento se mostrou eficiente e produziu metano a uma taxa máxima de 1,6 mL.L⁻¹.dia⁻¹, cerca de três vezes maior que o tratamento não suplementado. WANG *et al.* (2016) selecionaram cepas de microalgas submetendo-as à luz UV e gradativa adaptação em diluições de dejetos suínos. As taxas de remoção de N e P pelas espécies selecionadas foram de 90 e 85 %, respectivamente, mesmo quando crescidas no efluente não diluído.

Outros autores descrevem a associação de algas verdes e cianobactérias para remoção ótima de nutrientes (MUKHERJEE *et al.*, 2016), microalgas aplicadas à biorremediação de metais pesados (INTHORN *et al.*, 2002) e tratamentos de contaminantes químicos perigosos (MUÑOZ; GUIEYSSE, 2006). CHEAH *et al.* (2016) analisou o potencial de algumas microalgas para tratar esgoto doméstico, bagaço de óleo de palma e chorume de aterro sanitário e conclui que o acoplamento de processos de mitigação de rejeitos à geração de energia por meio do processamento de biomassa é ideal e promissor, mas atentou para a necessidade de elucidarem-se os mecanismos de remoção de nutrientes e de estudar-se melhor as condições dos processo, estratégias de otimização e etapas de *downstream*.

3.2.5 *Chlorella sorokiniana*

A primeira descrição do gênero *Chlorella* foi feita pelo professor alemão M.W. Beijerinck, em 1889, que deu o nome ao primeiro organismo do grupo, *Chlorella vulgaris* Beijerinck

(SHIHIRA; KRAUSS, 1965). Desde então, o gênero vem sofrendo constantes alterações, e nota-se que as grandes semelhanças morfológicas e metabólicas entre esses organismos, bem como fenômenos de convergência evolutiva, tem tornado o delineamento do gênero *Chlorella* caótica (BOCK; KRIENITZ; PROSCHOLD, 2011; HUSS *et al.*, 1999; KESSLER; HUSS, 1992; SHIHIRA; KRAUSS, 1965). Em 1965, SHIHIRA & KRAUSS renomearam 11 das 41 linhagens de *Chlorella* estudadas e contabilizaram 26 espécies sob esse gênero. Após a revisão taxonômica de KESSLER & HUSS (1992) o número de espécies caiu para 10, e todas as cepas até então classificadas como *C. pyrenoidosa* pertenciam, na verdade, às espécies *C. vulgaris*, *C. sorokiniana* e *C. fusca*. BOCK *et al.* (2011) relatam que até o momento do seu trabalho havia 5 espécies classificadas sob o gênero *Chlorella*. De acordo com a revisão taxonômica de BOCK *et al.* (2011), a mais recente encontrada para o gênero, 12 espécies compõem atualmente o gênero *Chlorella*, sendo *C. sorokiniana* uma delas.

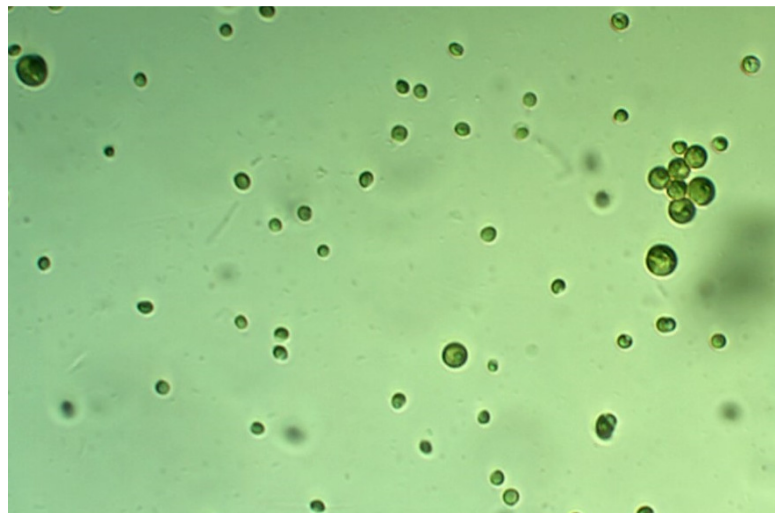
Atualmente, a microalga *Chlorella sorokiniana* é classificada no filo das Chlorophytas, ou algas verdes. Habitante primariamente de água doce, foi primeiramente isolada por Constantine Sorokin, em 1951, e foi descrita como células individuais, ovais ou esféricas, de até 4,5 x 3,5 μ quando crescidas em meio inorgânico e 4,5 x 5,5 μ quando crescidas em glicose. A cepa foi inicialmente chamada *C. pyrenoidosa*, devido à presença de centros de formação de amido em regiões diferenciadas do cloroplasto, chamados pirenóides (SHIHIRA; KRAUSS, 1965 *apud* SOROKIN, 1959). SOROKIN (1959) também descreveu preliminarmente algumas características bioquímicas da microalga: 1) apesar da coloração verde, podem ser tornar brancas em cultivos velhos; 2) crescem bem em meio inorgânico, líquido ou sólido, e podem crescer bem em glicose e manose sob iluminação, embora apenas glicose seja consumida no escuro; 3) utilizam amônia e nitrato igualmente, mas o hidrolisado de caseína é melhor utilizado como fonte de nitrogênio; 4) apresentam rápido crescimento a temperaturas altas (SHIHIRA; KRAUSS, 1965 *apud* SOROKIN, 1959). KESSLER & HUSS (1992) identificaram que essa espécie possui a enzima hidrogenase e que tem seu crescimento inibido por manitol, além de terem-na indicado para aplicações biológicas que envolvessem crescimento rápido e massivo, inclusive a altas temperaturas, de até 42 °C. Diversos outros trabalhos confirmam que essa microalga é termotolerante (DE-BASHAN *et al.*, 2008; HUSS *et al.*, 1999; SAKAI *et al.*, 1995), mas BASHAN *et al.* (2016) demonstraram que a cepa UTEX 2714 tem seu crescimento em torno de 19 °C, razão pela qual foi considerada por

muito tempo como pertencente à espécie *C. vulgaris*. Como indicado pelas observações iniciais de SOROKIN (1959), *C. sorokiniana* possui grande adaptabilidade metabólica, sendo capaz de ajustar seu metabolismo de acordo com as condições de cultivo e crescer autotroficamente, heterotroficamente e mixotroficamente (LI *et al.*, 2016; OGBONNA; TANAKA, 1998).

Devido às interessantes características metabólicas de *C. sorokiniana*, seu potencial biotecnológico vem se mostrando promissor nas seguintes áreas: 1) remoção eficiente de amônia de efluentes líquidos (DE-BASHAN *et al.*, 2008); 2) Produção de pigmentos, como luteína, clorofila *a* e *b*, zeaxantina e violaxantina (CORDERO *et al.*, 2011; DE-BASHAN *et al.*, 2008) e 3) Produção de biodiesel (LU *et al.*, 2013). Apesar de não serem tóxicas ao consumo humano, espécies de *Chlorella* tem sido associadas à ativação de uma flora intestinal produtora de gases, não sendo indicada para alimentação.

A Figura 4 é uma fotografia da estirpe de *C. sorokiniana* usada neste trabalho, cuja morfologia é condizente com o descrito por SHIHIRA; KRAUSS, 1965 *apud* SOROKIN, 1959.

Figura 4 – *Chlorella sorokiniana*. Foto em microscópio óptico da cepa utilizada neste trabalho.



Fonte: Elaborada pelo autor.

3.3 Cultivo

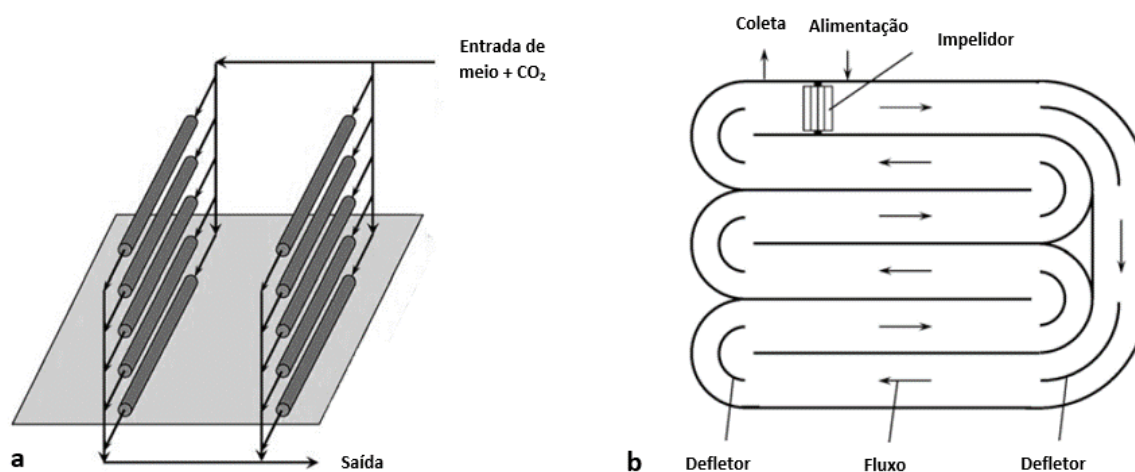
A vasta gama de rotas metabólicas, produtos e processos associados às microalgas não garantem uma resposta adequada se os parâmetros relacionados ao cultivo não se adequarem às características fisiológicas do organismo utilizado. As estratégias utilizadas para obter

produtividades máximas de biomassa algal e dos produtos que se deseja extrair, ou mesmo taxas ótimas de remoção de nutrientes ou contaminantes, são divididas entre físicas e nutritimentais (BENAVENTE-VALDÉS *et al.*, 2016). As primeiras tratam da manipulação das condições operacionais e de fatores externos, bem como do design e configuração de reatores, enquanto as nutritimentais dizem respeito à elaboração e manipulação do meio de cultivo, como na escolha de fontes de carbono e nitrogênio ou limitação de nutrientes.

