

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA AMBIENTAL-
MESTRADO**

**ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM MICROBIOLOGIA APLICADA À
TECNOLOGIA AMBIENTAL**

Eduarda Torres Amaral

**APROVEITAMENTO DE GLICEROL COMO SUPLEMENTO NUTRICIONAL
NO DESENVOLVIMENTO DE MICROALGAS: PROSPECÇÃO PARA
OBTENÇÃO DE BIOMASSA E LIPÍDIOS.**

SANTA CRUZ DO SUL, 23 de Fevereiro de 2017

Eduarda Torres Amaral

**APROVEITAMENTO DE GLICEROL COMO SUPLEMENTO NUTRICIONAL
NO DESENVOLVIMENTO DE MICROALGAS: PROSPECÇÃO PARA
OBTENÇÃO DE BIOMASSA E LIPÍDIOS.**

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Tecnologia Ambiental da Universidade de Santa Cruz do Sul – UNISC, como requisito para a obtenção do título de mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Lisianne Brittes Benitez.

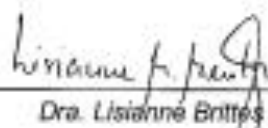
Coorientadora: Profa. Dra. Michele Hoeltz

SANTA CRUZ DO SUL, 2017

Eduarda Torres Amaral

**APROVEITAMENTO DE GLICEROL COMO SUPLEMENTO NUTRICIONAL
NO DESENVOLVIMENTO DE MICROALGAS: PROSPECÇÃO PARA
OBTENÇÃO DE BIOMASSA E LIPÍDIOS.**

Dissertação apresentada ao programa de
pós-graduação em Tecnologia Ambiental
da Universidade de Santa Cruz do Sul –
UNISC, como requisito para a obtenção
do título de mestre.



Dra. Lisiane Brites Benitez

Professor Orientador – UNISC



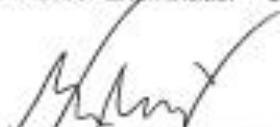
Dra. Michele Hoellz

Professor Coorientador - UNISC



Dra. Rosana de Cassia de Souza Schneider

Professor Examinador – UNISC



Dr. Fabio de Sales Neves

Professor Examinador - UDESC



Prof.ª Dr.ª Lourdes Teresinha Kist
Coordenadora
Programa de Pós-Graduação em
Tecnologia Ambiental – UNISC

SANTA CRUZ DO SUL, 2017

“Cada sonho que você deixa para trás, é um pedaço do seu futuro que deixa de existir”

STEVE JOB

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente à meus pais pelo apoio e incentivo para chegar onde cheguei.

A meu namorado Felipe, pelo carinho, companheirismo e dedicação ao longo desta trajetória.

As minhas orientadoras, professora Dra. Lisianne Brittes Benitez e profa. Dra. Michele Hoeltz, pela dedicação, disponibilidade, confiança, competência e especial atenção nas revisões e sugestões, fatores essenciais para a conclusão do trabalho.

A professora Dra. Rosana de Cassia de Souza pela oportunidade de entrar no grupo de pesquisa, pelo entusiasmo, carinho e dedicação que tem com a pesquisa e com seus alunos, estando sempre disposta a ajudar.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Ambiental que de alguma forma contribuíram para minha formação.

Ao Parque Tecnológico CEPPOB.

À UNISC pela bolsa de estudos BIPSS concedida ao Mestrado em Tecnologia Ambiental.

As bolsistas Martiele Bizarro e Jeniffer Julich pelo apoio e dedicação nas tarefas laboratoriais.

Aos colegas da turma do mestrado pelos bons momentos compartilhados ao decorrer da trajetória.

Aos demais familiares e amigos que sempre me apoiaram e incentivaram nesta jornada.

RESUMO

Sistemas mixotróficos de microalgas apresentam grande potencial na produção de bioenergia e no tratamento de águas residuais. O uso de fontes alternativas no cultivo de microalgas, como o glicerol, é importante por minimizar os impactos econômicos e ambientais gerados na produção de biomassa. Com o objetivo de aumentar a produção de biomassa e consequentemente o teor de lipídios, foi utilizado o glicerol como fonte de carbono para o cultivo das microalgas oriundas da ETE-UNISC. O estudo foi realizado no laboratório de microalgas do Centro de Excelência em Produtos e Processos Oleoquímicos e Biotecnológicos (CEPPOB) da Universidade de Santa Cruz do Sul (UNISC), campus de Santa Cruz do Sul. O comportamento das microalgas presentes no efluente foi testado, em escala laboratorial, utilizando-se o glicerol nas concentrações de 2,6; 5,2 e 10,4 g.L⁻¹. Nesta escala a concentração que teve melhor rendimento de biomassa foi a de 10,4 g.L⁻¹, apresentando média de 0,364 ± 0.082 g/L. A amostra com suplementação de 2,6 g.L⁻¹ foi a que obteve maior concentração de lipídios com média de 0,116 ± 0.030 g/L. O estudo feito em escala piloto testou as concentrações de 7,5; 10,4 e 12,5 g.L⁻¹ de glicerol, e a concentração de 12,5 g.L⁻¹ foi a que teve melhores rendimentos sendo 3.778 ± 1.1210 g/L em biomassa, e 0,135 ± 0.008 g/L em lipídios. Quanto ao perfil dos ácidos graxos encontrados em todos os experimentos, constatou-se que em geral ocorreu um aumento com a adição do glicerol como, por exemplo, em C14:0, C18:0, C18:2, C20:0, entre outros, contudo, destaca-se que em modo geral ambas as condições apresentaram um perfil cromatográfico de óleo com boa qualidade para produção de biodiesel.

PALAVRAS-CHAVE: *Chlorella* sp., efluente doméstico, glicerol, ácidos graxos

ABSTRACT

Mixotrophic microalgae systems present great potential in the production of bioenergy and wastewater treatment. The use of alternative sources in the microalgae growth, such as glycerol, is important because it minimizes economical and environmental impacts generated in biomass production. In order to increase the biomass production and consequently the lipid content, aiming its use at the biodiesel production, glycerol was used as a carbon source for the microalgae cultivation from the Wastewater Treatment Plant-UNISC. This study was carried out at the microalgae laboratory from the Excellence Center of Oleochemical and Biotechnological Products and Processes (ECOBPP), University of Santa Cruz do Sul (UNISC), Santa Cruz do Sul campus. The microalgae behavior present in the effluent was tested, in laboratory scale, using glycerol at concentrations of 2,6; 5,2 and 10,4 g L⁻¹. In this scale, the concentration that had the best biomass yield was 2,6 g.L⁻¹, presenting an average of 0.364 ± 0.082 g L⁻¹. The sample with supplementation of 2 g.L⁻¹ obtained the highest concentration of lipids with an average of 0.116 ± 0.030 L⁻¹. The glycerol concentrations tested in the pilot scale study were the 7,5; 10,4 and 12,5 g.L⁻¹, and the concentration of 12,5 g.L⁻¹ had the best yield rate (3.778 ± 1.1210 g.L⁻¹) in biomass, and (0.135 ± 0.008 g L⁻¹) for lipids. Regarding the profile of fatty acids found in both experiments, it was observed that in general occurred an increase of this profile with addition of glycerol as, for example, C14: 0, C18: 0, C18: 2, C20: 0, among others. However, it is noteworthy that in general both conditions presented an oil chromatographic profile with good quality for biodiesel production.

