

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CENTRO DE ENGENHARIAS E CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO “STRICTO SENSU”
ENGENHARIA QUÍMICA – NÍVEL DE MESTRADO

**MAXIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LIPÍDEOS E PIGMENTOS PELA
MICROALGA *DESMODESMUS* sp.**

TAINÁ MICHELLE DA CRUZ

TOLEDO – PARANÁ

2022

TAINÁ MICHELLE DA CRUZ

**MAXIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LIPÍDEOS E PIGMENTOS PELA
MICROALGA *DESMODESMUS* sp.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, em cumprimento parcial aos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Química, área de concentração em Desenvolvimento de Processos.

Orientadora: Prof.^a Dr^a Daniela Estelita Goes Trigueros

Coorientadora: Prof.^a Dr^a Vanessa Daneluz Gonçalves

TOLEDO – PARANÁ

2022

Cruz, Tainá Michelle da
MAXIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LIPÍDEOS E PIGMENTOS PELA
MICROALGA DESMODESMUS sp. / Tainá Michelle da Cruz;
orientadora Daniela Estelita Goes Trigueros; coorientadora
Vanessa Daneluz Gonçalves. -- Toledo, 2022.
65 p.

Dissertação (Mestrado Acadêmico Campus de Toledo) --
Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Centro de
Engenharias e Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Química, 2022.

1. . I. Goes Trigueros, Daniela Estelita , orient. II.
Daneluz Gonçalves, Vanessa , coorient. III. Título.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter sido minha fonte de esperança e força, principalmente nos momentos de fraqueza;

Aos meus pais Sônia e Josemar pelo apoio e ensinamentos valiosos;

Aos meus irmãos Wesley e Tony pelo suporte familiar;

As minhas sobrinhas Nataly e Lorena pelas doses gratuitas de amor;

Aos professores Dr^a. Daniela Estelita Goes Trigueros, Dr.^a Vanessa Daneluz Gonçalves e Dr. Aparecido Nivaldo Módenes pela orientação;

Aos amigos e parceiros de laboratório: Gabriella, Beatriz, Kayque, Natália, Sheila, Taysa, Rafael, Isabella, Camila, Ruth, Meline, Vanusa, Débora e Matheus por toda a ajuda nos experimentos e momentos de descontração que deixaram os dias mais leves;

Ao programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná,

Ao suporte psicológico fornecido pela Universidade Estadual do Oeste do Paraná durante o período do mestrado,

À CAPES pelo apoio financeiro.

CRUZ, T. M. Maximização da produção de lipídeos e pigmentos pela microalga *Desmodesmus* sp. Dissertação de Mestrado - 2022. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Estadual do Oeste do Paraná.

RESUMO

As microalgas podem ser consideradas grandes aliadas no contexto da sustentabilidade ambiental, uma vez que são fontes potenciais de uma grande quantidade de bioprodutos. Dentre os produtos de alto valor agregado e de interesse biotecnológico estão os lipídeos e os pigmentos, este último compreende clorofilas e carotenoides. Lipídeos podem ser aplicados nas indústrias de biocombustíveis e de alimentos, e os pigmentos apresentam importante participação nas matérias-primas de indústrias farmacêuticas, de suplementos alimentares e de cosméticos. Neste trabalho a microalga *Desmodesmus* sp. foi submetida a diferentes condições de cultivo, onde variou-se as concentrações nutricionais de micronutrientes e macronutrientes e faixas espectrais, com o objetivo de maximizar a produção de lipídeos e pigmentos em cada condição. Os resultados das produções dos bioprodutos em cultivos com diferentes quantidades de micronutrientes e em diferentes faixas espectrais foram avaliados pela análise de variância – ANOVA ao nível de 10% e pelo teste de comparação de médias – Tukey que sugeriram a dispensa da suplementação de micronutrientes e a luz de LED vermelha como sendo a mais propícia para a síntese de lipídeos, que em condições otimizadas aumentou 23,82%. Para os pigmentos fotossintetizantes, que envolvem clorofilas **a**, clorofilas **b** e carotenoides totais, a luz fluorescente branca e a suplementação de micronutrientes se apresentaram como as condições impostas que mais propiciaram suas produções, que atingiram de 61,19 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 54,41 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 18,07 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente.

Palavras-chave: *Desmodesmus* sp., meio BG-11, lipídeos, pigmentos, condições de estresse.

CRUZ, T. M. Maximization of lipid and pigment production by the microalgae *Desmodesmus* sp. Masters dissertation - 2022. Chemical Engineering Postgraduate Program, State University of West Paraná.

ABSTRACT

Microalgae can be considered great allies in the context of environmental sustainability, since they are potential sources of a large amount of bioproducts. Among the products of high added value and of biotechnological interest are lipids and pigments, the latter comprising chlorophylls and carotenoids. Lipids can be applied in the biofuel and food industries, and pigments play an important role in the raw materials of the pharmaceutical, food supplement and cosmetic industries. In this work the microalgae *Desmodesmus* sp. was submitted to different culture conditions, where the nutritional concentrations of micronutrients and macronutrients and spectral ranges were varied, with the objective of maximizing the production of lipids and pigments in each condition. The results of the production of bioproducts in cultures with different amounts of micronutrients and in different spectral ranges were evaluated by analysis of variance - ANOVA at 10% level and by the test of means comparison - Tukey, which suggested the dispensation of micronutrient supplementation and the red LED light as being the most conducive to lipid synthesis, which under optimized conditions increased by 23.82%. For photosynthetic pigments, which involve chlorophyll a, chlorophyll b and total carotenoids, white fluorescent light and micronutrient supplementation were the imposed conditions that most favored their production, which reached 61.19 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 54.41 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 18.07 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectively.

Keywords: *Desmodesmus* sp., BG-11 medium, lipids, pigments, stress conditions.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química das clorofilas Fonte: Nelson; Cox, 2014.	18
Figura 2 - Exemplos de estruturas de carotenoides: (a) Xantofilas; (b) Carotenos.	19
Figura 3 - <i>Desmodesmus</i> sp.	21
Figura 4 – 1) <i>Desmodesmus subspicatus</i> . 2) <i>Desmodesmus protuberans</i> . 3) <i>Desmodesmus brasiliensis</i>	22
Figura 5 - Sistemas de cultivo	24
Figura 6 - Curva típica de fotossíntese (P) vs irradiância (I) para células microalgais	25
Figura 7 - Curva semilogarítmica de crescimento celular em cultivo descontínuo	29
Figura 8- Exploração de microalgas	30
Figura 9 - Ilustração do módulo experimental irradiado por luz fluorescente utilizado para o cultivo de <i>Desmodesmus</i> sp.	34
Figura 10 - Ilustração do módulo experimental irradiado por LED utilizado para o cultivo de <i>Desmodesmus</i> sp.	34
Figura 11 - Concentração de biomassa de <i>Desmodesmus</i> sp. em cultivos sem (Cultivo 1) e com (Cultivo 2) suplementação de micronutrientes	43
Figura 12 - Taxa de crescimento específico de <i>Desmodesmus</i> sp. em cultivos sem (Cultivo 1) e com (Cultivo 2) suplementação de micronutrientes	43
Figura 13 - Efeitos dos tratamentos em cultivos sem (Cultivo 1) e com (Cultivo 2) suplementação de micronutrientes na concentração de biomassa de <i>Desmodesmus</i> sp.	44
Figura 14 - Rendimento lipídico de <i>Desmodesmus</i> sp. em cultivos sem (Cultivo 1) e com (Cultivo 2) suplementação de micronutrientes	45
Figura 15 - Efeitos dos tratamentos em cultivos sem (Cultivo 1) e com (Cultivo 2) suplementação de micronutrientes no teor lipídico de <i>Desmodesmus</i> sp.	45
Figura 16 - Produção de pigmentos de <i>Desmodesmus</i> sp. em cultivos sem (Cultivo 1) e com (Cultivo 2) suplementação de micronutrientes	46
Figura 17 - Efeitos dos tratamentos em cultivos sem (Cultivo 1) e com (Cultivo 2) suplementação de micronutrientes na produção de pigmentos de <i>Desmodesmus</i> sp.	48
Figura 18 - Concentração de biomassa de <i>Desmodesmus</i> sp. em diferentes faixas espectrais	49
Figura 19 - Taxa de crescimento específico de <i>Desmodesmus</i> sp. em diferentes faixas espectrais	50
Figura 20 - Rendimento lipídico de <i>Desmodesmus</i> sp. do décimo segundo e décimo sexto dia de cultivo em diferentes faixas espectrais	51
Figura 21 - Produção de pigmentos de <i>Desmodesmus</i> sp. no décimo segundo e décimo sexto dia de cultivo em diferentes faixas espectrais	53
Figura 22 - Concentração de biomassa de <i>Desmodesmus</i> sp. em diferentes concentrações nutricionais	56
Figura 23 - Taxa de crescimento específico para os experimentos 1 e 9	56
Figura 24 - Concentração de biomassa e rendimento lipídico de <i>Desmodesmus</i> sp. no décimo sexto dia de cultivo para os doze experimentos realizados	58
Figura 25 - Pareto dos efeitos linear (L), quadrático (Q) e de interações (L;Q) das variáveis independentes: nitrato de sódio (N) e fosfato de potássio (F) sobre o rendimento lipídico de <i>Desmodesmus</i> sp.	59
Figura 26 - Avaliação gráfica dos resíduos de ajuste ao modelo aos dados de rendimento lipídico: (a) Normalidade dos resíduos; (b) Homoscedasticidade dos resíduos versus valores preditos pelo modelo; (c) Correlação entre os valores preditos e observados; (d) Independência dos resíduos versus ensaio experimental.	61
Figura 27 - Superfície e contorno da resposta rendimento lipídico (%) de <i>Desmodesmus</i> sp. obtida por meio das variações de nitrato de sódio e fosfato de potássio	61
Figura 28 - Perfis dos valores preditos pela função desejabilidade para maximização de lipídeos	

.....	62
Figura 29 - Concentração de biomassa de <i>Desmodesmus</i> sp. nas condições de maximização para lipídeos.....	63
Figura 30 - Produção de pigmentos de <i>Desmodesmus</i> sp. no décimo sexto dia de cultivo para os doze experimentos realizados	64
Figura 31 - Pareto dos efeitos linear (L) e quadrático (Q) das variáveis independentes: nitrato de sódio (N) e fosfato de potássio (F) sobre a produção de pigmentos de <i>Desmodesmus</i> sp. .	65
Figura 32 - Avaliação gráfica dos resíduos de ajuste ao modelo aos dados de produção de pigmentos: (a) Normalidade dos resíduos; (b) Homoscedasticidade dos resíduos versus valores preditos pelo modelo; (c) Correlação entre os valores preditos e observados; (d) Independência dos resíduos versus ensaio experimental; 1: Cl a ; 2: Cl b ; 3: CT	68
Figura 33 - Superfícies e contornos das respostas produção de pigmentos ($\mu\text{g mL}^{-1}$) de <i>Desmodesmus</i> sp. obtida por meio das variações de nitrato de sódio e fosfato de potássio	69
Figura 34 - Perfis dos valores preditos pela função desejabilidade global para a maximização de pigmentos.....	70
Figura 35 - Concentração de biomassa de <i>Desmodesmus</i> sp. nas condições de maximização para pigmentos.....	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Conteúdo de lipídeos totais e perfil de ácidos graxos livres em diferentes espécies de microalgas.....	17
Tabela 2 - Comparação entre a produção de microalgas em biorreatores abertos e fechados .	23
Tabela 3 - Soluções estoque que compõem o meio de cultivo BG-11	32
Tabela 4 - Metais traço presentes no meio de cultivo BG-11	32
Tabela 5 - Condições de cultivo de <i>Desmodesmus</i> sp. relativos aos ensaios sem (Cultivo 1) e com (Cultivo 2) suplementação de micronutrientes	37
Tabela 6 - Condições de cultivo da <i>Desmodesmus</i> sp. em diferentes faixas espectrais.....	38
Tabela 7- Concentrações das variáveis independentes estudadas e níveis de variação.....	39
Tabela 8 – Matriz do planejamento experimental fatorial 3 ²	40
Tabela 9 - Condições de cultivo dos experimentos realizados no planejamento experimental fatorial 3 ²	41
Tabela 10 - ANOVA ($\alpha = 0,1$) com os resultados de pigmentos obtidos a partir dos cultivos de <i>Desmodesmus</i> sp. em meio BG-11 entre os tratamentos	47
Tabela 11- ANOVA ($\alpha = 0,1$) com os resultados de lipídeos obtidos a partir do cultivo de <i>Desmodesmus</i> sp. em diferentes faixas espectrais para o décimo segundo e décimo sexto dia de cultivo	51
Tabela 12 – Rendimento lipídico médio e Teste Tukey ($\alpha = 0,1$) referente ao cultivo de <i>Desmodesmus</i> sp. em diferentes faixas espectrais para o décimo sexto dia de cultivo	52
Tabela 13 - ANOVA ($\alpha = 0,1$) com os resultados de pigmentos obtidos a partir do cultivo de <i>Desmodesmus</i> sp. em diferentes faixas espectrais para o décimo sexto dia de cultivo	53
Tabela 14 - Produção média de pigmentos e Teste Tukey ($\alpha = 0,1$) referente ao cultivo de <i>Desmodesmus</i> sp. em diferentes faixas espectrais para o décimo sexto dia de cultivo	54
Tabela 15 - ANOVA dos fatores de variação e do modelo de regressão ajustado aos dados de rendimento lipídico obtidos no cultivo de <i>Desmodesmus</i> sp.	59
Tabela 16 - ANOVA dos fatores de	66

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO	13
1.1 OBJETIVO GERAL	15
1.1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
2 – FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	16
2.1 COMPOSTOS BIOATIVOS	16
2.1.1 Lipídeos	16
2.1.2 Clorofilas	17
2.1.3 Carotenoides	18
2.2 MICROALGAS	19
2.2.1 <i>Desmodesmus</i>	21
2.3 CULTIVO DE MICROALGAS	22
2.3.1 Sistemas de cultivo aberto e fechado	22
2.4 CONDIÇÕES DE CULTIVO	24
2.4.1 Iluminação	24
2.4.2 Temperatura	25
2.4.3 Potencial Hidrogeniônico (pH)	26
2.4.4 Agitação/Aeração.....	26
2.4.5 Meio de cultivo	26
2.4.5.1 Funções nutricionais	27
2.5 CINÉTICA DE TRANSFORMAÇÃO EM REGIME DE CULTIVO DESCONTÍNUO	28
3 – EXPLORAÇÃO DE MICROALGAS	29
3.1 Bioenergia.....	30
3.2 Produtos promotores da saúde	30
3.3 Biorremediação de águas residuais	31
4 - MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1 PREPARO DO INÓCULO	32
4.1.1 Microalga: origem e manutenção	32
4.1.2 Meio de Cultivo BG-11 líquido e soluções	32
4.1.3 Cultivo de ativação	33
4.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	33
4.2.1 Fotobiorreator tubular vertical irradiado por luz fluorescente.....	33
4.2.2 Fotobiorreator tubular vertical irradiado por LED.....	34
4.3 PARÂMETROS DE CRESCIMENTO	35
4.3.1 Concentração de biomassa.....	35

4.3.2 Taxa de crescimento específico	35
4.4 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO POR ESPECTROFOTOMETRIA UV-VIS	36
4.4.1 Quantificação de pigmentos: clorofilas e carotenoides	36
4.5 MEDIÇÕES ANALÍTICAS	36
4.5.1 Extração e quantificação do teor de lipídeos	36
4. 6 – EXPERIMENTOS.....	37
4.6.1 EXPERIMENTO 1 – AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DE CRESCIMENTO APÓS A SUPLEMENTAÇÃO DE MICRONUTRIENTES	37
4.6.2 EXPERIMENTO 2 – SELEÇÃO DA FONTE DE LUZ	38
4.6.3 EXPERIMENTO 3 – AVALIAÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DOS MACRONUTRIENTES NITRATO DE SÓDIO E FOSFATO DE POTÁSSIO	38
4.6.3.1 Validação das respostas experimentais.....	41
5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
5.1 EXPERIMENTO 1 – AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DE CRESCIMENTO APÓS A SUPLEMENTAÇÃO DE MICRONUTRIENTES	42
5.1.1 Concentração de biomassa e taxa de crescimento específico	42
5.1.2 Teste de comparação de médias com biomassa.....	43
5.1.3 Teor lipídico.....	44
5.1.4 Teste de comparação de médias com lipídeos	45
5.1.5 Teor de pigmentos	46
5.1.6 Teste de comparação de médias com pigmentos	47
5.1.7 Síntese do Experimento 1	48
5.2 EXPERIMENTO 2 – SELEÇÃO DA FONTE DE LUZ	49
5.2.1 Concentração de biomassa e taxa de crescimento específico	49
5.2.2 Teor lipídico.....	50
5.2.3 Teste de comparação de médias com lipídeos	51
5.2.4 Teor de pigmentos	52
5.2.5 Teste de comparação de médias com pigmentos	53
5.2.6 Síntese do Experimento 2	54
5.3 EXPERIMENTO 3 – AVALIAÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DOS MACRONUTRIENTES NITRATO DE SÓDIO E FOSFATO DE POTÁSSIO	55
5.3.1 Concentração de biomassa e taxa de crescimento específico	55
5.3.2 Teor lipídico.....	57
5.3.2.1 Efeitos da composição do meio de cultivo sobre a produção de lipídeos.....	58
5.3.2.2 Validação do modelo de regressão	62
5.3.2.3 Respostas experimentais de lipídeos nas condições de maximização	62
5.3.3 Teor de pigmentos	63

5.3.3.1 Efeitos da composição do meio de cultivo sobre a produção de pigmentos.....	64
5.3.3.2 Validação do modelo de regressão	70
5.3.3.3 Respostas experimentais de pigmentos nas condições de maximização	70
5.3.4 Síntese do Experimento 3	71
6 – CONCLUSÕES	72
7 - REFERÊNCIAS	73
APÊNDICE A - Cultivo da microalga <i>Desmodesmus</i> sp.	79
APÊNDICE B – Análises dos bioprodutos com a microalga <i>Desmodesmus</i> sp.	79
APÊNDICE C – Concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$) de Cla, Clb e CT	80

1 - INTRODUÇÃO

Atualmente, a população mundial se encontra em aproximadamente 7,5 bilhões de pessoas e estima-se que ocorra um aumento para 9,5 bilhões em 2050 (Kang et al., 2021; Searchinger et al., 2019). Este aumento afeta diretamente a demanda alimentar e energética per capita causando um crescimento considerável na busca por seus produtos, o que levanta questionamentos e preocupações em relação ao suprimento futuro dessas demandas globais e o grau de impacto que o esforço para suprir resultará sobre o meio ambiente (Brasil; Garcia, 2016; Flies et al., 2018).

Diante desse cenário, é de grande importância que os processos produtivos sejam mais sustentáveis, buscando unir medidas práticas de proteção ambiental ao desenvolvimento da economia, desenvolvendo técnicas e alternativas eficazes para mitigar o efeito dos impactos ambientais. Organismos fototróficos que envolvem plantas, algas e algumas bactérias, sintetizam a matéria orgânica por meio da energia radiante, e têm se mostrado promissores no campo das tecnologias verdes. As microalgas se destacam em eficiência frente às fontes vegetais terrestres, pela capacidade superior de fixação de CO₂, maior eficiência de fotoconversão da luz solar e produtividade de biomassa (Chung; Lee; Chung, 2017; Aresta; Dibenedetto, 2019).

A comercialização de microalgas é impulsionada por diversos fatores, como a despoluição de águas, recuperação do solo, dispensável uso de agrotóxicos durante seu cultivo, não competição por terras agrícolas, possível cultivo em terras improdutivas e a existência de milhares de espécies das quais pode-se fazer uso dos bioprodutos (Yin et al., 2020; Andersen, 2013). Os bioprodutos são metabólitos responsáveis pela manutenção celular que incluem carboidratos, proteínas, lipídeos e pigmentos que podem ser utilizados nas indústrias alimentícia, cosmética, farmacêutica e de biocombustíveis (Gargouch et al., 2018; Weiss; Schebek, 2020). Em ambientes de estresse, as microalgas podem sofrer modificações fisiológicas que as levam a alterar a composição de sua biomassa e do seu conteúdo metabólico. Tal característica substancial tem sido utilizada em muitos estudos que se destinam ao aumento de um ou mais metabólitos específicos para suas respectivas aplicações (Yap et al., 2021).

Abordagens de estresse nutricional celular são normalmente empregadas na tentativa de aumentar a concentração de bioprodutos, como a repleção/depleção envolvendo nitrogênio e fósforo. Lamers et al., (2012) constataram uma rápida acumulação de β -caroteno em *Dunaliella salina* após todo o nitrogênio residual ser esgotado. Um estudo conduzido por Chu et al., (2014) demonstrou que a limitação de nitrogênio juntamente com o fornecimento suficiente de fósforo

estimulou a produção de óleo em *Scenedesmus obliquus*. A *Desmodesmus* sp. se destaca como uma microalga oleaginosa, apresentando uma das maiores taxas de produtividade lipídica registradas na literatura, atingindo 302 mg L^{-1} por dia em condições otimizadas (Ho et al., 2014). Em seu trabalho, Pan et al., (2011) constataram uma produtividade de 16% de conteúdo lipídico na massa seca em condições normais de cultivo, e após 7 dias de privação de nitrogênio, o conteúdo lipídico aumentou para mais de 50%.

Estudos com diferentes frequências e espectros de luz também vêm sendo realizados para causar estresse fotoquímico nas microalgas visando o aumento dos bioprodutos. As lâmpadas de LED (*Light Emitting Diode*) fazem parte de uma tecnologia emergente e econômica em comparação com as lâmpadas fluorescentes no cultivo de microalgas, apresentado maior vida útil, menor consumo de energia, menor dissipação de calor, comprimento de onda único e penetração profunda no sistema de cultivo (Atta et al., 2013). Rai, Gautam e Sharma (2015) cultivaram *Chlorella* sp. em espectro visível (controle), vermelho, amarelo e verde, e obtiveram maior rendimento em biomassa e teor lipídico no cultivo realizado em luz vermelha e intensidade de 2700 lux. Atta et al., (2013) cultivaram *Chlorella vulgaris* em luz de LED azul e luz fluorescente branca e obtiveram valor máximo de biomassa de $2,730 \text{ g L}^{-1}$ em cultivo realizado na intensidade de $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e fotoperíodo 12h:12h na energia luminosa azul.

Considerando a potencialidade das aplicações, para que as microalgas se tornem uma fonte economicamente viável é importante maximizar o conteúdo de seus bioprodutos. Esta pesquisa apresenta um estudo do cultivo da microalga *Desmodesmus* sp. no qual investigou-se a produção de lipídeos e pigmentos por meio de fotoestimulação em diferentes faixas espectrais e em diferentes concentrações de micronutrientes e dos macronutrientes nitrato de sódio e fosfato de potássio.

1.1 OBJETIVO GERAL

Estimular a produção de lipídeos e pigmentos da microalga *Desmodesmus* sp. em cultivos realizados em escala laboratorial, variando-se a concentração de micronutrientes e macronutrientes que compõem o meio sintético BG-11 sob fotoestimulação de diferentes faixas espectrais.

1.1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os efeitos da suplementação de micronutrientes sob a concentração de biomassa, taxa de crescimento específico e teor de lipídeos e pigmentos;
- Determinar a faixa espectral que estimula a síntese de lipídeos e pigmentos pela microalga *Desmodesmus* sp.;
- Realizar um planejamento experimental fatorial 3^2 com diferentes concentrações das variáveis independentes nitrato de sódio e fosfato de potássio para as variáveis dependentes lipídeos e pigmentos em cultivos de *Desmodesmus* sp.;

2 – FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 COMPOSTOS BIOATIVOS

Para sobreviver as mais diversas condições físico-químicas, as microalgas se ajustam às mudanças no ambiente externo com mudanças em seu ambiente intracelular, produzindo novos compostos bioativos oriundos do metabolismo primário, como ácidos graxos, proteínas, pigmentos e vitaminas, ou que podem ser sintetizados a partir do metabolismo secundário (Anbuechzieh; Karuppiyah; Li, 2015; Moraes et al., 2015). Na maioria das microalgas, os compostos bioativos se acumulam na biomassa, mas em determinados casos, esses metabólitos são secretados no meio (Moraes et al., 2015).

2.1.1 Lipídeos

Os lipídeos biológicos constituem um grupo de compostos quimicamente diverso, cuja característica em comum que os define é a insolubilidade em água. As principais formas de armazenamento de energia em muitos organismos são gorduras e óleos, e suas funções biológicas são tão diversas quanto a sua composição química. Os lipídeos atuam como elementos estruturais de membranas, cofatores enzimáticos, pigmentos fotossensíveis, transportadores de elétrons, protetores hidrofóbicos para proteínas, agentes emulsificantes no trato digestivo, hormônios e mensageiros intracelulares (Nelson; Cox, 2014).

Lipídeos produzidos por microalgas podem ser agrupados em duas classes: polares, que geralmente constituem 41-92% do teor de lipídeos totais, e apolares ou neutros, que constituem 5-51% desse teor. Os lipídeos polares, como fosfolipídeos e glicolipídeos, são chamados de lipídeos estruturais, pois auxiliam na construção estrutural da membrana celular, e quando consistem em ácidos graxos de cadeia longa podem ser transformados em ácidos graxos poliinsaturados devido a uma série de reações metabólicas. Triglicerídeos e esteróis, também conhecidos como triacilgliceróis (TAGs) e fitoesteróis, respectivamente, estão na classe de lipídeos apolares que não desempenham funções na estrutura celular, mas atuam no armazenamento de energia e no controle da fluidez e permeabilidade das membranas (Tang et al., 2020).

De modo geral, a composição lipídica produzida é uma individualidade de cada espécie de microalga, conforme apresenta-se na Tabela 1, fazendo com que diferentes classes de lipídeos tenham diferentes aplicações. Tanto lipídeos polares quanto apolares têm efeitos

benéficos para a saúde humana. Por exemplo, os fosfolipídeos atuam na prevenção de doenças coronárias e mutações celulares; os fitoesteróis apresentam atividades redutoras de colesterol, propriedades antiinflamatórias, anticâncer, antioxidantes, antibacterianas e antidiabéticas. Para a produção de biodiesel, os TAGs são os mais utilizados devido ao seu menor grau de insaturação (Chhandama et al., 2021; Tang et al., 2020).

Tabela 1 - Conteúdo de lipídeos totais e perfil de ácidos graxos livres em diferentes espécies de microalgas

Espécie de microalga	Teor de lipídeos (% em peso)	Perfil de ácidos graxos
<i>Ankistrodesmus fusiformis</i>	20,66	C4, C6, C8, C10, C13, C14, C16, C16: 1, C17, C17: 1, C18, C18: 1, C18: 2, C18: 3
<i>Botryococcus braunii</i>	44,97	C14, C16, C17: 1, C18, C18: 1, C18: 2, C18: 3
<i>Botryococcus terribilis</i>	49,00	C12, C16, C18, C18: 1, C18: 2, C18: 3
<i>Chlamydomonas</i> sp.	15,07	C4, C6, C8, C10, C12, C14, C16, C17, C18, C18, C18: 1, C18: 2, C18: 3
<i>Chlorella vulgaris</i>	28,07	C14, C15: 1, C16, C16: 1, C17, C17: 1, C18, C18: 1, C18: 2, C18: 3, C20
<i>Desmodesmus brasiliensis</i>	17,99	C6, C14, C16, C17: 1, C18, C18: 1, C18: 2, C18: 3
<i>Dunaliella</i> sp.	22	C16, C16: 1, C18, C18: 1, C18: 2, C18: 3, C20: 1
<i>Scenedesmus obliquus</i>	16,73	C4, C6, C8, C14, C16, C18, C18: 1, C18: 2, C18: 3

Fonte: Adaptado de Nascimento et al. (2013) e Talebi et al. (2013).

2.1.2 Clorofilas

As clorofilas são pigmentos verdes essenciais no processo de fotossíntese e estão presentes nos tilacoides (estrutura interna do cloroplasto) possuindo duas bandas de absorção: azul ou azul-esverdeado (450-475 nm) e vermelho (630-675 nm). As clorofilas possuem uma complexa estrutura formada por quatro núcleos pirrólicos (porfirinas ou clorinas) ligados a um átomo central de magnésio (Bicudo; Menezes, 2006) (Figura 1). Existem diferentes tipos de clorofila: **a**, **b**, **c** e **d**, que se diferem pela estrutura molecular e capacidade de absorção. Os

cloroplastos contêm as clorofilas **a** e **b**, e embora ambas sejam verdes, possuem espectros diferentes de absorção (Tomaselli, 2004; Nelson; Cox, 2014). A clorofila **a** é o pigmento principal da fase fotoquímica, primeiro estágio do processo fotossintético, enquanto os demais pigmentos auxiliam na absorção de luz e transferência de energia radiante para centros de reações, sendo chamados de pigmentos acessórios. A clorofila **b**, está presente em vegetais superiores, algas verdes e algumas bactérias; clorofila **c** em feófitas e diatomáceas; e clorofila **d** em algas vermelhas (Taiz; Zeiger, 2004).