Os parâmetros físicos que mais afetam o metabolismo algal são temperatura, pH e intensidade luminosa. Em organismos vivos, virtualmente todas as reações do metabolismo são mediadas por enzimas, que são fortemente influenciadas pela temperatura e pH do meio. Embora o aumento da temperatura favoreça grande parte das reações, valores altos demais podem causar danos irreversíveis às enzimas que as catalisam, além de afetar a fluidez da membrana e a solubilidade de gases (NELSON; COX, 1995). A maioria das microalgas é capaz de crescer sob amplas faixas de temperatura, com temperatura ótima geralmente próxima à temperatura ambiente, embora algumas espécies possam crescer em condições extremas (DE-BASHAN *et al.*, 2008; SAKAI *et al.*, 1995). O pH é responsável pela forma protonada ou iônica de diversos grupos funcionais em enzimas, o que tem influência direta na sua conformação e desempenho (NELSON; COX, 1995). Em crescimento autotrófico, as microalgas geralmente elevam consideravelmente o pH do meio, pois o consumo de CO₂ dissolvido para realizar fotossíntese leva ao consumo de ácido carbônico e, conseqüentemente, de H⁺ do meio. Portanto, o crescimento ótimo para a maior parte das espécies se dá em pH de neutro a básico (LOPES, 2007). A condição de iluminação pode definir o tipo de rotas metabólicas que serão ativadas, e melhores rendimentos de biomassa acontecem em cultivos iluminados, ilustrando a eficiência das microalgas em aproveitar a energia luminosa (BOYLE; MORGAN, 2009). Condições extremas de iluminação podem inibir o crescimento, mas também podem levar à produção de certos produtos (CORDERO *et al.*, 1996). Valores moderados de iluminação correspondem a alguns poucos kilolux (BENAVENTE-VALDÉS *et al.*, 2016; CHEIRSILP; TORPEE, 2012). Outros fatores que impactam o crescimento e a qualidade do produto ou eficiência do processo são agitação/aeração, salinidade e porcentagem de inóculo (BENAVENTE-VALDÉS *et al.*, 2016; LU *et al.*, 2013; MATA; MARTINS; CAETANO, 2010).

A habilidade de fixar carbono com uso de energia luminosa é uma das maiores vantagens das microalgas, pois elimina custos com energia e compostos orgânicos e causa o sequestro de CO₂. Para aplicações reais com o uso de luz e carbono atmosférico, o cultivo de microalgas vem sendo realizado em fotobiorreatores fechados ou em tanques abertos do tipo *raceway*, como mostrados na Figura 5.

Figura 5 – (a) Desenho esquemático de reatores tubulares fechados e (b) visão superior de tanque *raceway* aberto.



Fonte: Adaptado de CHISTI (2007).

O desenho esquemático (a) representa reatores tubulares de material transparente e raio de cerca de 0,1 m, onde o meio é recirculado até um reservatório com borbulhamento e remoção de ar. Sistemas *raceway* (b) consistem em tanques abertos de cerca de 0,3 m de profundidade, onde o meio é fracamente agitado por um impelidor. Como revisou CHISTI (2007), os fotobiorreatores apresentam maior rendimento de biomassa que sistemas *raceway*, pois permitem o cultivo de espécies puras e com maior nível de controle dos parâmetros de crescimento, o que não é possível em tanques abertos. Tanques *raceway* também apresentam problemas com evaporação, mistura e iluminação, sendo indicados apenas para diminuir custos de produção, que são mais altos em fotobiorreatores, ou para o cultivo de espécies extremófilas, como *Spirulina* ou *Dunaliella*, que inibem o crescimento de outros organismos (CARDOSO; VIEIRA; MARQUES, 2011).

WANG *et al.* (2014) descreve a importância de se escolher e otimizar o meio de cultivo com o intuito de maximizar o crescimento algal e a produção de moléculas de interesse, sobretudo para cultivos autotróficos. A disponibilidade de nutrientes deve ser investigada para melhor atender às demandas nutricionais do microrganismo e induzir a ativação das rotas metabólicas de interesse. Os elementos necessários ao crescimento celular e manutenção do metabolismo são frequentemente divididos entre macro e micronutrientes, de acordo com suas concentrações ideais no meio de cultivo. Os micronutrientes, como zinco, cobalto, molibdênio e cobre, geralmente são cofatores de enzimas, e se encontram no meio em concentrações de alguns miligramas por litro ou menos. Os macronutrientes são aqueles utilizados na formação de moléculas e estruturas celulares, como carbono, nitrogênio, fósforo e enxofre, ou como cofatores e reguladores de funções metabólicas primárias, como potássio, magnésio e cálcio. Em cultivos autotróficos, nos quais CO₂ atmosférico é suprido como fonte de C, os macronutrientes mais requeridos para o crescimento são nitrogênio, fósforo e potássio, sendo frequentemente os elementos limitantes do crescimento.

O nitrogênio é essencial para a formação de proteínas, ácidos nucleicos, pigmentos e parede celular. CHENG *et al.* (2013) demonstraram que altos níveis de nitrogênio podem ser associados à formação de clorofila e proteínas, sugerindo que esse nutriente é fortemente requerido para a fotossíntese, além de estar diretamente relacionado à geração de biomassa. Sob baixas concentrações de nitrogênio, as microalgas ainda podem realizar fotossíntese, mas a biomassa final terá menos compostos ricos nesse elemento, como carotenóides e clorofilas, e apresentarão mais compostos de alta energia, como lipídios e carboidratos (BENAVENTE-VALDÉS *et al.*, 2016). A carência de nitrogênio no meio foi, por vezes, relacionada ao acúmulo de lipídios no interior da célula (BENAVENTE-VALDÉS *et al.*, 2016; CHENG *et al.*, 2013; FENG *et al.*, 2012). CORDERO *et al.* (1996) descreve também a otimização da produção de astaxantina por *Haematococcus pluvialis* por meio da privação de nitrogênio.

Segundo BENAVENTE-VALDÉS *et al.* (2016), o fósforo é um elemento essencial para as microalgas, por participar da formação de diversas estruturas e processos, além de afetar vários aspectos da fotossíntese. Todavia, KOZŁOWSKA-SZERENOS *et al.* (2000) não notaram interferência nos níveis de clorofila *a* e *b* em *C. vulgaris* ao variarem as concentrações de fósforo do cultivo, embora tenham observado alta influência desse mineral na produção de glicolato.

FENG *et al.* (2012) confirmam que a ausência de fósforo inibe drasticamente o crescimento, mas também gera rendimentos altos de lipídios.

Ao contrário de N e P, o potássio não participa da formação de moléculas ou estruturas nas células, mas parece ter participação fundamental em diversos processos reguladores, incluindo o controle da pressão osmótica e ativação da nitrato redutase, uma enzima chave na regulação do metabolismo de nitrogênio que converte nitrato em nitrito, culminando na sua incorporação em aminoácidos (DEVI; SWAMY; MOHAN, 2013; MARSCHNER, 1995). Íons K^+ também parecem participar da regulação do ciclo do nitrogênio nas células em diversos níveis, incluindo o balanço de cargas na absorção de nitrato (TISCHNER, 2006). Entretanto, pouco foi descrito sobre a influência particular desse nutriente sobre microalgas, e deve-se buscar compreender esses mecanismos para melhor controle das condições e do meio de cultivo.

4 Material e Métodos

4.1 Microrganismo e meios de cultura

A cepa de *Chlorella sorokiniana* utilizada foi cordialmente cedida pelo Professor Dr. Eduardo Jacob Lopes, do Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). O pré-inóculo e manutenção dessas microalgas foram feitos em Meio 18-modificado (INTHORN *et al.*, 2002), composto por: NaNO_3 ($1,5 \text{ g.L}^{-1}$), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (380 mg.L^{-1}), K_2HPO_4 (120 mg.L^{-1}), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (110 mg.L^{-1}), NaCl (70 mg.L^{-1}), $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ (10 mg.L^{-1}), $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (9 mg.L^{-1}), H_3BO_3 (3 mg.L^{-1}), $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (2 mg.L^{-1}), $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ($0,3 \text{ mg.L}^{-1}$), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ($0,08 \text{ mg.L}^{-1}$) e $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($0,04 \text{ mg.L}^{-1}$), pH 7,5. Os cultivos foram conduzidos em incubadora (Modelo SL 224, Solab científica, Piracicaba, SP) a 25°C , fotoperíodo de 12 horas e luminosidade de $2,6 \pm 0,2 \text{ klux}$.