KEYWORDS: *Chlorella* sp., wastewater, glycerol, fatty acids.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS	14
2.1 <i>Objetivo Geral</i>	14
2.2 <i>Objetivos Específicos</i>	14
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
3.1 <i>Microalgas</i>	15
3.1.1 <i>Cultivo de microalgas</i>	16
3.1.1.1 <i>Em condições naturais</i>	16
3.1.1.2 <i>Em condições sintéticas</i>	17
3.1.1.3 <i>Em condições de estresse</i>	19
3.1.2 <i>Conteúdo lipídico das Microalgas</i>	22
3.2 <i>Glicerol como fonte de Carbono para Microalgas</i>	24
4. METODOLOGIA	28
4.1 <i>Meio de cultivo e caracterização físico-química</i>	29
4.2 <i>Produção e manutenção do inóculo</i>	29
4.2.1 <i>Microalga predominante</i>	31
4.3 <i>Cultivos com suplementação de glicerol: escala de 400 mL</i>	31
4.4 <i>Cultivo com suplementação de glicerol: Fotobiorreator 2,5 L</i>	32
4.5 <i>Processamento das amostras</i>	33
4.6 <i>Quantificação de glicerol por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)</i>	33
4.7 <i>Extração de lipídios da biomassa</i>	33
4.8 <i>Determinação de ácidos graxos da biomassa</i>	34
4.9 <i>Determinação do carbono orgânico total – COT</i>	35
4.10 <i>Análise estatística dos dados</i>	36
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5.1 <i>Caracterização do meio de cultivo</i>	37
5.1.1 <i>Análises físico-químicas do efluente</i>	37
5.1.2 <i>Identificação da espécie predominante de microalga</i>	37
.....	38
5.1.3 <i>Comportamento de crescimento do Inóculo</i>	38
5.2 <i>Comportamento microalgal</i>	39
5.3 <i>Rendimento de biomassa</i>	42
5.4 <i>Rendimento de lipídios na biomassa</i>	45

5.5 Consumo de glicerol no cultivo das microalgas.....	48
5.6 Caracterização de ácidos graxos presentes na fração lipídica da biomassa.....	49
5.7 Análises de carbono orgânico total – COT.....	53
5.8 Análise físico-química do meio de cultivo após etapa II.....	54
6. CONCLUSÕES	57
7. REFERÊNCIAS.....	58

LISTA DE FIGURAS

Figura 2. Metabolismo do glicerol na produção de produtos de valor agregado. (Fonte: (Dobson et al. 2012).....	26
Figura 3. Fluxograma do delineamento de pesquisa	28
Figura 4. Fotobiorreator utilizado no cultivo de microalgas.	30
Figura 5. Instrumentos utilizados para as contagens: Contador manual (A); Câmara de Neubauer (B); Microscópio óptico (C).....	30
Figura 6. Experimento realizado com diferentes concentrações de glicerol.....	32
Figura 7. Experimento realizado em fotobiorreatores de 2,5 L com diferentes concentrações de glicerol.	32
Figura 8. Fotomicrografia de <i>Chlorella</i> sp. identificada em inóculo de cultivo em fotobiorreator de escala piloto ampliada em 1.000 vezes.....	38
Figura 9. Comportamento das microalgas do efluente sem adição de glicerol.....	39
Figura 10. Comportamento de crescimento das microalgas em efluente doméstico suplementado com diferentes concentrações de glicerol (g.L ⁻¹). Os dados são expostos como média ± desvio-padrão, n=3.	40
Figura 11. Comportamento de crescimento das microalgas em efluente doméstico suplementado com diferentes concentrações de glicerol (g.L ⁻¹). Os dados são expostos como média ± desvio-padrão, n=3.	41
Figura 12. Rendimentos de biomassas secas da etapa I, suplementadas com diferentes concentrações de glicerol (g.L ⁻¹). Os valores representam a média ± desvio padrão de três experimentos independentes.....	43
Figura 13. Rendimentos de biomassas secas da etapa II, suplementadas com diferentes concentrações de glicerol (g.L ⁻¹). Os valores representam a média ± desvio padrão de três experimentos independentes.....	44
Figura 14. Teores de lipídios extraídos da biomassa microalgal em crescimento contendo diferentes concentrações de glicerol (C0, G2, G5 e G10 g.L ⁻¹).....	46
Figura 15. Teores de lipídios extraídos da biomassa microalgal em crescimento contendo diferentes concentrações de glicerol (C0, G7, G10 e G12 g.L).	47
Figura 16. Perfil cromatográfico da escala de 400 mL – Etapa I.....	50
Figura 17. Perfil cromatográfico do experimento de escala 2,5L – Etapa II.	50
Figura 18. Áreas relativas dos ácidos graxos majoritários encontrados na etapa I- 400 mL com diferentes concentrações de glicerol.....	51
Figura 19. Áreas relativas dos ácidos graxos majoritários encontrados na etapa II- 2,5 L com diferentes concentrações de glicerol.....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Diferentes tipos de metabolismos que as microalgas podem assumir dependendo do tipo de fonte utilizada (Fonte: (Chen et al. 2011)).	18
Tabela 2. Teor de lipídios de diferentes espécies de microalgas, sob diferentes condições de cultivo.	24
Tabela 3. Experimentos suplementados com glicerol, seus respectivos teores de lipídios e ácidos graxos encontrados a partir da biomassa.	27
Tabela 4. Parâmetros analíticos do efluente da ETE.	37
Tabela 5. Quantidade de glicerol (g.L^{-1}) consumidas durante o experimento.	48
Tabela 6. Proporção relativa (%) dos principais ácidos graxos encontrados nos experimentos com e sem glicerol.	49
Tabela 7. Resultados obtidos na análise de COT para amostras sem e com glicerol.	53
Tabela 8. Parâmetros analíticos do efluente da ETE e do sobrenadante do experimento com glicerol.	54

1. INTRODUÇÃO

Fontes de energia não renováveis são limitadas na natureza e se extinguem com o uso continuado. Os combustíveis fósseis são produzidos a partir de recursos não sustentáveis, e aliados a isso, a recente volatilidade no preço do óleo bruto e a expectativa no aumento do preço vinculado com o estímulo em reduzir emissões de poluentes e gases de efeito estufa no meio ambiente, se tem criado um novo interesse no desenvolvimento de alternativas aos combustíveis fósseis.

Este é um combustível renovável produzido principalmente a partir de óleos vegetais e gorduras animais. Regulamentos ambientais exigentes, criaram grande interesse no biodiesel como uma alternativa de combustível, objetivando maior redução das emissões veiculares.

Dentre as alternativas de produção do biodiesel a utilização de microalgas tem recebido grande atenção dos pesquisadores. A utilização da microalga para a produção de biocombustíveis pode suprir parte das necessidades energéticas globais, além de sua capacidade de fornecer produtos de alto valor comercial tanto na indústria alimentícia como farmacêutica.

A utilização das microalgas na produção de biocombustíveis também pode desenvolver outro papel importante para o meio ambiente uma vez que podem ser utilizadas para a biorremediação de águas residuais bem como atuar no sequestro de dióxido de carbono.

Microalgas são produtores naturais de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa, tal como ômega 3. Dentre todas as espécies, algumas possuem extrema abundância de óleos, sendo que podem apresentar teores de óleo superiores a 80% de sua composição, e esses podem ser convertidos em ésteres metílicos (biodiesel) (O'Grady e Morgan 2011).

Em geral, ambas as microalgas heterotróficas e autotróficas são capazes de sintetizar óleo crescendo com a suplementação de glicerina como

fonte de carbono e assim utilizar os resíduos desse processo a fim de melhorar a sua produtividade.

A viabilidade econômica de biodiesel a partir de microalgas pode ser alcançada através da garantia de alta acumulação de lipídios em células de microalgas. Abordagens convencionais como a alteração do regime de nutrientes e das condições de cultivo são caras ou estão associadas com baixa produtividade lipídica global. Assim, o glicerol representa uma fonte suplementar promissora, ao proporcionar um maior rendimento lipídico em relação aos métodos convencionais.

Neste contexto, caracteriza-se a importância do estudo dos efeitos de diferentes concentrações de glicerol sobre o comportamento de microalgas visando a obtenção de uma biomassa com perfil lipídico viável para a produção de biodiesel. A iniciativa de incrementar a produção de óleos utilizando microalgas autóctones e de promover o seu crescimento em condições de remediação de compostos eutrofizantes, como nitrogênio e fósforo, surge como uma possibilidade que, além de sustentável, pode colaborar para tornar o processo de obtenção de biodiesel economicamente viável.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a influência do glicerol como suplemento nutricional no cultivo e na qualidade da biomassa de microalgas.

2.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar as microalgas predominantes no sistema de efluentes da ETE- UNISC;
- Determinar a influencia de diferentes concentrações de glicerol no crescimento, rendimento e teor de lipídios da biomassa de microalgas;
- Monitorar o consumo de glicerol pelas microalgas;
- Caracterizar a fração lipídica da biomassa de microalgas produzida em meio efluente e com diferentes concentrações de glicerol.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Microalgas

Microalgas são microrganismos fotossintéticos eucarióticos ou procarióticos que podem crescer rapidamente e viver em condições adversas devido a sua estrutura unicelular ou multicelular simples (Mata et al. 2010, Zhang et al. 2016). Possuem necessidades simples de crescimento (luz, açúcares, CO₂, nitrogênio, fósforo e potássio) e podem produzir lipídios, proteínas e carboidratos em grandes quantidades, sob curtos períodos de tempo (Demirbas 2011).