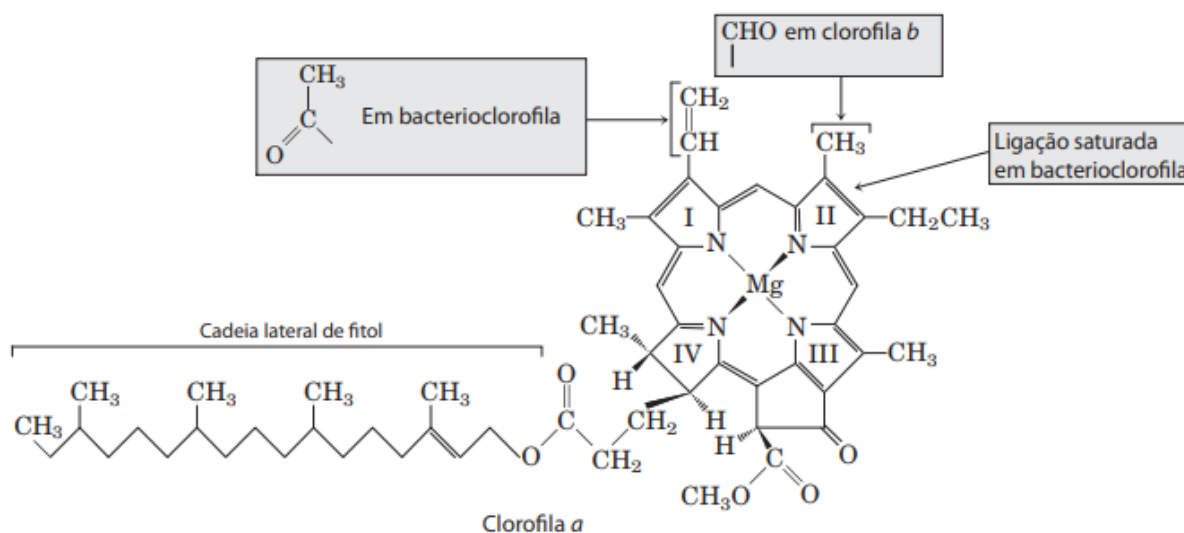


Figura 1 - Estrutura química das clorofilas
Fonte: Nelson; Cox, 2014.

2.1.3 Carotenoides

Os carotenoides são pigmentos terpenos amplamente distribuídos na natureza, com mais de 750 estruturas identificadas, sintetizados em todos os organismos fotossintéticos. A presença de uma cadeia cromofórica de polieno conjugada em sua estrutura confere cores que variam do incolor ao amarelo, vermelho e laranja, com variações refletidas em muitas flores, frutas e vegetais (Kalra; Gaur; Goel, 2021; Nisar et al., 2015).

Com base em sua estrutura química, os carotenoides são classificados em carotenos ou xantofilas. Os carotenos são compostos essencialmente formados por carbono e hidrogênio, enquanto as xantofilas envolvem funções oxigenadas.

Em organismos fotossintéticos, os carotenoides funcionam como pigmentos acessórios que captam a energia luminosa de comprimentos de onda que são pouco absorvidos pela clorofila, aumentando a eficiência fotossintética. Também atuam como protetores, dissipando o excesso de energia, evitando a formação de espécies reativas de oxigênio, incluindo a forma

altamente reativa desse elemento, conhecida como oxigênio singlete, gerada durante o processo de fotossíntese (Krinsky, 1998). A Figura 2 ilustra a estrutura de alguns carotenoides.

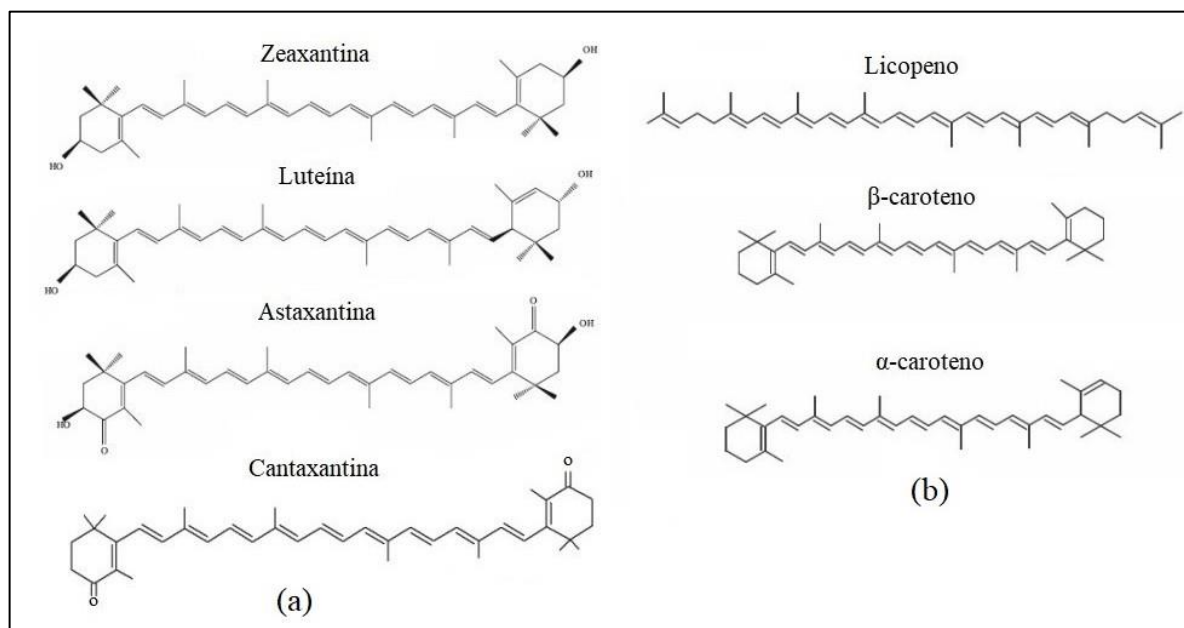


Figura 2 - Exemplos de estruturas de carotenoides: (a) Xantofilas; (b) Carotenos.

Carotenoides primários se posicionam nos fotossistemas da membrana tilacoide como pigmentos fotossintéticos acessórios. Esses pigmentos, como a luteína, transferem a energia absorvida para as clorofilas, auxiliam na expansão do espectro de absorção e na capacidade de produção de alimentos (Kalra; Gaur; Goel, 2021). Os carotenoides secundários, que incluem astaxantina e cantaxantina, são produzidos pelas microalgas após exposição a condições de estresse, e são encontrados nas vesículas lipídicas citoplasmáticas fornecendo cor característica as algas (Henríquez et al., 2016).

A composição dos pigmentos nas algas se difere em cada espécie e é influenciada pela condição ambiental. De modo geral, os carotenoides desempenham importantes papéis no funcionamento das células algais, como funções antioxidantes, estabilização do sistema fotossintético e manutenção na integridade da membrana celular (Kalra; Gaur; Goel, 2021; Takaichi, 2011).

2.2 MICROALGAS

As algas compõem um grande grupo de diversidade morfofisiológica, genética, reprodutiva e ecológica, abrangendo indivíduos microscópicos (3–10 μm) e macroscópicos (até 70 metros). São organismos aquáticos que compreendem desde espécies morfológicamente muito simples, como os unicelulares, até formas que apresentam talos multicelulares com

formação de tecidos e detalhada divisão de trabalho (Anbuezhia; Karupiah; Li, 2015; Bicudo; Menezes, 2006).

O termo microalga inclui organismos de dois grupos: procariontes e eucariontes. As microalgas procariontes são denominadas de algas azul-esverdeadas ou cianobactérias. Os organismos eucariontes são conhecidos como algas verdes, e se diferenciam das cianobactérias apresentando núcleo, organelas delimitadas por membranas, cromossomos complexos e células individuais normalmente maiores que as encontradas nas cianobactérias (Andrade; Colozzi Filho, 2014). Na escala evolutiva são os organismos que originaram os vegetais superiores. Entretanto, há autores que discordam com a denominação de algas azul-esverdeadas, pois mesmo possuindo semelhança com algas eucarióticas e muitas vezes ocupando o mesmo nicho ambiental, elas são bactérias (Tortora; Funke; Case, 2012).

As microalgas podem apresentar diferentes tipos de organização celular: unicelular, colonial e filamentosa. A maioria das células unicelulares não são móveis, tendo sua motilidade realizada por deslizamento ou mobilidade de natação; quando o são, o movimento acontece principalmente pela presença de flagelos, mas também pode ocorrer pela secreção de mucos por meio de um processo conhecido como *gliding*, onde as células deixam um rastro de mucilagem ao se movimentar, que ao entrar em contato com a água acaba se inchando e empurrando as células para frente (Tomaselli, 2004; Andrade; Colozzi Filho, 2014).

A reprodução pode ocorrer de maneira assexuada e sexuada. A forma assexuada se dá por um processo denominado citocinese. Nele, a alga unicelular duplica seu material genético por meio de mitose, dando origem a duas células-filhas vegetativas idênticas, estas, por sua vez, dão origem a quatro células vegetativas também idênticas, e assim por diante (Tortora; Funke; Case, 2012; Andrade; Colozzi Filho, 2014). Na reprodução sexuada, gametas masculino e feminino, oriundos da duplicação do material genético seguido da divisão meiótica se fundem, formando um zigoto que dará origem a um novo indivíduo (Tortora; Funke; Case, 2012).

Quanto à nutrição, as microalgas podem ser fotoautotróficas, heterotróficas ou mixotróficas. As fotoautotróficas são dependentes da fotossíntese e realizam a síntese de seus metabólitos fundamentais a partir de substâncias químicas relativamente simples como o dióxido de carbono (CO_2) e energia luminosa. A microalga heterotrófica obrigatória depende de uma fonte externa de compostos orgânicos altamente energéticos e facilmente metabolizáveis para obter sua energia; processo conhecido como quimiossíntese. Algumas microalgas podem apresentar o comportamento de fotoautotrofia, bem como o de heterotrofia, sendo conhecidas como mixotróficas (Bicudo; Menezes, 2006; Andrade; Colozzi Filho, 2014).

2.2.1 *Desmodesmus*

Microalgas do gênero *Desmodesmus* são organismos cenóbios, de vida livre, pertencentes a classe *Chlorophyceae*, formadas por duas, quatro, oito ou dezesseis células fusiformes, elipsoidais ou cilíndricas, dispostas linearmente (Figura 3). A parede celular pode conter pequenas verrugas, retículo ou apresentar uma evidente crista mediana. A maioria das espécies apresenta espinhos em suas células externas e internas do cenóbio (Figura 4). A partir de análises sequenciais gênicas do rDNA, o gênero *Desmodesmus* foi criado. Anteriormente, os organismos pertenciam ao subgênero *Scenedesmus*. Dessa forma, muitas espécies de *Scenedesmus* que apresentam espinhos foram transferidas para o novo gênero *Desmodesmus*. A reprodução se dá assexuadamente pela formação de autocolônias liberadas pela ruptura da parede da célula-mãe (Franceschini et al., 2010).

Estima-se a existência de mais de 100 espécies descritas para este gênero espalhadas pelo mundo. Elas vivem no fitoplâncton de água doce, tanto em ambientes lênticos como lóticos, e de diferentes trofismos como oligotrófico, mesotrófico ou eutrófico, mas, principalmente em meio eutrófico (Franceschini et al., 2010; Bicudo; Menezes, 2006). As células de *Desmodesmus* sp. podem suportar altas temperaturas, caracterizando-a como uma microalga termotolerante (Pan et al., 2011).

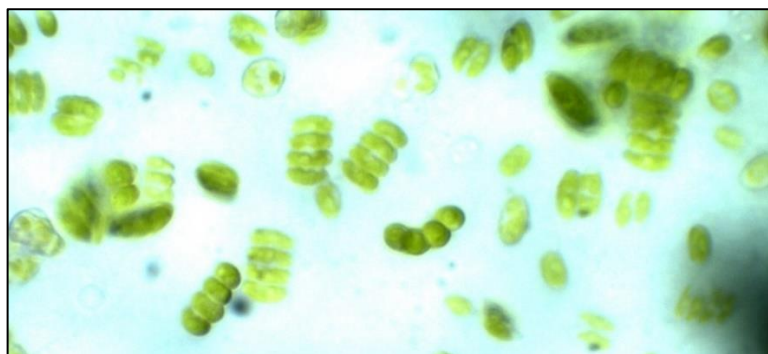


Figura 3 - *Desmodesmus* sp.

Fonte: O autor.



Figura 4 – 1) *Desmodesmus subspicatus*. 2) *Desmodesmus protuberans*. 3) *Desmodesmus brasiliensis*.
Fonte: AlgaeBase.

2.3 CULTIVO DE MICROALGAS

A escolha de um sistema de cultivo adequado e das condições físico-químicas para a produção de microalgas são influenciados principalmente pela espécie da microalga, fonte de nutrientes, produto desejado e custos de investimento. Os sistemas de cultivo se dividem em abertos e fechados. Os sistemas abertos são formados por instalações externas, como tanques e lagoas, e os sistemas fechados se formam por vasos ou tubos feitos de materiais transparentes para absorção de luz solar ou artificial (Klinthong et al., 2015).

2.3.1 Sistemas de cultivo aberto e fechado

Sistemas de cultivo aberto, conforme ilustrado na Figura 5.A são normalmente utilizados para o cultivo de microalgas em grande escala, devido a sua construção relativamente simples e facilidade de operação, podendo ser formado por águas naturais ou artificiais (Klinthong et al., 2015). Os sistemas mais utilizados são grandes lagoas rasas, tanques, lagoas circulares ou de canaletas. O cultivo em lagoas abertas apresenta algumas limitações como a má utilização da luz pelas células em profundidade superior a 1,5 m, evaporação, difusão de CO₂ para a atmosfera, necessidade de áreas de terra para sua instalação e contaminação por outros organismos, o que acaba restringindo a produção comercial de microalgas apenas para espécies que conseguem se desenvolver em condições extremas. Além disso, a agitação neste tipo de técnica tende a ser ineficiente, resultando numa baixa produtividade de biomassa (Ugwu; Aoyagi; Uchiyama, 2008; Zhou et al., 2017).

O cultivo de microalgas em sistemas fechados, demonstrado na Figura 5.B, permite maior controle de algumas condições, como a utilização de luz e porcentagem de CO₂. Apresenta, ainda, soluções para alguns dos problemas encontrados nos sistemas abertos como a redução de contaminação cruzada, alta capacidade de transferência de massa e alta eficiência fotossintética (Klinthong et al., 2015). Os reatores podem ser configurados em planos verticais, horizontais ou inclinados, sendo tubulares ou de placa plana. Os tubulares aumentam o tempo de contato entre as fases gasosa e líquida, aumentando assim a transferência de massa de CO₂, entretanto, este modelo tem disposição a altos custos de bombeamento de ar. Os fotobiorreatores de placa plana podem atingir alta produtividade celular em mais de uma ordem de magnitude, e apresentam menor consumo de energia quando comparado a outros biorreatores (Pires et al., 2012). Com vantagens superiores, como mostrado na Tabela 2, os sistemas fechados têm o desafio de se tornarem economicamente competitivos com as técnicas aplicadas em sistemas abertos (Zhou et al., 2017

Tabela 2 - Comparação entre a produção de microalgas em biorreatores abertos e fechados

Fator	Sistemas abertos	Sistemas fechados
Espaço necessário	Alto	Baixo
Evaporação	Alta	Baixa
Perda de água	Muito alta	Baixa
Perda de CO ₂	Alta	Baixa
Temperatura	Altamente variável	Resfriamento necessário
Dependência do clima	Alta	Baixa
Controle do processo	Difícil	Fácil
Contaminação	Alta	Baixa
Espécie de algas	Restrita	Flexível
Qualidade da biomassa	Variável	Reproduzível
Densidade populacional	Baixa	Alta
Parâmetros mais caros	Mistura	Oxigênio e controle de temperatura
Investimentos de capital	Baixo	Alto

Fonte: Adaptado de Pires et al. (2012).

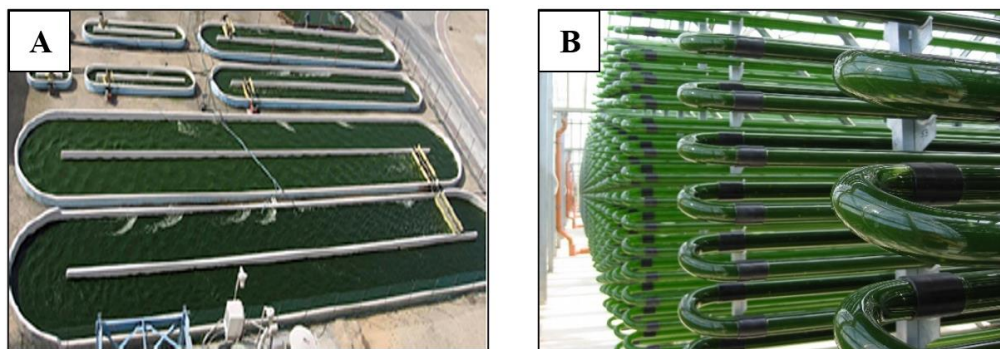


Figura 5 - Sistemas de cultivo
Fonte: Clifford (2020).

2.4 CONDIÇÕES DE CULTIVO

O crescimento de microalgas e a fixação de carbono são influenciados pela iluminação, temperatura, pH, tensão, nível de carbono e nutrientes. Fatores como esses são administrados com a finalidade de fornecer condições ideais para o crescimento das microalgas, e compreendê-los possibilita um bom desenvolvimento de novas tecnologias e otimização de processos (Zhou et al., 2017).

2.4.1 Iluminação

A luz é um fator básico essencial para o crescimento das microalgas. Suas fontes podem se originar da luz solar natural, luz artificial ou a combinação de ambas. A luz é necessária para a fotossíntese e seu excesso ou insuficiência pode interferir no desempenho ideal da microalga em termos de biomassa ou rendimentos metabólicos. A fotossíntese e a consequente produção de biomassa são dependentes do fluxo fotônico (Carvalho et al., 2010).

Pode-se diferenciar três áreas na Figura 6: (1) uma área limitada pela luz, na qual a taxa de entrada fotônica é totalmente aproveitada na fotossíntese, de modo que a eficiência fotossintética aumenta com o aumento da irradiância; tal região se delimita pela intensidade da luz na qual as células microalgais começam a crescer, ou seja, intensidade da luz de compensação (I_c); (2) uma região de saturação de luz, na qual a capacidade fotossintética da cultura atinge seu valor máximo, e o fluxo fotônico excessivo dado à cultura é dissipado na forma de calor ou fluorescência; e (3) região de fotoinibição, na qual o aumento da intensidade luminosa se torna prejudicial, sendo inicialmente expresso por uma diminuição na taxa de crescimento, eventualmente causando foto-danos e até mesmo levando a cultura a morte. A

fotossíntese e a fotoinibição geralmente ocorrem próximas à superfície da cultura, enquanto o sombreamento das células causa gradientes acentuados de intensidade luminosa no interior da cultura, apresentando valores baixos de luz disponíveis para células distantes da superfície (Carvalho et al., 2010).

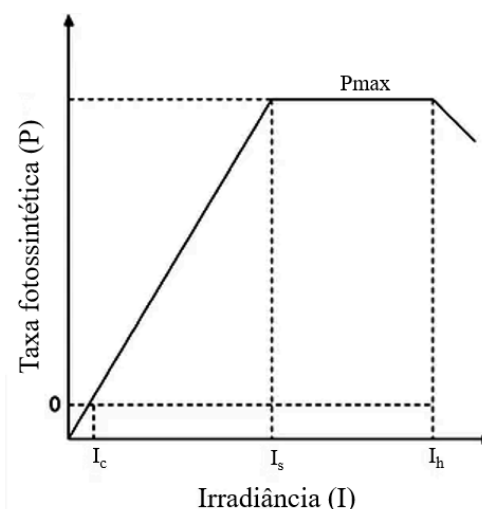


Figura 6 - Curva típica de fotossíntese (P) vs irradiância (I) para células microalgais
Fonte: Adaptado de Carvalho et al. (2010).

2.4.2 Temperatura

A temperatura é um fator de grande importância para o crescimento das microalgas, pois afeta sua taxa metabólica e crescimento celular. Para a manutenção de culturas, a temperatura varia de acordo com a espécie a ser cultivada e o local onde foi coletada. Espécies provenientes de ambientes polares devem ser cultivadas abaixo de 10°C, de ambientes temperados entre 10°C e 25°C e de ambientes tropicais acima de 20°C. Para a escolha de uma temperatura específica, deve-se levar em consideração a composição do meio e a espécie escolhida para o cultivo, contudo, a faixa usual de temperatura tolerável para os cultivos está entre 15°C e 30°C (Andrade; Colozzi Filho, 2014; Zhou et al., 2017).

Picos de temperatura que transpõem a temperatura de crescimento letal, promovem a morte das células por desnaturação, dissociação e desestabilização de estruturas do ácido nucleico, proteínas e membranas celulares. Temperaturas abaixo da letal, mas maiores que a temperatura ideal de crescimento, causam estresse celular, de modo que para sobreviver, as células necessitam reequilibrar sua composição (Barten et al., 2021). Temperaturas constantes são desejáveis no cultivo de microalgas, uma vez que proporcionam maior estabilidade em experimentos e maior reprodutibilidade dos resultados (Andrade; Colozzi Filho, 2014).

2.4.3 Potencial Hidrogeniônico (pH)

O pH em um meio de cultivo influencia no metabolismo e crescimento das microalgas, pois controla o equilíbrio ácido-base na solução e afeta a solubilidade e disponibilidade de substratos (amônio/amônia, fosfatos, carbonatos), formas livres de nitrogênio amoniacal e carbono inorgânico, bem como fenômenos de transferências de gases (Rossi et al., 2020).

Elevações de pH podem acontecer em decorrência do metabolismo autotrófico, quando o íon bicarbonato do meio se desidrata e forma CO_2 para a fotossíntese e íons OH^- . A liberação de CO_2 no meio resulta na redução de pH, contudo, o aumento da densidade celular das microalgas faz com que o teor de CO_2 seja reduzido por meio da atividade fotossintética, aumentando assim, o pH. Esse aumento causa a formação de gás de amônia a partir da dissociação do íon amônio, que é tóxico para microalgas. Cada espécie de microalga possui uma faixa de pH adequada para seu crescimento, mas para a maioria das espécies o pH deve ser mantido entre neutro e alcalino (Andrade; Colozzi Filho, 2014).

2.4.4 Agitação/Aeração

O processo de agitação permite que as células microalgais fiquem suspensas no meio, melhorando a eficiência de utilização da luz, favorecendo a troca de gases, evitando a estratificação térmica, auxiliando na distribuição homogênea de nutrientes, evitando o acúmulo de matéria orgânica no fundo do biorreator e a sedimentação celular (Andrade; Colozzi Filho, 2014).

Individualidades como peso, tamanho, densidade das células e tolerância à tensão de cisalhamento influenciam a taxa de mistura e aeração ideal. Quando a taxa de aeração é superior a ideal, danos podem ser ocasionados nas células da microalga devido aos efeitos da força de cisalhamento, resultando num aumento de evaporação e custos de operação (Guo; Yao; Huang, 2015).

2.4.5 Meio de cultivo

Lourenço (2006) define meio de cultivo como o ambiente específico e finito que integra elementos e nutrientes necessários para o desenvolvimento de animais, vegetais e microrganismo que estão sendo cultivados.

De certa forma, os meios de cultivo são as fontes dos elementos que constituem os organismos em cultivo, os quais recebem estimulação de crescimento justamente pelo fornecimento dos componentes presentes no meio (Lourenço, 2006). Os componentes nutricionais se dividem em macronutrientes e micronutrientes. Os macronutrientes são compostos pelos elementos de maior demanda metabólica por parte das microalgas, como o carbono (C), nitrogênio (N), oxigênio (O) e fósforo (P), sendo fornecidos em concentrações de g L^{-1} . Os micronutrientes constituem um grupo formado por elementos como o bário (Ba), cobalto (Co), manganês (Mn) e zinco (Zn), em concentrações menores ou iguais a mg L^{-1} suficientes para o crescimento microalgal (Grobbelaar, 2004).

Meios formulados são caldos sintéticos produzidos a partir de concentrações recomendadas de macro e micronutrientes comumente utilizados para fornecer nutrição as microalgas. Cada meio sintético possui instruções e informações específicas que direcionam a preparação das soluções. Os meios formulados podem ser específicos para um grupo de microalgas, e não específicos, podendo ser utilizados em cultivos de diversas espécies. Por exemplo, para o cultivo de microalgas de água salgada utiliza-se frequentemente o meio *Bold's Basal Medium* (BBM); para o cultivo de espécies de água doce, o *Guillard (f/2)* é o mais utilizado; o meio *Blue-Green* (BG-11) é favorável para o cultivo de cianobactérias, mas é utilizado amplamente para o cultivo de microalgas (Daneshvar et al., 2021).

O meio é considerado modificado quando sua composição é alterada pelo aumento ou pela diminuição das concentrações originais de um ou mais compostos. Tais alterações são feitas para estimular a produção dos metabólitos de interesse, aumentar a produção de biomassa ou avaliar os efeitos dessas modificações baseando-se nas exigências do projeto experimental (Daneshvar et al., 2021).

2.4.5.1 Funções nutricionais

As funções nutricionais dos elementos são variadas, por exemplo, o nitrogênio e o fósforo são elementos essenciais para as estruturas celulares, proteínas operacionais e processos metabólicos. Associado ao fósforo e ao nitrogênio, o enxofre é de suma importância para a célula vegetal, uma vez que faz parte da constituição de determinados aminoácidos (metionina, cisteína e cistina), vitaminas e sulfolipídeos. Os íons de sódio são imprescindíveis à fixação de nitrogênio para a transformação molecular do nitrogênio em amônia, e devido a semelhanças químicas, o sódio pode substituir o potássio em algumas situações. Contudo, cultivos com teor insuficiente de potássio, apresentam células com menor crescimento, baixa taxa fotossintética

e aumento na taxa respiratória. Quanto aos metais traços (ou micronutrientes) como magnésio, ferro, cobre, cálcio e manganês, desempenham importantes funções no mecanismo celular das microalgas, processo fotossintético, divisão celular, transporte intracelular e biossíntese de lipídeos e proteínas (Moura Junior et al., 2006; Wan et al., 2014).

2.5 CINÉTICA DE TRANSFORMAÇÃO EM REGIME DE CULTIVO DESCONTÍNUO

A cinética de transformação é definida por meio da evolução dos valores de concentração dos constituintes do cultivo (biomassa, nutrientes do meio de cultivo e bioprodutos) em função do tempo e se compõe por curvas de crescimento celular, de consumo do substrato limitante e de formação de produtos de interesse.

Em um cultivo descontínuo, a concentração celular (**X**) aumenta à proporção que se aumenta a transformação do substrato (**S**) e do produto (**P**), de modo que as velocidades instantâneas de transformação podem ser relacionadas a concentração celular apresentada no instante de tempo (**t**), de acordo com as Equações 1, 2 e 3, que caracterizam as velocidades específicas de crescimento celular, consumo de substrato e formação de produto, respectivamente.

$$\mu_X = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \quad \text{EQUAÇÃO 1}$$

$$\mu_S = \frac{1}{X} \left(-\frac{dS}{dt} \right) \quad \text{EQUAÇÃO 2}$$

$$\mu_P = \frac{1}{X} \frac{dP}{dt} \quad \text{EQUAÇÃO 3}$$

Em condições favoráveis de cultivo realizadas em regime descontínuo, a concentração celular de microalgas apresenta fases bem delineadas, ilustradas na Figura 7: (1) *lag* ou latência; (2) transição; (3) crescimento logarítmico ou exponencial; (4) crescimento linear; (5) desaceleração; (6) estacionária e (7) declínio ou lise (Schmidell et al., 2001).

(1) Fase que se inicia imediatamente após a inoculação da cepa em meio de cultivo apropriado. Nesta fase não há reprodução celular, pois as células estão em período de adaptação fisiológica; a duração dessa fase varia com a concentração do inóculo, idade e estado fisiológico da cepa.

(2) Fase em que há um aumento na velocidade de reprodução e na velocidade específica de crescimento, sendo possível observar o início da reprodução celular. Ao término desta, a população começa a se separar em um intervalo médio de tempo.

(3) Fase que se relaciona às condições do meio de cultivo e apresenta velocidade específica de crescimento máxima e constante (μ_{max}), propiciando a duplicação da concentração celular ao longo do tempo de geração (t_g).

(4) Fase que apresenta velocidade constante de reprodução. Pode ocorrer sem a necessidade de preexistência da fase 3, como no caso de microrganismo filamentosos, onde o transporte de nutrientes do meio de cultura para o interior da célula é restrito.

(5) Fase de desaceleração ocasionada pelo esgotamento de um ou mais componentes do meio de cultivo, e pela anulação das velocidades de reprodução e de crescimento específico (t_f) em decorrência do acúmulo de metabólitos inibidores.

(6) Fase em que X atinge o valor máximo e constante (X_m). Nesta etapa estacionária, há um balanço entre a velocidade de crescimento e velocidade de morte do microrganismo, ocorrendo também mudanças na estrutura bioquímica celular.