Os meios com variadas concentrações de NPK utilizados na porção fatorial deste trabalho foram preparados a partir das seguintes soluções estoque: Meio 18-modificado duas vezes concentrado (ausência de K_2HPO_4 e NaNO_3), solução de K_2HPO_4 (4 g.L^{-1}), solução de NaNO_3 (50 g.L^{-1}), solução de Na_2HPO_4 (4 g.L^{-1}) e solução de KCl (4 g.L^{-1}).

4.2 Quantificação indireta de biomassa

Para tornar prática a quantificação de biomassa, um método espectrofotométrico de quantificação indireta foi validado. A fim de se identificar um comprimento de onda adequado para as medições, foi feita uma varredura de absorbâncias em uma amostra de *C. Sorokiniana* sob comprimentos de onda entre 400 e 700 nm, com o uso de espectrômetro UV-VIS-NIR (Modelo UV-3600, Shimadzu, Barueri, SP). Essa região do espectro visível foi escolhida por englobar os comprimentos de onda absorvidos pelos principais pigmentos presentes nas microalgas verdes, incluindo as clorofilas. A absorbância das amostras foi realizada a 600 nm utilizando-se espectrofotômetro UV-Visível (Modelo IL-592, Kasuaki/Ionlab, Araucária, PR).

A curva de calibração relacionando densidade óptica (D.O.) e biomassa seca foi construída a partir de diversas diluições de um cultivo de *C. sorokiniana*. As densidades ópticas foram registradas e 50 mL de cada diluição foram vertidos em placas de Petri previamente secas e pesadas em balança analítica (Modelo AY 220, Shimadzu, Barueri, SP). Essas amostras foram secas em três etapas: três horas em estufa a 100°C , 3 horas em estufa a 80°C e resfriamento em dessecador

por meia hora. As placas foram pesadas novamente e a massa algal foi inferida pela diferença das massas finais e iniciais. A concentração mássica foi calculada e plotada em relação aos valores de D.O. correspondentes. A regressão linear dos pontos foi feita por meio do Método dos Mínimos Quadrados e computada pela função *lm* do ambiente de desenvolvimento integrado, RStudio. As representações gráficas do modelo foram geradas pelo mesmo software.

4.3 Planejamento experimental

A análise dos efeitos das concentrações de NPK no meio de cultivo sobre o crescimento de *C. sorokiniana* foi realizada pela metodologia de superfície de resposta. O planejamento experimental foi feito em Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR) com três pontos centrais e dois níveis de concentração para cada variável, num total de 17 ensaios. Os níveis altos e baixos foram codificados como 1 e -1, respectivamente, e os pontos centrais correspondentes às concentrações intermediárias entre esses valores foram codificados como 0. Por se tratar de um experimento rotacional, em que todos os pontos se encontram igualmente distantes do centro, os pontos axiais foram codificados de acordo com (MONTGOMERY; RUNGER; HUBELE, 2009):

$$\alpha = (n^k)^{1/4}$$

Onde α é o módulo dos códigos de pontos axiais, k é o número de variáveis avaliadas e n é o número de níveis dessas variáveis. Para um experimento de três variáveis e dois níveis, $\alpha = 1,682$.

Uma revisão da literatura sobre a composição de meios basais para o cultivo de microalgas foi feita a fim de determinarem-se os níveis de concentração utilizados para cada nutriente. Para padronização, foram selecionados apenas meios cujo conteúdo de nitrogênio e fósforo se encontrassem unicamente na forma de íons NO_3^- e PO_4^{3-} , respectivamente.

Os meios para crescimento autotrófico de microalgas investigados estão apresentados na Tabela 1, juntamente com suas respectivas concentrações de NPK e organismos utilizados.

Tabela 1 – Concentração de NPK em meios para crescimento autotrófico de microalgas.

Meio	Microalga	[N] (mM)	[P] (mM)	[K] (mM)	Referência
18-modificado	52 microalgas verdes e azuis	17,65	0,69	1,38	(INTHORN <i>et al.</i> , 2002)
Bold's	<i>Chlorella vulgaris</i>	2,94	1,72	2,70	(LAM; LEE, 2012)
ALGAL N-otimizado	<i>Nannochloropsis gaditana</i>	11,30	0,16	11,30	(CAMACHO-RODRÍGUEZ <i>et al.</i> , 2013, 2015)
Allen	<i>Chlorella</i> sp.	17,65	0,29	0,29	(RYU; OH; KIM, 2009)
BG-11	178 Cianobactérias	17,65	0,18	0,35	(RIPPKA <i>et al.</i> , 1979)
F-Si	<i>Cyclotella nana</i> & <i>Detonula confervacea</i>	5,88	0,06	0,00	(GUILLARD; RYTHER, 1962 <i>apud</i> WANG <i>et al.</i> , 2014)
SE*	<i>Chlorella</i> sp.	2,94	1,61	1,94	(CHENG <i>et al.</i> , 2013)
BG-11 otimizado	<i>Chlorella Sorokokiniana</i>	16,80	0,30	0,60	(KANAGA <i>et al.</i> , 2016)
F/2 modificado	<i>Scenedesmus</i> sp.	10,00	0,15	0,15	(TAN; LIN, 2011)
SK	<i>Chlorella Sorokokiniana</i>	14,71	9,19	23,89	(OGBONNA; TANAKA, 1998)

Fonte: Elaborada pelo autor.

Como indicado na Tabela 1, a faixa de concentrações de macronutrientes utilizados na literatura é ampla. Para explorar o efeito desses nutrientes ao longo dessa ampla faixa, as médias das concentrações de cada elemento foram escolhidas como pontos centrais, e os valores mais baixos foram tomados como pontos axiais inferiores. Todas as outras concentrações foram encontradas a partir desses dois valores, de acordo com seus respectivos códigos. Os códigos e valores reais para cada ensaio estão mostrados na Tabela 2.

Tabela 2 – Códigos e concentrações de NPK em DCCR.

Tratamento	N (mM)		P (mM)		K (mM)	
	Nível	Concentração	Nível	Concentração	Nível	Concentração
1	-1	6,55	-1	0,62	-1	0,93
2	1	17,0	-1	0,62	-1	0,93
3	-1	6,55	1	2,25	-1	0,93
4	1	17,0	1	2,25	-1	0,93
5	-1	6,55	-1	0,62	1	3,23
6	1	17,0	-1	0,62	1	3,23
7	-1	6,55	1	2,25	1	3,23
8	1	17,0	1	2,25	1	3,23
9	0	11,8	0	1,43	-1.682	0,15
10	0	11,8	0	1,43	1.682	4,00
11	0	11,8	-1.682	0,06	0	2,08
12	0	11,8	1.682	2,81	0	2,08
13	-1.682	3,00	0	1,43	0	2,08
14	1.682	20,5	0	1,43	0	2,08
15	0	11,8	0	1,43	0	2,08
16	0	11,8	0	1,43	0	2,08
17	0	11,8	0	1,43	0	2,08

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.4 Obtenção e análise dos dados experimentais

Os 17 ensaios foram preparados em ordem aleatória, combinando-se diferentes volumes de soluções estoque para obter as composições estipuladas pelo planejamento. Após mistura, o pH foi ajustado para 7,5 com o uso de pHmetro (Modelo DM-22, Digimed, Campo Grande, MS). Os volumes foram aferidos para 150 mL, transferidos para frascos Erlenmeyers com capacidade de 250 mL e esterilizados em autoclave. Os ensaios foram inoculados com 7,5 mL (5 %) do pré-inóculo de *C. Sorokiniana*, cultivado por duas semanas, e incubados por 10 dias em shaker (Modelo NT 715, Novatecnica, Piracicaba, SP) a 180 r.p.m e 26 ± 1 °C. Uma lâmpada fluorescente branca de 34 W foi instalada sobre o vidro do shaker e mantida ligada durante todo o tempo de cultivo. A intensidade luminosa nas paredes dos frascos foi medida com uso de luxímetro digital (Modelo LD-400, Instrutherm, São Paulo, SP) e mantida a $2,08 \pm 0,06$ klux.

A variável resposta foi obtida em concentração de biomassa, obtida indiretamente a partir dos valores de densidade óptica coletados ao final do cultivo. O software de estatística Minitab 17

(Minitab Inc., PA, USA) foi utilizado na computação dos coeficientes e ajuste dos dados a um modelo quadrático, cuja forma genérica é dada por (MONTGOMERY; RUNGER; HUBELE, 2009):

$$Y = \beta_0 + \sum_{j=1}^k \beta_j x_j + \sum_{i < j} \sum \beta_{ij} x_i x_j + \sum_{j=1}^k \sum \beta_{jj} x_j^2 + \varepsilon \quad (1)$$

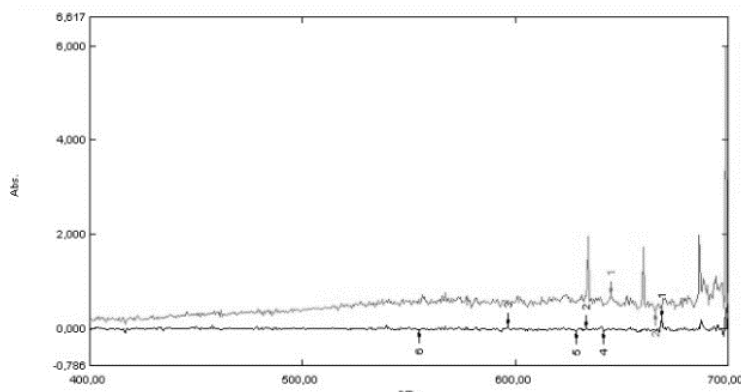
Onde β_j , β_{ij} e β_{jj} são os coeficientes dos fatores lineares x_i , da interação entre fatores lineares x_i, x_j , e dos fatores quadráticos x_j^2 , respectivamente. β_0 é o intercepto e ε é o erro associado ao modelo. As superfícies de respostas e demais representações gráficas foram geradas utilizando o mesmo software.