Elas estão presentes em diversos tipos de ecossistemas existentes na terra, não apenas aquáticos como também terrestres, representam uma grande diversidade de espécies vivendo em uma larga variedade de condições ambientais. É estimado que existam mais de 50 mil espécies, em torno de 30 mil são catalogadas (Mata et al. 2010).

Com base na sua abundância, as microalgas são caracterizadas em três principais classes: diatomáceas, algas verdes e algas douradas. Existem duas principais populações de microalgas: algas filamentosas e fitoplâncton. Dessas duas espécies em particular o fitoplâncton, aumenta rapidamente a partir da sua proliferação (Demirbas e Fatih Demirbas 2011).

No decorrer dos anos, inúmeras pesquisas utilizando microalgas vem sendo aplicadas em uma ampla variedade de processos, ou na fabricação de importantes produtos práticos e econômicos (Spolaore et al. 2006, Mata et al. 2010).

Diversos produtos úteis para humanos podem ser provenientes de microalgas, variando desde carboidratos, ácidos graxos essenciais, pigmentos, suplementos alimentares, fertilizantes, farmacêuticos até biocombustíveis (Hemaiswarya et al. 2011, Mitra et al. 2012). As microalgas são fábricas de óleo dirigidas pela luz solar, que convertem dióxido de carbono em potenciais biocombustíveis, rações, alimentos e bioativos de alto valor (Akkerman et al. 2002, Banerjee et al. 2002, Walker et al. 2005, Spolaore et al. 2006, Phukan et

al. 2011). As microalgas usam uma enorme quantidade de CO₂, e são capazes de converter este CO₂ em biomassa, liberando via fotossíntese mais oxigênio para a atmosfera do que as florestas (Demirbas 2011).

O interesse em usar microalgas para energias renováveis aumentou na década de 1970 durante a primeira crise do petróleo (Spolaore et al. 2006, Mata et al. 2010). As algas são o mais eficiente produtor biológico de óleo no planeta e uma versátil fonte de biomassa, e podem em breve ser uma das mais importantes culturas renováveis de combustível da terra (Phukan et al. 2011). A integração da produção de biocombustíveis baseado em microalgas e o tratamento de efluentes tem benefícios econômicos e ambientais. Em grandes quantidades de água e nutrientes (por exemplo, nitrogênio e fósforo) podem ser poupados em sistema de cultivo de microalgas em efluentes (Li et al. 2011, Pittman et al. 2011, Zhou et al. 2011, Ma et al. 2016).

3.1.1 Cultivo de microalgas

3.1.1.1 Em condições naturais

No habitat natural, as microalgas convivem com muitos outros microrganismos, onde se inclui as bactérias que muitas vezes tem influência no crescimento de microalgas (Cheirsilp et al. 2011, Cho et al. 2015). As prováveis relações simbióticas entre microalgas e bactérias não podem ser ignoradas em diversos sistemas de cultivo. Outra relação simbiótica comum em ecossistemas são microalgas e fungos. Culturas mistas podem ser utilizadas para produzir lipídios, utilizando resíduos como substrato de crescimento (Singh et al. 2016).

Interações que ocorrem entre algas e bactérias, particularmente para o fornecimento de nitrogênio fixado ou micronutrientes tais como vitaminas e Fe, bem como fornecendo informações sobre o ciclo biogeoquímico importante no mundo aquático, estudos dessas relações começaram a abordar mecanismos moleculares subjacentes à troca de materiais. Contudo, no mundo microbiano onde a distinção entre hospedeiro e simbiote é menos clara, se torna um

desafio identificar parceiros nas comunidades mais complexas, e determinar a vantagens em que são obtidas por cada um deles (Cooper e Smith 2015).

A entrega de carbono orgânico fixo via fotossíntese é o principal fator contribuinte pela alga nas interações de algas e bactérias. Em muitos casos, as bactérias podem simplesmente ser capazes de acessar matéria orgânica dissolvida na ficosfera, mas interações mutuas em que a bactéria fornece fatores que aumentam o crescimento algal podem consolidar esse relacionamento e oferecem a elas uma vantagem seletiva. Para muitos, as interações têm sido demonstradas que o mutualismo é mediado pelo fornecimento de nutrientes por parte das bactérias (Cooper e Smith 2015). A correlação nutricional fornece uma base para a compreensão de muitas associações entre microalgas e bactérias. Tal como acontece com algumas plantas terrestres, algas marinhas podem derivar sua fonte de nitrogênio pela associação com cianobactérias diazotróficas (Hom et al. , Foster et al. 2011).

Muitas microalgas dependem de vitamina B12, obtidas a partir de bactérias heterotróficas na troca de carbono orgânico fixo, o que pode afetar a composição e produtividade das comunidades contendo microalgas (Hom et al. , Croft et al. 2005).

Além de uma troca direta de nutrientes benéficos, podem ocorrer interações cooperativas indiretas através de proteção contra fatores prejudiciais de inibição (por exemplo, defesa contra o stress ou a degradação de resíduos de produtos nocivos e toxinas) (Hom et al. , Vanellander et al. 2012).

No estudo de Yen et al. (2015) relataram o efeito mútuo do fungo *Rhodotorula glutinis* e da microalga *Scenedesmus* sobre a acumulação de biomassa e lipídios. A co-cultura melhorou o rendimento da biomassa entre 40-50% e teor de lipídios cerca de 60-70%, respectivamente, em comparação com a cultura individual de ambas as linhagens (Singh et al. 2016).

3.1.1.2 Em condições sintéticas

Microalgas dependem tipicamente de suprimentos de carbono (como CO₂), luz (embora algumas espécies não necessitem de CO₂ ou luz) (Hirano et al. 1997, Fenton e Ó hUallacháin 2012) e nutrientes (Mata et al. 2010, Fenton e Ó hUallacháin 2012) para realizar a fotossíntese e crescimento da biomassa. Os nutrientes necessários para a maioria das microalgas incluem nitrogênio, fósforo e potássio em concentrações requeridas para as espécies existentes (Fenton e Ó hUallacháin 2012).

As microalgas podem assumir muitos tipos de metabolismos como, por exemplo, autotrófico, heterotrófico, mixotrófico e fotoheterotrófico, representados na tabela 1, e são capazes de mudanças metabólicas como resposta as alterações das condições ambientais. O cultivo fotoautotrófico, é a condição de cultivo mais comumente utilizada para o crescimento de microalga (Illman et al. 2000, Gouveia et al. 2009, Gouveia e Oliveira 2009, Mandal e Mallick 2009, Chen et al. 2011).

O cultivo heterotrófico evita problemas associados com a luz limitada que impedem uma alta densidade celular em um fotobiorreator de larga escala durante o cultivo fototrófico (Huang et al. 2010, Mata et al. 2010, Chen et al. 2011). Algumas espécies de microalgas são capazes de sobreviver sob condições fototróficas ou heterotróficas ou ambas. O CO₂ liberado pela microalga via respiração vai ser preso e reutilizado sob cultivo fototrófico. Comparado com cultivo fototrófico e heterotrófico, o cultivo mixotrófico é raramente utilizado na produção de óleo de microalga (Mata et al. 2010, Chen et al. 2011).

Tabela 1. Diferentes tipos de metabolismos que as microalgas podem assumir dependendo do tipo de fonte utilizada (Fonte: (Chen et al. 2011)).

Condição de Cultivo	Fonte de Energia	Fonte de Carbono	Densidade Celular
Fototrófico	Luz	Inorgânico	Baixa
Heterotrófico	Composto orgânico	Orgânico	Alta
Mixotrófico	Luz ou composto orgânico	Inorgânico ou orgânico	Média
Fotoheterotrófico	Luz	Orgânico	Média

As microalgas são predominantemente cultivadas fotoautotróficamente, embora algumas cepas possam usar carbono orgânico e oxigênio para crescer

por um caminho heterotrófico (Cerón-García et al. 2013, Kirrolia et al. 2013). Algas heterotróficas e mixotróficas são conhecidas por crescer muito mais rápido e gerar uma maior quantidade de óleo celular como matéria prima de biocombustíveis em comparação as células fotoheterotróficas (Cerón Garcí et al. 2000, Miao e Wu 2004, Mitra et al. 2012).

O metabolismo envolvido também pode ser distinguido de acordo com as mudanças de pH que dependem da estequiometria de crescimento da microalga. *Chlorella vulgaris*, *Haematococcus pluvialis*, *Arthrospira (Spirulina) platensis* são exemplos de cepas encontradas para crescer sob condições fotoautotróficas, heterotróficas ou ainda sob condições mixotróficas (Mata et al. 2010).