(7) Fase em que a concentração celular diminui a uma velocidade excedente a velocidade de produção de novas células, caracterizando o declínio. Durante esta fase, ocorre a “lise” celular, que é o rompimento dos microrganismos causado pela ação de enzimas intracelulares.

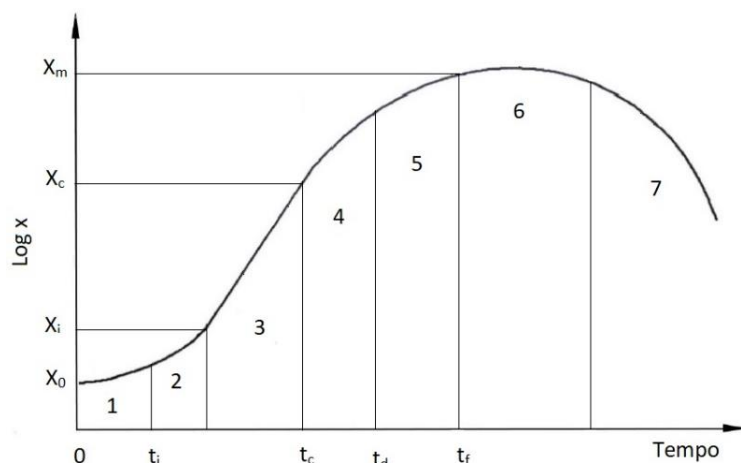


Figura 7 - Curva semilogarítmica de crescimento celular em cultivo descontínuo
Fonte: Adaptado de Schmidell et al. (2001).

3 – EXPLORAÇÃO DE MICROALGAS

A bioeconomia se apresenta como um componente de grande importância no campo de consumo e da produção sustentável, despertando o interesse global. Estudos apontam que o uso das microalgas, no contexto da economia circular (Figura 8), resulta em produtos alternativos de alto valor agregado ao mesmo tempo em que se torna um atenuante de lançamentos de cargas

orgânicas e emissões de gases causadores do efeito estufa (Kholssi et al., 2021).

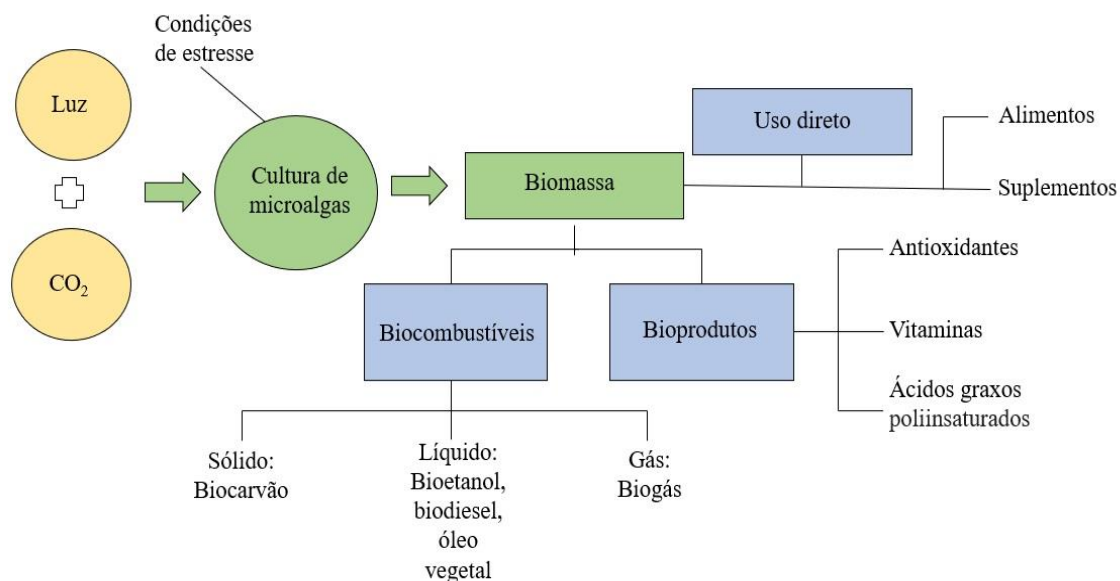


Figura 8- Exploração de microalgas
Fonte: Adaptado de Kholssi et al. (2021).

3.1 Bioenergia

Biocombustíveis líquidos procedentes de microalgas são os grandes responsáveis pelo crescimento de pesquisas a respeito do assunto desde o início do século XXI (Kholssi et al., 2021). Vários biocombustíveis advindos de microalgas foram obtidos como produtos principais: bioetanol, biodiesel, bio-óleo, biometano, bio-hidrogênio e biobutanol (Arun et al., 2020). O processo de produção de biocombustíveis a partir de microalgas conta com diversas etapas que envolvem cultivo, colheita, secagem, rompimento de células, extração e, posteriormente, transesterificação que envolve o uso de álcool e catalisadores (Rodionova et al., 2017).

3.2 Produtos promotores da saúde

As microalgas são capazes de converter a energia solar em energia química, acumulando compostos bioativos. Tais compostos são atrativos para o cuidado com a saúde, pois apresentam propriedades antioxidantes, antimicrobianas e antiinflamatórias, prevenindo e atenuando diversas doenças (Morais et al., 2015). Na alimentação, o valor nutricional e funcional das microalgas está nas proteínas, ácidos graxos poliinsaturados, esteróis, polissacarídeos, vitaminas, minerais, compostos fenólicos e voláteis, carotenoides e clorofilas. O gênero *Chlorella* é certificado como um alimento e medicamento seguros pela *Food and Drug*

Administration, e a espécie *Scenedesmus* possui status de segurança, pois não apresenta “nenhuma toxina conhecida”. Os gêneros *Scenedesmus bijuga* e *Chlorella sorokiniana* são espécies exploradas para fins alimentares e de saúde. A principal forma de inserir microalgas na alimentação humana é por meio de suplementos dietéticos (Fernandes et al., 2021).

Pigmentos extraídos de microalgas se apresentam com uma potencialidade alternativa no ramo industrial da saúde, uma vez que apresentam rápido crescimento e alto teor de pigmentos com efeitos alergênicos praticamente nulos (Morocho-Jácome et al., 2020). Pesquisas relacionam que níveis elevados de β -caroteno e licopeno no sangue estão associados a riscos reduzidos de vários tipos de câncer; as xantofilas luteína e zeaxantina podem reduzir os riscos de degeneração macular relacionada a idade (Black et al., 2020). O ser humano não é capaz de produzir carotenoides, logo, sua principal forma de obtenção é por meio da ingestão de folhas, legumes, frutas, cereais ou suplementação.

3.3 Biorremediação de águas residuais

No que tange à poluição ambiental, acredita-se que as microalgas sejam candidatas promissoras para a remoção de substâncias tóxicas, uma vez que podem remover com eficiência compostos nocivos por meio de suas formas de nutrição (Mustafa et al., 2021). No processo de biorremediação, microrganismos são utilizados para remover ou metabolizar substâncias tóxicas, mutagênicas e carcinogênicas em porções não tóxicas. No caso das microalgas, estas possuem capacidade única de fotossintetizar e utilizar substratos de carbono orgânico/inorgânico, podendo degradar poluentes dos setores agrícola, doméstico e industrial. Além do mais, o oxigênio produzido pela fotossíntese pode reduzir a demanda bioquímica de oxigênio (DBO) das águas residuais (Hammed et al., 2016).

4 - MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Engenharia de Bioprocessos – LEB e no Laboratório de Controle e Poluição – LCP do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), no campus de Toledo – PR.

4.1 PREPARO DO INÓCULO

4.1.1 Microalga: origem e manutenção

A cepa de microalga PPEQ-08 (*Desmodesmus* sp.) foi isolada e identificada por Schuelter e colaboradores, de acordo com a metodologia apresentada em Schuelter et al., (2019). As cepas permaneceram incubadas em câmara de germinação (NI-4101 New Lab) em placas de Petri contendo meio de cultivo BG-11 com ágar, sob temperatura ambiente e iluminação fluorescente constante ≈ 2100 lux ($28 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), sendo periodicamente conservadas a partir de repiques em meio de cultivo novo.

4.1.2 Meio de Cultivo BG-11 líquido e soluções

As soluções que compõem o meio BG-11 foram adicionadas na ordem e quantidade apresentadas na Tabela 3. Posteriormente, adicionou-se a solução de metais traço apresentada na Tabela 4. A solução final foi esterilizada em Autoclave Vertical CS (Prismatec) a 1 atm por 15 min sendo posteriormente armazenada em um refrigerador a 4°C.

Tabela 3 - Soluções estoque que compõem o meio de cultivo BG-11

Ordem	Componente	Quantidade (mL L ⁻¹)	Solução Estoque (g 200 mL ⁻¹ de H ₂ O)	Concentração Final (mM)
1	NaNO ₃	10	30,0	17,65
2	K ₂ HPO ₄	10	0,8	0,23
3	MgSO ₄ ·7H ₂ O	10	1,5	0,30
4	CaCl ₂ ·2H ₂ O	10	0,72	0,24
5	Ácido Cítrico·H ₂ O	10	0,12	0,031
6	Citrato de Ferro e Amônio	10	0,12	0,021
7	Na ₂ EDTA·2H ₂ O	10	0,02	0,0027
8	Na ₂ CO ₃	10	0,4	0,19
9	Solução de metais traço (Tabela 4)	1	-	-

Fonte: UTEX (2021).

Tabela 4 - Metais traço presentes no meio de cultivo BG-11

Ordem	Componente	Quantidade (g L ⁻¹)	Concentração Final(mM)
1	H ₃ BO ₃	2,86	46,0
2	MnCl ₂ ·4H ₂ O	1,81	9,0
3	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,22	0,77
4	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,39	1,6
5	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,079	0,3
6	Co (NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	0,0494	0,17

Fonte: UTEX (2021).

4.1.3 Cultivo de ativação

Os cultivos de ativação foram realizados em erlenmeyers de 125 mL contendo meio BG-11 líquido, células de PPEQ-08 (*Desmodesmus* sp.) e 0,15g de bicarbonato de sódio. Os erlenmeyers permaneceram sob agitação de 150 rpm em mesa agitadora orbital (MA 140 CFT Marconi) e iluminação fluorescente constante ≈ 3300 lux ($45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) por um período de 4 dias (ver Figura A.1 – Apêndice A).

4.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.2.1 Fotobiorreator tubular vertical irradiado por luz fluorescente

Para o cultivo da PPEQ-08 (*Desmodesmus* sp.) utilizou-se o módulo experimental projetado por Hinterholz et al. (2019) ilustrado na Figura 9. O módulo é composto por injeção de ar e CO₂ executada por um sistema de vazão de gás (G), formado por um compressor de ar (B), um cilindro industrial de CO₂ comprimido (A), filtro de ar odontológico (C) e medidores de fluxo (D) para vazão volumétrica dos gases (0,5 a 1 vvm) que chegariam por meio de mangueiras de 6mm de diâmetro feitas de poliuretano (E).

As câmaras C2 do módulo experimental recebem iluminação de lâmpadas fluorescentes brancas (400-700 nm). Em cada câmara C2, oito lâmpadas tubulares foram horizontalmente dispostas com distância de 3 cm uma da outra, sendo quatro lâmpadas (30 W) localizadas na parte posterior e quatro lâmpadas (20 W) localizadas na parte frontal da câmara.

A câmara C1 do módulo experimental é constituída por dois reatores do tipo placa plana de volume útil de 10 L (60 x 40 x 5 cm; A/V = 20 m^{-1}) cada, construídos em vidro de 3 mm e 5 mm. Dez lâmpadas fluorescentes brancas (30 W) foram horizontalmente dispostas na parte posterior e um refletor (2000 W) foi posicionado na parte frontal do reator.

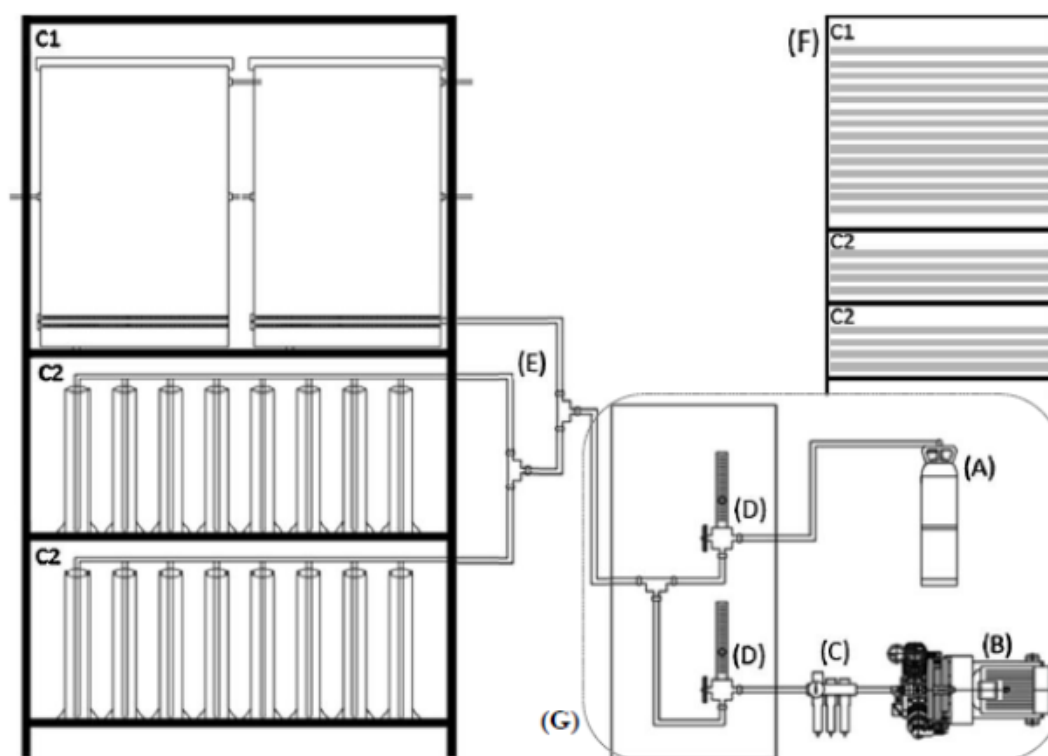


Figura 9 - Ilustração do módulo experimental irradiado por luz fluorescente utilizado para o cultivo de *Desmodesmus* sp.

Fonte: Adaptado de Hinterholz et al. (2019).

4.2.2 Fotobiorreator tubular vertical irradiado por LED

A estrutura do módulo experimental irradiado por LED é composta por quatro câmaras com capacidade de acomodação para até doze provetas de 500 mL e dezesseis lâmpadas de LED cada (F) (Figura 10). O sistema de injeção de ar e CO₂ é o mesmo apresentado no item 4.2.1.

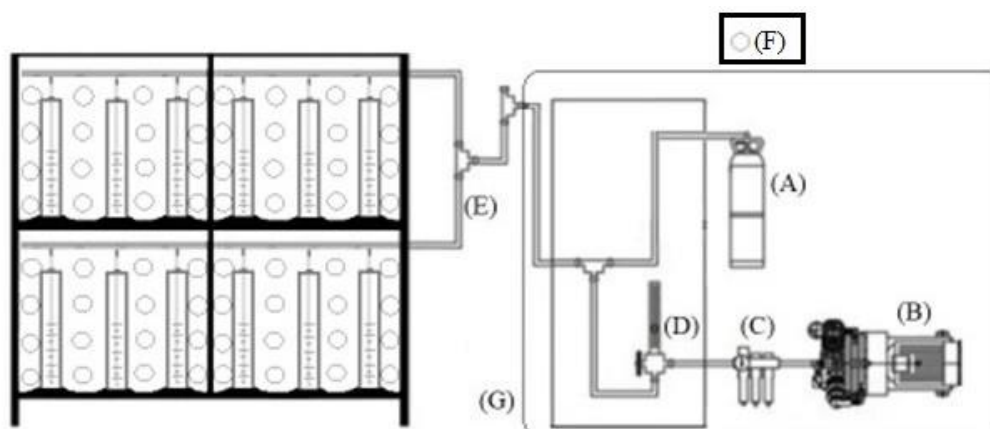


Figura 10 - Ilustração do módulo experimental irradiado por LED utilizado para o cultivo de *Desmodesmus* sp.

Fonte: Adaptado de Hinterholz et al. (2019).

4.3 PARÂMETROS DE CRESCIMENTO

4.3.1 Concentração de biomassa

A concentração de biomassa foi determinada por um fator de correlação entre a concentração de biomassa (Equação 4) e a sua respectiva densidade óptica, sendo este fator utilizado para converter a densidade óptica aferida diariamente em concentração de peso seco celular (Wagner; Steinweg; Posten, 2016).

A concentração de biomassa foi obtida por análise de regressão entre a biomassa e leitura óptica em 687 nm ($DO_{687} \approx 0,252 \text{ g L}^{-1}$) em espectrofotômetro UV-VIS (PerkinElmer, modelo Lambda 35). A determinação da biomassa em peso seco foi realizada em triplicata de acordo com o método gravimétrico de APHA (1999) modificado, sendo determinada pela Equação 4. Para isto, aferiu-se em balança analítica (Shimadzu), a massa (M_0) do microfiltro de fibra de vidro GF6 (Macherey-Nagel, 6 μm de porosidade) que foi previamente seco em estufa de esterilização e secagem (New Lab), a 105 °C até peso constante e armazenado em dessecador por 30 min para equilíbrio térmico. Filtrou-se 10 mL da cultura de microalga e o microfiltro contendo a massa celular foi novamente seco em estufa a 105 °C até peso constante e armazenado em dessecador por 30 min, tendo, posteriormente, sua massa aferida (M_f).

$$B = \frac{M_f - M_0}{V} \cdot 1000 \quad \text{EQUAÇÃO 4}$$

sendo B a concentração de biomassa (g L^{-1}); M_0 e M_f (g) a massa inicial e final do filtro, respectivamente e V o volume de amostra filtrado (L).

4.3.2 Taxa de crescimento específico

O cálculo das velocidades específicas de crescimento seguiu o método geométrico de Leduy e Zajic (1973). A taxa máxima de crescimento (μ ; h^{-1}) e o tempo de geração celular (t_g ; h) foram estimados por meio de regressão linear do comportamento semilogarítmico dos dados observados na fase de crescimento exponencial (Equação 5) (Han et al., 2015). O valor de $\mu_{\max}$ foi obtido pelo coeficiente angular da equação de melhor ajuste.

$$\mu = \frac{(\ln X_f - \ln X_0)}{t_f - t_0} \quad \text{EQUAÇÃO 5}$$

sendo X_0 e X_f (g L^{-1}) a concentração de biomassa inicial e final, respectivamente, e t_0 e t_f (d) o tempo inicial e final da fase de crescimento exponencial, respectivamente.

4.4 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO POR ESPECTROFOTOMETRIA UV-VIS

4.4.1 Quantificação de pigmentos: clorofilas e carotenoides

Para estimar o teor de pigmentos que envolve clorofila **a** (**Cl_a**), clorofila **b** (**Cl_b**) e carotenoides totais (**CT**), adaptou-se as metodologias propostas por Wagner, Steinweg e Posten (2016) e Ritchie (2006), onde 5 mL do cultivo de microalgas foi coletado e centrifugado a 3500 rpm por 5 min em centrífuga modelo SL-5M (Spinlab), sendo o sobrenadante descartado. A biomassa residual resultante da centrifugação foi ressuspensa com água destilada e deionizada e novamente centrifugada para remoção de possíveis impurezas. Descartou-se o sobrenadante e a biomassa residual foi congelada a -15 °C por 24 h. Após descongelamento, adicionou-se à amostra 5 mL de solução de metanol (99,8%) e a mistura permaneceu refrigerada a 4 °C por 30 min protegida da luz. Para causar a ruptura da membrana celular, a mistura ficou em repouso por 20 min em banho ultrassônico, sendo posteriormente centrifugada a 3500 rpm por 5 min. Repetiu-se o processo até total descoloração da biomassa (ver Figura B.1 – Apêndice B). O sobrenadante foi transferido para um tubo falcon protegido da luz, e teve sua absorbância mensurada em espectrofotômetro nos seguintes comprimentos de onda: 470; 652,4 e 665,2 nm, contra um branco de metanol (99,8%). Estimou-se as concentrações de pigmentos (µg mL⁻¹) de acordo com as Equações 6, 7 e 8 (Lichtenthaler; Buschmann, 2001):

$$Cl_a = (16,72 \cdot A_{665,2}) - (9,16 \cdot A_{652,4}) \quad \text{EQUAÇÃO 6}$$

$$Cl_b = (34,09 \cdot A_{652,4}) - (15,28 \cdot A_{665,2}) \quad \text{EQUAÇÃO 7}$$

$$CT = \frac{(1000 \cdot A_{470} - 1,63 \cdot Cl_a - 104,96 \cdot Cl_b)}{221} \quad \text{EQUAÇÃO 8}$$

sendo **Cl_a** clorofila **a** (µg mL⁻¹); **Cl_b** clorofila **b** (µg mL⁻¹); **CT** carotenoides totais (µg mL⁻¹); **A_{652,4}** absorbância em 652,4 nm; **A_{665,2}** absorbância em 665,2 nm; **A₄₇₀** absorbância em 470 nm.

4.5 MEDIÇÕES ANALÍTICAS

4.5.1 Extração e quantificação do teor de lipídeos

Para mensurar o teor lipídico, utilizou-se a metodologia proposta por Bligh e Dyer (1959), modificada por Chen et al. (2012). Os ensaios realizados em triplicata consistiram na pesagem de 0,1g de amostra de microalga seca (X), misturada a 5 mL de clorofórmio/metanol (1:2, v/v) que ficou sob agitação a 65 °C por 1 hora em incubadora *shaker* com agitação orbital

refrigerada (SL – 221 (SOLAB)). A mistura foi centrifugada a 3500 rpm por 5 min. Coletou-se o sobrenadante e a biomassa residual foi centrifugada mais duas vezes e juntou-se as três alíquotas de sobrenadante. Adicionou-se clorofórmio e solução de cloreto de sódio 1% de modo que o volume final resultasse na proporção 1:1:0,9 (clorofórmio/metanol/cloreto de sódio). A solução permaneceu em repouso até separar as fases e então foi transferida para um recipiente de massa conhecida (P1) (ver Figura B.2 – Apêndice B). As amostras foram secas em estufa a 60 °C até obtenção de peso constante. O recipiente teve novamente sua massa aferida (P2), e o teor de lipídeos foi determinado pela diferença de massa entre P2 e P1 relacionado a quantidade de biomassa seca utilizada para a extração. O teor total de lipídeos foi calculado como uma porcentagem do peso seco das microalgas, como mostra a Equação 9:

$$\text{Teor de lipídeos} = \frac{(P2-P1)}{X} \cdot 100 \quad \text{EQUAÇÃO 9}$$

sendo P1 a massa do recipiente vazio (g); P2 a massa do recipiente com a amostra após secagem (g) e X a quantidade de biomassa seca utilizada (g).

4. 6 – EXPERIMENTOS

4.6.1 EXPERIMENTO 1 – AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DE CRESCIMENTO APÓS A SUPLEMENTAÇÃO DE MICRONUTRIENTES

Para avaliar a cinética de crescimento concomitante ao efeito da suplementação de micronutrientes na produção de biomassa, lipídeos e pigmentos, a microalga PPEQ-08 (*Desmodesmus* sp.) foi cultivada em meio BG-11 por vinte dias em um cultivo que não recebeu suplementação extra de micronutrientes (Cultivo 1) e em outro cultivo em meio BG-11 que recebeu a interferência na quantidade de 1 mL de solução de micronutrientes ao quinto dia (Cultivo 2). Ambos os cultivos foram realizados em duplicata, em erlenmeyers de 1 L. Na Tabela 5 apresenta-se os parâmetros monitorados durante os cultivos.

Tabela 5 - Condições de cultivo de *Desmodesmus* sp. relativos aos ensaios sem (Cultivo 1) e com (Cultivo 2) suplementação de micronutrientes

Parâmetros	Cultivo 1 (DP)	Cultivo 2 (DP)
Temperatura (°C)	28 (1)	29 (1)
pH	7,30 (0,10)	7,31 (0,16)
CO ₂ (%)	3 (0)	3 (0)
Iluminação - lux $\approx \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	8085 $\approx$ 109 (177)	7972 $\approx$ 108 (165)

Os valores de desvio padrão amostral – DP estão apresentados entre parênteses.

A concentração de biomassa foi aferida diariamente. Nos dias quatro, oito, doze, dezesseis e vinte foram realizadas análises de pigmentos e lipídeos. Os resultados foram analisados estatisticamente por meio do *Software Statistica* quanto: (i) Análise de Variância a 90% de nível de confiança; e (ii) Teste Tukey com 90% de nível de confiança.

4.6.2 EXPERIMENTO 2 – SELEÇÃO DA FONTE DE LUZ

Durante dezesseis dias, a cepa PPEQ-08 (*Desmodesmus* sp.). foi cultivada em meio BG-11 em provetas de 500 mL sob fotoestimulação de quatro diferentes faixas espectrais (cores): visível (Vi), azul (Az), vermelha (Vm) e verde (Vd). A Tabela 6 apresenta as informações dos parâmetros monitorados durante os cultivos para cada faixa espectral.

Tabela 6 - Condições de cultivo da *Desmodesmus* sp. em diferentes faixas espectrais.

Parâmetros	Faixa espectral			
	Visível (DP)	Azul (DP)	Vermelha (DP)	Verde (DP)
Temperatura (°C)	27 (1)	30 (1)	27 (1)	27 (1)
pH	7,52 (0,22)	7,61 (0,17)	7,53 (0,18)	7,50 (0,25)
CO ₂ (%)	3 (0)	3 (0)	3 (0)	3 (0)
Iluminação - lux	327 (32)	321 (33)	315 (30)	321 (32)

Os valores de desvio padrão amostral – DP estão apresentados entre parênteses

A concentração de biomassa foi aferida diariamente. Nos dias doze e dezesseis foram realizadas análises de pigmentos e lipídeos. Os resultados foram analisados estatisticamente por meio do *Software Statistica* quanto: (i) Análise de Variância a 90% de nível de confiança; e (ii) Teste Tukey com 90% de nível de confiança.

4.6.3 EXPERIMENTO 3 – AVALIAÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DOS MACRONUTRIENTES NITRATO DE SÓDIO E FOSFATO DE POTÁSSIO

Construiu-se o planejamento experimental fatorial 3^2 para avaliar os efeitos de diferentes concentrações de nutrientes sobre a biossíntese de bioprodutos de PPEQ-08 (*Desmodesmus* sp.). Investigou-se a influência das variáveis independentes (nitrato de sódio (NaNO₃) e fosfato de potássio dibásico (K₂HPO₄)) em diferentes níveis: superior (+1), médio (0) e inferior (-1) sobre as variáveis dependentes lipídeos e pigmentos (Tabela 7). Os valores das variáveis independentes foram definidos por testes preliminares, tendo como referencial

utilizado para determinação dos níveis a composição do meio BG-11 (Tabela 3), de modo que, o nível zero foi a formulação original, e os níveis superiores e inferiores foram variações dessa formulação.

Os planejamentos foram definidos por doze experimentos executados de forma aleatória, onde as duas variáveis independentes variaram em um fatorial 3^2 , sendo três experimentos realizados no ponto central, conforme apresentado na Tabela 8.

A significância estatística do modelo ajustado aos dados experimentais foi avaliada pelo teste F ao nível de 10%. A qualidade do ajuste foi verificada pelo coeficiente de determinação (R^2), pelo coeficiente de determinação ajustado ($R^2_{\text{ajust.}}$) e pela análise gráfica dos resíduos: distribuição da probabilidade normal dos resíduos; resíduos em função dos valores preditos; valores observados em função dos valores preditos e resíduos em função do número do ensaio experimental.

O modelo polinomial de segunda ordem, apresentado pela Equação 10 (Montgomery, 2012), foi utilizado para o ajuste dos dados experimentais da variável resposta (lipídeos e pigmentos), os quais foram submetidos à análise de variância – ANOVA.

$$Y = \beta_0 + \sum_{j=1}^k \beta_j q_j + \sum_{j=1}^k \beta_{jj} q_j^2 + \sum_{i < j}^k \beta_{ij} q_i q_j + \varepsilon \quad \text{EQUAÇÃO 10}$$

Sendo Y a variável dependente predita pelo modelo de regressão; β os coeficientes do modelo representando os termos lineares (β_j), quadráticos (β_{jj}) e de interação (β_{ij}) entre as variáveis independentes (q_1, q_2) definidas como variáveis de projeto; k corresponde ao número de variáveis independentes e ε ao erro experimental.