5 Resultados e discussão

5.1 Validação de método indireto de quantificação de biomassa

O padrão das varreduras realizadas sobre a amostra de cultivo pode ser observado na Figura 6. A leitura indica que os valores de absorbância aumentam gradativamente com o comprimento de onda, mas se mantém relativamente constante a partir de cerca de 560 nm. Como não foram identificados picos de absorção molecular, escolheu-se o comprimento de 600 nm para medição das amostras, por se tratar de um comprimento de onda clássico de medição de microrganismos diversos.

Figura 6 – Varredura de absorbância de *C. sorokiniana* entre 400 e 700 nm. As curvas inferior e superior são referentes ao meio mineral (branco) e ao cultivo algal, respectivamente.

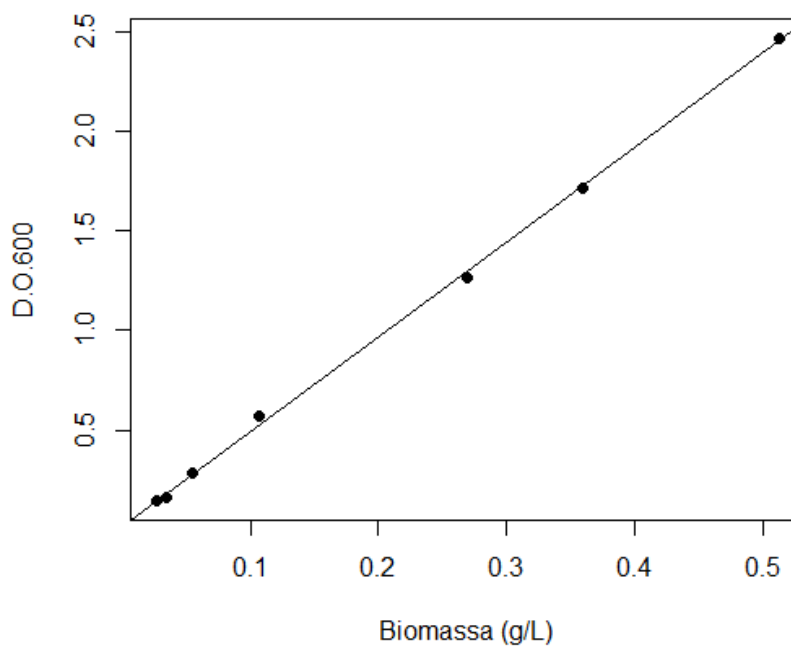


Fonte: Output espectrômetro UV-VIS-NIR (Modelo UV-3600, Shimadzu, Barueri, SP).

Os finos picos da Figura 6 foram observados em pontos aleatórios do espectro em outras varreduras, sugerindo a presença de particulados sólidos em suspensão. De fato, partículas verdes de tamanhos variados foram observadas em suspensão em grande parte dos cultivos. Essas observações demonstram uma ligeira limitação da técnica de espectrofotometria na análise e quantificação dessas microalgas, o que buscou ser contornado por meio de metódica homogeneização dos cultivos antes de cada medição e transferência entre frascos, bem como da interpretação crítica das medições realizadas.

A curva de padronização da relação entre densidade óptica a 600 nm ($D.O._{600}$) e biomassa é apresentada na Figura 7.

Figura 7 – Correlação entre D.O.₆₀₀ e concentração mássica algal, em g.L⁻¹.



Fonte: Elaborada pelo autor.

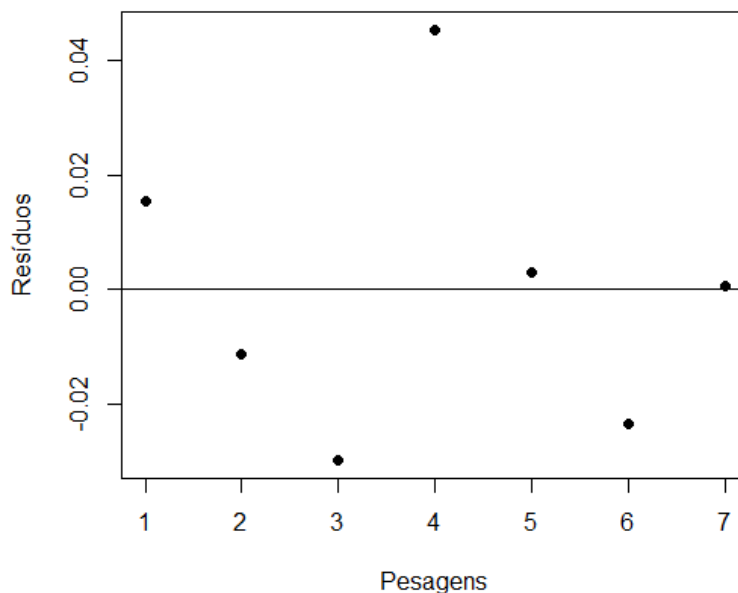
A regressão linear dos pontos apresentados na Figura 7 resulta na equação:

$$B = 4,742 \times D + 0,020 \quad (2)$$

Em que B é a concentração mássica de microalgas e D é a densidade óptica correspondente.

O coeficiente de correlação do modelo gerado é $R^2 = 0,9992$ e os resíduos são aleatoriamente distribuídos (Figura 8), o que indica que o modelo apresentado na equação (2) descreve bem os pontos experimentais. Portanto, a análise estatística dos dados valida o método de predição de biomassa algal a partir de valores de D.O. dentro do espaço amostral investigado.

Figura 8 – Gráfico da distância entre os pontos experimentais e o modelo (resíduos).



Fonte: Elaborada pelo autor.

5.2 Análise dos dados experimentais

As densidades ópticas medidas ao final do cultivo, bem como as respectivas concentrações mássicas calculadas a partir da equação (2), são apresentadas na Tabela 3. Um dos pontos centrais foi perdido ao longo do experimento, razão pela qual apenas dois deles são mostrados.

Em condições de cultivo semelhantes às deste trabalho, WANG *et al.* (2014) obtiveram um máximo de $1,09 \text{ g.L}^{-1}$ de biomassa de *Chlorella pyrenoidosa* em 4 dias, proporcionalmente inferior aos melhores resultados da Tabela 3. Em condições otimizadas de transferência de CO_2 , RYU *et al.* (2009) obtiveram $2,02 \text{ g.L}^{-1}$ de *Chlorella* sp. em 6 dias. Cultivos de *C. vulgaris* tiveram seus melhores resultados em torno de $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ em 12 dias (LAM & LEE, 2012). Os valores de biomassa obtidos demonstram, portanto, uma alta produtividade e alto potencial comercial da cepa de *Chlorella sorokiniana* em estudo.

Tabela 3 – Resultados experimentais de D.O.₆₀₀ e concentração de biomassa em DCCR.

Tratamento	D.O. ₆₀₀	Biomassa (g.L ⁻¹)
1	0,667	3,183
2	0,527	2,519
3	0,418	2,002
4	0,404	1,936
5	0,593	2,832
6	0,740	3,529
7	0,340	1,632
8	0,457	2,187
9	0,498	2,382
10	0,510	2,438
11	0,650	3,102
12	0,384	1,841
13	0,445	2,130
14	0,549	2,623
15	0,365	1,751
16	0,440	2,106

Fonte: Elaborada pelo autor.

A análise fatorial dos resultados experimentais sugere fortemente que o crescimento algal sofreu influência dos três nutrientes avaliados. Os coeficientes do modelo proposto na equação (1) e suas significâncias estatísticas são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 – Coeficientes ajustados para modelo quadrático e suas significâncias estatísticas.

Fator	Coeficiente	Erro Padrão	t	p	Estimativas por intervalo	
					-95 %	95 %
Intercepto	1,925923	0,144757	13,3046	1,12E-05	1.57172	2.28013
K (L)*	0,046591	0,055559	0,8386	0,433829	-0.08936	0.18254
P (L)*	-0,470614	0,055559	-8,4706	0,000148	-0.60656	-0.33467
N (L)*	0,098927	0,055559	1,7806	0,125277	-0.03702	0.23487
K (Q)*	0,176766	0,067457	2,6204	0,039563	0.01171	0.34183
P (Q)*	0,198562	0,067457	2,9435	0,025829	0.03350	0.36362
N (Q)*	0,165031	0,067457	2,4465	0,050031	-0.00003	0.33009
K (L) x P (L)*	-0,097211	0,072591	-1,3392	0,229017	-0.27484	0.08041
K (L) x N (L)*	0,247770	0,072591	3,4132	0,014262	0.07015	0.42539
P (L) x N (L)*	0,056904	0,072591	0,7839	0,462913	-0.12072	0.23453

Fonte: Elaborada pelo autor.