São importantes para o crescimento das algas o carbono orgânico ou seus substratos (fontes de carbono como açúcares, proteínas e gorduras), vitaminas, sais e outros nutrientes (nitrogênio e fósforo), porém também é necessário um equilíbrio entre seus parâmetros operacionais (oxigênio, dióxido de carbono, pH, temperatura, intensidade de luz e a remoção de produtos e sub produtos) (Mata et al. 2010).

Existem vários fatores que influenciam o crescimento algal, entre eles destacam-se os fatores abióticos como a luz (qualidade e quantidade), temperatura, concentração de nutrientes, O₂, CO₂, pH, salinidade, químicos tóxicos, os fatores bióticos como os patógenos (bactérias, fungos e vírus) e competição e os fatores operacionais como a taxa de diluição, a profundidade do cultivo, a frequência de colheita, a adição de bicabornato, entre outros (Mata et al. 2010).

3.1.1.3 Em condições de estresse

Quando microalgas são cultivadas em condições sub ou supra-ótimas reagem e mudam o seu padrão e estratégias metabólicas, a fim de lidar com as dificuldades relacionadas ao ambiente e a condições específicas. Esta mudança dinâmica sobre a estratégia metabólica afeta a composição da

biomassa, variando o conteúdo relativo dos compostos da biomassa (Hu et al. 2008, Markou e Nerantzis 2013). Quando as condições ambientais são extremas e as microalgas crescem sob estresse, elas sintetizam e produzem vários metabólitos secundários. A síntese destes metabólitos secundários acredita-se que funcionam como tentativa de os microrganismos para reter as suas taxas de crescimento ou para aumentar a possibilidade de sobrevivência (Markou e Nerantzis 2013).

A adaptação da microalga para mudanças climáticas é geralmente o resultado da mudança de padrões de lipídios e síntese de vários compostos incomuns (Guschina e Harwood 2006, Rawat et al. 2013). É possível induzir ou aumentar o teor de lipídios pela falta de nitrogênio ou outros fatores de stress. Deficiências de nutrientes, podem conduzir a um aumento no teor de lipídio celular. Frações lipídicas elevadas como 70% a 85% em peso seco são reportadas, um teor de lipídios tão alto excede o da maioria das plantas terrestres (Rawat et al. 2013).

Perfis de lipídios são afetados por condições nutricionais, processamento e cultivo. Uma seleção criteriosa deve ser baseada em um número de fatores incluindo taxa de crescimento, qualidade e quantidade de lipídios, forte adaptação a mudanças ambientais e determinação de nutrientes preferidos e taxas de assimilação de nutrientes (Amaro et al. 2011, Rawat et al. 2013).

Triacilgliceróis podem ser encontrados em elevadas proporções, em algumas espécies de algas durante a fase estacionária. A fase estacionária pode ser induzida limitando uma ou mais variáveis que controlam o crescimento, como nitrogênio e fósforo (Mansour et al. 2005, Rawat et al. 2013). Certas cepas de *Botryococcus braunii* tem alto potencial de armazenamento de lipídios (mais de 75% lipídio/grama de peso de célula seca), mas isso é acompanhado por uma baixa produtividade. Sendo assim culturas com níveis de acumulação de lipídios moderados (20% a 50%), mas com maior produtividade são preferidos para o cultivo em massa (Mata et al. 2010, Amaro et al. 2011, Rawat et al. 2013).

Temperatura e luz também desempenham papéis no tipo de lipídio produzido. Ácidos graxos poli-insaturados C₁₆ e C₁₈, bem como mono e digalactosil diglicerídios, esfingolipídios, fosfoglicerídios em *Euglena gracilis* e *Chlorella vulgaris* são aumentados pela luz. A síntese de ácidos graxos poli-insaturados C₁₈ pela *Monochrysis lutheri*, e mudanças na composição de ácidos graxos da *Dunaliella salina* pode ser provocado sob condições de baixa temperatura (Rawat et al. 2013).

Uma das técnicas mais sugeridas é o cultivo de microalgas em processo de múltiplos estágios, em que em cada etapa ou condições ótimas apropriadas são aplicadas. A técnica em múltiplos estágios mais frequentemente sugerida é a cultivo em sistemas de duas fases, em que na primeira fase condições ótimas são aplicadas visando a maximização da produção de biomassa, enquanto que na segunda fase, são aplicadas condições de estresse com vista a acumulação do composto desejado (Aflalo et al. 2007, Del Río et al. 2008, Markou e Nerantzis 2013).

Durante condições de crescimento ótimas, *C. vulgaris* pode atingir entre 5-40% de lipídios em peso seco de biomassa (Safi et al. 2014), composto principalmente por glicolipídios, hidrocarbonetos, fosfolipídios, e pequenas quantidades de ácidos graxos livres (Hu et al. 2008). Estes componentes são sintetizados pelo cloroplasto e também localizados na parede da célula e nas membranas de organelas. No entanto, durante as condições de crescimento desfavoráveis, o teor de lipídios (composto principalmente de triacilgliceróis) pode chegar a 58% (Mata et al. 2010, Stephenson et al. 2010, Safi et al. 2014).

No crescimento heterotrófico, as microalgas são cultivadas num biorreator onde se espera um maior grau de crescimento aliado a um baixo custo de colheita devido à maior produtividade de biomassa seca obtida (até 0,25 g.L⁻¹.d⁻¹) e elevada acumulação de componentes diferentes, tais como 22-54 mg.L⁻¹.d⁻¹ de lipídios encontrados por MARTÍNEZ et al. (1991). As fontes de carbono utilizadas para *C. vulgaris* são glicose, acetato, glicerol e o glutamato com uma taxa específica de crescimento máximo obtido com glicose. No entanto, a principal desvantagem deste sistema é o preço e a disponibilidade

de açúcares, que competem com matérias-primas para outros usos, tais como produção de alimentos e biocombustíveis (Safi et al. 2014).

3.1.2 Conteúdo lipídico das Microalgas

Muitas espécies de microalgas podem ser induzidas a acumular quantidades substanciais de lipídios (Mata et al. (2010), contribuindo assim para um alto rendimento de óleo. O teor médio de lipídio varia entre 1 e 70%, mas sob certas condições algumas espécies podem alcançar 80% do peso seco (Spolaore et al. 2006, Chisti 2007, Li et al. 2008, Li et al. 2008, Mata et al. 2010, Demirbas e Fatih Demirbas 2011, Demirbas 2011).

Aproximadamente 46 toneladas de óleo/hectare/ano podem ser produzidos a partir de microalgas. Algumas algas produzem mais de 50% de óleo por peso (Demirbas 2011). De acordo com algumas estimativas o rendimento (por acre) de óleo a partir de alga é maior do que 200 vezes o rendimento de óleos de plantas/ vegetais de melhor rendimento (Demirbas e Fatih Demirbas 2011).

As algas utilizadas na produção de biodiesel são geralmente algas verdes e unicelulares. Este tipo de alga é eucariótica fotossintética, caracterizada por altas taxas de crescimento e altas densidades populacionais. Em boas condições, a algumas algas podem dobrar sua biomassa em menos de 24 horas e acumular quantidades relevantes de lipídios, frequentemente mais de 50% de seu peso seco (Chisti 2007, Demirbas e Fatih Demirbas 2011).

Na maioria dos casos a produção do biodiesel depende das espécies e cepas já disponíveis que se mostraram adequadas devido a seus teores de lipídios ou produtividade. Além disso, elas podem mudar a sua estrutura interna, enquanto externamente elas podem excretar uma variedade de componentes, tornando nutrientes disponíveis ou limitando o crescimento de competidores (Mata et al. 2010). Um hectare de alga cultivada em terras improdutivas pode produzir óleo de 10 a 100 vezes mais comparado com quaisquer outras fontes conhecidas de culturas oleaginosas. Enquanto um

ciclo de culturas oleaginosas pode levar de três meses a três anos para produção, a alga pode começar a produzir óleo dentro de três a cinco dias e depois disso o óleo pode ser coletado diariamente (Schenk et al. 2008, Demirbas 2011, Baierle et al. 2015).

Algumas microalgas têm um perfil conveniente de ácidos graxos e uma fração insaponificável permitindo uma produção de biodiesel com alta estabilidade de oxidação (Minowa et al. 1995, Gouveia e Oliveira 2009).