Tabela 7- Concentrações das variáveis independentes estudadas e níveis de variação

		Nível (-1)		Nível (0)		Nível (+1)	
Variáveis	Quant. (mL L ⁻¹)	Solução Estoque (g 200 mL ⁻¹ de H ₂ O)	Final (mM)	Solução Estoque (g 200 mL ⁻¹ de H ₂ O)	Final (mM)	Solução Estoque (g 200 mL ⁻¹ de H ₂ O)	Final (mM)
(NaNO ₃)	10	5	2,94	30	17,65	55	32,35
(K ₂ HPO ₄)	10	0,2	0,05	0,8	0,23	1,4	0,40

Tabela 8 – Matriz do planejamento experimental fatorial 3²

Experimento	Variáveis	
	N	F
1	-1	-1
2	-1	0
3	-1	+1
4	0	-1
5	0	0
6	0	+1
7	+1	-1
8	+1	0
9	+1	+1
10 (PC)	0	0
11 (PC)	0	0
12 (PC)	0	0

NOTA: N - Nitrato de sódio (NaNO₃); F - Fosfato de potássio (K₂HPO₄); Ponto Central (PC).

Os experimentos tiveram duração de dezesseis dias em provetas de 500 mL sob monitoramento das condições de cultivo apresentadas na Tabela 9. Em comparação com o Experimento 2 (item 4.6.2), a intensidade luminosa do Experimento 3 foi elevada a fim de causar um estresse luminoso.

A concentração de biomassa foi aferida diariamente. No décimo sexto dia de cultivo foram realizadas análises de pigmentos e lipídeos.

Tabela 9 - Condições de cultivo dos experimentos realizados no planejamento experimental fatorial 3²

Experimento ^(a)	Parâmetros			
	Temperatura (°C)	pH	CO ₂ (%)	Iluminação em faixa espectral vermelha - lux (DP)
1 (N 5, F 0,2)	27 (3)	7,63 (0,31)	3 (0)	1932 (181)
2 (N 5, F 0,8)	27 (3)	7,66 (0,32)		
3 (N 5, F 1,4)	27 (3)	7,69 (0,32)		
4 (N 30, F 0,2)	27 (3)	7,73 (0,33)		
5 (N 30, F 0,8)	27 (3)	7,74 (0,36)		
6 (N 30, F 1,4)	27 (2)	7,76 (0,33)		
7 (N 55, F 0,2)	27 (3)	7,71 (0,33)		
8 (N 55, F 0,8)	27 (3)	7,75 (0,33)		
9 (N 55, F 1,4)	27 (3)	7,78 (0,34)		
10 (N 30, F 0,8)	27 (3)	7,76 (0,34)		
11 (N 30, F 0,8)	27 (2)	7,75 (0,36)		
12 (N 30, F 0,8)	27 (2)	7,81 (0,38)		

Nota: Os valores de desvio padrão amostral – DP estão apresentados entre parênteses;

^(a) Quantidades (g) de nitrato de sódio (N) e fosfato de potássio (F).

4.6.3.1 Validação das respostas experimentais

Os modelos de regressão ajustados às respostas experimentais foram validados separadamente pela função desejabilidade cujo objetivo foi a obtenção de um modelo capaz, matematicamente, de maximizar a produção de lipídeos e pigmentos por parte da microalga PPEQ-08 (*Desmodesmus* sp.), tendo em vista os limites das variáveis independentes definidas no planejamento experimental fatorial 3².

O procedimento matemático foi realizado com o uso do *Software Statistica*. A desejabilidade variava entre 0 e 1 conforme limitações impostas pelos valores mínimo e máximo, respectivamente, das variáveis dependentes obtidos experimentalmente. Ao passo que cada resposta se torna mais desejável, a desejabilidade aproxima-se de 1. Optou-se por realizar uma função desejabilidade individual (Equação 11) para a produção de lipídeos e uma função desejabilidade global (Equação 12) para a produção de pigmentos, envolvendo clorofila *a* e *b* e carotenoides totais, pois, de acordo com os resultados obtidos, as maiores concentrações de

lipídeos e pigmentos correspondiam aos extremos opostos das variáveis independentes, de modo que, a junção destes resultaria numa baixa desejabilidade global.

$$d_i = \begin{cases} 0 & Y_i < L \\ \left(\frac{Y_i - L}{T - L}\right)^s & L \leq Y_i \\ 1 & Y_i > T \end{cases} \quad \text{EQUAÇÃO 11}$$

$$D = (d_1 \cdot d_2 \cdot \dots \cdot d_m)^{\frac{1}{m}} \quad \text{EQUAÇÃO 12}$$

sendo d_i a desejabilidade individual da resposta experimental “ i ”; m o número de respostas; Y_i o valor da resposta “ i ”; L o valor mínimo da resposta experimental; T o valor alvo máximo da resposta experimental e s o peso igual a 1 para todas as respostas.

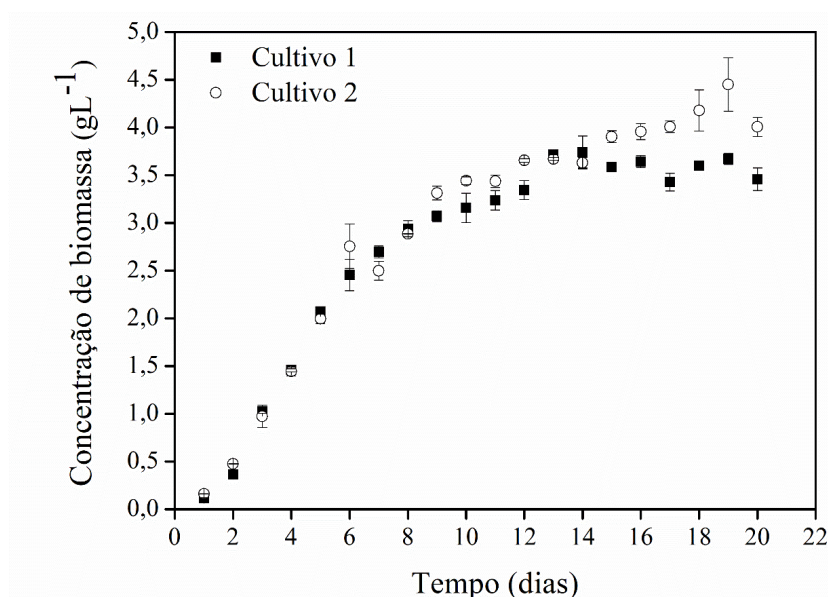
O perfil das respostas (Y_i) foi apresentado em função das variáveis independentes por meio de gráficos bidimensionais relacionados ao perfil desejabilidade individual e global da variável dependente.

5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 EXPERIMENTO 1 – AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DE CRESCIMENTO APÓS A SUPLEMENTAÇÃO DE MICRONUTRIENTES

5.1.1 Concentração de biomassa e taxa de crescimento específico

Ao longo de vinte dias a concentração de biomassa foi mensurada diariamente. Ao observar a Figura 11, verifica-se que os cultivos da cepa PPEQ-08 (*Desmodesmus* sp.) apresentaram crescimento cinético similar até o quinto dia, momento em que ocorre a suplementação de micronutrientes, a partir do qual ocorre diferenciação para acúmulo da biomassa. As máximas concentrações de biomassa de PPEQ-08 obtida nos experimentos sem (Cultivo 1) e com (Cultivo 2) suplementação de micronutrientes foram de 3,74 g L⁻¹ e 4,45 g L⁻¹, atingidos respectivamente no décimo quarto dia e décimo nono dia de cultivo. Ambos os cultivos apresentaram valores de biomassa maiores que os relatados por Zhao et al., (2019) que cultivaram *Desmodesmus* sp. ZFY atingindo 2,06 g L⁻¹ de biomassa em meio de cultura BG-11.



Nota: Dados apresentados com desvio padrão amostral.

Figura 11 - Concentração de biomassa de *Desmodemus* sp. em cultivos sem (Cultivo 1) e com (Cultivo 2) suplementação de micronutrientes

A Figura 12 apresenta as taxas de crescimento específico para os cultivos realizados no experimento. Para os cultivos 1 e 2, a taxa máxima de crescimento foi de $0,05 \text{ h}^{-1}$ e $0,04 \text{ h}^{-1}$ e o tempo de duplicação celular foi de 12,40 h e 17,36 h, respectivamente.

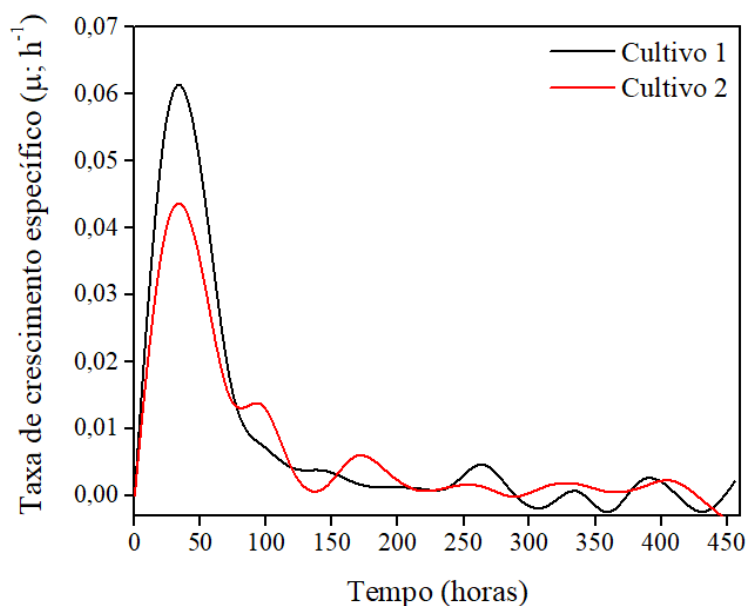


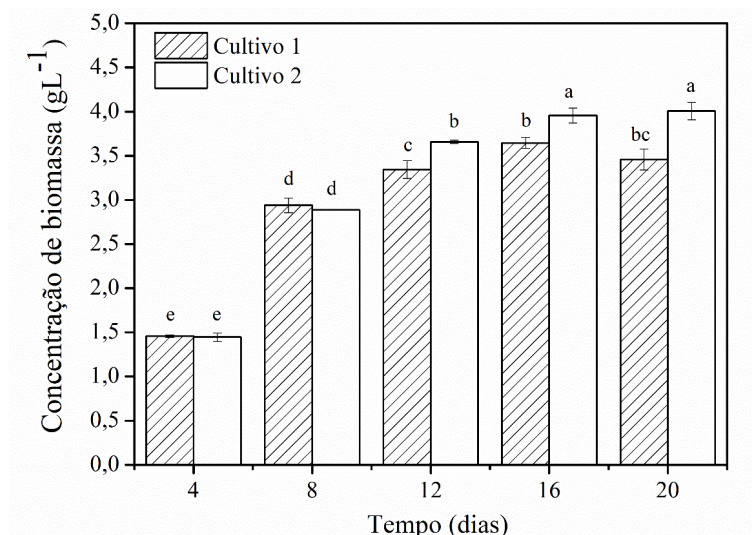
Figura 12 - Taxa de crescimento específico de *Desmodemus* sp. em cultivos sem (Cultivo 1) e com (Cultivo 2) suplementação de micronutrientes

5.1.2 Teste de comparação de médias com biomassa

A Figura 13 apresenta os valores médios de produção em biomassa e Teste Tukey onde os resultados sugerem incremento gradativo de biomassa a partir da suplementação de micronutrientes ao cultivo da cepa PPEQ-08 (*Desmodemus* sp.), o qual foi significativamente

superior ao tratamento sem suplementação.

O Teste Tukey aponta médias estatisticamente iguais para as produções do décimo sexto e vigésimo dia, indicando que para obtenção do maior rendimento em biomassa, o cultivo poderia ter sido encerrado ao décimo sexto dia.

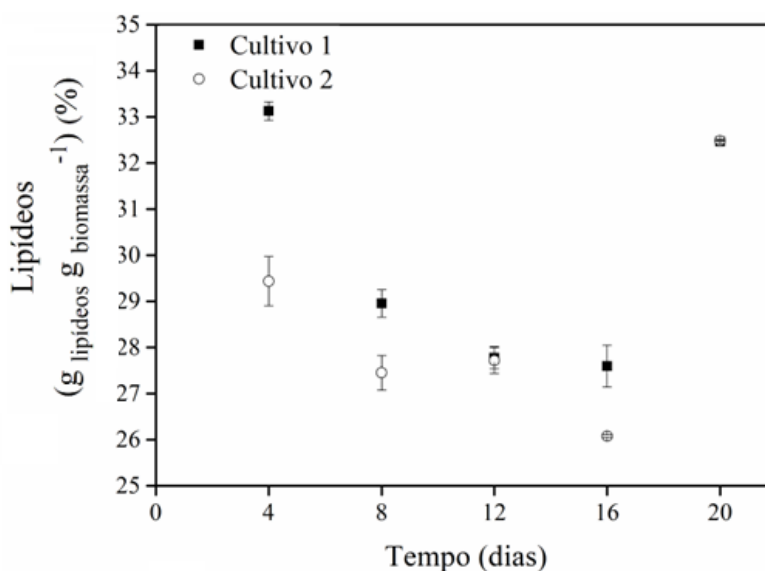


Nota: Dados apresentados com desvio padrão amostral; médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente (p-valor <0,1) pelo Teste Tukey.

Figura 13 - Efeitos dos tratamentos em cultivos sem (Cultivo 1) e com (Cultivo 2) suplementação de micronutrientes na concentração de biomassa de *Desmodesmus* sp.

5.1.3 Teor lipídico

A biomassa microalgal foi coletada a cada quatro dias e submetida à extração para medição do teor lipídico. Conforme apresentado na Figura 14, exceto para o quarto dia em que ainda não havia interferência e para o vigésimo dia, a biomassa obtida dos cultivos sem suplementação de micronutrientes apresentou um teor lipídico por peso seco maior quando comparado ao teor apresentado pelos cultivos que a receberam. A produção de lipídeos aparenta ciclicidade, com redução gradativa de teor do dia quatro ao dia dezesseis, e aumento do dia dezesseis ao vinte. Nas condições em que os experimentos foram realizados, tais resultados apontam que a suplementação de micronutrientes inibiu/reduziu a produção lipídica nos dias oito e dezesseis, efeito contrário ao observado na produção de biomassa nos dias doze, dezesseis e vinte (Figura 13), entretanto, os resultados do teor de lipídeos mensurados no quarto dia de cultivo, previamente a suplementação de micronutrientes, sugerem que esta diferença lipídica tem origem em outro fator não controlado. Os maiores teores lipídicos alcançados após a interferência ocorreram no vigésimo dia atingindo 32,46% (I.C. 90% 32,35 – 32,57) e 32,48% (I.C. 90% 32,44 – 32,51) para os cultivos 1 e 2, respectivamente.

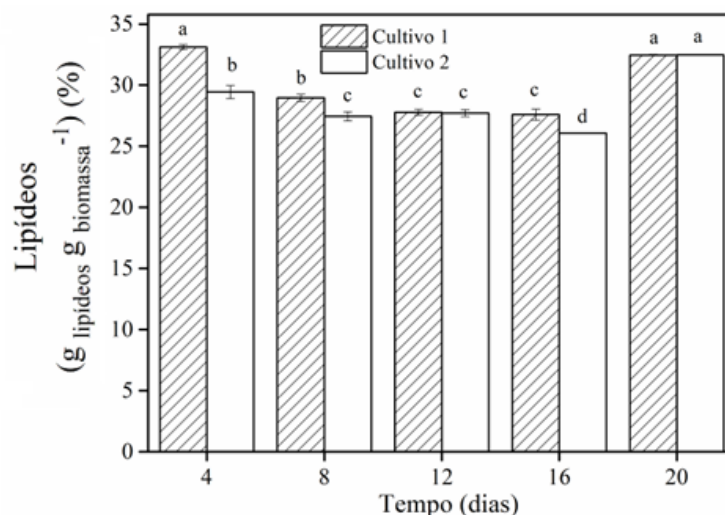


Nota: Dados apresentados com desvio padrão amostral.

Figura 14 - Rendimento lipídico de *Desmodemus* sp. em cultivos sem (Cultivo 1) e com (Cultivo 2) suplementação de micronutrientes

5.1.4 Teste de comparação de médias com lipídeos

Pela comparação dos valores médios para rendimento lipídico entre os cultivos, empregando-se Teste Tukey (10%), constata-se pela Figura 15, diferença significativa ao longo do cultivo. As maiores médias para o teor de lipídeos foram detectadas no vigésimo dia, sendo independentes em relação a suplementação adicional de micronutrientes, ou seja, não se diferenciaram estatisticamente em teor lipídico pelo Teste Tukey, dispensando assim, a suplementação de micronutrientes.

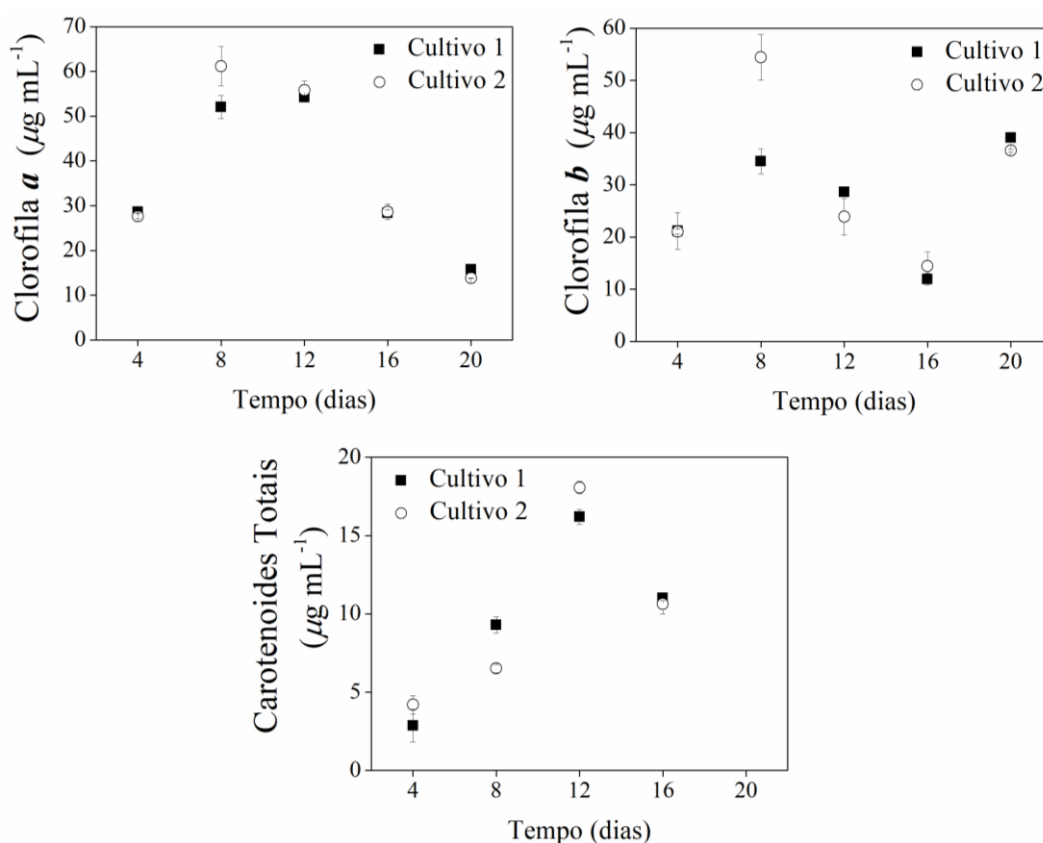


Nota: Dados apresentados com desvio padrão amostral; médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente (p -valor $< 0,1$) pelo Teste Tukey.

Figura 15 - Efeitos dos tratamentos em cultivos sem (Cultivo 1) e com (Cultivo 2) suplementação de micronutrientes no teor lipídico de *Desmodemus* sp.

5.1.5 Teor de pigmentos

Os valores médios para acúmulo de pigmentos na cepa PPEQ-08, apresentados na Figura 16, apontam que o Cultivo 2, que recebeu a suplementação de micronutrientes ao quinto dia, apresentou os maiores picos para produção de pigmentos. A maior produção de clorofila **a** (Cl**a**) para o Cultivo 1 foi de $54,24 \mu\text{g mL}^{-1}$ (I.C. 90% 54,20 – 54,29) no décimo segundo dia, enquanto para o Cultivo 2, a produção foi de $61,19 \mu\text{g mL}^{-1}$ (I.C. 90% 51,72 – 70,65) no oitavo dia de cultivo. A maior produção de clorofila **b** (Cl**b**) para o Cultivo 1 foi de $39,03 \mu\text{g mL}^{-1}$ (I.C. 90% 38,75 – 39,30) no vigésimo dia, enquanto para o Cultivo 2, a produção foi de $54,41 \mu\text{g mL}^{-1}$ (I.C. 90% 44,86 – 63,96) ocorrendo no oitavo dia de experimento. A maior produção de carotenoides totais (CT) aconteceu no décimo segundo dia de experimento, atingindo $16,19 \mu\text{g mL}^{-1}$ (I.C. 90% 15,15 – 17,23) e $18,07 \mu\text{g mL}^{-1}$ (I.C. 90% 17,18 – 18,95) para os Cultivos 1 e 2, respectivamente. O vigésimo dia de cultivo não apresentou valores de CT.



Nota: Dados apresentados com desvio padrão amostral.

Figura 16 - Produção de pigmentos de *Desmodemus* sp. em cultivos sem (Cultivo 1) e com (Cultivo 2) suplementação de micronutrientes

5.1.6 Teste de comparação de médias com pigmentos

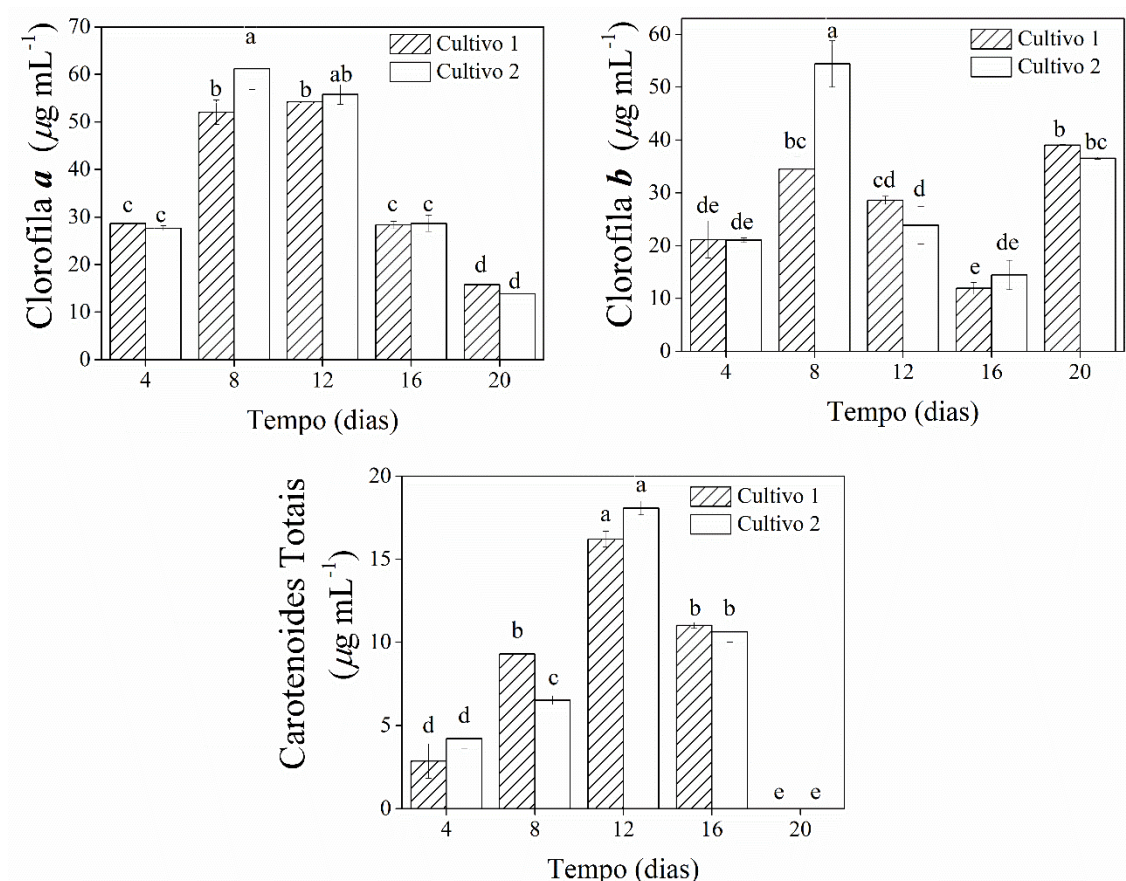
A análise de variância para os cultivos 1 e 2 apresentada na Tabela 10 foi realizada para os dias quatro, oito, doze, dezesseis e vinte. A análise sugere diferença significativa do teor de pigmentos ($p\text{-valor} < 0,1$) entre os tratamentos que envolvem **Cla**, **Clb** e **CT** entre os dias de cultivo.

Tabela 10 - ANOVA ($\alpha = 0,1$) com os resultados de pigmentos obtidos a partir dos cultivos de *Desmodemus* sp. em meio BG-11 entre os tratamentos

Fator	G.L	SQ	QM	F _{calc}	p-valor
Cla	9	5500,282	611,142	180,927	0
Erro	10	33,778	3,377	-	-
Total	19	5534,060	-	-	-
Clb	9	2974,149	330,461	55,366	0
Erro	10	59,685	5,968	-	-
Total	19	30,33835	-	-	-
CT	9	714,219	79,357	310,784	0
Erro	10	2,553	0,255	-	-
Total	19	716,772	-	-	-

G.L: graus de liberdade; SQ: soma de quadrados; QM: soma de quadrados médios; F_{calc}: F calculado.

A Figura 17 apresenta os valores médios das produções de pigmentos e teste Tukey. Para **Cla**, o Cultivo 1 apresenta queda na produção do pigmento a partir do dia quatro. Para o Cultivo 2, as médias apontam queda em sua produtividade, exceto para o dia oito, logo, observa-se uma tendência de redução de **Cla** com o aumento do tempo de cultivo. Após a suplementação de micronutrientes, o Cultivo 2 apresentou, no oitavo dia, a maior média de produção para **Cla**. Para **Clb**, após a suplementação de micronutrientes, o Cultivo 2 apresentou aumento estatisticamente considerável em sua produção no oitavo dia, mas apresentou queda em sua produção a partir de então, com médias iguais e inferiores comparado ao Cultivo 1. Para **CT**, as maiores produções para os Cultivos 1 e 2 ocorreram no décimo segundo dia de experimento, e as médias não se diferenciaram estatisticamente pelo teste Tukey para ambos os tratamentos. A partir do oitavo dia de cultivo, para **Cla**, **Clb** e **CT**, nota-se que a suplementação de micronutrientes não ocasionou aumento em suas produtividades, pois, algumas médias não se diferenciaram estatisticamente pelo teste entre os tratamentos e outras apresentaram menor produtividade para o Cultivo 2. No Apêndice C é possível visualizar a Tabela C.1, que contém os valores médios de produção de pigmentos para ambos os cultivos durante todos os dias analisados.



Nota: Dados apresentados com desvio padrão amostral; médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente (p -valor $<0,1$) pelo Teste Tukey.

Figura 17 - Efeitos dos tratamentos em cultivos sem (Cultivo 1) e com (Cultivo 2) suplementação de micronutrientes na produção de pigmentos de *Desmodesmus* sp.

5.1.7 Síntese do Experimento 1

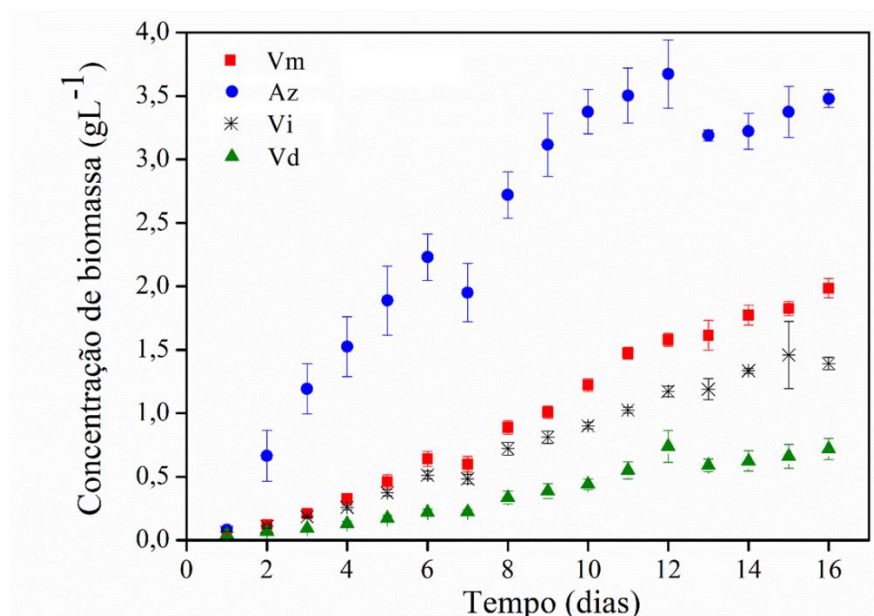
A cepa PPEQ-08, identificada como microalga *Desmodesmus* sp. foi avaliada quanto ao seu crescimento em biomassa, produção de lipídeos e para os teores de clorofilas **a** e **b** e carotenoides totais, a partir do seu cultivo em meio BG-11 por vinte dias, com e sem suplementação de 1 mL da solução de micronutrientes no quinto dia. Os resultados sugerem que o tratamento com suplementação de micronutrientes resultou em maior concentração de biomassa. Para lipídeos, o cultivo que recebeu a suplementação obteve um teor percentual menor e ao fim do se igualou estatisticamente em rendimento ao cultivo que não recebeu a interferência. Para **CT**, o cultivo que recebeu a suplementação de micronutrientes não se diferenciou estatisticamente da maior média de produção comparado ao cultivo que não a recebeu. Para **Cl_a** e **Cl_b**, houve um pico isolado de produção para o cultivo que recebeu a suplementação, entretanto, com o decorrer do tempo, ele apresentou quedas muitas vezes superiores de produção comparado ao cultivo que não recebeu a interferência. Para os próximos experimentos, optou-se por desenvolver os cultivos sem suplementação de micronutrientes

durante dezesseis dias e coletar amostras no décimo segundo dia de cultivo para serem submetidas às análises de lipídeos e pigmentos.