*L = Linear; Q = Quadrático.

A influência dos parâmetros destacados na Tabela 4 sobre a geração de biomassa possui alta evidência estatística ($p \leq 0,05$).

Apesar de a análise puramente estatística dos dados ter gerado alguns fatores com valor-p altos ($p > 0,1$), existem algumas considerações a serem feitas. A técnica de medição indireta de biomassa por espectrofotometria, mesmo que metodicamente realizada, se mostrou susceptível a variações de leitura, presumindo-se que fatores significativos possam ter sido penalizados pelas imprecisões das medidas. Sugere-se que esses erros tenham eliminado N (L) ($p = 0,13$). O experimento fatorial realizado por KANAGA *et al.* (2016) utilizando a mesma microalga deste trabalho, embora sob condições heterotróficas, obteve valores-p significativos para efeitos lineares e quadráticos de fósforo e nitrogênio, sugerindo que N(L) pertença de fato ao modelo. Embora o coeficiente da interação entre P e N também tenha apresentado baixa significância no experimento KANAGA *et al.* (2016), CAMACHO-RODRÍGUEZ *et al.* (2013) demonstraram a forte influência que a razão N/P tem sobre o crescimento de *Nannochloropsis gaditana*, resultado semelhante obtido para o crescimento de *Scenedesmus rubescens* por TAN & LIN (2011). Optou-se, então, pela inclusão de todos os fatores no modelo quadrático e, com o auxílio da Tabela 4, o modelo da equação (1) pode ser reescrito como:

$$Y = 1,93 + 0,05K + 0,18K^2 - 0,47P + 0,20P^2 + 0,10N + 0,17N^2 - 0,10KP + 0,25KN + 0,06PN \quad (3)$$

No qual Y é a concentração de biomassa, em g.L⁻¹, e N, P e K são os valores codificados de concentrações de nitrogênio, fósforo e potássio, respectivamente.

A análise de variância do modelo se encontra na Tabela 5.

Tabela 5 – Análise de variância e teste F para o modelo quadrático.

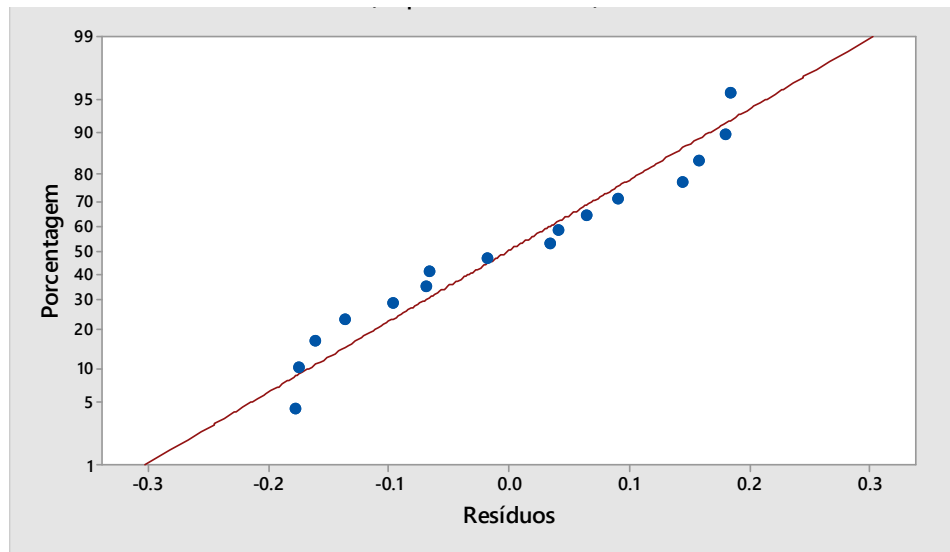
Fonte Variação	Graus Liberdade	Soma Quadrática	Média Quadrática	F _{Calculado}	<i>p</i>
Regressão	9	4.27929	0.47548	11.28	0.004
Resíduos	6	0.25302	0.04217		
Falta de ajuste	5	0.18977	0.03795		
Erro puro	1	0.06324	0.06324		
Total	15	4.53231			

Fonte: Elaborada pelo autor.

A análise de variância resulta em um F calculado de 11,28 com graus de liberdade 9 e 6, quase 3 vezes maior que o tabelado, $F_{(0.05, 9, 6)} = 4,10$. A análise de variância mostra que o modelo quadrático se ajusta bem aos dados experimentais, com 99,96 % de confiança.

O gráfico da distribuição normal dos resíduos é apresentado na Figura 9.

Figura 9 – Gráfico da distribuição normal de resíduos do modelo quadrático.

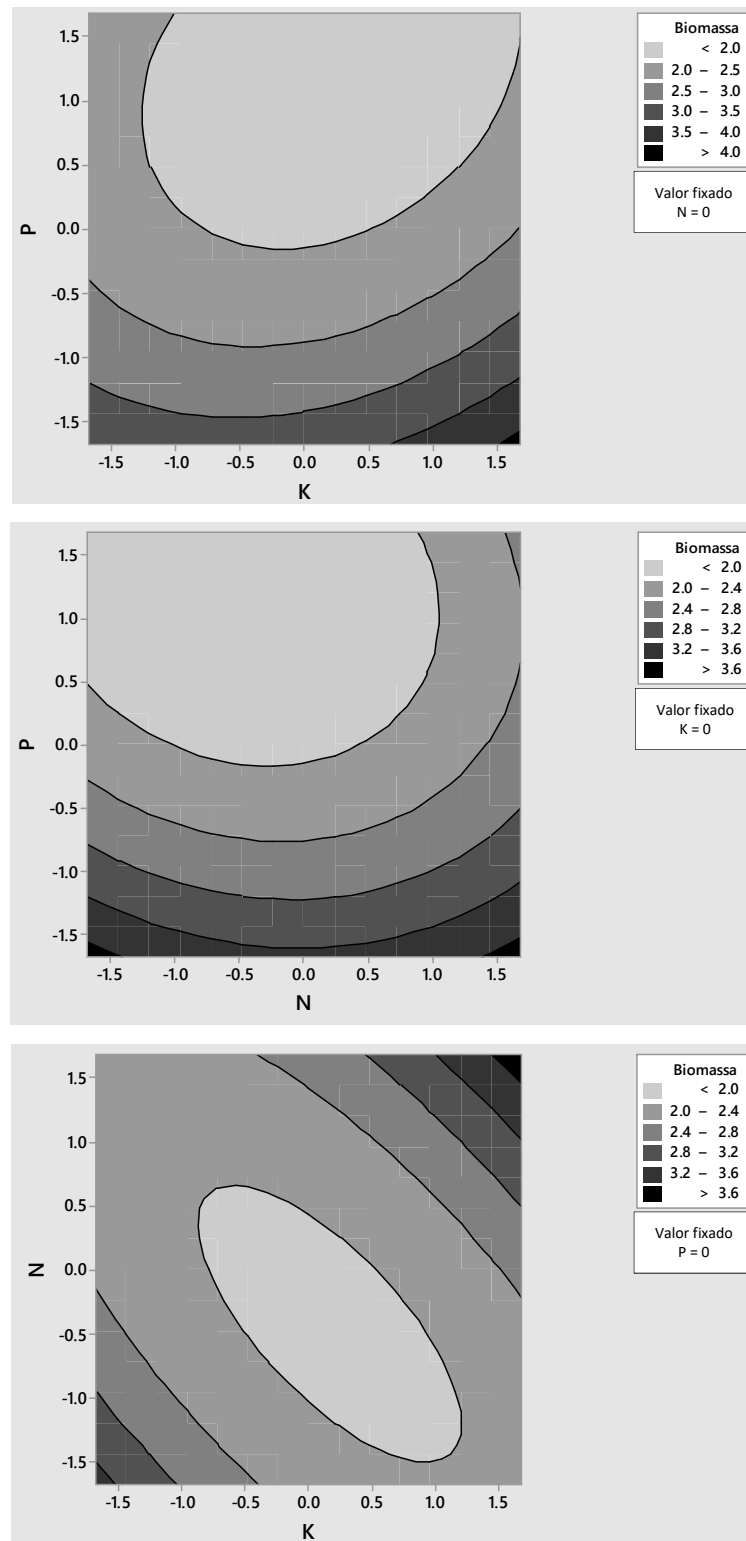


Fonte: Elaborada pelo autor.

O gráfico da Figura 9 mostra a distância dos pontos experimentais em relação ao modelo e indica uma distribuição aleatória dos resíduos. Esse comportamento, associado à alta significância estatística do modelo, valida a regressão realizada.

Os diagramas de contorno do modelo apresentado na equação (3) são exibidos na Figura 10. As superfícies mostram a variação do crescimento algal em função das concentrações dos macronutrientes estudados, tomados de dois a dois, com o terceiro parâmetro fixado em seu valor central.