O gênero de *Chlorella* parece ser uma boa opção para a produção de biodiesel, no entanto outras espécies são tão eficientes e produtivas quanto. A seleção da espécie mais adequada precisa levar em consideração outros fatores como, por exemplo, a habilidade da microalga para se desenvolver utilizando os nutrientes disponíveis ou sob condições ambientais específicas. Todos esses parâmetros devem ser considerados simultaneamente na seleção da espécie mais adequada ou produção das cepas mais adequadas para produção de biodiesel (Mata et al. 2010).

Espécies de microalgas marinhas têm demonstrado produzir níveis mais altos de fosfolipídios do que triacilgliceróis, (Singh et al. 2011), Rawat et al. (2013). Esses tipos de lipídios são inadequados para produção de biodiesel via transesterificação. Cepas de água doce tem demonstrado produzir grandes quantidades de lipídios neutros saturados fazendo delas candidatas ideais para produção de biodiesel (Ahmad et al. 2011), Rawat et al. (2013). A composição dos ácidos graxos varia entre as espécies de microalga de água doce bem como entre as espécies de água marinha. Além disso, é possível manipular o tipo de lipídio produzido por ajustes das condições de cultura (Griffiths e Harrison 2009, Rawat et al. 2013).

O acúmulo de lipídios ocorre naturalmente como um mecanismo para armazenamento de energia em condições desfavoráveis (Li et al. (2011), Rawat et al. (2013). O papel dos lipídios no crescimento das microalgas é como reservas de energia e parte dos componentes estruturais da célula. Fosfolipídios e glicolipídios são componentes primários da parede celular e determinam a fluidez das membranas sob várias condições (Williams e Laurens

2010), Rawat et al. (2013). Na tabela 2, encontram-se diferentes condições de cultivo de microalgas com seus respectivos teores de lipídios.

Tabela 2. Teor de lipídios de diferentes espécies de microalgas, sob diferentes condições de cultivo.

Espécie de Microalga	Condição de Cultivo	Teor de Lipídios (%)	Referência
<i>Chlorella sorokiniana</i> (PCH02)	Fotoautotrófico	4 – 33	(Paranjape et al. 2016)
	Mixotrófico	25 – 35	
<i>Chlorella vulgaris</i> (PCH05)	Fotoautotrófico	21 - 51	(Paranjape et al. 2016)
	Mixotrófico	20 – 62	
<i>Chlorella vulgaris</i>	Mixotrófico	15,91	(Choi e Yu 2015)
	Autotrófico	12,20	
<i>Botryococcus braunii</i>	Mixotrófico	16,41	(Choi e Yu 2015)
	Autotrófico	9,30	
<i>Scenedesmus sp.</i>	Mixotrófico	16,24	(Choi e Yu 2015)
	Autotrófico	13,11	
<i>Chlorella protothecoides</i>	Heterotrófico	47.0 - 50,6	(Feng et al. 2014)
<i>Chlorococcum sp.</i>	Mixotrófico	39	(Ummalyma e Sukumaran 2014)
	Heterotrófico	42	
<i>Chlorella vulgaris</i> Beijerick 1890 (IBL-C105)	Mixotrófico	13 – 27	(Cabanelas et al. 2013)
<i>B.terribilis</i> Komárček 1990 (IBL-C115)	Mixotrófico	9,5 – 25	(Cabanelas et al. 2013)
<i>Chlamydomonas polypyrenoideum</i>	Heterotrófico	42	(Kothari et al. 2013)
<i>Thraustochytrium sp.</i> (AMCQS5-5)	Heterotrófico	33,1 – 48	(Gupta et al. 2013)
		46	
<i>Scenedesmus dimorphus</i>	Heterotrófico	28,2	(Prathima Devi et al. 2012)
<i>C. vulgaris</i> 2714	Autotrófica	22.94 - 27.38	(Heredia-Arroyo et al. 2011)
	Heterotrófica	26.50 - 30.58	
	Mixotrófica	9.91 - 13.82	
<i>Botryococcus braunii</i> UTEX572	Fototrófico	20,65	(Yoo et al. 2010)
<i>Chlorella vulgaris</i> #259	Mixotrófico	23	(Liang et al. 2009)
		34	
<i>Chlorella vulgaris</i> #259	Heterotrófico	23	(Liang et al. 2009)
		36	
<i>Chlorella protothecoides</i>	Heterotrófico	50,3 – 57,8	(Xiong et al. 2008)
<i>Chlorella protothecoides</i>	Heterotrófico	43 – 48,7	(Li et al. 2007)
<i>Chlorella protothecoides</i>	Heterotrófico	46,1	(Xu et al. 2006)

3.2 Glicerol como fonte de Carbono para Microalgas

As microalgas quando produzidas por sistemas heterotróficos, precisam de fontes de carbono orgânico para crescer, que são responsáveis por 80%

dos custos médios (Li et al. 2007, Mitra et al. 2012). A fim de reduzir os custos de produção microalgal é indispensável achar substratos orgânicos baratos que satisfaça as necessidades nutricionais de algas oleaginosas (Mitra et al. 2012).

A substituição de uma fonte de carbono tradicional, como a glicose, para fontes menos custosas tem um impacto positivo na economia dos bioprocessos. A redução do custo no meio de crescimento com efeitos indesejáveis mínimos é crucial para uma potencial implementação industrial. Neste cenário, o glicerol bruto é um co-produto industrial disponível em grandes quantidades, sendo uma combinação ideal (da Silva et al. 2009, Abad e Turon 2012).

Com a larga escala de produção de biodiesel, o mercado está inundado com glicerol bruto e conseqüentemente, produtores de biodiesel devem encontrar novos usos para este fluxo de resíduo. Uma possibilidade para a utilização do glicerol bruto é o uso como substrato para cultivo, por exemplo, da microalga oleaginosa *Schizochytrium limacinum* (Chi et al. (2007), Choi e Yu (2015), que pode produzir quantidades significantes de lipídios totais e ácido docosa-hexaenóico quando cresce em glicerol ou outras fontes de carbono (O'Grady e Morgan 2011), Choi e Yu (2015). Assim o glicerol derivado do biodiesel pode ser considerado um substrato potencial para o cultivo mixotrófico de microalgas oleaginosas, o que poderia reduzir o custo de produção de biodiesel microalgal (Kong et al. 2013, Choi e Yu 2015).

A capacidade de microalgas para utilizar fontes de carbono orgânico para crescimento é altamente dependente do esforço e baseia-se na disponibilidade de transporte para dentro da célula e na presença de vias enzimáticas de converter a fonte de carbono em precursores adequados para o carbono metabolismo (Azma et al. 2011).

Quando microalgas crescem em um substrato com glicerol, ele entra nas células por uma difusão simples e dentro das células, é utilizado como uma molécula osmorregulatória, demonstrada na figura 2. O glicerol é primeiro fosforilado usando ATP e o glicerol fosfato é então oxidado para triose fosfato. As microalgas possuem glicerol quinase (EC2.7.1.30), sn-glicerol-3-fosfato + NAD oxirredutase (CE 1.1.1.8) e fosfato de triose- (EC: 5.3.1.1) para converter

o glicerol em gliceraldeído-3- fosfato e glicerato , que são intermediários na via da Glicólise tipo Embden-Meuerhof-Parnas (EMP) formam piruvato que entra no ciclo do ATP (Neilson e Lewin 1974, Perez-Garcia et al. 2011). O gliceraldeído-3-fosfato pode também ser formado por redução de 3-fosfoglicerato, um intermediário chave do ciclo de Calvin-Benson. Isto tem sido demonstrado que glicerol 3- fosfato inibe a via glicolítica reversível, como seria de esperar na via da Gliconeogênese (Perez-Garcia et al. 2011).