5.2 EXPERIMENTO 2 – SELEÇÃO DA FONTE DE LUZ

5.2.1 Concentração de biomassa e taxa de crescimento específico

Pela comparação do acúmulo de biomassa da cepa PPEQ-08, submetidas as faixas espectrais do visível (Vi), azul (Az), vermelha (Vm) e verde (Vd), constatou-se que o cultivo realizado em espectro azul, resultou em valor de maior magnitude ($3,673 \text{ g L}^{-1}$) (Figura 18). Para os cultivos realizados nos espectros do vermelho, visível e verde, houve redução do acúmulo de biomassa, atingindo-se $1,985 \text{ g L}^{-1}$, $1,459 \text{ g L}^{-1}$ e $0,739 \text{ g L}^{-1}$, respectivamente. A luz azul promove reações consideráveis e interessantes no metabolismo da microalga, como maior penetração no cultivo do que qualquer outra cor; a clorofila *a* possui um acentuado pico de absorção na faixa azul do espectro de luz, e ainda influencia na ativação de enzimas e vias metabólicas por meio dos fotorreceptores de luz azul (Lehmuskero; Chauton; Boström, 2018).



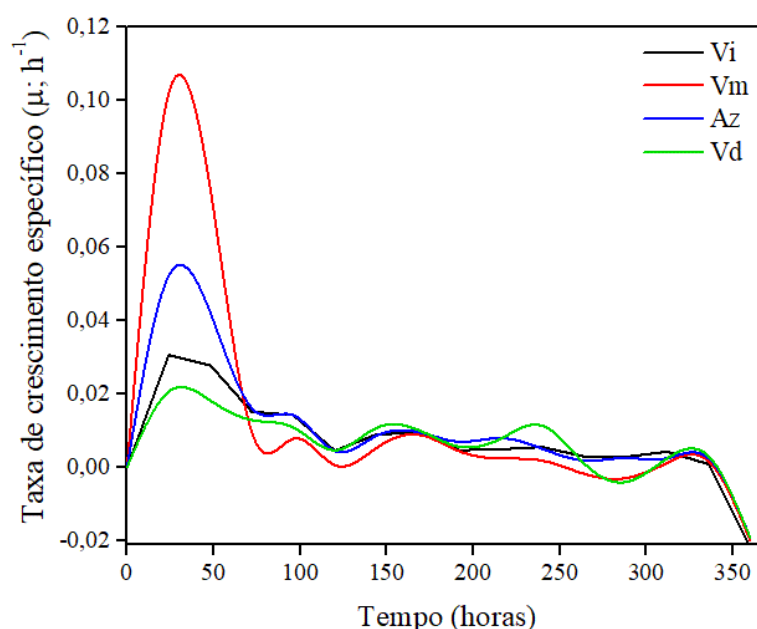
Nota: Dados apresentados com desvio padrão amostral; Visível (Vi); Azul (Az); Vermelho (Vm); Verde (Vd).

Figura 18 - Concentração de biomassa de *Desmodesmus* sp. em diferentes faixas espectrais

Asuthkar et al., (2016) cultivaram *Chlorella Pyrenoidosa* em meio BG-11 sob fotoestimulação de LED's nas cores vermelha (480 lux), verde (450 lux), azul (1663 lux) e visível (1986 lux), obtendo maior crescimento da microalga na luz azul. Devido à composição do pigmento e espectros de absorção, normalmente a luz azul e vermelha promovem maiores taxas de crescimento e acúmulo de biomassa nas microalgas, quando comparadas as cores verde

e amarela, exceto para espécies com ficobilinas (Lehmuskero; Chauton; Boström, 2018).

A Figura 19 apresenta a taxas de crescimento específico para os cultivos realizados em cada faixa espectral. Para o cultivo realizado em espectro visível, a taxa máxima de crescimento foi de $0,031 \text{ h}^{-1}$ e o tempo de duplicação celular foi de 22,67 h. Para o cultivo em espectro vermelho, a taxa máxima de crescimento foi de $0,052 \text{ h}^{-1}$ e o tempo de duplicação celular foi de 13,28 h. O espectro azul resultou no melhor cultivo de crescimento com taxa específica de $0,102 \text{ h}^{-1}$ e tempo de duplicação celular de 6,80 h. Em contrapartida, o espectro verde foi o que apresentou a menor taxa de crescimento específico e o maior tempo de duplicação celular, com $0,021 \text{ h}^{-1}$ e 33,64 h, respectivamente. Atta et al., 2013 cultivaram *Chlorella vulgaris* em luz de LED azul e luz fluorescente branca e alcançaram máxima taxa de crescimento específico de $1,26 \text{ d}^{-1}$ no cultivo realizado em espectro azul sob intensidade luminosa de $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

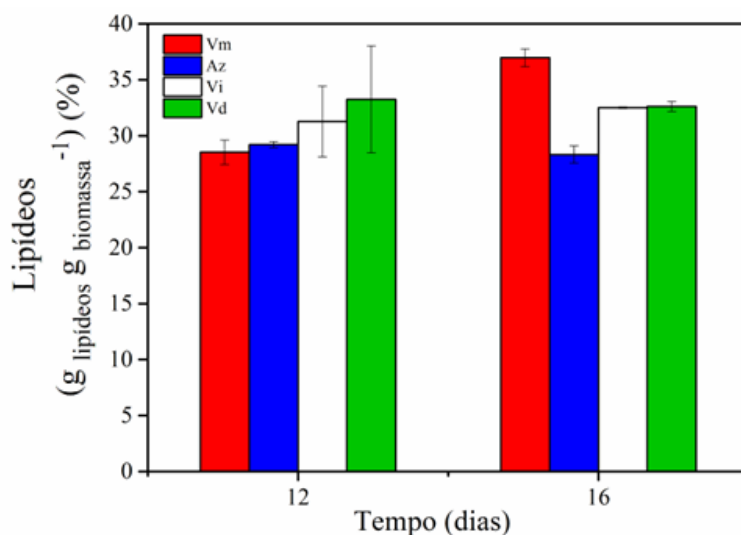


Nota: Visível (Vi); Azul (Az); Vermelho (Vm); Verde (Vd).

Figura 19 - Taxa de crescimento específico de *Desmodesmus* sp. em diferentes faixas espectrais

5.2.2 Teor lipídico

A biomassa utilizada na análise lipídica foi coletada no décimo segundo e décimo sexto dia de cultivo. A Figura 20 apresenta os valores médios das produções nos dias analisados com o desvio padrão amostral. É possível observar que no décimo segundo dia o maior rendimento lipídico pertenceu ao cultivo realizado em espectro verde, e no décimo sexto dia, esse rendimento pertenceu ao cultivo realizado em espectro vermelho. Rai, Gautom e Sharma (2015) cultivaram *Chlorella* sp. em espectro visível (controle), vermelho, amarelo e verde, e obtiveram o maior rendimento lipídico ($0,092 \text{ g L}^{-1}$), no cultivo realizado em luz vermelha e intensidade de 2700 lux.



Nota: Dados apresentados com desvio padrão amostral; Visível (Vi); Azul (Az); Vermelho (Vm); Verde (Vd).

Figura 20 - Rendimento lipídico de *Desmodesmus* sp. do décimo segundo e décimo sexto dia de cultivo em diferentes faixas espectrais

5.2.3 Teste de comparação de médias com lipídeos

A análise de variância do rendimento lipídico para os cultivos em diferentes faixas espectrais (Tabela 11) foi realizada para os dias doze e dezesseis. O p-valor <0,1 resultante da análise sugere que não houve diferença significativa de rendimento lipídico entre as cores no décimo segundo dia de cultivo, mas sugere diferença significativa ao décimo sexto dia.

Tabela 11- ANOVA ($\alpha = 0,1$) com os resultados de lipídeos obtidos a partir do cultivo de *Desmodesmus* sp. em diferentes faixas espectrais para o décimo segundo e décimo sexto dia de cultivo

Fator	G.L	SQ	QM	F _{calc}	p-valor
Lipídeos - décimo segundo dia de cultivo	3	27,403	9,134	1,066	0,456
Erro	4	34,249	8,562	-	-
Total	7	61,652	-	-	-
Lipídeos - décimo sexto dia de cultivo	3	74,836	24,945	69,631	0
Erro	4	1,432	0,358	-	-
Total	7	76,270	-	-	-

G.L: graus de liberdade; SQ: soma de quadrados; QM: soma de quadrados médios; F_{calc}: F calculado.

A Tabela 12 apresenta as médias de rendimento lipídico entre os tratamentos no décimo sexto dia e o Teste Tukey. No décimo segundo dia de cultivo não houve diferença estatística entre os rendimentos, entretanto, no décimo sexto dia, o cultivo realizado em espectro azul apresentou o menor rendimento quando comparado aos outros espectros, ou seja, a maior concentração de biomassa não resultou necessariamente em maior rendimento lipídico, como

observado no Experimento 1.

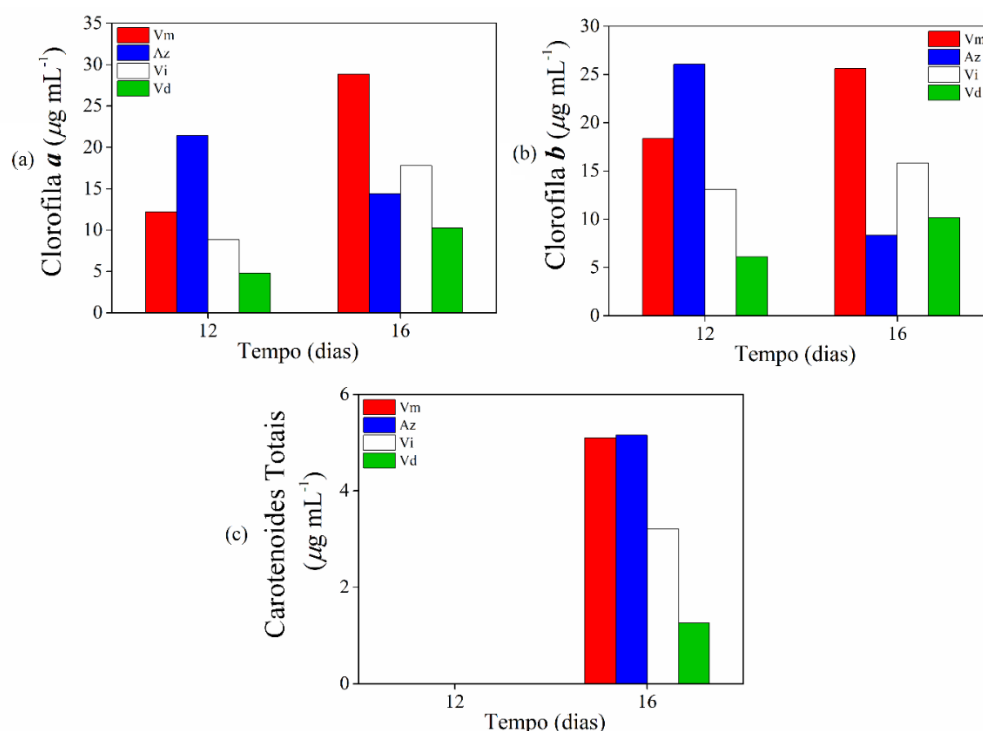
Tabela 12 – Rendimento lipídico médio e Teste Tukey ($\alpha = 0,1$) referente ao cultivo de *Desmodemus* sp. em diferentes faixas espectrais para o décimo sexto dia de cultivo

Faixa espectral	Rendimento lipídico (%) referente ao décimo sexto dia de cultivo (I.C)
Vermelha	36,96 (90% 35,25 – 38,68) ^a
Verde	32,62 (90% 31,64 – 33,60) ^b
Visível	32,51 (90% 32,37 – 32,65) ^b
Azul	28,31 (90% 26,62 – 30,00) ^c

Nota: Intervalo de confiança (I.C); médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente (p-valor <0,1) pelo Teste Tukey.

5.2.4 Teor de pigmentos

Observa-se uma dinâmica na produção de pigmentos entre os dias doze e dezesseis na Figura 21. No décimo segundo dia de cultivo os experimentos realizados nas faixas espectrais azul e vermelha apresentaram as maiores médias de produção para **Cl_a** e **Cl_b**; valores de **CT** não foram observados neste dia para nenhum dos espectros. No décimo sexto dia a faixa espectral vermelha resultou na maior produção de **Cl_a** e **Cl_b** e a faixa espectral azul, na maior produção de **CT**. Os pigmentos diferem entre si em capacidade de absorção de luz: as clorofilas **a** e **b** absorvem significativamente a luz nos comprimentos de onda azul e vermelho (400 a 700 nm), enquanto os carotenoides absorvem a luz principalmente em comprimentos de onda que variam de 350 a 600 nm (Begum et al., 2015). Quando os níveis de irradiação ultrapassam os limites suportados pelas clorofilas, os carotenoides passam a ser produzidos para protegê-las da oxidação, sugere-se então, que no décimo segundo dia, as luzes irradiadas não provocaram estresse fotoquímico em *Desmodemus* sp.



Nota: Visível (Vi); Azul (Az); Vermelho (Vm); Verde (Vd).

Figura 21 - Produção de pigmentos de *Desmodemus* sp. no décimo segundo e décimo sexto dia de cultivo em diferentes faixas espectrais

5.2.5 Teste de comparação de médias com pigmentos

A análise de variância (Tabela 13) e o Teste Tukey para a produção de pigmentos em diferentes faixas espectrais foram realizados para o dia dezesseis, onde os valores médios de **CT** para os espectros azul e vermelho estão bem próximos. A análise sugere diferença estatisticamente significativa no teor de pigmentos ($p\text{-valor} < 0,1$) no dia analisado entre todas as faixas espectrais.

Tabela 13 - ANOVA ($\alpha = 0,1$) com os resultados de pigmentos obtidos a partir do cultivo de *Desmodemus* sp. em diferentes faixas espectrais para o décimo sexto dia de cultivo

Fator	G.L	SQ	QM	F _{calc}	p-valor
Cl_a	3	380,612	126,870	52,170	0
Erro	4	9,727	2,432	-	-
Total	7	390,339	-	-	-
Cl_b	3	362,747	120,915	133,307	0
Erro	4	3,628	0,907	-	-
Total	7	366,375	-	-	-
CT	3	20,463	6,821	13,134	0
Erro	4	2,077	0,519	-	-
Total	7	22,540	-	-	-

G.L: graus de liberdade; SQ: soma de quadrados; QM: soma de quadrados médios; F_{calc}: F calculado.

A Tabela 14 apresenta os valores médios das produções de pigmentos e Teste Tukey do

dia dezesseis. É possível observar que as maiores médias produtivas de *Cla* e *Clb* pertenceram aos cultivos realizados em espectro vermelho; para *CT*, as maiores produções pertenceram aos cultivos realizados em espectro azul e vermelho, respectivamente, entretanto, o Teste Tukey sugere que as médias não se diferenciaram estatisticamente entre as cores. Mohsenpour, Richards e Willoughby (2012), realizaram um experimento com *Chlorella vulgaris* sob iluminação espectral violeta, amarela, laranja e vermelha; a luz vermelha aumentou consideravelmente a pigmentação de *C. vulgaris* durante um período de quatorze dias, induzindo a produção de *Cla* em 1,29%, em comparação ao controle (visível) de 0,86% e favorecendo a produção de *Clb* em 0,38%, em comparação ao controle (visível) de 0,28%. Ma et al., (2022) cultivaram *Chlorella sorokiniana* MB-1 em meio BG-11 sob irradiação de LED's visível, azul, verde e vermelho, e concluíram que os carotenoides totais contribuíram para a absorção da luz azul e verde, enquanto a *Cla* desempenhou um importante papel na absorção da luz vermelha.

Tabela 14 - Produção média de pigmentos e Teste Tukey ($\alpha = 0,1$) referente ao cultivo de *Desmodesmus* sp. em diferentes faixas espectrais para o décimo sexto dia de cultivo

Faixa espectral	Produção de pigmentos ($\mu\text{g mL}^{-1}$) (I.C)		
	<i>Cla</i>	<i>Clb</i>	<i>CT</i>
Vermelha	28,86 (90% 26,20 – 31,53) ^a	25,60 (90% 22,38 – 28,83) ^a	5,09 (90% 4,83 – 5,35) ^a
Visível	17,79 (90% 15,38 – 20,20) ^b	15,83 (90% 15,53 – 16,13) ^b	3,20 (90% 2,07 – 4,34) ^{ab}
Azul	14,41 (90% 8,77 – 20,05) ^{bc}	8,33 (90% 6,20 – 10,45) ^c	5,15 (90% 2,24 – 8,05) ^a
Verde	10,29 (90% 9,13 – 11,45) ^c	10,13 (90% 8,66 – 11,61) ^c	1,26 (90% 0,99 – 1,53) ^b

Nota: Intervalo de confiança (I.C); médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente (p-valor <0,1) pelo Teste Tukey.

5.2.6 Síntese do Experimento 2

A microalga PPEQ-08 (*Desmodesmus* sp.) foi avaliada quanto ao seu crescimento em biomassa, produção de lipídeos, clorofilas *a* e *b* e carotenoides totais, a partir do seu cultivo em meio BG-11 por dezesseis dias nas seguintes faixas espectrais: visível, azul, vermelha e verde. Os resultados sugerem maior concentração de biomassa e taxa de crescimento específico no cultivo realizado em cor azul. Para lipídeos, não houve diferença significativa de rendimento entre os espectros no décimo segundo dia, mas no décimo sexto dia o cultivo conduzido em luz vermelha apresentou maior rendimento lipídico. Para pigmentos, não foi observada produção de carotenoides totais no décimo segundo dia, e para as clorofilas *a* e *b*, exceto para os cultivos

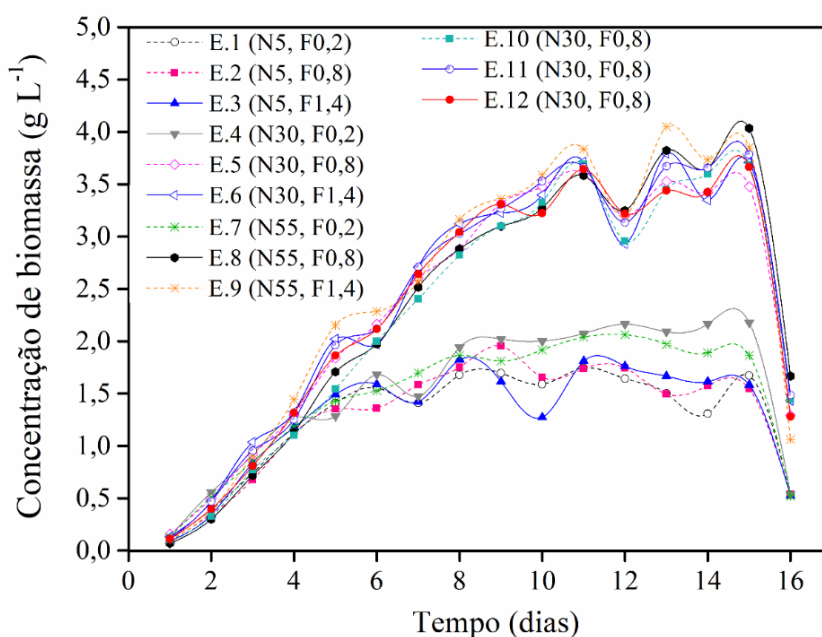
realizados em espectro azul, observou-se uma tendência de aumento de produção no décimo sexto dia. A luz vermelha resultou na maior produção de clorofilas no décimo sexto dia, para carotenoides totais as maiores produções ficaram entre as luzes azul e vermelha, entretanto, ambas não apresentaram diferenças significativas entre si pelo Teste Tukey. Logo, diante dos resultados obtidos, optou-se por conduzir os próximos experimentos em espectro vermelho e coletar amostras para análises de lipídeos e pigmentos no décimo sexto dia de cultivo devido a maior produção de ambos neste dia.

5.3 EXPERIMENTO 3 – AVALIAÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DOS MACRONUTRIENTES NITRATO DE SÓDIO E FOSFATO DE POTÁSSIO

5.3.1 Concentração de biomassa e taxa de crescimento específico

A concentração de biomassa foi estimada diariamente a partir da densidade óptica durante dezesseis dias. Em geral, os experimentos (E) limitados nutricionalmente por nitrato de sódio (N) e fosfato de potássio (F) apresentaram menor crescimento quando comparados aos experimentos realizados em condições repletas destes nutrientes ou em formulações originais (suficientes) do meio BG-11 (Figura 22).

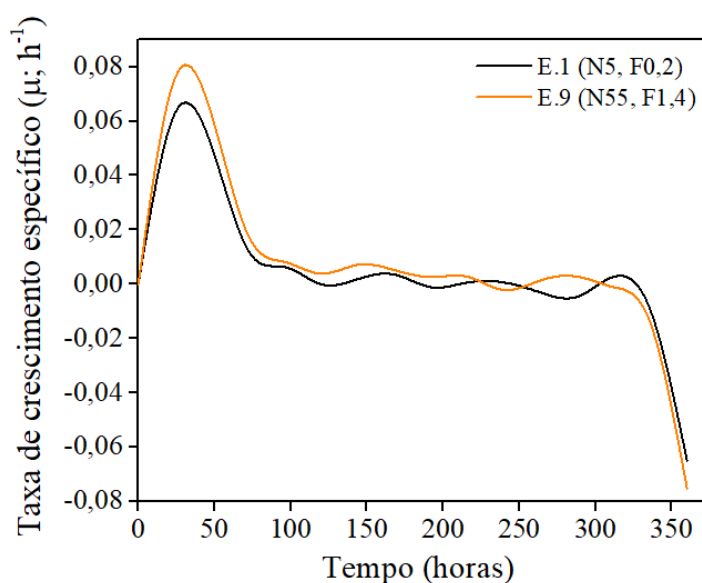
Pancha et al., (2014), cultivaram *Scenedesmus* sp. CCNM 1077 e observaram redução significativa do teor de biomassa quando a concentração de nitrato no meio diminuiu de 247 mg L⁻¹ para 0 mg L⁻¹, atingindo aproximadamente 570 mg L⁻¹ de biomassa na primeira condição e aproximadamente 200 mg L⁻¹ de biomassa na segunda condição, indicando que a falta de nitrogênio retardou a atividade metabólica e a divisão celular por parte da microalga. Goiris et al., (2015), também observaram este efeito no rendimento final de biomassa em culturas de *Phaeodactylum tricornutum*, *Tetraselmis suecica* e *Chlorella vulgaris*. Nas culturas de *P. tricornutum* houve queda na quantidade celular devido a limitação de nitrogênio e fósforo; nas culturas de *T. suecica* o volume celular diminuiu em resposta a limitação de ambos os elementos, entretanto, a quantidade celular não foi afetada; para as culturas de *C. vulgaris* a limitação de fósforo ocasionou redução da quantidade de células, enquanto a limitação de nitrogênio resultou em diminuições na quantidade e no volume celular.



Nota: Entre parênteses estão apresentadas as quantidades (g) de nitrato de sódio (N) e fosfato de potássio (F) usadas em cada experimento.

Figura 22 - Concentração de biomassa de *Desmodemus* sp. em diferentes concentrações nutricionais

O Experimento 1 (E.1 – N5, F0,2), realizado em condições deficientes de nutrição, apresentou a menor média de concentração de biomassa ao fim do período de cultivo, de maneira oposta, o E.9 (N55, F1,4), conduzido em condições repletas nutricionalmente, obteve maior concentração média de biomassa durante o período analisado em relação aos outros experimentos. A Figura 23 apresenta a taxas de crescimento específico para os experimentos 1 e 9; o E.1 apresentou taxa de crescimento específico e tempo de duplicação celular de $0,063 \text{ h}^{-1}$ e 11,00 h, respectivamente; o E.9 apresentou taxa de crescimento específico de $0,076 \text{ h}^{-1}$ e tempo de duplicação celular de 9,13 h.

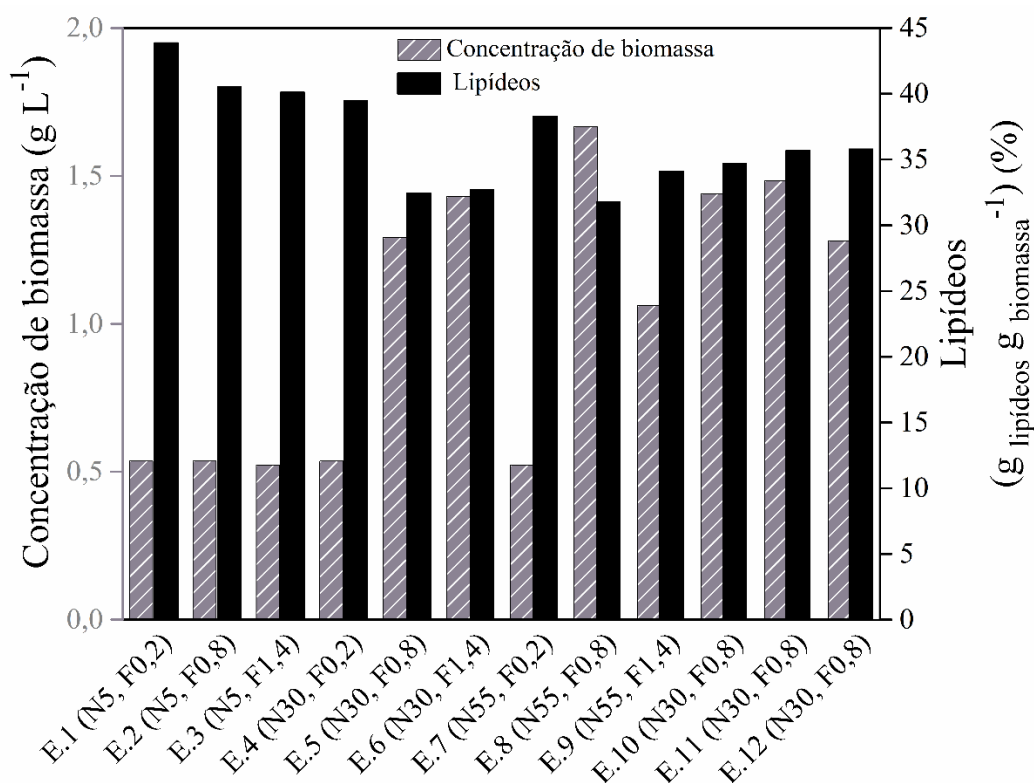


Nota: Entre parênteses estão apresentadas as quantidades (g) de nitrato de sódio (N) e fosfato de potássio (F) usadas em cada experimento.

Figura 23 - Taxa de crescimento específico para os experimentos 1 e 9

5.3.2 Teor lipídico

Células mantidas sob limitação de nitrogênio extracelular tem a quantidade de triacilgliceróis (TAGs) aumentada, entretanto, essa limitação causa uma interrupção no crescimento celular, de modo que, o aumento da biomassa passa a depender do acúmulo de reservas intracelulares de nitrogênio (Johnson; Alric, 2013). O fósforo se divide nas células microalgais de diferentes formas, por exemplo, o polifosfato auxilia no crescimento celular quando o meio fica desprovido de fósforo, atuando como um elemento reserva e de fonte de energia. A biomassa utilizada na análise de lipídeos foi coletada no décimo sexto dia de cultivo e ao analisar a Figura 24, é possível verificar que o maior rendimento lipídico pertenceu ao Experimento 1 (E.1 – N5, F0,2) atingindo 43,86%, cuja formulação do meio se constituiu dos níveis inferiores de N e F, seguida do E.2 (N5, F0,8) e E.3 (N5, F1,4) que atingiram 40,40% e 40,10%, respectivamente. Chu et al., (2014) conduziram um estudo com *Scenedesmus obliquus* avaliando o efeito do fósforo na produção de óleo em condições de estresse por deficiência de nitrogênio, e verificaram a maior produtividade de ácidos graxos sob condições de deficiência de nitrogênio com teor suficiente de fósforo; a produtividade lipídica de *S. obliquus* na condição de nitrogênio deficiente e fósforo suficiente duplicou em comparação com níveis suficientes de ambos os nutrientes, atingindo 24,2 mg L⁻¹. Pozzobon et al., (2020) cultivaram *Desmodesmus* sp. em meio B3N e identificaram os ácidos oleico e linoleico como sendo os lipídeos de armazenamento desta cepa, pois, a deficiência de nitrogênio favoreceu suas produções. Ao cultivarem *Chlamydomonas* sp. TAI-2 em iluminação contínua e meio BBM modificado, Wu et al., (2012) constataram produção de 1,3 g L⁻¹ de biomassa e 25,3% de teor lipídico e 1,8 g L⁻¹ de biomassa e 18% de teor lipídico na concentração inicial de 3 e 6 mM de nitrogênio, respectivamente.