Figura 10 – Diagramas de contorno da concentração de biomassa sobre os planos P:K, P:N e N:K.



Fonte: Elaborada pelo autor.

De acordo com os gráficos P:K e P:N, da Figura 10, a produção máxima de biomassa tende a aumentar a valores menores que -1,682. Entretanto, esses valores resultam em concentrações reais inferiores a zero ou fora do espaço amostral investigado, o que não tem significado prático. Em contrapartida, sabe-se que o crescimento microbiano requer fósforo na síntese de ácidos nucleicos, ATP, fosfolipídios constituintes das membranas celulares e em todos os processos mediados por fosforilações enzimáticas, tornando impossível o crescimento em meio completamente isento desse mineral (BENAVENTE-VALDÉS *et al.*, 2016). Como pode ser observado na Tabela 1, ter-se referenciado em OGBONNA & TANAKA (1998), que utilizam uma concentração de fósforo 16 vezes maior que a média dos outros trabalhos, foi a principal razão para a escolha das altas concentrações utilizadas. Curiosamente, a cepa de *C. sorokiniana* utilizada nesses cultivos não parece sofrer inibição pela alta concentração de fósforo, como aparentemente acontece com as deste trabalho, atingindo uma biomassa acima de 3 g.L⁻¹ em apenas 100 horas. Vale ressaltar, porém, que as condições de cultivo aplicadas pelos autores diferem das condições descritas neste trabalho, e podem ter influenciado positivamente o crescimento. Sugere-se, ainda, que as características metabólicas das linhagens de *C. sorokiniana* utilizadas sejam significativamente diferentes entre si. Além disso, o gênero *Chlorella* sofreu e vem sofrendo diversas alterações taxonômicas desde OGBONNA & TANAKA (1998), como revisado nesse trabalho, o que não descarta a possibilidade de que os autores tenham usado uma espécie diferente da relatada. Os outros trabalhos apresentados na Tabela 1 confirmam que a concentração de fósforo em OGBONNA & TANAKA (1998) é atipicamente alta. Ainda, as concentrações de fósforo utilizadas para o crescimento de uma microalga semelhante a *Scenedesmus rubescens* no planejamento fatorial 3 x 3 de TAN & LIN (2011) foram de 0,02; 0,05 e 0,15 mM e, nessa faixa, o aumento da concentração favoreceu o crescimento algal. O valor ótimo para a produção de biomassa a partir de *Chlorella pyrenoidosa* por (WANG *et al.*, 2014) foi de 0,05 mM. A partir da análise dos resultados e comparação com a literatura, sugere-se que a faixa de concentração de fósforo ideal para a produção de biomassa da microalga utilizada neste trabalho se encontre em torno do ponto axial inferior de -1.682 (0,06 mM), e tanto concentrações muito mais altas quanto aquelas próximas a zero levam à inibição do crescimento.

O gráfico P:N da Figura 10 mostra que, a uma concentração fixa de potássio e em concentrações baixas de fósforo, o rendimento de biomassa varia pouco em função das

concentrações de nitrogênio estudadas. O mesmo pode ser observado para o potássio, de acordo com o gráfico P:K da mesma figura. Resta, então, encontrar a razão ideal entre as concentrações de potássio e nitrogênio. O gráfico N:K sugere que o planejamento não foi capaz de mapear a região de máxima produtividade em relação a esses dois nutrientes, mas indica que as regiões compreendendo os níveis superiores e inferiores desses parâmetros apresentam inclinações positivas que apontam para valores de maior produtividade. Os níveis inferiores, porém, se encontram muito próximos a zero e aparentam ser mera extrapolação matemática do modelo, não apresentando significado prático. Valores otimizados de concentração de nitrogênio para o crescimento de algas verdes são descritos entre 6 e 17 mM (KANAGA *et al.*, 2016; TAN; LIN, 2011; WANG *et al.*, 2014), sugerindo que a escolha da faixa de nitrogênio estudada foi razoável. Todavia, os resultados encontrados mostram que uma faixa mais restrita e próxima às concentrações mais altas seria uma melhor escolha.

Pouco tem sido feito para se compreender os mecanismos de atuação de K no metabolismo celular de microalgas, mas sabe-se que esse nutriente está associado ao crescimento massivo de algas em corpos hídricos eutrofizados, juntamente com N e P, além de já ter sido mostrado que meios de cultivo à base de fertilizantes de NPK influenciam fortemente o crescimento autotrófico de microalgas (BANERJEE; GURIA; MAITI, 2016; CAMACHO-RODRÍGUEZ *et al.*, 2013). Contudo, muitos desses mecanismos já foram elucidados para plantas superiores, organismos evolutivamente próximos às microalgas eucarióticas que podem ser usados para projeções de estudos futuros sobre esses microrganismos. K^+ é o cátion mais abundante em plantas superiores, está presente no citoplasma e nos cloroplastos, e regula diversas enzimas alostericamente (MARSCHNER, 1995). Esse cátion influencia diretamente o uso eficiente do nitrogênio presente no meio, uma vez que regula sua entrada na célula vegetal e ativa a nitrato redutase (MARSCHNER, 1995). Esse mecanismo explicaria a interdependência de N(L).K(L) encontrada no modelo, uma vez que, mesmo a concentrações satisfatórias de nitrogênio, a carência de potássio levaria a um mau aproveitamento desse mineral. Essa observação é corroborada por SILVA *et al.* (2011), que relataram que a atividade da nitrato redutase em milho sofre influência do fator de interação entre as concentrações de N e K, na melhor proporção de 2,5:1, embora nenhum dos nutrientes tenha apresentado efeito isoladamente. VIANA & KIEHL (2010), por outro lado, não

observaram influência significativa da concentração de potássio sobre a mesma enzima em trigo, sugerindo que talvez esses mecanismos não sejam unanimemente difundidos.

Em células de fígado de porco, íons potássio foram associados à ativação da enzima frutose-1,6-bisfosfatase, que converte frutose-1,6-bisfosfato em frutose-6-fosfato (VILLERET *et al.*, 1995). Como foi discutido na revisão deste trabalho, frutose-6-fosfato é um metabólito central que pode participar de vias anabólicas ou ser decomposto em trioses fosfato para translocação de fotossintetatos, portanto, frutose-1,6-bisfosfatase é uma enzima chave na coordenação do fluxo de carbono em organismos fotossintetizantes. Embora essa enzima tenha sido isolada de um organismo relativamente distante evolutivamente, isozimas citosólicas de frutose-1,6-bisfosfatase em plantas superiores e em ao menos uma microalga verde já foram descritas como apresentando características semelhantes àsquelas de organismos heterotróficos, *i.e.* alta afinidade por substrato, inibição por AMP e frutose-2,6-bisfosfato e pH ótimo neutro (BOTHÁ; TURPIN, 1990). Como o transporte de carboidratos fotossintetizados para fora dos cloroplastos é regulado por essa enzima, essa observação deixa em aberto a possibilidade de que íons K^+ também estejam relacionados a regulações sistêmicas que envolvem taxas de fotossíntese e respiração celular em *C. sorokiniana*. Esse mecanismo certamente explicaria a influência de K(Q) sobre o crescimento, de acordo com o modelo construído.

Os dados sugerem que o ponto ótimo de produção de biomassa se encontra a concentrações de potássio mais altas que as estudadas, mas deve-se considerar que esses íons podem ser tóxicos para algumas microalgas em determinadas concentrações (LEHMAN, 1976).

De acordo com o modelo gerado, a condição ótima de crescimento seria de 20,5 mM de nitrogênio, 0,06 mM de fósforo e 4,00 mM de potássio, com um rendimento teórico de 5,3 g.L⁻¹ de biomassa. Observa-se, porém, que as superfícies obtidas pelo modelo (Figura 10) não convergem a pontos ótimos de cultivo, majoritariamente devido à ampla faixa de concentrações investigadas. Esse resultado gera um modelo que, embora bem ajustado aos dados experimentais, pode perder informações importantes contidas entre os níveis das variáveis, e as respostas calculadas por ele podem não ser tão precisas. Embora o modelo mostre que os pontos ótimos de concentração estejam fora do campo amostral investigado, ele também indica em qual direção esses pontos se encontram.

6 Conclusão

As microalgas são organismos de ampla aplicação comercial, embora muitas ainda em potencial, principalmente em decorrência das amplas rotas metabólicas que possuem e, portanto, dos amplos processos que catalisam e dos diversos insumos que produzem. Algumas espécies de microalgas, como *Chlorella sorokiniana*, são capazes de ajustar seu metabolismo para crescer fotoautotroficamente, captando energia luminosa, heterotroficamente, no escuro, ou mixotroficamente, utilizando luz, CO₂ e fontes de carbono simultaneamente. Cada tipo de crescimento leva à produção de compostos e estruturas diferentes, permitindo a combinação de diferentes processos à produção dos mais diversos insumos. O condicionamento dessa produção, porém, depende fortemente das condições de cultivo, sendo a composição do meio de cultura um parâmetro crucial para a condução bem sucedida do processo. Em cultivos autotróficos, os nutrientes requeridos em maior concentração são nitrogênio, fósforo e potássio (NPK), razão do interesse em estudá-los neste trabalho.