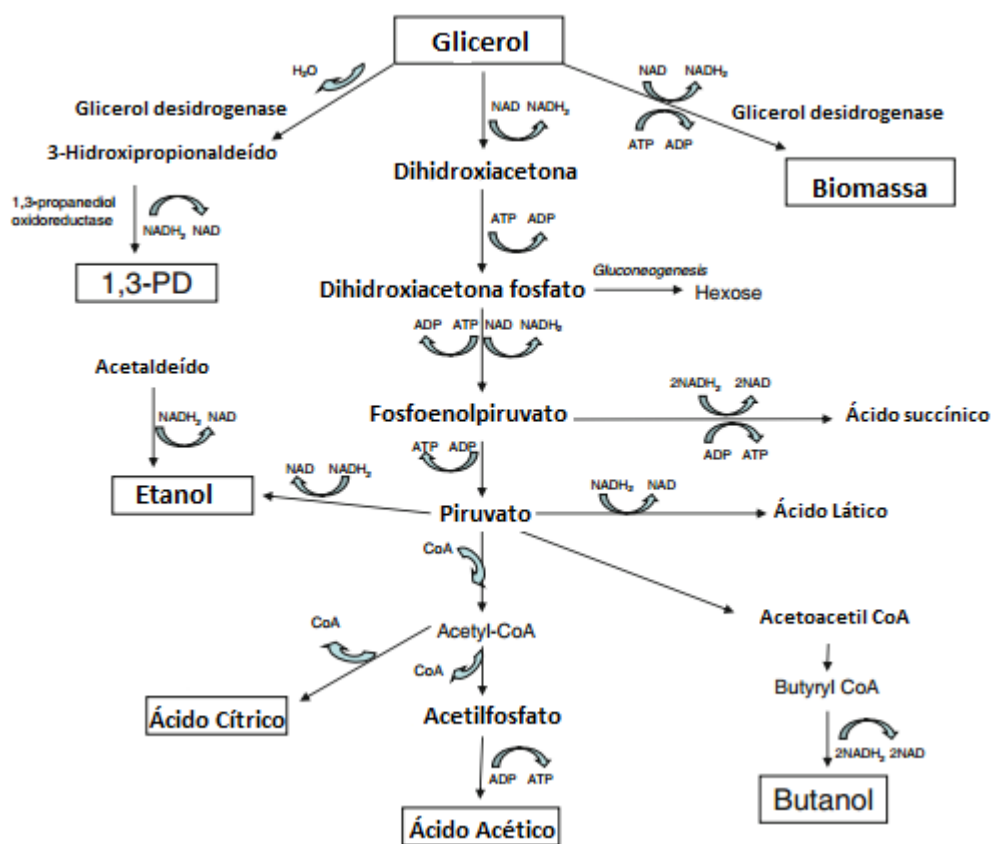


Figura 1. Metabolismo do glicerol na produção de produtos de valor agregado. (Fonte: (Dobson et al. 2012))

O glicerol pode ser fotometabolizado (fotoheterotrófico) por algumas espécies de algas, tais como *Agmenellum quadruplicatum*, *Goniotrichium elegans*, *Navicula pelliculosa*, *Nostoc* sp. Estas espécies só podem assimilar o glicerol como fonte de carbono, na presença de luz e com uma fonte externa de CO₂ (Perez-Garcia et al. 2011).

Na tabela 3 refere-se a trabalhos anteriores investigados, onde autores utilizaram glicerol como fonte de carbono para diferentes espécies de microalgas, e seus respectivos resultados encontrados em relação aos lipídios extraídos da biomassa.

Tabela 3. Experimentos suplementados com glicerol, seus respectivos teores de lipídios e ácidos graxos encontrados a partir da biomassa.

Espécie	Teor de lipídios (%)	Principais Ácidos graxos	Referência
<i>Chlorella vulgaris</i> #259	34	Não específica	(Liang et al. 2009)
<i>Thraustochytrium</i> sp. (AMCQS5-5)	33,1 - 48	C16:0, C18:0 C18:1, C20:4, C20:5, C22:5, C22:6	(Gupta et al. 2013)
<i>B.terribilis</i> Ko- maréck 1990 (IBL-C115)	9,5 – 25	C16:0, C16:1, C17:0, C18:0, C18:1, C18:2	(Cabanelas et al. 2013)
<i>Chlorella vulgaris</i> Beijerick 1890 (IBLC105)	13 – 27	C16:0, C16:1, C17:0, C18:0, C18:1, C18:2	(Cabanelas et al. 2013)
<i>Chlorococcum</i> sp.	39 – 42	C12:0, C14:0, C16:0, C16:1, C16:2, C18:0, C18:1, C18:2, C18:3	(Ummalyma e Sukumaran 2014)
<i>Scenedesmus</i> sp.	16,24 - 13,11	C14:0, C16:0, C16:1, C17:0, C18:0, C18:1, C18:2, C18:3, C20:0, C20:1, C22:0, C22:1, C24:0, C24:1	(Choi e Yu 2015)
<i>Botryococcus braunii</i>	16,41 - 9,30	C14:0, C16:0, C16:1, C17:0, C18:0, C18:1, C18:2, C18:3, C20:0, C20:1, C22:0, C22:1, C24:0, C24:1	(Choi e Yu 2015)
<i>Chlorella vulgaris</i>	15,91 - 12,20	C14:0, C16:0, C16:1, C17:0, C18:0, C18:1, C18:2, C18:3, C20:0, C20:1, C22:0, C22:1, C24:0, C24:1	(Choi e Yu 2015)
<i>Chlorella vulgaris</i> (PCH05)	20 – 62	Não específica	(Paranjape et al. 2016)
<i>Chlorella sorokiniana</i> (PCH02)	25 – 35	Não específica	(Paranjape et al. 2016)

O glicerol é o maior sub-produto acumulado na produção do biodiesel, e uma das possibilidades para sua reutilização é usá-lo como substrato, por exemplo, do produto oleaginoso da microalga *Schizochytrium limacinum* (Chi et al. 2007), podendo produzir quantidades significativas de lipídios totais quando cultivado em glicerol. Assim, o glicerol derivado do biodiesel pode ser considerado um substrato potencial para o cultivo de microalgas (Choi e Yu 2015).

4. METODOLOGIA

Os experimentos foram realizados no Centro de Excelência em Produtos e Processos Oleoquímicos e Biotecnológicos (CEPPOB) da Universidade de Santa Cruz do Sul (UNISC), campus de Santa Cruz do Sul. Foram conduzidos em triplicata, a fim de avaliar os efeitos da utilização do glicerol como fonte de carbono para suplementar as microalgas, tendo em vista seu maior rendimento em óleo, e avaliar os perfis de ácidos graxos produzidos pelas microalgas.

Os experimentos foram divididos em 2 etapas, sendo representadas no esquema da Figura 3.