Nota: Entre parênteses estão apresentadas as quantidades (g) de nitrato de sódio (N) e fosfato de potássio (F) usadas em cada experimento.

Figura 24 - Concentração de biomassa e rendimento lipídico de *Desmodesmus* sp. no décimo sexto dia de cultivo para os doze experimentos realizados

5.3.2.1 Efeitos da composição do meio de cultivo sobre a produção de lipídeos

Os efeitos das variações nas concentrações de nitrato de sódio (N) e fosfato de potássio (F) no meio BG-11 em relação a produção de lipídeos foram estimados ao nível de 10%, levando em consideração a produção lipídica de PPEQ-08 (*Desmodesmus* sp.) no décimo sexto dia de cultivo. A representatividade dos efeitos significativos (p -valor $<0,1$) dentro da região experimental foi averiguada pela estatística *t-Student* e análise de variância – ANOVA. A relevância dos efeitos significativos (p -valor $<0,1$) é apresentada no gráfico de Pareto (Figura 25), apontando que as variações das concentrações dos elementos nutricionais realizadas no presente estudo mostraram-se favoráveis para a produção de lipídeos da microalga PPEQ-08 (*Desmodesmus* sp.). Nota-se que o fator nitrato de sódio linear ((1)N(L)) foi o que apresentou maior interferência, seguido pelo fator fosfato de potássio linear ((2)F(L)).

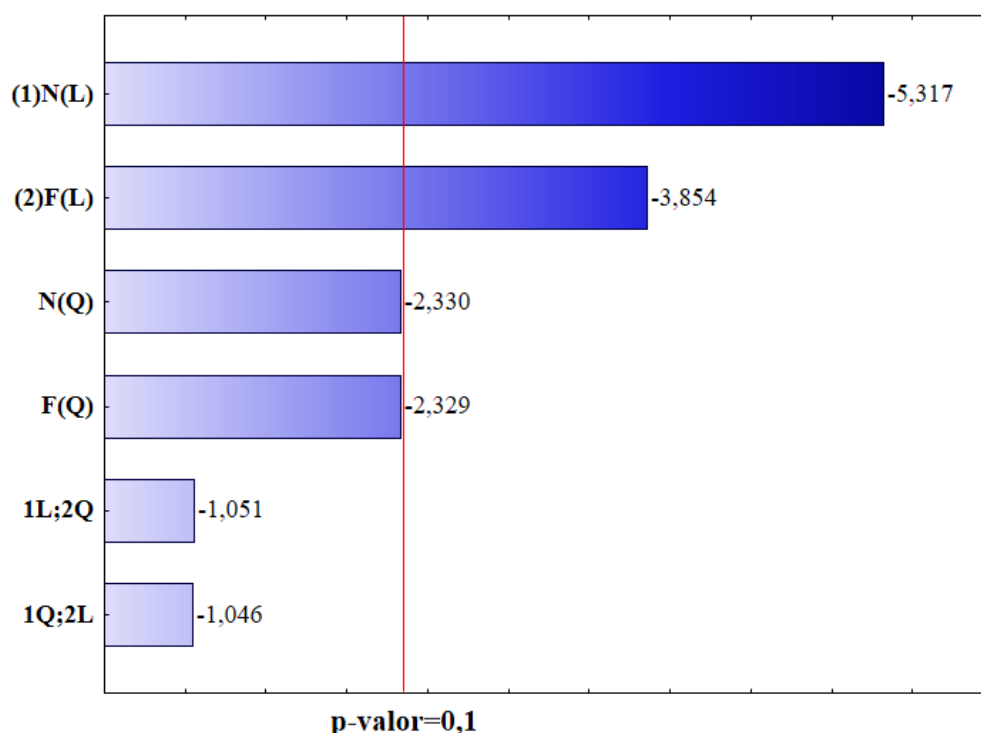


Figura 25 - Pareto dos efeitos linear (L), quadrático (Q) e de interações (L;Q) das variáveis independentes: nitrato de sódio (N) e fosfato de potássio (F) sobre o rendimento lipídico de *Desmodemus* sp.

A Tabela 15 apresenta a ANOVA aplicada às fontes de variação e ajuste do modelo aos dados experimentais, o nitrato de sódio foi o maior responsável pelo aumento do rendimento lipídico de acordo com o valor da soma dos quadrados ($SQ \approx 68$), seguido pelo fosfato de potássio ($SQ \approx 36$).

Tabela 15 - ANOVA dos fatores de variação e do modelo de regressão ajustado aos dados de rendimento lipídico obtidos no cultivo de *Desmodemus* sp.

Fator	G.L	SQ	QM	F _{calc}	p-valor
(1)N(L)	1	68,427	68,427	28,277	0
N(Q)	1	13,144	13,144	5,431	0,10
(2)F(L)	1	35,946	35,946	14,854	0
F(Q)	1	13,126	13,126	5,424	0,10
1L;2Q	1	2,677	2,677	1,106	0,37
1Q;2L	1	2,650	2,650	1,095	0,37
Regressão	6	135,97	22,661	12,670	0
Falta de ajuste	2	1,683	0,841	0,347	0,73
Erro puro	3	7,259	2,419	-	-
Resíduo	5	8,942	1,788	-	-
Total	11	144,915	-	-	-

G.L: graus de liberdade; SQ: soma de quadrados; QM: soma de quadrados médios; F_{calc}: F calculado; L: linear; Q: quadrático.

Durante o processo de ajuste do modelo de regressão, alguns efeitos não significativos (p -valor $<0,1$) foram excluídos conforme o critério de melhor coeficiente de determinação ajustado ($R^2_{\text{ajust.}}$), porém, alguns efeitos não significativos permaneceram, pois foram fundamentais para descrever o processo. Considerou-se apenas as simulações que atendiam aos pressupostos: normalidade, homoscedasticidade, independência e aleatoriedade dos resíduos para a avaliação da qualidade do ajuste, considerando a boa correlação entre os valores preditos e observados, de acordo com o coeficiente de determinação (R^2).

O rendimento lipídico de PPEQ-08 (*Desmodesmus* sp.) pode ser estimado pela Equação 13, desde que as condições operacionais e as variações das concentrações de nutrientes do meio de cultivo BG-11 estejam dentro da faixas experimentais adotadas no planejamento experimental fatorial 3^2 (ver item 4.6.3). O modelo de regressão foi validado pelo teste F ($F_{\text{calc}} = 12,67$) ao nível de 10%. Pela distribuição de F, o modelo apresentou representatividade estatisticamente significativa (p -valor $\approx 0,006$), segundo os graus de liberdade da regressão e do resíduo do ajuste ($F_{\text{tab}(90\%;6;5)} = 3,40$).

$$Y_{\text{Lipídeos (\%)}} = 48,94 - 0,34x_1 - 14,25x_2 + 6,32x_2^2 \quad \text{EQUAÇÃO13}$$

A variabilidade experimental do rendimento lipídico obtida no décimo sexto dia de cultivo foi bem representada pelo modelo ($R^2_{\text{ajust.}} = 0,87$). A variabilidade dos dados lipídicos que não pôde ser explicada pela regressão foi $<1\%$, apresentando falta de ajuste não significativo (p -valor $\approx 0,731$). De acordo com os dados obtidos no planejamento, o erro devido às flutuações aleatórias representou 8,29% (erro puro = 2,41).

Uma verificação do comportamento dos resíduos e representatividade do modelo ajustado aos dados experimentais está sendo apresentada na Figura 26. Os resíduos de ajuste seguem uma distribuição normal dentro do intervalo $(-2,0; +2,0)$ (Figura 26.a) e são independentes, conforme distribuição aleatória (Figura 26.d), não apresentando tendência nas flutuações experimentais. A relação entre os valores observados *versus* preditos (Figura 26.c) aponta adequada representatividade do modelo ($R^2 = 0,94$). A variância dos resíduos pode ser considerada homogênea, indicando que os valores preditos não foram tendenciosos, de acordo com a dispersão dos pontos (Figura 26.b).

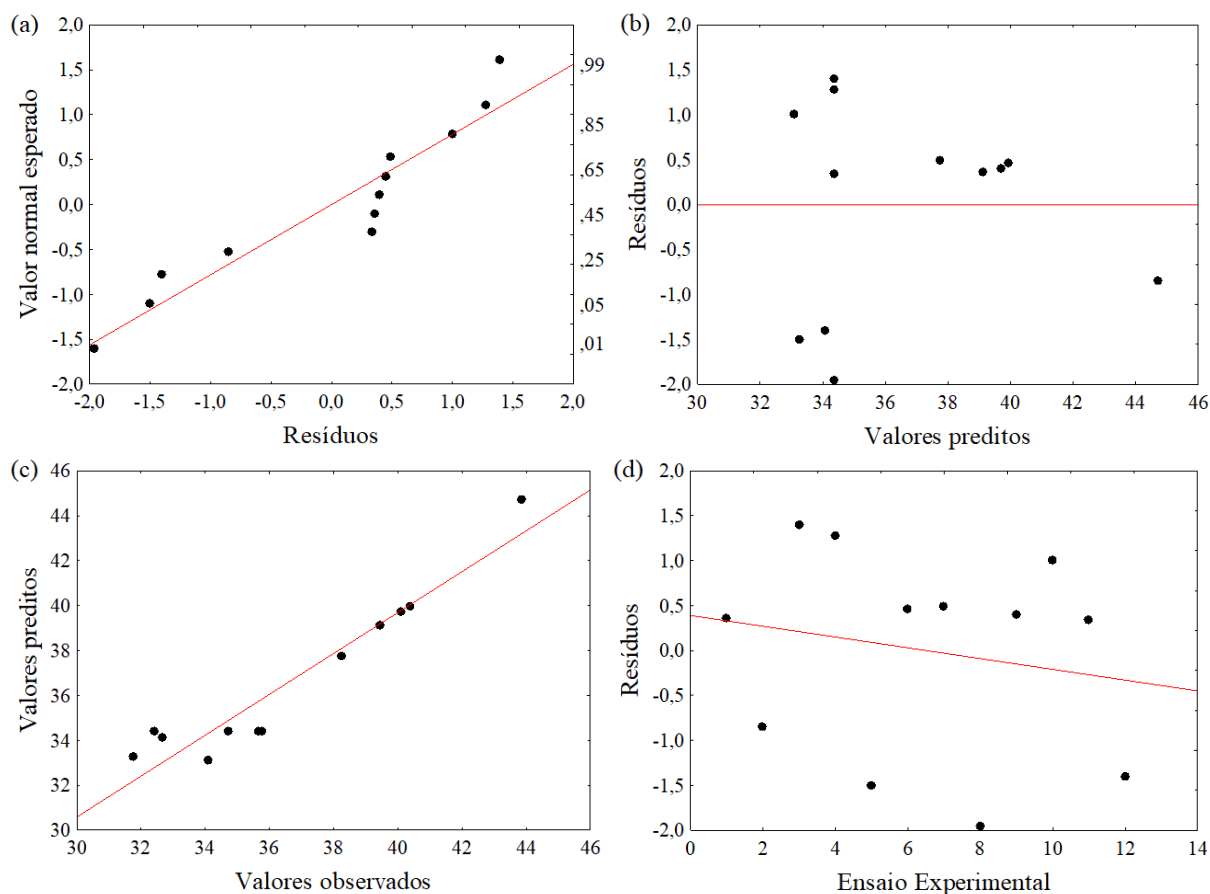


Figura 26 - Avaliação gráfica dos resíduos de ajuste ao modelo aos dados de rendimento lipídico: (a) Normalidade dos resíduos; (b) Homoscedasticidade dos resíduos *versus* valores preditos pelo modelo; (c) Correlação entre os valores preditos e observados; (d) Independência dos resíduos *versus* ensaio experimental.

A superfície e contorno de resposta (Figura 27) foram simuladas pelo ajuste do modelo de regressão (Equação 13) variando-se as concentrações de N e F dentro da faixa de experimentação do planejamento experimental fatorial 3^2 . O maior rendimento lipídico da microalga PPEQ-08 (*Desmodesmus* sp.) nas condições experimentais realizadas, é predito em meio BG-11 com 5 g de N e aproximadamente 0,05 g de F.

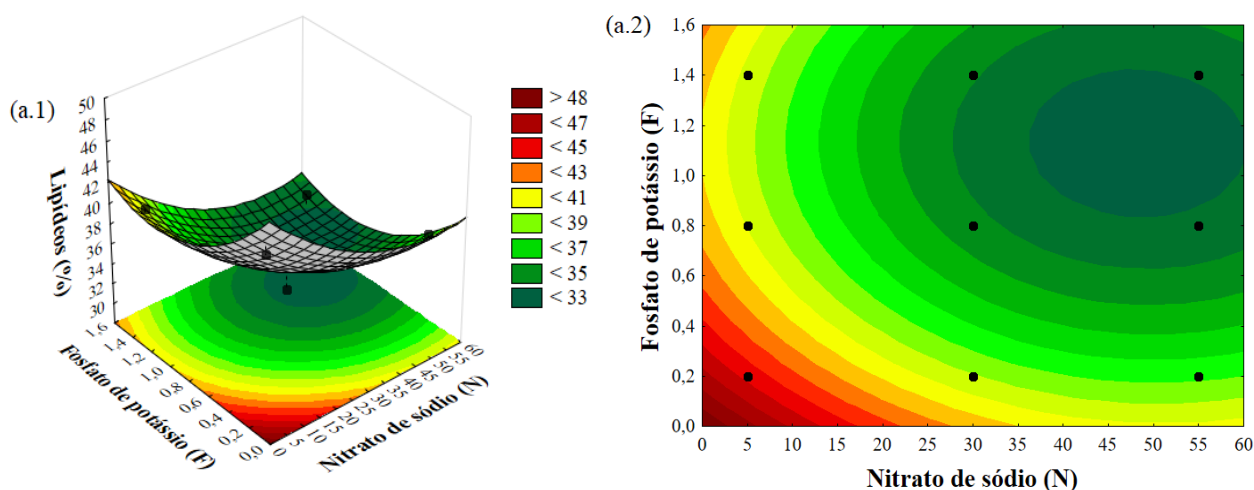


Figura 27 - Superfície e contorno da resposta rendimento lipídico (%) de *Desmodesmus* sp. obtida por meio das variações de nitrato de sódio e fosfato de potássio

5.3.2.2 Validação do modelo de regressão

A condição experimental em que o meio BG-11 terá 5 g de N e 0,2 g de F foi determinada como sendo a que proporcionará maior rendimento lipídico pela função objetivo (Figura 28), cuja desejabilidade foi de 1,00 e a condição prediz um rendimento lipídico de 44,7 %.

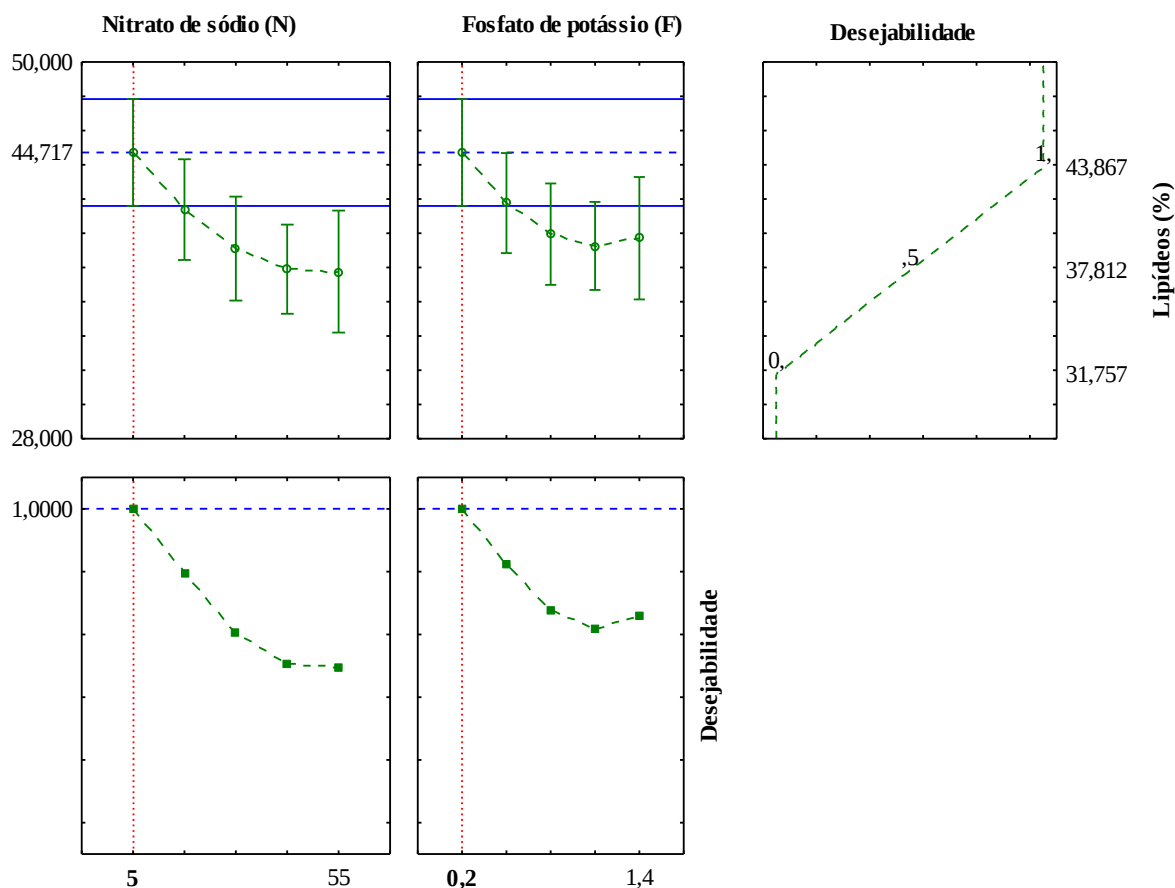


Figura 28 - Perfis dos valores preditos pela função desejabilidade para maximização de lipídeos

5.3.2.3 Respostas experimentais de lipídeos nas condições de maximização

A predição realizada com a simulação do modelo de otimização foi de 44,7 % de rendimento lipídico em cultivos realizados em meio BG-11 com 5 g de N e 0,2 g de F, atendendo a função desejabilidade = 1,00 (Figura 28). Assim, os cultivos de validação foram realizados em triplicata durante dezesseis dias, tendo sua concentração de biomassa diariamente aferida (Figura 29) nas condições experimentais preditas pelo modelo, cujo resultado do rendimento lipídico foi de 40,20% (I.C. 90% 39,17 – 41,22).

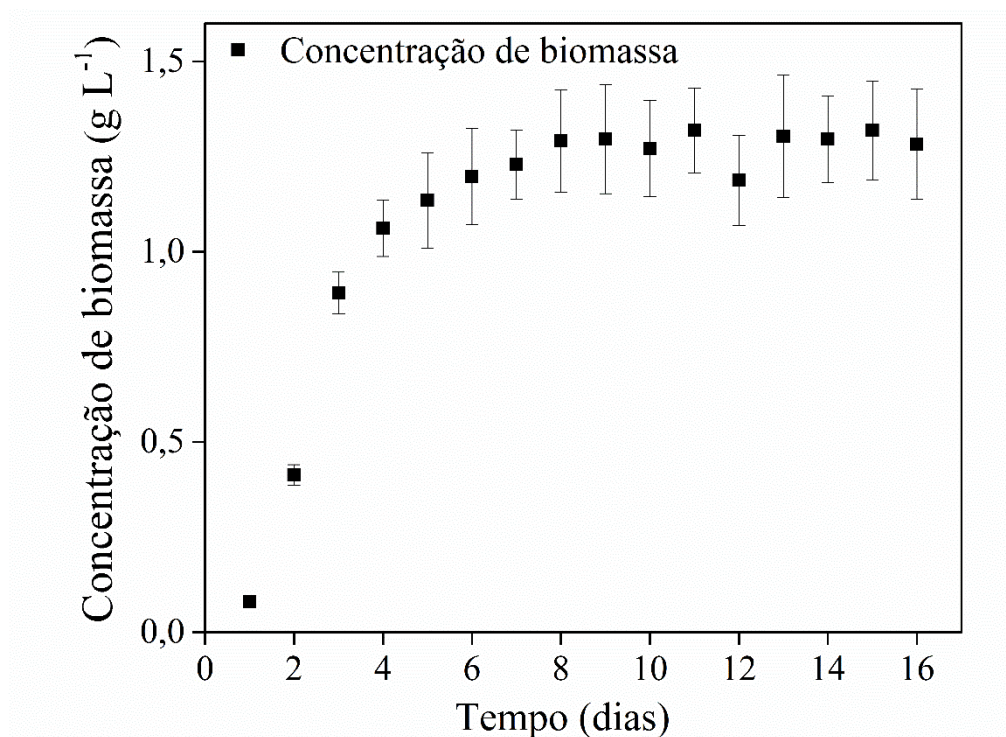


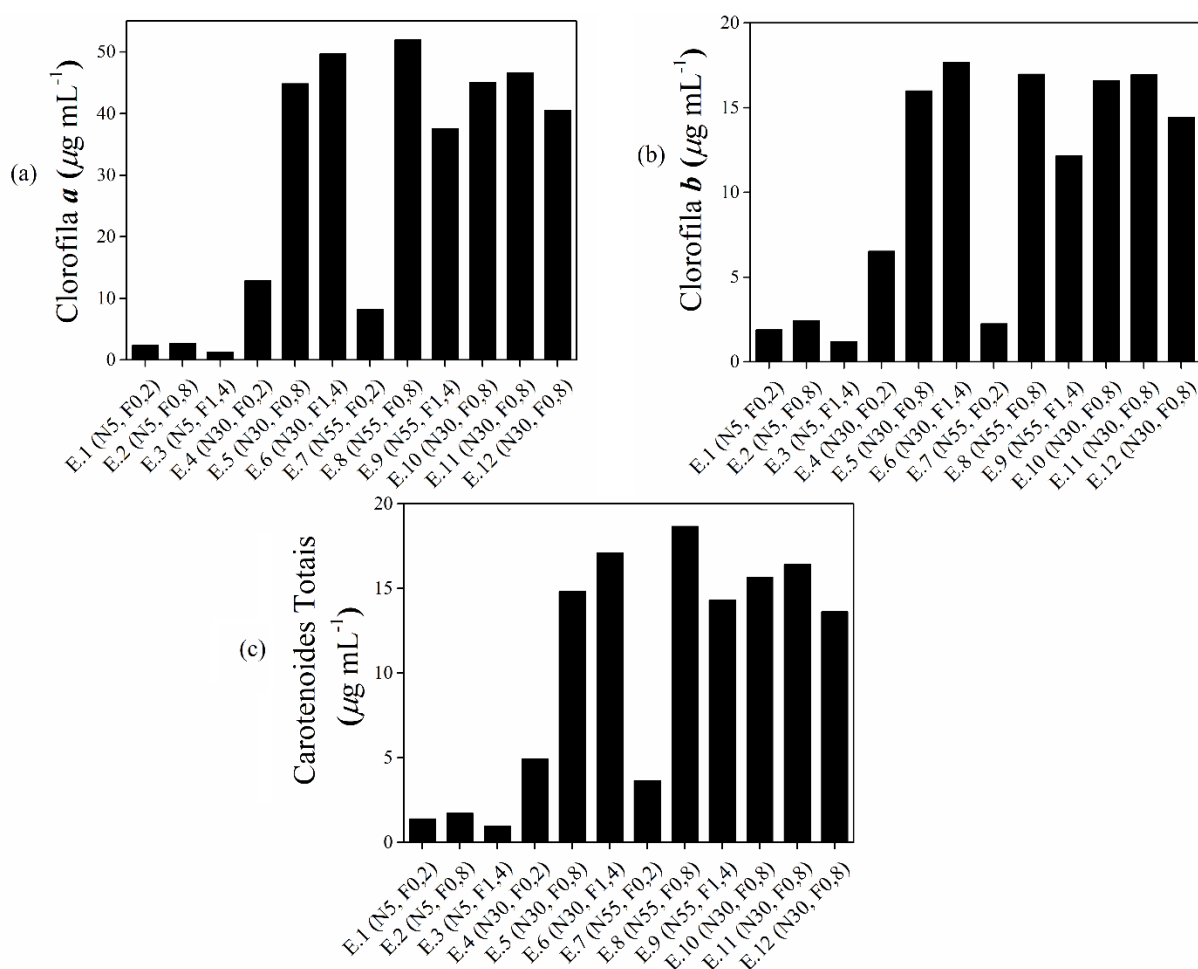
Figura 29 - Concentração de biomassa de *Desmodemus* sp. nas condições de maximização para lipídeos

5.3.3 Teor de pigmentos

A biomassa utilizada na análise de pigmentos foi coletada no décimo sexto dia de cultivo. Os valores médios das produções de clorofilas e carotenoides estão apresentados na Figura 30; a maior produção de **Cl_a** e **CT** pertenceu ao Experimento 8 (E.8 – N55, F0,8), atingindo 51,95 µg mL⁻¹ e 18,66 µg mL⁻¹, respectivamente; para **Cl_b** a maior produção foi de 17,69 µg mL⁻¹ pertencendo ao E.6 (N30, F1,4). Nota-se que as menores produções de pigmentos pertenceram aos cultivos com pelo menos um nível inferior (-1) de concentração de nutriente. No Apêndice C, a Tabela C.2 apresenta os valores de produção de pigmentos para cada experimento realizado.

O nitrogênio é o elemento mineral mais requerido pelas plantas, atuando como um constituinte de diversos componentes vegetais, incluindo a clorofila. A deficiência de nitrogênio rapidamente inibe o crescimento vegetal, e caso essa deficiência persista, as chances de espécies apresentarem clorose (amarelecimento das folhas) são grandes (Taiz; Zeiger, 2004). Pancha et al., (2014), cultivaram *Scenedesmus* sp. CCNM 1077 e observaram que a diminuição da concentração de nitrato de 123 mg L⁻¹ para 0 mg L⁻¹ provocou considerável redução de **Cl_a** de 7,03 para 1,89 µg mL⁻¹; **Cl_b** de 4,20 para 0,87 µg mL⁻¹ e **CT** de 1,54 para 0,64 µg mL⁻¹. Moussa et al., (2017), realizaram um estudo com *Tetraselmis* marina em meio de cultivo f/2 e observaram uma redução nos conteúdos de clorofilas **a** e **b** em meio com depleção de nitrato e

fosfato, verificaram, ainda, uma correlação positiva entre o aumento do fosfato no meio e o teor de carotenoides, comportamento também observado por Martins et al., (2011) ao avaliarem os efeitos da disponibilidade de nitrato e fosfato em *Hypnea musciformis*.



Nota: Entre parênteses estão apresentadas as quantidades (g) de nitrato de sódio (N) e fosfato de potássio (F) usadas em cada experimento.

Figura 30 - Produção de pigmentos de *Desmodesmus* sp. no décimo sexto dia de cultivo para os doze experimentos realizados

5.3.3.1 Efeitos da composição do meio de cultivo sobre a produção de pigmentos

Os efeitos das variações nas concentrações de nitrato de sódio (N) e fosfato de potássio (F) no meio BG-11 em relação a produção de pigmentos foram estimados ao nível de 10%, considerando a produção de **Cl_a**, **Cl_b** e **CT** de PPEQ-08 (*Desmodesmus* sp.) no décimo sexto dia de cultivo. A representatividade dos efeitos significativos (p-valor <0,1) dentro da região experimental foi averiguada pela estatística *t-Student* e análise de variância – ANOVA. A relevância dos efeitos significativos (p-valor <0,1) é apresentada no gráfico de Pareto (Figura 31), apontando que as variações das concentrações dos elementos nutricionais realizadas neste estudo mostraram-se favoráveis para a produção de pigmentos da microalga PPEQ-08

(*Desmodesmus* sp.)