A investigação dos efeitos e interações entre esses nutrientes sobre o crescimento da microalga verde *Chlorella sorokiniana* confirmou que o rendimento de biomassa é influenciado pela concentração desses três compostos no meio. Os dados coletados confirmam com grande confiança ($p \leq 0.05$) que o crescimento é diretamente depende de K(Q), N(Q), P(Q) e da interação N(L).K(L), e inversamente dependente de P(L), onde Q e L são fatores quadráticos e lineares, respectivamente. Dentro do espaço amostral experimentado, um rendimento teórico máximo de 5.3 g.L⁻¹ é obtido em cultivos com 20,5 mM de nitrogênio, 0,06 mM de fósforo e 4,00 mM de potássio. Contudo, o modelo apresentado não converge para pontos de máximo, mas indica onde esses pontos se encontram. Propõe-se, então, uma reformulação do planejamento baseando-se na escolha de faixas de concentração mais curtas e em regiões indicada pelos dados, para otimização da produtividade e elaboração de um modelo mais preciso.

7 Trabalhos futuros

De acordo com as informações levantadas e discutidas, propõe-se um novo experimento para que se encontrem os valores ótimos de concentração de NPK no meio de cultivo. As concentrações reformuladas são apresentadas na Tabela 6.

Tabela 6 – Valores sugeridos para novo planejamento em DCCR

	-1,682	-1	0	1	1.682
N	9,00	11,4	15,0	18,6	21,0
P	0,01	0,21	0,50	0,79	0,99
K	2,50	3,11	4,00	4,89	5,50

Fonte: Elaborada pelo autor.

Acredita-se que essas concentrações gerarão uma superfície de resposta focada nas regiões ótimas de cultivo e permitirão a formulação de um modelo convergente e mais preciso, que poderá ser utilizado na otimização do crescimento algal e minimização dos custos de elaboração do meio.

8 Referências bibliográficas

- APPEL, J.; SCHULZ, R. Hydrogen metabolism in organisms with oxygenic photosynthesis : hydrogenases as important regulatory devices for a proper redox poising ? **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 47, p. 1–11, 1998.
- BANERJEE, A.; GURIA, C.; MAITI, S. K. Fertilizer assisted optimal cultivation of microalgae using response surface method and genetic algorithm for biofuel feedstock. **Energy**, v. 115, p. 1272–1290, 2016.
- BASHAN, Y. *et al.* *Chlorella sorokiniana* (formerly *C. vulgaris*) UTEX 2714, a non-thermotolerant microalga useful for biotechnological applications and as a reference strain. **Journal of Applied Phycology**, v. 28, p. 113–121, 2016.
- BELL, P. R.; HEMSLEY, A. R. Green Plants: Their Origin and Diversity. 2nd ed. Cambridge: **Cambridge University Press**, 2000. 349 p.
- BENAVENTE-VALDÉS, J. R. *et al.* Strategies to enhance the production of photosynthetic pigments and lipids in Chlorophyceae species. **Biotechnology Reports**, v. 10, p. 117–125, 2016.
- BENEMANN, J. R. *et al.* The controlled eutrophication process: Using microalgae for CO₂ utilization and agricultural fertilizer recycling, 2002. Disponível em: <http://www.csupomona.edu/~biodiesel/ref/algae_salton_sea.pdf>
- BENETTO, E. *et al.* Life cycle assessment of fossil CO₂ emissions reduction scenarios in coal-biomass based electricity production. **Energy Conversion and Management**, v. 45, p. 3053–3074, 2004.
- BIRESSELIOGLU, M. E.; YELKENCI, T. Scrutinizing the causality relationships between prices, production and consumption of fossil fuels: A panel data approach. **Energy**, v. 102, p. 44–53, 2016.
- BOCK, C.; KRIENITZ, L.; PROSCHOLD, T. Taxonomic reassessment of the genus *Chlorella* (Trebouxiophyceae) using molecular signatures (barcodes), including description of seven new species. **Fottea**, v. 11, n. 2, p. 293–312, 2011.
- BOTHA, F. C.; TURPIN, D. H. Fructose 1,6-Bisphosphatase in the Green Alga *Selenastrum minutum*. **Plant Physiology**, v. 93, p. 1460–1465, 1990.
- BOYLE, N. R.; MORGAN, J. A. Flux balance analysis of primary metabolism in *Chlamydomonas reinhardtii*. **BMC Systems Biology**, v. 3, n. 9, 2009.
- CAMACHO-RODRÍGUEZ, J. *et al.* A low-cost culture medium for the production of *Nannochloropsis gaditana* biomass optimized for aquaculture. **Bioresource Technology**, v. 144, p. 57–66, 2013.
- CAMACHO-RODRÍGUEZ, J. *et al.* Genetic algorithm for the medium optimization of the microalga *Nannochloropsis gaditana* cultured to aquaculture. **Bioresource Technology**, v. 177, p. 102–109, 2015.

- CARDOSO, A. DA S.; VIEIRA, G. E. G.; MARQUES, A. K. O uso de microalgas para a obtenção de biocombustíveis. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 9, n. 4, p. 542–549, 2011.
- CHEAH, W. Y. *et al.* Cultivation in wastewaters for energy : A microalgae platform. **Applied Energy**, v. 179, p. 609–625, 2016.
- CHEIRSILP, B.; TORPEE, S. Bioresource Technology Enhanced growth and lipid production of microalgae under mixotrophic culture condition: Effect of light intensity, glucose concentration and fed-batch cultivation. **Bioresource Technology**, v. 110, p. 510–516, 2012.
- CHENG, J. *et al.* Improving CO₂ fixation efficiency by optimizing *Chlorella* PY-ZU1 culture conditions in sequential bioreactors. **Bioresource Technology**, v. 144, p. 321–327, 2013.
- CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, v. 25, p. 294–306, 2007.
- COHEN, Y.; PADAN, E.; SHILO, M. Facultative anoxygenic photosynthesis in the Cyanobacterium *Oscillatoria limnetica*. **Journal of Bacteriology**, v. 123, n. 3, p. 855–861, 1975.
- CORDERO, B. *et al.* Astaxanthin production from the green alga *Haematococcus pluvialis* with different stress conditions. **Biotechnology Letters**, v. 18, n. 2, p. 213–218, 1996.
- CORDERO, B. F. *et al.* Enhancement of lutein production in *Chlorella sorokiniana* (chlorophyta) by improvement of culture conditions and random mutagenesis. **Marine Drugs**, v. 9, p. 1607–1624, 2011.
- DE-BASHAN, L. E. *et al.* *Chlorella sorokiniana* UTEX 2805, a heat and intense, sunlight-tolerant microalga with potential for removing ammonium from wastewater. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 11, p. 4980–4989, 2008.
- DERNER, R. B. *et al.* Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural**, v. 36, n. 6, p. 1959–1967, 2006.
- DEVI, M. P.; SWAMY, Y. V; MOHAN, S. V. Bioresource Technology Nutritional mode influences lipid accumulation in microalgae with the function of carbon sequestration and nutrient supplementation. **Bioresource Technology**, v. 142, p. 278–286, 2013.
- FENG, P. *et al.* Lipid accumulation and growth characteristics of *Chlorella zofingiensis* under different nitrate and phosphate concentrations. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 114, n. 4, p. 405–410, 2012.
- GANI, D.; KRUMBEIN, W. E. Growth characteristics of non-heterocystous cyanobacterium *Plectonema boryanum* with N₂ as nitrogen source. **Archives of Microbiology**, v. 145, p. 259–265, 1986.
- GILBERT-LÓPEZ, B. *et al.* Downstream processing of *Isochrysis galbana*: a step towards microalgal biorefinery. **Green Chemistry**, v. 17, p. 4599–4609, 2015.
- GUILLARD, R. R.; RYTHER, J. H. Studies of marine planktonic diatoms I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* (cleve) Gran. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 8, p. 229–239, 1962.