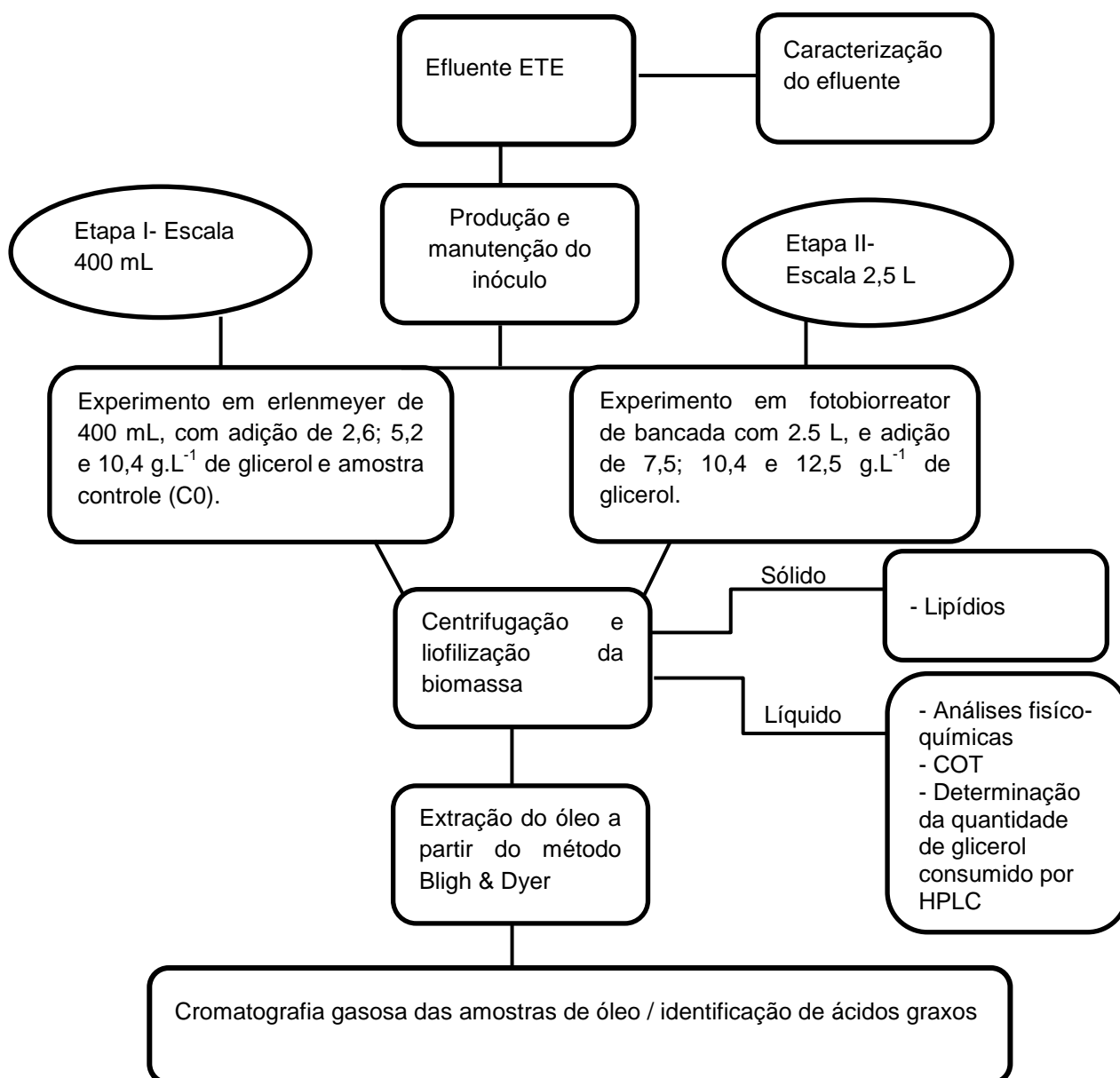


Figura 2. Fluxograma do delineamento de pesquisa

4.1 Meio de cultivo e caracterização físico-química

Como meio de cultivo para os experimentos foi utilizado o efluente da Estação de Tratamento de Efluentes (ETE/UNISC). A caracterização do efluente foi realizada na Central Analítica da Universidade de Santa Cruz do Sul, laboratório certificado pela Fundação Estadual de Proteção Ambiental Henrique Luiz Roessler – FEPAN como Laboratório de Análises Ambientais, sendo feitas análises de alcalinidade, DBO5, DQO, fósforo total, nitrogênio total Kjeldahl. Como fonte de carbono suplementar foi utilizada glicerina, com glicerol à 99,5% da marca Nuclear. Foram caracterizados os efluentes anterior ao início dos experimentos e após a conclusão dos experimentos realizados em fotobiorreator com volume de 2,5 L e concentração de 10,4 g.L⁻¹.

4.2 Produção e manutenção do inóculo

Como as microalgas foram removidas do seu ambiente natural (efluente) e submetidas a condições de estresse metabólico foi necessária sua aclimação às condições laboratoriais. Para tanto, os experimentos foram divididos em duas etapas e delimitados em 10 dias.

A produção do inóculo foi realizada com 2,5 L do efluente proveniente do UASB localizado na Estação de Tratamento de Efluente (ETE/UNISC). A cultura foi mantida em fotobiorreatores de bancada conforme figura 4. A viabilidade do inóculo foi acompanhada periodicamente por contagem de células em câmara de Neubauer em microscópio óptico. A manutenção foi feita a cada 3 dias, retirando-se 2/3 do cultivo e completando com efluente. Quando alcançada a densidade celular equivalente a 4,75 x 10⁵ cel mL⁻¹ de inóculo, os experimentos foram iniciados.



Figura 3. Fotobiorreator utilizado no cultivo de microalgas.

A Densidade Celular Máxima (DCM) de microalgas foi determinada por meio da média das medidas de absorvância diária em triplicata de cada alíquota de cultivo coletada em 682 nm usando um espectrofotômetro da marca Spectrum, modelo SP 2000 (Tamburic et al. 2011).

A padronização do emprego de absorvância para determinar a DCM foi realizada a partir de leituras em câmara de Neubauer (Figura 5).

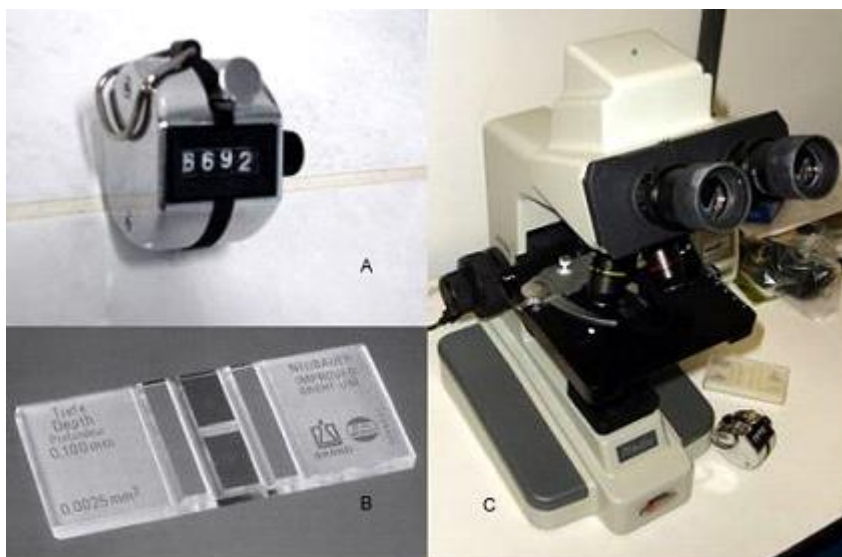


Figura 4. Instrumentos utilizados para as contagens: Contador manual (A); Câmara de Neubauer (B); Microscópio óptico (C).

4.2.1 Microalga predominante

A identificação da microalga predominante foi realizada no laboratório de Limnologia da Universidade de Santa Cruz do Sul, através de microscopia óptica em aumento de 1.000x, utilizando os inóculos provenientes da ETE- UNISC.

4.3 Cultivos com suplementação de glicerol: escala de 400 mL

Para os três experimentos realizados foram utilizados frascos de *erlenmeyer* de 500 mL. Todos os testes foram feitos em triplicata para cada concentração testada. As amostras controle (sem adição de glicerol) foram testadas paralelamente aos experimentos (figura 6).

As condições foram controladas com uma temperatura de 25°C, iluminação artificial constante e aeração através de bombas diafragmáticas durante todo período do experimento.

A densidade celular foi acompanhada diariamente através de leituras no espectrofotômetro (682 nm). As medições foram interrompidas ao se observar o decréscimo da densidade celular. A evaporação foi suprida pela adição de água deionizada.

Primeiramente foi realizado um experimento sem a suplementação do glicerol para avaliação isolada do crescimento microalgal com inóculo e efluente líquido, encerrado no 10º dia.

Para avaliar o comportamento da microalga usando glicerol como suplemento de carbono, foi montado um sistema com variação de fontes nutritivas para o cultivo. Com base nos resultados encontrados por Cabanelas et al. (2013), após 48 h de cultivo iniciais, foram adicionadas ao sistema concentrações de 2,6; 5,2 e 10,4 g L⁻¹ de glicerol, o cultivo foi mantido por 240 horas.

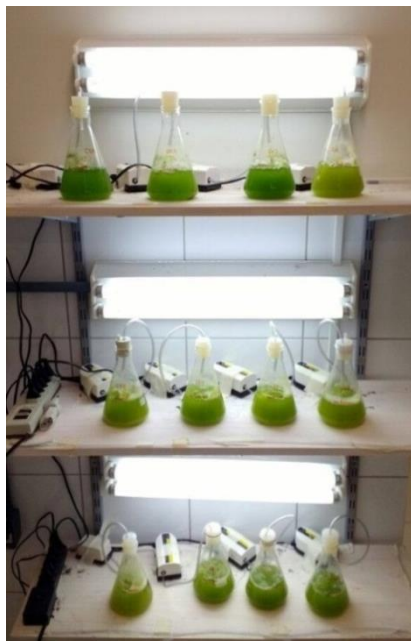


Figura 5. Experimento realizado com diferentes concentrações de glicerol.

4.4 Cultivo com suplementação de glicerol: Fotobiorreator 2,5 L

O experimento realizado na etapa II foi feito em fotobiorreatores de 2,5 L, representado na figura 7. Todos os testes em triplicata assim como foi testado paralelamente a amostra controle (C0) sem adição de glicerol. As condições foram as mesmas da etapa I, única diferença foi a concentração de glicerol que consistiu na adição de 7,5; 10,4 e 12,5 g L⁻¹.



Figura 6. Experimento realizado em fotobiorreatores de 2,5 L com diferentes concentrações de glicerol.

4.5 Processamento das amostras

Finalizado o período de cultivo, cada amostra foi centrifugada individualmente em uma centrífuga de bancada por 15 min a 2500 rpm, e retirada também uma alíquota do sobrenadante, para posterior análise cromatográfica. A biomassa retirada foi acondicionada em tubos do tipo Falcon e armazenada no freezer a -20°C. Após 24 horas a biomassa foi liofilizada em torno de 72 horas, em liofilizador de marca Liotop, modelo K120.