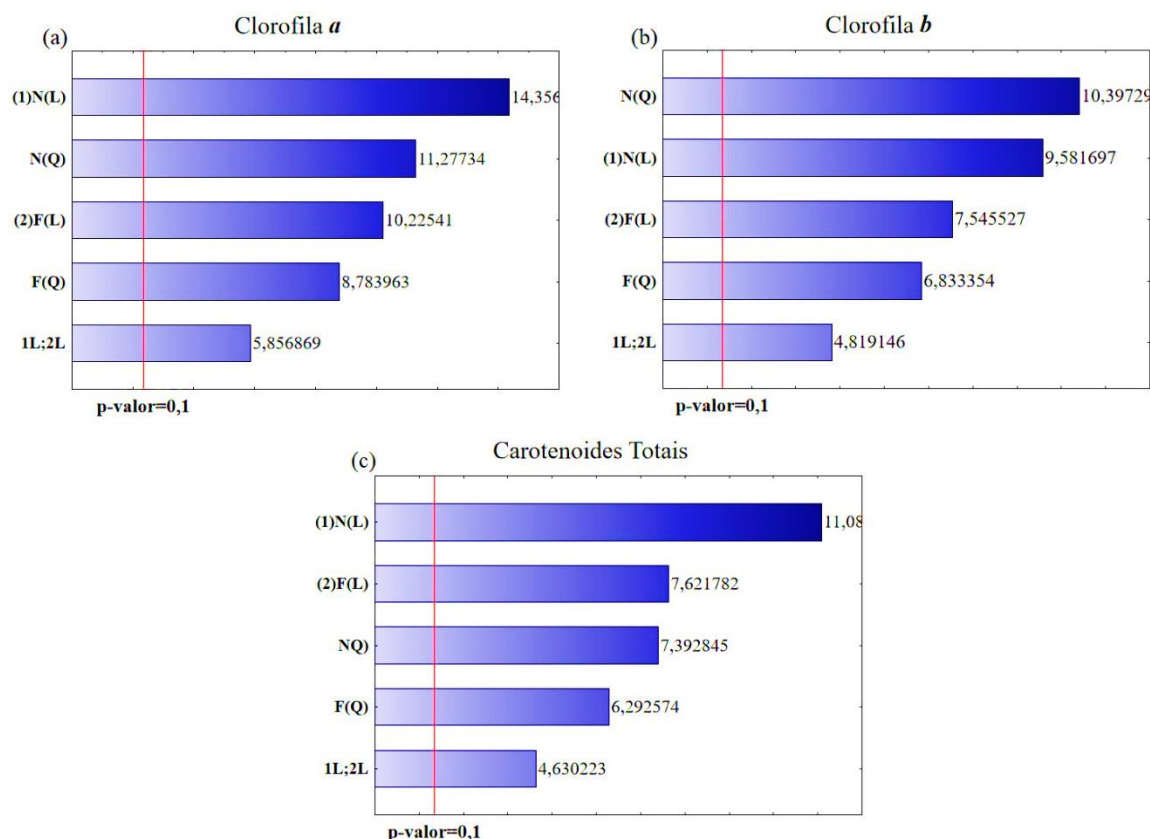


Figura 31 - Pareto dos efeitos linear (L) e quadrático (Q) das variáveis independentes: nitrato de sódio (N) e fosfato de potássio (F) sobre a produção de pigmentos de *Desmodesmus* sp.

A Tabela 16 apresenta a ANOVA aplicada às fontes de variação e ajuste do modelo aos dados experimentais. Analisando cada resposta individualmente, O N(Q) e o F(Q) apresentaram grande interferência na produção de **Cl a** , mas o N e o F em suas formas lineares foram os maiores responsáveis pela produção do pigmento, com soma quadrática de ≈ 1391 e ≈ 706 , respectivamente. Para **Cl b** , o fator que mais interferiu em sua produção foi o N(Q) ($SQ \approx 131$) e para o fosfato foi o F(L) ($SQ \approx 69$). Para **CT**, o N(L) interferiu de forma prevalente em sua produção de acordo com o valor da soma dos quadrados ($SQ \approx 177$), quanto ao fosfato, o nutriente em sua forma linear apresentou maior interferência na produção de **CT** ($SQ \approx 84$).

Tabela 16 - ANOVA dos fatores de variação e do modelo de regressão ajustado aos dados de produção de pigmentos obtidos no cultivo de *Desmodemus* sp.

Cla					
Fator	G.L	SQ	QM	F _{calc}	p-valor
(1)N(L)	1	1391,463	1391,463	206,118	0
N(Q)	1	858,557	858,557	127,178	0
(2)F(L)	1	705,858	705,858	104,559	0
F(Q)	1	520,879	520,879	77,158	0
1L;2L	1	231,572	231,572	34,302	0
Regressão	5	3708,328	741,665	9,662	0
Falta de ajuste	3	440,306	146,769	21,740	0
Erro puro	3	20,252	6,751	-	-
Resíduo	6	460,558	76,759	-	-
Total	11	4168,886	-	-	-
Cib					
Fator	G.L	SQ	QM	F _{calc}	p-valor
(1)N(L)	1	111,526	111,526	91,808	0
N(Q)	1	131,321	131,321	108,103	0
(2)F(L)	1	69,162	69,162	56,935	0
F(Q)	1	56,723	56,723	46,694	0
1L;2L	1	28,212	28,212	23,224	0
Regressão	5	396,946	79,389	10,403	0
Falta de ajuste	3	42,143	14,047	11,564	0
Erro puro	3	3,644	1,214	-	-
Resíduo	6	45,787	7,631	-	-
Total	11	442,733	-	-	-
CT					
Fator	G.L	SQ	QM	F _{calc}	p-valor
(1)N(L)	1	176,819	176,819	122,940	0
N(Q)	1	78,606	78,606	54,654	0
(2)F(L)	1	83,550	83,550	58,091	0
F(Q)	1	56,949	56,949	39,596	0
1L;2L	1	30,834	30,834	21,439	0
Regressão	5	426,761	85,352	10,372	0
Falta de ajuste	3	45,064	15,021	10,444	0
Erro puro	3	4,314	1,438	-	-
Resíduo	6	49,379	8,229	-	-
Total	11	476,141	-	-	-

G.L.: graus de liberdade; SQ: soma de quadrados; QM: soma de quadrados médios; F_{calc}: F calculado; L: linear; Q: quadrático.

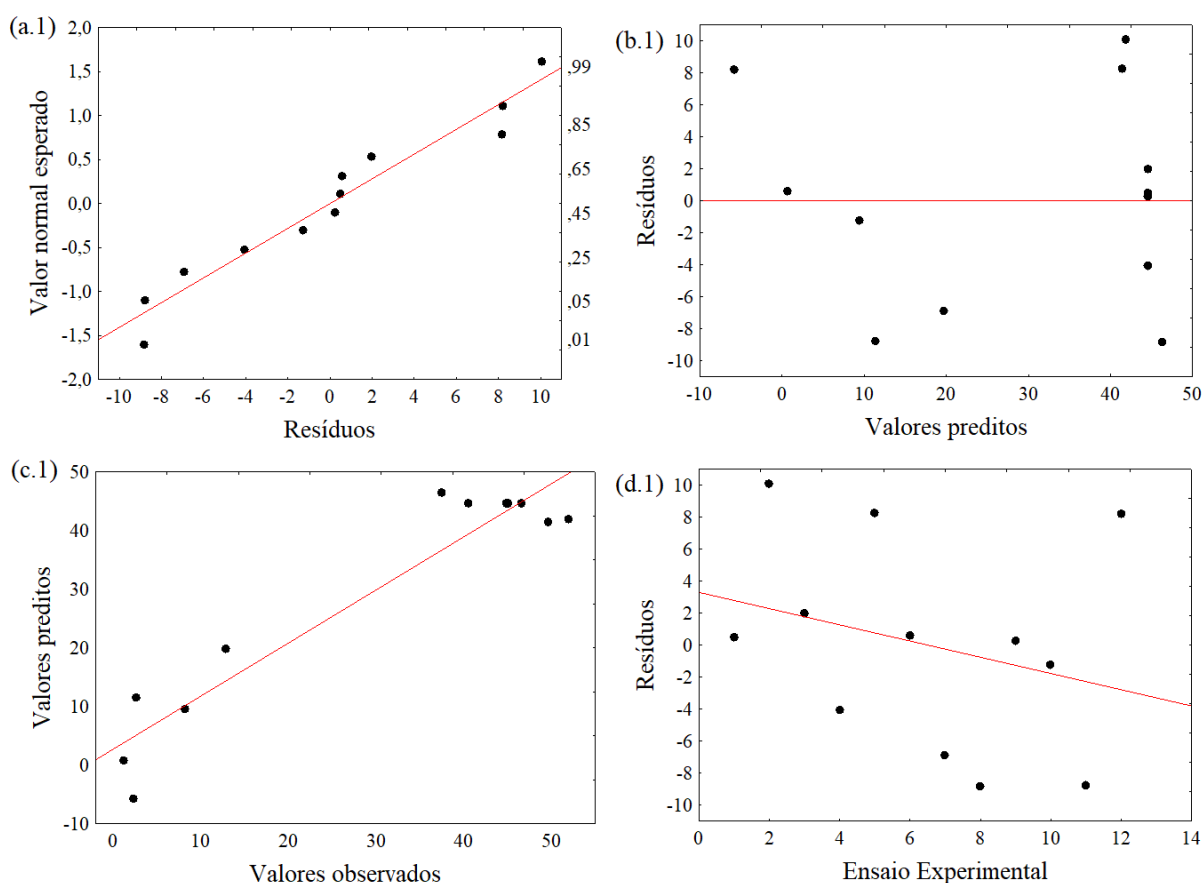
O rendimento de Cla, Cib e CT de PPEQ-08 (*Desmodemus* sp.) podem ser estimados pelas Equações 14, 15 e 16, respectivamente, desde que as condições operacionais e as variações das concentrações de nutrientes do meio de cultivo BG-11 estejam dentro da faixas experimentais adotadas no planejamento experimental fatorial 3² (ver item 4.6.3). Os ajustes dos três modelos de regressão para os pigmentos apresentaram significância estatística pelo

teste F: **Cl_a**, (p-valor $\approx 7,77 \text{ E-}03$; $F_{\text{calc}} = 9,66 > F_{\text{tab}(90\%;5;6)} = 3,10$); **Cl_b**, (p-valor $\approx 6,43\text{E-}03$; $F_{\text{calc}} = 10,40 > F_{\text{tab}(90\%;5;6)} = 3,10$) e **CT** (p-valor $\approx 6,48\text{E-}03$; $F_{\text{calc}} = 10,37 > F_{\text{tab}(90\%;5;6)} = 3,10$). Todos os pressupostos para a aplicação da ANOVA e ajuste do modelo foram atendidos (Figura 32).

$$Y_{\text{Cl}_a} (\mu\text{g mL}^{-1}) = -26,66 + 1,92x_1 - 0,02x_1^2 + 64,97x_2 - 38,82x_2^2 + 0,50x_1x_2 \quad \text{EQUAÇÃO 14}$$

$$Y_{\text{Cl}_b} (\mu\text{g mL}^{-1}) = -7,51 + 0,70x_1 - 0,01x_1^2 + 20,84x_2 - 12,81x_2^2 + 0,17x_1x_2 \quad \text{EQUAÇÃO 15}$$

$$Y_{\text{CT}} (\mu\text{g mL}^{-1}) = -7,78 + 0,59x_1 + 21,20x_2 - 12,83x_2^2 + 0,18x_1x_2 \quad \text{EQUAÇÃO 16}$$



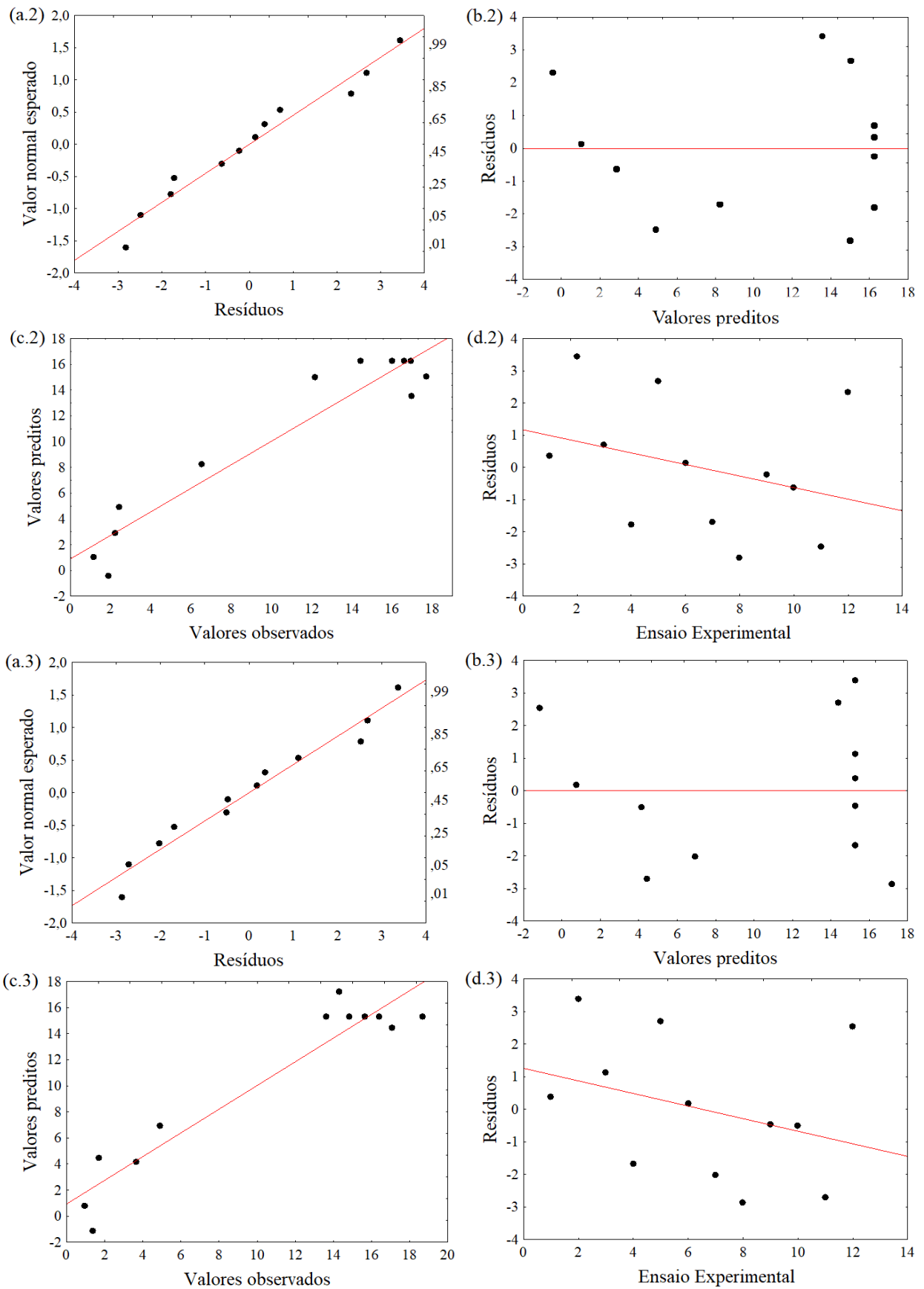


Figura 32 - Avaliação gráfica dos resíduos de ajuste ao modelo aos dados de produção de pigmentos: (a) Normalidade dos resíduos; (b) Homoscedasticidade dos resíduos *versus* valores preditos pelo modelo; (c) Correlação entre os valores preditos e observados; (d) Independência dos resíduos *versus* ensaio experimental; 1: Cla; 2: Clb; 3: CT

As superfícies e contornos de respostas (Figura 33) foram simuladas pelos ajustes dos modelos de regressão (Equações 14, 15 e 16) variando-se as concentrações de N e F dentro da faixa de experimentação do planejamento experimental fatorial 3^2 . Nas condições experimentais realizadas, o maior rendimento de **Cl***a* é predito em meio BG-11 com aproximadamente 45g de N e 1,1 g de F; de **Cl***b*, aproximadamente em 40 g de N e 1,1 de F e para **CT**, a predição corresponde a aproximadamente 45 g de N e 1,2 g de F.

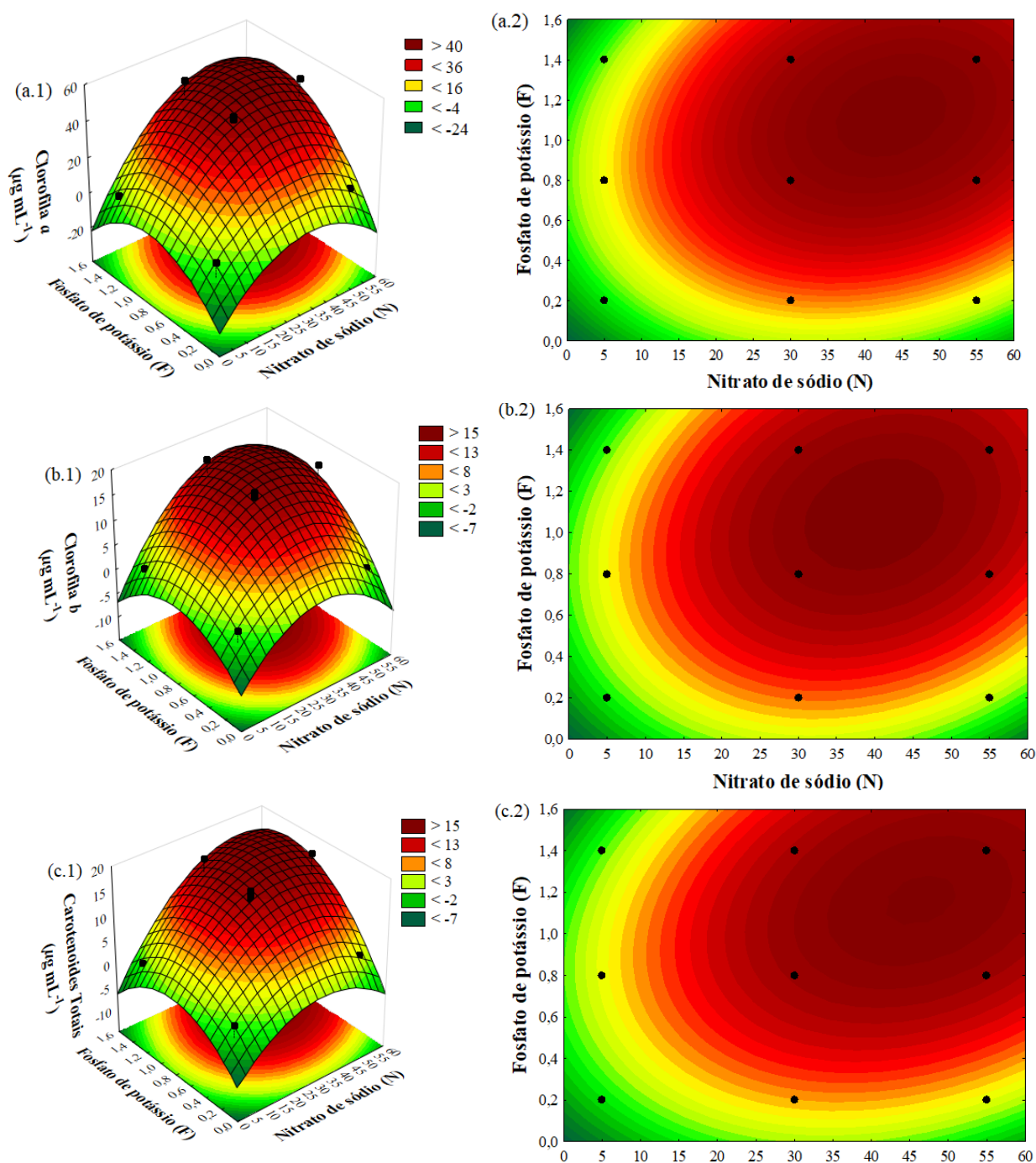


Figura 33 - Superfícies e contornos das respostas produção de pigmentos ($\mu\text{g mL}^{-1}$) de *Desmodesmus* sp. obtida por meio das variações de nitrato de sódio e fosfato de potássio

5.3.3.2 Validação do modelo de regressão

A condição experimental em que o meio BG-11 terá 42,5 g de N e 1,1 g de F foi determinada como sendo a que proporcionará maior produção de pigmentos pela função global (Figura 34), cuja desejabilidade foi de 0,949 e a condição prediz uma produtividade de *Cla* de 49,64 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 17,18 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para *Clb* e 17,36 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para *CT*.

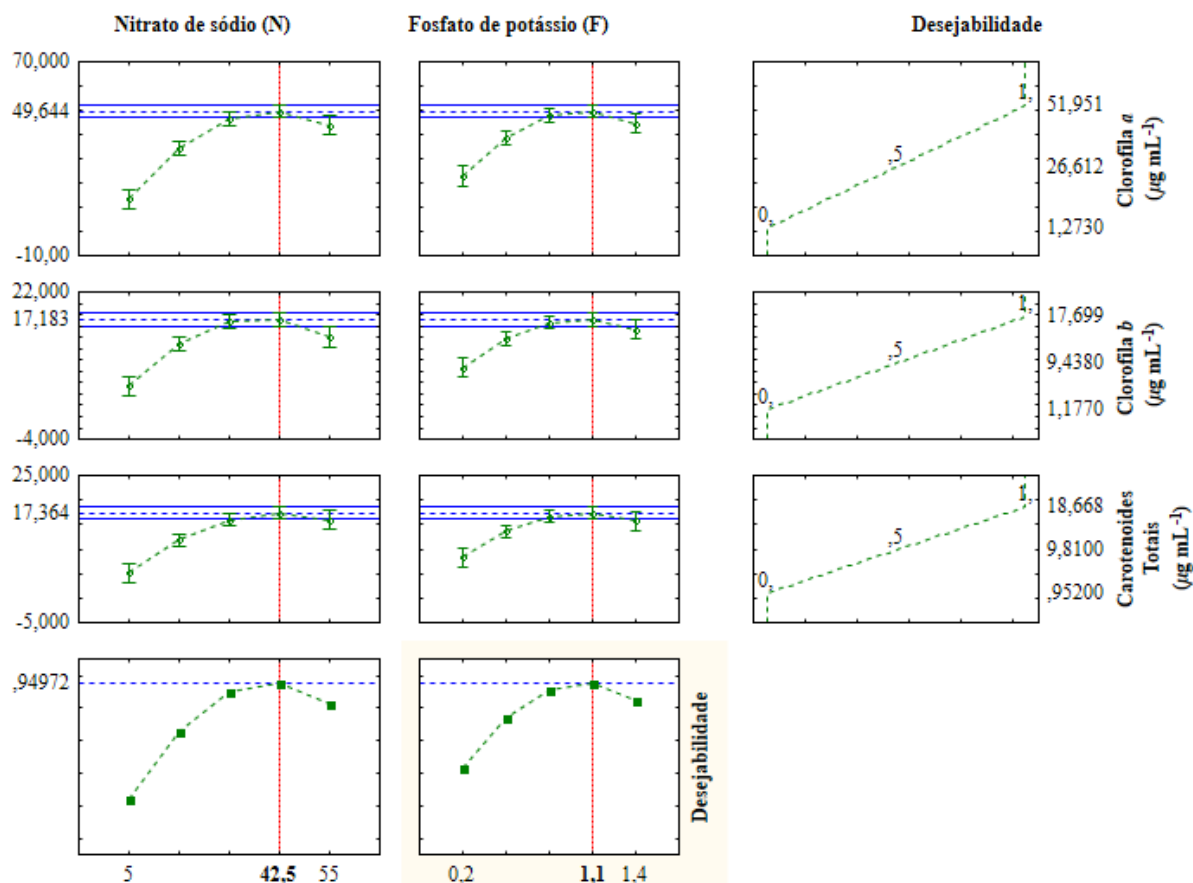


Figura 34 - Perfis dos valores preditos pela função desejabilidade global para a maximização de pigmentos

5.3.3.3 Respostas experimentais de pigmentos nas condições de maximização

A predições realizadas com a simulação do modelo de otimização para *Cla* foi de 49,64 $\mu\text{g mL}^{-1}$, para *Clb* 17,18 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 17,36 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para *CT* em meio de cultivo BG-11 com 42,5 g de N e 1,1 g de F, atendendo a função desejabilidade global $\approx 0,95$. A Figura 35 apresenta a concentração de biomassa dos cultivos de validação que foram realizados em triplicata durante dezesseis dias nas condições experimentais preditas pelo modelo, cujos resultados de produção de pigmentos foram de 41,71 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (I.C. 90% 40,15 – 43,27) para *Cla*; 16,30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (I.C. 90% 15,69 – 16,90) para *Clb* e 14,99 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (I.C. 90% 14,68 – 15,29) para *CT*.

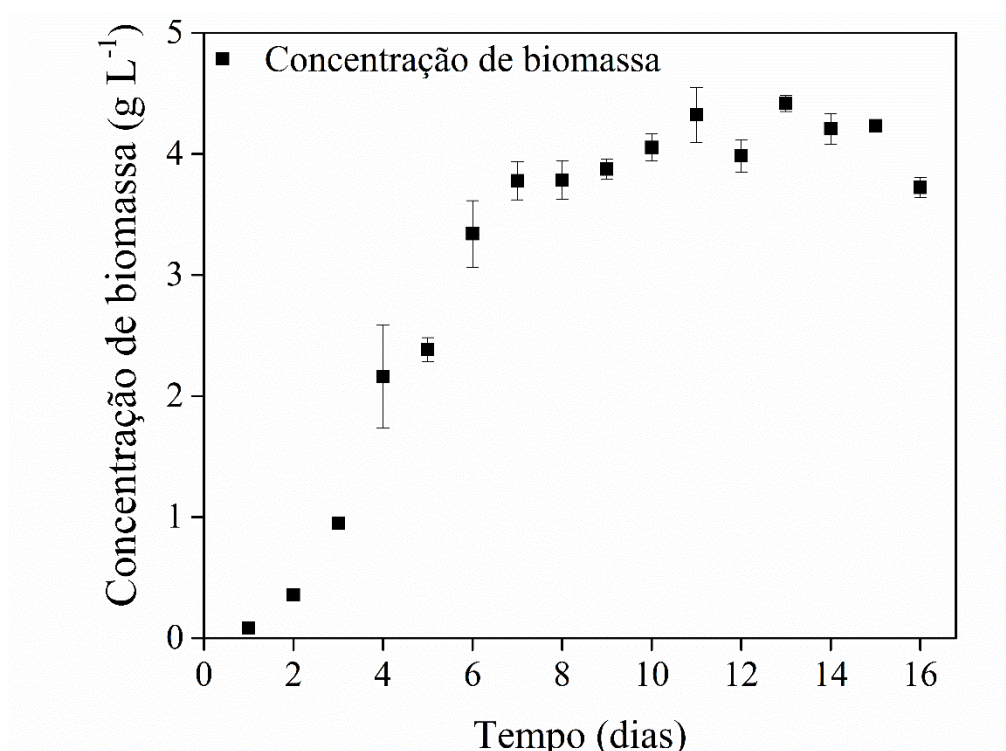


Figura 35 - Concentração de biomassa de *Desmodesmus* sp. nas condições de maximização para pigmentos

5.3.4 Síntese do Experimento 3

A microalga PPEQ-08 (*Desmodesmus* sp.) foi avaliada quanto ao seu crescimento em biomassa e produção de lipídeos, clorofilas **a** e **b** e carotenoides totais, a partir do seu cultivo em meio BG-11 por dezesseis dias em diferentes concentrações e combinações dos macronutrientes nitrato de sódio (N) e fosfato de potássio (F). Os resultados sugerem que os cultivos realizados em baixas concentrações destes nutrientes apresentaram menor concentração de biomassa, mas favoreceu a produção lipídica; já os cultivos realizados em altas concentrações nutricionais produziram maiores concentrações de biomassa e produção de pigmentos.

6 – CONCLUSÕES

Para o Experimento 1, a suplementação ocasionou um incremento na produção de biomassa e aumento na produção de pigmentos. Para o rendimento lipídico, após a suplementação de micronutrientes, os experimentos que a receberam apresentaram menor teor lipídico, se igualando, ao fim dos cultivos, com os experimentos que não receberam a interferência.

Para o Experimento 2, onde variou-se a fonte de luz, o LED azul apresentou os melhores resultados para a produção de biomassa. Para a produção lipídica e produção de pigmentos, o LED vermelho se destacou.

Para o Experimento 3, os cultivos conduzidos em níveis inferiores de macronutrientes apresentam menor concentração de biomassa quando comparados os experimentos conduzidos em níveis superiores. Os níveis inferiores de nitrato de sódio e fosfato de potássio resultaram num maior rendimento lipídico. Em contrapartida, os níveis superiores destes macronutrientes ocasionaram maiores produções de pigmentos.

Diante do exposto, este estudo demonstrou diferentes condições de cultivo em escala laboratorial que favoreceram a síntese de lipídeos e pigmentos da microalga PPEQ-08 (*Desmodesmus* sp.).