- HELLEBUST, J. A. Glucose uptake by *Cyclotella cryptica*: dark induction and light inactivation of transport system. **Journal of Phycology**, v. 7, p. 345–349, 1971.
- HENA, S.; FATIMAH, S.; TABASSUM, S. Cultivation of algae consortium in a dairy farm wastewater for biodiesel production. **Water Resources and Industry**, v. 10, p. 1–14, 2015.
- HUSS, V. A. R. *et al.* Biochemical taxonomy and molecular phylogeny of the genus *Chlorella*: sensu lato (Chlorophyta). **Journal of Phycology**, v. 35, p. 587–598, 1999.
- INTHORN, D. *et al.* Sorption of mercury, cadmium and lead by microalgae. **ScienceAsia**, v. 28, p. 253–261, 2002.
- KAJIWARA, S. *et al.* Design of the bioreactor for carbon dioxide fixation by *Synechococcus* PCC7942. **Energy Conversion and Management**, v. 38, p. 529–532, 1997.
- KANAGA, K. *et al.* Multi-objective optimization of media nutrients for enhanced production of algae biomass and fatty acid biosynthesis from *Chlorella pyrenoidosa* NCIM 2738. **Bioresource Technology**, v. 200, p. 940–950, 2016.
- KESSLER, E.; HUSS, V. A. R. Comparative physiology and biochemistry and taxonomic assignment of the *Chlorella* (Chlorophyceae) strains of the culture collection of the University of Texas at Austin. **J. Phycol.**, v. 28, p. 550–553, 1992.
- KOZŁOWSKA-SZERENOS, B.; ZIELIŃSKI, P.; MALESZEWSKI, S. Involvement of glycolate metabolism in acclimation of *Chlorella vulgaris* cultures to low phosphate supply. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 38, n. 9, p. 727–734, 2000.
- KULASOORIYA, S. A.; LANG, N. J.; FAY, P. The heterocysts of blue-green algae III. Differentiation and nitrogenase activity. **Proceedings of the Royal Society of London B**, v. 181, p. 199–209, 1972.
- LAM, M. K.; LEE, K. T. Potential of using organic fertilizer to cultivate *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. **Applied Energy**, v. 94, p. 303–308, 2012.
- LEE, R. E. Phycology. 4th ed. Cambridge: **Cambridge University Press**, 2008. 547 p.
- LEE, Y. *et al.* Mixotrophic growth of *Chlorella sorokiniana* in outdoor enclosed photobioreactor. **Journal of Applied Phycology**, v. 8, p. 163–169, 1996.
- LEESING, R.; SIHAWONG, S.; DUANGKEAW, N. Producing of microalgal lipid by isolated microalgae under photoautotrophic and heterotrophic cultivations. **APCBEE Procedia**, v. 7, p. 48–53, 2013.
- LEHMAN, J. T. Ecological periodicity and nutritional studies on *Dinobryon* Ehrenb.: Seasonal and the phosphate toxicity problem. **Limnology and Oceanography**, v. 21, n. 5, p. 646–658 September, 1976.
- LI, R.; WATANABE, M.; WATANABE, M. M. Akinete formation in planktonic *Anabaena* spp. (Cyanobacteria) by treatment with low temperatura. **Journal of Phycology**, v. 33, p. 576–584, 1997.

- LI, T. *et al.* Assessment of photosynthesis regulation in mixotrophically cultured microalga *Chlorella sorokiniana*. **Algal Research**, v. 19, p. 30–38, 2016.
- LI, Y. *et al.* Comparison of autotrophic and mixotrophic cultivation of green microalgal for biodiesel production. **Energy Procedia**, v. 52, p. 371–376, 2014.
- LIN, Q.; LIN, J. Bioresource technology effects of nitrogen source and concentration on biomass and oil production of a *Scenedesmus rubescens* like microalga. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 1615–1621, 2011.
- LÔBO, I. P.; FERREIRA, S. L. C. Biodiesel: Parâmetros de qualidade e métodos analíticos. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1596–1608, 2009.
- LOPES, E. J. Sequestro de dióxido de carbono em fotobiorreatores. 2007. 135 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Campinas, São Paulo. 2007.
- LU, S. *et al.* Phospholipid Metabolism in an Industry Microalga *Chlorella sorokiniana*: The Impact of Inoculum Sizes. **PLoS ONE**, v. 8, n. 8, 2013.
- MAEDA, K. *et al.* CO₂ fixation from the flue gas on coal-fired thermal power plant by microalgae. **Energy Conversion and Management**, v. 36, n. 6–9, p. 717–720, 1995.
- MARSCHNER, H. Functions of mineral nutrients: Macronutrients. In: **Mineral Nutrition of Higher Plants**. 2. ed. New York: Academic Press, 1995. p. 229–312.
- MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, p. 217–232, 2010.
- MONTGOMERY, D. C.; RUNGER, G. C.; HUBELE, N. F. Engineering statistics. 5th ed. [s.l.] **Wiley**, 2011. 515 p.
- MUKHERJEE, C. *et al.* Parboiled rice effluent: A wastewater niche for microalgae and cyanobacteria with growth coupled to comprehensive remediation and phosphorus biofertilization. **Algal Research**, v. 19, p. 225–236, 2016.
- MUÑOZ, R.; GUIEYSSE, B. Algal–bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: A review. **Water Research**, v. 40, p. 2799–2815, 2006.
- YOSHIHARA, K.; HIROYASU, N.; KAORU, E.; KAZUMASA, H.; KAZUHISA, M. Biological elimination of nitric oxide and carbon dioxide from flue gas by marine microalga NOA-13 Cultivated in a long tubular photobioreactor. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 82, n. 4, p. 351–354, 1996.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. Lehninger Princípios de bioquímica. 2. ed. São Paulo: **Sarvier**, 2002. 997 p.
- NORTHOFF, E. **2050: A third more mouths to feed**. Disponível em: <<http://www.fao.org/news/story/en/item/35571/icode/>>. Acesso em: 23 nov. 2016.

- OGBONNA, J. C.; TANAKA, H. Cyclic autotrophic/heterotrophic cultivation of photosynthetic cells: a method of achieving continuous cell growth under light/dark cycles. **Biore**, v. 65, p. 65–72, 1998.
- ONO, E.; CUELLO, J. L. Feasibility assessment of microalgal carbon dioxide sequestration technology with photobioreactor and solar collector. **Biosystems Engineering**, v. 95, n. 4, p. 597–606, 2006.
- PHILIPPIS, R. DE; VINCENZINI, M. Exocellular polysaccharides from cyanobacteria and their possible applications. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 22, p. 151–175, 1998.
- RIPPKA, R. *et al.* Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of Cyanobacteria. **Journal of General Microbiology**1, v. 111, p. 1–61, 1979.
- RYU, H. J.; OH, K. K.; KIM, Y. S. Optimization of the influential factors for the improvement of CO₂ utilization efficiency and CO₂ mass transfer rate. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 15, n. 4, p. 471–475, 2009.
- SAKAI, N. *et al.* *Chlorella* strains from hot spring tolerant to high temperature and high CO₂. **Energy Conversion and Management**, v. 36, p. 693–696, 1995.
- SCHÜTZ, K. *et al.* Cyanobacterial H₂ production – a comparative analysis. **Planta**, v. 218, p. 350–359, 2004.
- SHIHIRA, I.; KRAUSS, R. W. *Chlorella*. Physiology and taxonomy of forty-one isolates. [s.l.] University of Maryland, College Park, MD, USA, 1965.
- SILVA, S. M. DA *et al.* Atividade da enzima nitrato redutase em milho cultivado sob diferentes níveis de adubação nitrogenada e potássica. **Ciência Rural**, v. 41, n. 11, p. 1931–1937, 2011.
- SOROKIN, C. Tabular comparative data for the low-temperature and high-temperature strains of *Chlorella*. **Nature**, v. 184, p. 613–614, 1959.
- STAAL, M.; MEYSMAN, F. J. R.; STAL, L. J. Temperature excludes N₂-fixing heterocystous cyanobacteria in the tropical oceans. **Nature**, v. 425, p. 504–507, 2003.
- STAL, L. J.; KRUMBEIN, W. E. Oxygen protection of nitrogenase in the aerobically nitrogen fixing, non-heterocystous cyanobacterium *Oscillatoria* sp. **Archives of Microbiology**, v. 143, p. 72–76, 1985.
- TAN, Y.; LIN, J. Biomass production and fatty acid profile of a *Scenedesmus rubescens*-like microalga. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 21, p. 10131–10135, 2011.
- TISCHNER, R. Nitrate Uptake and Reduction in Plants. **Journal of Crop Improvement**, v. 15, n. 2, p. 53–95, 2006.
- TRIVEDI, J. *et al.* Algae based biorefinery – How to make sense? **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 47, p. 295–307, 2015.
- VASSILEV, S. V; VASSILEVA, C. G. Composition, properties and challenges of algae biomass for biofuel application: An overview. **Fuel**, v. 181, p. 1–33, 2016.

VIANA, E. M.; KIEHL, J. DE C. Doses de nitrogenio e potássio no crescimento do trigo. **Bragantia**, v. 69, n. 4, p. 975–982, 2010.

VILLERET, V. *et al.* Crystallographic evidence for the action of potassium, thallium, and lithium ions on fructose-1,6-bisphosphatase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, n. 19, p. 8916–20, 1995.

WANG, M. *et al.* Removal of nutrients from undiluted anaerobically treated piggery wastewater by improved microalgae. **Bioresource Technology**, v. 222, p. 130–138, 2016.

WANG, W. *et al.* Medium screening and optimization for photoautotrophic culture of *Chlorella pyrenoidosa* with high lipid productivity indoors and outdoors. **Bioresource Technology**, v. 170, p. 395–403, 2014.

WEARE, N. M.; BENEMANN, J. R. Nitrogenase activity and photosynthesis in *Plectonema boryanum*. **Journal of Bacteriology**, v. 119, n. 1, p. 258–265, 1974.

WEISSMAN, J. C. *et al.* Growth and production of thermophilic cyanobacteria in a simulated thermal mitigation process. **Bioresource Technology**, v. 65, p. 87–95, 1998.

YEN, H.; BRUNE, D. E. Anaerobic co-digestion of algal sludge and waste paper to produce methane. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 130–134, 2007.

ZEILER, K. G. *et al.* The use of microalgae for assimilation and utilization of carbon dioxide from fossil fuel-fired power plant flue gas. **Energy Conversion and Management**, v. 36, n. 6–9, p. 707–712, 1995.