7 - REFERÊNCIAS

- Algaebase, 2021. Disponível em: <https://www.algaebase.org/>. Acesso em: 05 abr. 2021.
- Anbuchezhia, Ramasamy; Karuppiah, Valliappan; LI, Zhiyong. Prospect of Marine Algae for Production of Industrially Important Chemicals. *Algal Biorefinery: An Integrated Approach*, [S.L], p. 195-217, 2015.
- Andersen, R. A. The microalgae cell. In: *Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology*. 2. ed. Usa: Wiley, 2013. Ed. Richmond, A.; Hu, Q. p 3-20.
- Andrade, Diva Souza; Colozzi Filho, Arnaldo. *Microalgas de águas continentais: Potencialidades e desafios do cultivo*. Londrina, Pr: Iapar, 2014. 343p.
- Apha (1999) *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. American Public Health Association, Washington DC.
- Aresta, Michele; Dibeneditto, Angela. Beyond fractionation in the utilization of microalgal components. *Bioenergy With Carbon Capture and Storage*, [S.L.], p. 173-193, 2019. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-816229-3.00009-0>.
- Arun, Jayaseelan; Gopinath, Kannappan Panchamoorthy; Sundarajan, Panneerselvam; Felix, Vargees; Joselynmonica, Marudai; Malolan, Rajagopal. A conceptual review on microalgae biorefinery through thermochemical and biological pathways: bio-circular approach on carbon capture and wastewater treatment. *Bioresource Technology Reports*, [S.L.], v. 11, p. 100477, set. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biteb.2020.100477>.
- Asuthkar, Mounica; Gunti, Yamini; S, Ramgopal Rao; Yadavalli, C s Rao And Rajasri. Effect of different wavelengths of light on the growth of *Chlorella Pyrenoidosa*. *International Journal Of Pharmaceutical Sciences And Research*, S.L, v. 7, p. 1000-1004, fev. 2016.
- Atta, Madiha; Idris, Ani; Bukhari, Ataullah; Wahidin, Suzana. Intensity of blue LED light: a potential stimulus for biomass and lipid content in fresh water microalgae *chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology*, [S.L.], v. 148, p. 373-378, nov. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.08.162>.
- Barten, Robin; Djohan, Yovita; Evers, Wendy; Wijffels, Rene; Barbosa, Maria. Towards industrial production of microalgae without temperature control: the effect of diel temperature fluctuations on microalgal physiology. *Journal Of Biotechnology*, [S.L.], v. 336, p. 56-63, ago. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2021.06.017>.
- Begum, Hasina; Yusoff, Fatimah Md.; Banerjee, Sanjoy; Khatoon, Helena; Shariff, Mohamed. Availability and Utilization of Pigments from Microalgae. *Critical Reviews In Food Science And Nutrition*, [S.L.], v. 56, n. 13, p. 2209-2222, 12 fev. 2015. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/10408398.2013.764841>.
- Bicudo, Carlos E. de M.; Menezes, Mariângela. *Gêneros de algas de águas continentais do Brasil: chave para identificação e descrições*. 2. ed. São Carlos: Rima, 2006. 502 p.
- Black, Homer S.; Boehm, Fritz; Edge, Ruth; Truscott, T. George. The Benefits and Risks of Certain Dietary Carotenoids that Exhibit both Anti- and Pro-Oxidative Mechanisms—A Comprehensive Review. *Antioxidants*, [S.L.], v. 9, n. 3, p. 264, 23 mar. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/antiox9030264>.
- Brasil, Bruno dos Santos Alves Figueiredo; Garcia, Lorena Costa. *Microalgas: Alternativas promissoras para a indústria. Agroenergia em Revista*, [S.L], v. 10, p. 7-10, dez. 2016.
- Carvalho, Ana P.; Silva, Susana O.; Baptista, José M.; Malcata, F. Xavier. Light requirements in microalgal photobioreactors: an overview of biophotonic aspects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, [S.L.], v. 89, n. 5, p. 1275-1288, 23 dez. 2010. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-010-3047-8>.

- Chen, Lin; Liu, Tianzhong; Zhang, Wei; Chen, Xiaolin; Wang, Junfeng. Biodiesel production from algae oil high in free fatty acids by two-step catalytic conversion. *Bioresource Technology*, [S.L.], v. 111, p. 208-214, maio 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.02.033>.
- Chhandama, Michael van Lal; SATYAN, Kumudini Belur; CHANGMAI, Bishwajit; VANLALVENI, Chhange; ROKHUM, Samuel Lalthazuala. Microalgae as a feedstock for the production of biodiesel: a review. *Bioresource Technology Reports*, [S.L.], v. 15, p. 100771, set. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biteb.2021.100771>.
- Chu, Fei-Fei; Chu, Pei-Na; Shen, Xiao-Fei; Lam, Paul K.s.; Zeng, Raymond J.. Effect of phosphorus on biodiesel production from *Scenedesmus obliquus* under nitrogen-deficiency stress. *Bioresource Technology*, [S.L.], v. 152, p. 241-246, jan. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.11.013>.
- Cliffor, Caroline Burgess. Design of Algae Farms. 2020. Disponível em: <https://www.e-education.psu.edu/egee439/node/695>. Acesso em: 26 jun. 2021.
- Daneshvar, Ehsan; Ok, Yong Sik; Tavakoli, Samad; Sarkar, Binoy; Shaheen, Sabry M.; Hong, Hui; Luo, Yongkang; Rinklebe, Jörg; Song, Hocheol; Bhatnagar, Amit. Insights into upstream processing of microalgae: a review. *Bioresource Technology*, [S.L.], v. 329, p. 124870, jun. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124870>.
- Fernandes, Andrêssa S.; Nascimento, Tatiele C.; Pinheiro, Pricila N.; Vendruscolo, Raquel G.; Wagner, Roger; Rosso, Veridiana V. de; Jacob-Lopes, Eduardo; Zepka, Leila Q.. Bioaccessibility of microalgae-based carotenoids and their association with the lipid matrix. *Food Research International*, [S.L.], v. 148, p. 110596, out. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110596>.
- Flies, Emily J.; Brook, Barry W.; Blomqvist, Linus; Buettel, Jessie C.. Forecasting future global food demand: a systematic review and meta-analysis of model complexity. *Environment International*, [S.L.], v. 120, p. 93-103, nov. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2018.07.019>.
- Franceschini, Iara Maria; Burliga, Ana Luiza; Reviers, Bruno de; Prado, João Fernando; Rézig, Sahima Hamlaoui. *Algas: Uma abordagem filogenética, taxonômica e ecológica*. Porto Alegre, Rs: Artmed, 2010.
- Gargouch, Nesrine; Karkouch, Ines; Elleuch, Jihen; Elkahoui, Salem; Michaud, Phillipe; Abdelkafi, Slim; Laroche, Céline; Fendri, Imen. Enhanced B-phycoerythrin production by the red microalga *Porphyridium maritimum*: a powerful agent in industrial applications. *International Journal Of Biological Macromolecules*, [S.L.], v. 120, p. 2106-2114, dez. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.09.037>.
- Goiris, Koen; Van Colen, Willem; Wilches, Isabel; León-Tamariz, Fabián; Cooman, Luc de; Muylaert, Koenraad. Impact of nutrient stress on antioxidant production in three species of microalgae. *Algal Research*, [S.L.], v. 7, p. 51-57, jan. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2014.12.002>.
- Gonçalves, Vanessa Daneluz. Maximização da síntese de carotenoides mediante a fotoestimulação do crescimento da microalga *Tetrademus* sp. 2019. 152 f. Tese (Doutorado) - Curso de Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo, Pr, 2019.
- Grobbelaar, Johan U.. Algal Nutrition: mineral nutrition. In: Richmond, Amos. *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. Oxford: Blackwell Science, 2004. p. 97-115.
- Guo, Xin; Yao, Lishan; Huang, Qingshan. Aeration and mass transfer optimization in a rectangular airlift loop photobioreactor for the production of microalgae. *Bioresource Technology*, [S.L.], v. 190, p. 189-195, ago. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.04.077>.
- Hammed, Ademola Monsur; Prajapati, Sanjeev Kumar; Simsek, Senay; Simsek, Halis. Growth regime and environmental remediation of microalgae. *Algae*, [S.L.], v. 31, n. 3, p. 189-204, 15 set. 2016. The Korean Society of Phycology. <http://dx.doi.org/10.4490/algae.2016.31.8.28>.
- Han, Lin; Pei, Haiyan; Hu, Wenrong; Jiang, Liqun; Ma, Guixia; Zhang, Shuo; Han, Fei. Integrated campus sewage treatment and biomass production by *Scenedesmus quadricauda* SDEC-13. *Bioresource Technology*, [S.L.], v. 175, p. 262-268, jan. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.10.100>.

Henríquez, Vitalia; Escobar, Carolina; Galarza, Janeth; Gimpel, Javier. Carotenoids in Microalgae. *Subcellular Biochemistry*, [S.L.], p. 219-237, 2016. Springer International Publishing. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-39126-7_8.

Hinterholz, Camila Larissa; Trigueros, Daniela Estelita Goes; Módenes, Aparecido Nivaldo; Borba, Carlos Eduardo; Scheufele, Fabiano Bisinella; Schuelter, Adilson Ricken; Kroumov, Alexander Dimitrov. Computational fluid dynamics applied for the improvement of a flat-plate photobioreactor towards high-density microalgae cultures. *Biochemical Engineering Journal*, [S.L.], v. 151, p. 107257, nov. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2019.107257>.

Ho, Shih-Hsin; Chen, Ching-Nen Nathan; Lai, Yen-Ying; Lu, Wei-Bin; Chang, Jo-Shu. Exploring the high lipid production potential of a thermotolerant microalga using statistical optimization and semi-continuous cultivation. *Bioresource Technology*, [S.L.], v. 163, p. 128-135, jul. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.04.028>.

Jianfeng; Chang, Jo-Shu; Lu, Yinghua. Disruption of thermo-tolerant *Desmodesmus* sp. F51 in high pressure homogenization as a prelude to carotenoids extraction. *Biochemical Engineering Journal*, [S.L.], v. 109, p. 243-251, maio 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2016.01.003>.

Johnson, Xenie; Alric, Jean. Central Carbon Metabolism and Electron Transport in *Chlamydomonas reinhardtii*: metabolic constraints for carbon partitioning between oil and starch. *Eukaryotic Cell*, [S.L.], v. 12, n. 6, p. 776-793, jun. 2013. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/ec.00318-12>.

Kalra, Rishu; Gaur, Suchitra; Goel, Mayurika. Microalgae bioremediation: a perspective towards wastewater treatment along with industrial carotenoids production. *Journal Of Water Process Engineering*, [S.L.], v. 40, p. 101794, abr. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jwpe.2020.101794>.

Kang, Sang-Mo; Shaffique, Shifa; Kim, Lee-Rang; Kwon, Eun-Hae; Kim, Seong-Heon; Lee, Yun-Hae; Kalsoom, Kalsoom; Khan, Muhammad Aaqil; Lee, In-Jung. Effects of Organic Fertilizer Mixed with Food Waste Dry Powder on the Growth of Chinese Cabbage Seedlings. *Environments*, [S.L.], v. 8, n. 8, p. 86, 23 ago. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/environments8080086>.

Kholssi, Rajaa; Ramos, Priscila Vogelei; MarkS, Evan A.N.; Montero, Olimpio; Rad, Carlos. 2Biotechnological uses of microalgae: a review on the state of the art and challenges for the circular economy. *Biocatalysis And Agricultural Biotechnology*, [S.L.], p. 102114, jul. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102114>.

Klinthong, Worasaung; Yang, Yi-Hung; Huang, Chih-Hung; Tan, Chung-Sung. A Review: microalgae and their applications in co2 capture and renewable energy. *Aerosol And Air Quality Research*, [S.L.], v. 15, n. 2, p. 712-742, 2015. Taiwan Association for Aerosol Research. <http://dx.doi.org/10.4209/aaqr.2014.11.0299>.

Krinsky, Norman I.. The Antioxidant and Biological Properties of the Carotenoids. *Annals Of The New York Academy Of Sciences*, [S.L.], v. 854, n. 1, p. 443-447, nov. 1998. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1749-6632.1998.tb09923.x>.

Lamers, Packo P.; Janssen, Marcel; Vos, Ric C.H. de; Bino, Raoul J.; Wijffels, René H.. Carotenoid and fatty acid metabolism in nitrogen-starved *Dunaliella salina*, a unicellular green microalga. *Journal Of Biotechnology*, [S.L.], v. 162, n. 1, p. 21-27, nov. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.04.018>.

Leduy A., Zajic J.E., 1973 A geometrical approach for differentiation of an experimental function at a point: Applied to growth and product formation. *Biotechnol Bioeng*. 15, 805-810.

Lehmuskero, Anni; Chauton, Matilde Skogen; Boström, Tobias. Light and photosynthetic microalgae: a review of cellular- and molecular-scale optical processes. *Progress In Oceanography*, [S.L.], v. 168, p. 43-56, nov. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pocean.2018.09.002>.

Lichtenthaler, Hartmut K.; Buschmann, Claus. Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and Characterization by UV-VIS Spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, v. 1, n. 1, p. F4. 3.1-F4. 3.8, 2001.

Lourenço, Sergio O. Cultivo de microalgas marinhas - princípios e aplicações. São Carlos: Rima, 2006. 606 p.

Ma, Shiyang; Zeng, Weida; Huang, Yun; Zhu, Xianqing; Xia, Ao; Zhu, Xun; Liao, Qiang. Revealing the synergistic effects of cells, pigments, and light spectra on light transfer during microalgae growth: a comprehensive light attenuation model. *Bioresource Technology*, [S.L.], v. 348, p. 126777, mar. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2022.126777>.

Martins, Aline P.; Necchi Junior, Orlando; Colepiccolo, Pio; Yokoya, Nair S.. Effects of nitrate and phosphate availabilities on growth, photosynthesis and pigment and protein contents in colour strains of *Hypnea musciformis* (Wulfen in Jacqu.) J.V. Lamour. (Gigartinales, Rhodophyta). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, [S.L.], v. 21, n. 2, p. 340-348, abr. 2011. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1590/s0102-695x2011005000078>.

Mohsenpour, Seyedeh Fatemeh; Richards, Bryce; Willoughby, Nik. Spectral conversion of light for enhanced microalgae growth rates and photosynthetic pigment production. *Bioresource Technology*, [S.L.], v. 125, p. 75-81, dez. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.08.072>.

Montgomery D. C., Design and Analysis of Experiments, Des. Anal. Exp. ISBN 9781118146927, Eighth Ed. Wiley, 2012. 3 (2012) 754.

Morais, Michele Greque de; Vaz, Bruna da Silva; Morais, Etiele Greque de; Costa, Jorge Alberto Vieira. Biologically Active Metabolites Synthesized by Microalgae. *Biomed Research International*, [S.L.], v. 2015, p. 1-15, 2015. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/835761>.

Moura Junior, Alfredo Matos; Bezerra Neto, Egídio; Koenig, Maria Luise; Leça, Enide Eskinazi. Composição química de microalgas em cultivo semi-intensivo: *Chaetoceros gracilis* Schutt, *Isochrysis galbana* Parke e *Thalassiosira weissflogii* (Grunow) G. Fryxell & Hasle. *Ciência Agronômica*, Fortaleza, CE, v. 37, p. 142-148, 2006.

Moussa, Ines Dahmen-Ben; Chtourou, Haifa; Karray, Fatma; Sayadi, Sami; Dhoub, Abdelhafidh. Nitrogen or phosphorus repletion strategies for enhancing lipid or carotenoid production from *Tetraselmis marina*. *Bioresource Technology*, [S.L.], v. 238, p. 325-332, ago. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.04.008>.

Nascimento, Iracema Andrade; Marques, Sheyla Santa Izabel; Cabanelas, Iago Teles Dominguez; Pereira, Solange Andrade; Druzian, Janice Isabel; Souza, Carolina Oliveira de; Vich, Daniele Vital; Carvalho, Gilson Correia de; Nascimento, Maurício Andrade. Screening Microalgae Strains for Biodiesel Production: Lipid Productivity and Estimation of Fuel Quality Based on Fatty Acids Profiles as Selective Criteria. *Bioenerg. Res.* 6, 1–13 (2013).

Nelson, David L.; Cox, Michael M. Princípios de Bioquímica de Lehninger. 6. ed. Porto Alegre, Rs: Artmed, 2014.

Nisar, Nazia; Li, Li; Lu, Shan; Khin, Nay Chi; Pogson, Barry J.. Carotenoid Metabolism in Plants. *Molecular Plant*, [S.L.], v. 8, n. 1, p. 68-82, jan. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molp.2014.12.007>.

Pan, Yi-Ying; Wang, Suz-Ting; Chuang, Lu-Te; Chang, Yen-Wei; Chen, Ching-Nen Nathan. Isolation of thermo-tolerant and high lipid content green microalgae: oil accumulation is predominantly controlled by photosystem efficiency during stress treatments in *desmodesmus*. *Bioresource Technology*, [S.L.], v. 102, n. 22, p. 10510-10517, nov. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2011.08.091>.

Pancha, Imran; Chokshi, Kaumeel; George, Basil; Ghosh, Tonmoy; Paliwal, Chetan; Maurya, Rahulkumar; Mishra, Sandhya. Nitrogen stress triggered biochemical and morphological changes in the microalgae *Scenedesmus* sp. CCNM 1077. *Bioresource Technology*, [S.L.], v. 156, p. 146-154, mar. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.01.025>.

Pires, J.C.M.; Alvim-Ferraz, M.C.M.; Martins, F.G.; Simões, M.. Carbon dioxide capture from flue gases using microalgae: engineering aspects and biorefinery concept. *Renewable And Sustainable Energy Reviews*, [S.L.], v. 16, n. 5, p. 3043-3053, jun. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2012.02.055>.

Pozzobon, Victor; Levasseur, Wendie; Guerin, Cédric; Gaveau-Vaillant, Nathalie; Pointcheval, Marion; Perré, Patrick. Desmodesmus sp. pigment and FAME profiles under different illuminations and nitrogen status. *Bioresource Technology Reports*, [S.L.], v. 10, p. 100409, jun. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biteb.2020.100409>.

Rai, Monika Prakash; Gautom, Trishnamoni; Sharma, Nikunj. Effect of Salinity, pH, Light Intensity on Growth and Lipid Production of Microalgae for Bioenergy Application. *Online Journal Of Biological Sciences*, [S.L.], v. 15, n. 4, p. 260-267, 1 abr. 2015. Science Publications. <http://dx.doi.org/10.3844/ojbsci.2015.260.267>.

Ritchie, Raymond J.. Consistent Sets of Spectrophotometric Chlorophyll Equations for Acetone, Methanol and Ethanol Solvents. *Photosynthesis Research*, [S.L.], v. 89, n. 1, p. 27-41, 9 jun. 2006. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11120-006-9065-9>.

Rodionova, M.V.; Poudyal, R.s.; Tiwari, I.; Voloshin, R.A.; Zharmukhamedov, S.K.; Nam, H.G.; Zayadan, B.K.; Bruce, B.D.; Hou, H.J.M.; Allakhverdiev, S.I.. Biofuel production: challenges and opportunities. *International Journal Of Hydrogen Energy*, [S.L.], v. 42, n. 12, p. 8450-8461, mar. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.11.125>.

Rossi, S.; Casagli, F.; Mantovani, M.; Mezzanotte, V.; Ficara, E.. Selection of photosynthesis and respiration models to assess the effect of environmental conditions on mixed microalgae consortia grown on wastewater. *Bioresource Technology*, [S.L.], v. 305, p. 122995, jun. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122995>.

Schmidell, Willibaldo; Lima, Urgel de Almeida; Aquarone, Eugênio; Borzani, Walter. *Biotechnologia Industrial: engenharia bioquímica*. S.L: Edgard Blücher Ltda., 2001. 560 p..

Schuelter, Adilson Ricken; Kroumov, Alexander Dimitrov; Hinterholz, Camila Larissa; Fiorini, Adriana; Trigueros, Daniela Estelita Goes; Vendruscolo, Eliane Gruska; Zaharieva, Maya Margaritova; Módenes, Aparecido Nivaldo. Isolation and identification of new microalgae strains with antibacterial activity on food-borne pathogens. Engineering approach to optimize synthesis of desired metabolites. *Biochemical Engineering Journal*, [S.L.], v. 144, p. 28-39, abr. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2019.01.007>.

Searchinger, Tim; Waite, Richard; Hanson, Craig; Ranganathan, Janet. Creating a sustainable food future: A menu of solutions to feed nearly 10 billion people by 2050. [S.L]: Wri, 2019.

Taiz, Lincoln; Zeiger, Eduardo. *Fisiologia Vegetal*. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

Takaichi, Shinichi. Carotenoids in Algae: distributions, biosyntheses and functions. *Marine Drugs*, [S.L.], v. 9, n. 6, p. 1101-1118, 15 jun. 2011. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/md9061101>.

Talebi, Farhad Ahmad; Mohtashami, Seyed Kaveh; Tabatabaei, Meisam; Tohidfar, Masoud; Bagheri, Abdolreza; Zeinalabedini, Mehrshad; Mirzaei, Hossein Hadavand; Mirzajanzadeh, Mehrdad; Shafaroudi, Saeid Malekzadeh; Bakhtiari, Shiva. Fatty acids profiling: A selective criterion for screening microalgae strains for biodiesel production. *Algal Research*, [s. l], v. 2, p. 258-267, maio 2013.

Tang, Doris Ying Ying; Yew, Guo Yong; Koyande, Apurav Krishna; Chew, Kit Wayne; Vo, Dai-Viet N.; Show, Pau Loke. Green technology for the industrial production of biofuels and bioproducts from microalgae: a review. *Environmental Chemistry Letters*, [S.L.], v. 18, n. 6, p. 1967-1985, 7 ago. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10311-020-01052-3>.

Tomaselli, Luisa. The Microalgal Cell. In: Richmond, Amos. *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. Oxford: Blackwell Science, 2004. p. 3-19.

Tortora, Gerard J.; Funke, Berdell R.; Case, Christine L.. *Microbiologia*. 10. ed. Porto Alegre, Rs: Artmed, 2012.

Transparency Market Research. Algae market to reach valuation of ~us\$ 10.7 bn by 2027. 2020. Disponível em: <https://www.transparencymarketresearch.com/pressrelease/algae-market.htm>. Acesso em: 26 fev. 2021

Ugwu, C.u.; Aoyagi, H.; Uchiyama, H.. Photobioreactors for mass cultivation of algae. *Bioresource Technology*, [S.L.], v. 99, n. 10, p. 4021-4028, jul. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2007.01.046>.

Utex. BG-11 Medium. 2021. Disponível em: <https://utex.org/products/bg-11-medium?variant=30991786868826>. Acesso em: 21 jul. 2021.

Wagner, Ines; Steinweg, Christian; Posten, Clemens. Mono- and dichromatic Led illumination leads to enhanced growth and energy conversion for high-efficiency cultivation of microalgae for application in space. *Biotechnology Journal*, [S.L.], v. 11, n. 8, p. 1060-1071, 19 maio 2016. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/biot.201500357>.

Wan, Minxi; Jin, Xuejie; Xia, Jinlan; Rosenberg, Julian N.; Yu, Geng; Nie, Zhenyuan; Oyler, George A.; Betenbaugh, Michael J.. The effect of iron on growth, lipid accumulation, and gene expression profile of the freshwater microalga *Chlorella sorokiniana*. *Applied Microbiology And Biotechnology*, [S.L.], v. 98, n. 22, p. 9473-9481, 25 set. 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-014-6088-6>.

Weiss, Annika; Schebek, Liselotte. The net energy ratio of microalgae biofuels production based on correlated cultivation parameters in flat plate photobioreactors. *Journal Of Cleaner Production*, [S.L.], p. 1-10, nov. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.125073>.

Wu, Li Fen; Chen, Pei Chung; Huang, Ai Ping; Lee, Chi Mei. The feasibility of biodiesel production by microalgae using industrial wastewater. *Bioresource Technology*, [S.L.], v. 113, p. 14-18, jun. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2011.12.128>.

Yap, Jiunn Kwok; Sankaran, Revathy; Chew, Kit Wayne; Munawaroh, Heli Siti Halimatul; Ho, Shih-Hsin; Banu, J. Rajesh; Show, Pau Loke. Advancement of green technologies: a comprehensive review on the potential application of microalgae biomass. *Chemosphere*, [S.L.], v. 281, p. 130886, out. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130886>.

Yin, Zhihong; Zhu, Liandong; LI, Shuangxi; Hu, Tianyi; Chu, Ruoyu; Mo, Fan; Hu, Dan; Liu, Chenchen; Li, Bin. A comprehensive review on cultivation and harvesting of microalgae for biodiesel production: environmental pollution control and future directions. *Bioresource Technology*, [S.L.], v. 301, p. 122804, abr. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122804>.

Zhao, Feiyan; Xiao, Junmu; Ding, Wei; Cui, Na; Yu, Xuya; Xu, Jun-Wei; LI, Tao; Zhao, Peng. An effective method for harvesting of microalga: coculture-induced self-flocculation. *Journal Of The Taiwan Institute Of Chemical Engineers*, [S.L.], v. 100, p. 117-126, jul. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtice.2019.04.011>.

Zhou, Wenguang; Wang, Jinghan; Chen, Paul; Ji, Chengcheng; Kang, Qiuyun; Lu, Bei; Li, Kun; Liu, Jin; Ruan, Roger. Bio-mitigation of carbon dioxide using microalgal systems: advances and perspectives. *Renewable And Sustainable Energy Reviews*, [S.L.], v. 76, p. 1163-1175, set. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2017.03.065>.

APÊNDICE A - Cultivo da microalga *Desmodesmus* sp.



Figura A.1 – Cultivos de ativação em mesa agitadora orbital (MA 140 CFT Marconi); 150 rpm e iluminação média de ≈ 3300 lux ($45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

APÊNDICE B – Análises dos bioprodutos com a microalga *Desmodesmus* sp.

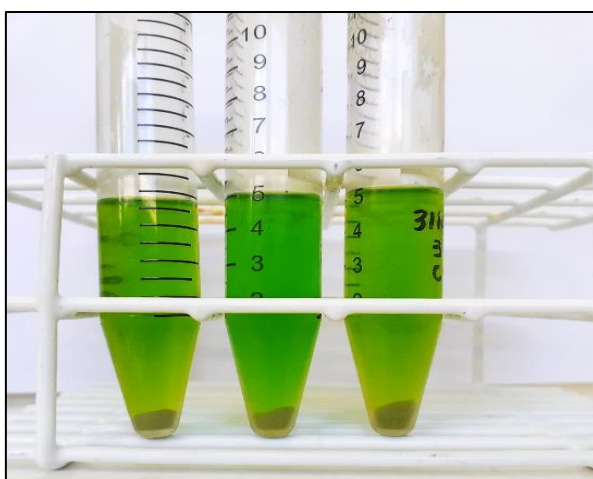


Figura B.1 – Descoloração total da biomassa para análise de pigmentos. Solução de metanol (99,8 %).



Figura B.2 – Separação de fases na análise de extração e quantificação de lipídeos.

APÊNDICE C – Concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$) de Cla, Clb e CT

Tabela C.1 -Produção média de pigmentos referente ao cultivo de *Desmodesmus* sp. em diferentes condições

Dias	Produção de pigmentos ($\mu\text{g mL}^{-1}$) referente ao Cultivo 1 (DP)			Produção de pigmentos ($\mu\text{g mL}^{-1}$) referente ao Cultivo 2 (DP)		
	Cla	Clb	CT	Cla	Clb	CT
4	28,62 (0,12)	21,16 (3,55)	2,86 (1,03)	27,65 (0,47)	21,02 (0,43)	4,20 (0,58)
8	52,03 (2,57)	34,48 (2,37)	9,30 (0,51)	61,19 (4,35)	54,41 (4,39)	6,51 (0,26)
12	54,24 (0,02)	28,60 (0,74)	16,19 (0,47)	55,77 (2,07)	28,87 (3,55)	18,07 (0,40)
16	28,33 (0,77)	11,91 (1,11)	11,01 (0,16)	28,66 (1,75)	14,44 (2,76)	10,62 (0,62)
20	15,76 (0,05)	39,03 (0,12)	0	13,82 (0,03)	36,55 (0,20)	0

Nota: Os valores de desvio padrão – DP estão apresentados entre parênteses.

Cultivo 1 – Sem adicional de micronutrientes. Cultivo 2 – Com adicional de micronutrientes

Tabela C.2 - Produção média de pigmentos referente ao cultivo de *Desmodemus* sp. em diferentes concentrações de nutrientes no décimo sexto dia de cultivo

Pigmento ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	E.1 (-1, -1)	E.2 (-1, 0)	E.3 (-1, +1)	E.4 (0, -1)	E.5 (0, 0)	E.6 (0, +1)
Cl_a	2,361 (0,037)	2,658 (0,323)	1,273 (0,240)	12,862 (0,924)	44,839 (0,203)	49,681 (1,629)
Cl_b	1,893 (0,093)	2,432 (0,041)	1,177 (0,035)	6,519 (0,047)	16,003 (0,058)	17,699 (0,675)
CT	1,396 (0,089)	1,724 (0,174)	0,952 (0,161)	4,918 (0,029)	14,827 (0,138)	17,090 (0,586)
	E.7 (+1, -1)	E.8 (+1, 0)	E.9 (+1, +1)	E.10 (0, 0)	E.11 (0, 0)	E.12 (0, 0)
Cl_a	8,183 (0,323)	51,951 (1,410)	37,530 (0,063)	45,077 (2,478)	46,575 (2,086)	40,533 (1,426)
Cl_b	2,244 (0,041)	16,975 (1,257)	12,151 (2,095)	16,596 (0,536)	16,937 (1,531)	14,447 (0,733)
CT	3,657 (0,028)	18,668 (0,288)	14,319 (0,412)	15,668 (0,982)	16,413 (0,467)	13,618 (0,358)

Nota: Entre parênteses estão os níveis inferiores (-1), centrais (0) e superiores (+1) referentes as concentrações de nitrato de sódio e fosfato de potássio, respectivamente, usadas em cada experimento; E: experimento; os valores de desvio padrão – DP estão apresentados entre parênteses.