4.6 Quantificação de glicerol por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

Para quantificar o teor de glicerol consumido pelas microalgas no experimento, foi retirada da centrifugação após término dos experimentos amostras do sobrenadante e diluídas 1:10 para análise em HPLC (Sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) de modelo SHIMADZU 6 MODULOS: DGU-20A N/S L20244606893; LC-20AT N/S L20114708996; SIL-20A N/S L20164604613; SPD-M20A N/S L20154704885; CTO-20A N/S L20204605053; CBM-20A N/S L20234609055, onde foi utilizada água Milli-Q de fase móvel, com fluxo de 0,6 mL/ min, detector RID, 25 minutos, temperatura 85°C e coluna Rezex RHM – Monosaccharide H+(300x7.8mm) Phenomenex.

4.7 Extração de lipídios da biomassa

A quantidade de lipídios foi determinada através de uma adaptação do método de extração descrito por Bligh & Dyer (1959). Os lipídios foram extraídos com clorofórmio e metanol (2:1, V/V), ultrassonicados em banho de gelo por 45 min. e armazenados em freezer a -20°C por 4 horas.

Após 4 horas, foi ultrassonicado em banho de gelo por mais 30 minutos e centrifugados a 2500rpm durante 15 min. A fase lipídica foi removida para outro tubo. A biomassa restante sofreu nova lavagem para remoção de lipídios

eventualmente retidos na biomassa. Adicionou-se clorofórmio – metanol (2:1) a essa biomassa. O sobrenadante foi recuperado e juntado à fase lipídica.

Foi adicionado à fase lipídica 4 mL de água e 2 mL de clorofórmio e centrifugado por 15 min. Após isso, a fase inferior foi transferida para frasco pré-pesado, e seco em estufa à 40°C para a evaporação do solvente.

O teor de lipídios foi calculado com a seguinte fórmula:

$$L_B = \text{Lipídios totais (\%)} \quad (2)$$

$$L_B = \frac{(F_2 - F_1) \times 100\%}{P_{\text{amostra}}}$$

F1= peso frasco vazio (mg)

F2= peso final do frasco (mg)

P amostra= quantidade de amostra (mg)

$$L_C = \frac{L_B \times B_L}{100\%}$$

$$L_C = \text{Lipídios totais (mg L}^{-1}\text{)} \quad (3)$$

B_L = Biomassa seca por

4.8 Determinação de ácidos graxos da biomassa

Para realizar as análises no CG/MS de ácidos graxos presentes nos lipídios extraídos, fez-se necessário efetuar a derivatização das amostras.

O procedimento foi efetuado da seguinte maneira: em balões de fundo redondo, foram colocados 0,100 g do conteúdo previamente extraído anteriormente e adicionado 6 mL de solução metanólica preparada com 1 g de NaOH em 50 mL de metanol, prosseguida de refluxo com aquecimento durante 20 min. Posteriormente, foram adicionados 7 mL de BF₃ através do condensador por gotejamento. Ficou em refluxo por mais 4 min. e então foi adicionado 5 mL de heptano via condensador, com consecutivo refluxo por mais 2 min. e após retira-se os balões para serem resfriados a temperatura ambiente.

Após resfriados, foi adicionado aos balões 2 mL de solução saturada de NaCl, seguidos de leve agitação para visualização de duas fases, onde a fase superior foi recuperada em tubo de ensaio. Nesta fase foi acrescentado cerca de 0,5 g de Na₂SO₄ anidro previamente seco em estufa à 100°C.

Os extratos obtidos foram submetidos à análise por cromatografia gasosa em cromatógrafo Shimadzu GC 2010 MS-QP 2010 Plus detector Massas. A coluna utilizada para as análises foi a DB5-MS 30m sendo utilizado o gás Hélio para arraste, com vazão constante de 1,0 mL min⁻¹. A programação de temperatura do forno foi 80°C, 5 °C/min, até 270 °C por 10 min, totalizando 48 minutos de análise. Temperatura do detector 300 °C, temperatura do injetor 250 °C, operado no modo “split” (Split ratio 10) e volume de injeção de 1 µL.

4.9 Determinação do carbono orgânico total – COT

As amostras líquidas, provenientes da centrifugação da biomassa passaram por análises de COT, onde foram previamente filtradas e diluídas, e então analisadas no equipamento de marca Shimadzu, H544353. O método de oxidação catalítica por combustão atinge uma combustão total das amostras pelo aquecimento das mesmas a 680 °C em um meio rico em oxigênio dentro de um tubo de combustão preenchido com um catalizador de platina. Uma vez que esta utiliza o simples princípio da oxidação por meio do aquecimento e de combustão. O dióxido de carbono gerado pela oxidação é detectado usando um detector de gás infravermelho (*Non Dispersive Infrared Sensor- NDIR sensor*). O dióxido de carbono gerado é resfriado e desumidificado, e então detectado pela NDIR. A concentração de CT (carbono total) na amostra é obtida através da comparação com uma curva de calibração. Submetendo a amostra oxidada ao processo de aspersão, oxida-se o CI (carbono inorgânico), em dióxido de carbono, obtendo-se a concentração de CI por meio da detecção deste com o NDIR. A concentração COT é então calculada subtraindo a concentração de IC da concentração de CT obtido.

4.10 Análise estatística dos dados

Todos os experimentos foram realizados em triplicata (n=3) com seus valores expressos como média \pm desvio – padrão.

Como estatística não-paramétrica foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis para comparar os resultados de rendimento de biomassa e teor de lipídios nos diferentes teores de glicerol, tanto na etapa I como na etapa II. O nível de significância dos testes foi de 5% ($p < 0,05$), e o *software* utilizado foi o Past 2011.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização do meio de cultivo

5.1.1 Análises físico-químicas do efluente

A carga orgânica do efluente empregado nos experimentos pode passar por variações conforme a época do ano (fatores climáticos e número de pessoas que frequentam a Universidade, por exemplo).

Os resultados dos parâmetros analisados das amostras provenientes da ETE (efluente anterior aos experimentos) são expressos na tabela 4.

Tabela 4. Parâmetros analíticos do efluente da ETE.

Parâmetros	Efluente ETE
Alcalinidade Total $\text{mg L}^{-1} \text{CaCO}_3$	514,6
Alcalinidade Carbonatos $\text{mg L}^{-1} \text{CaCO}_3$	0,0
Alcalinidade Hidróxidos $\text{mg L}^{-1} \text{CaCO}_3$	0,0
Alcalinidade Bicarbonatos $\text{mg L}^{-1} \text{CaCO}_3$	514,6
DBO ₅ $\text{mg L}^{-1} (\text{O}_2)$	8,0
DQO mg L^{-1}	23,35
Fósforo Total mg L^{-1}	5,19
Nitrogênio Total Kjeldahl mg L^{-1}	64,9

5.1.2 Identificação da espécie predominante de microalga

A classificação foi feita especialmente pela distinção estrutural celular básica, pigmentação e ciclo de vida (Khan et al. 2009, Brennan e Owende 2010).

As amostras analisadas apresentaram conformidade para a microalga *Chlorella* sp., demonstrada na figura 8.

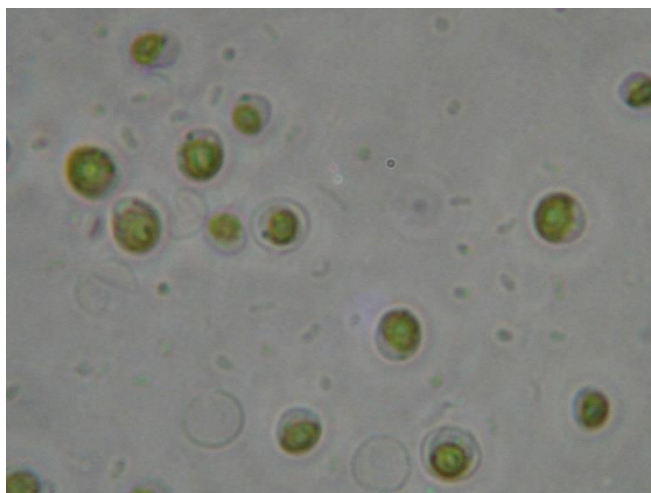


Figura 7. Fotomicrografia de *Chlorella* sp. identificada em inóculo de cultivo em fotobiorreator de escala piloto ampliada em 1.000 vezes.

A espécie *Chlorella* é uma alga verde, suas células são isoladas, muito pequenas medindo de 2,0–10,0 μm de diâmetro, tendo forma esférica, globular ou elipsoidal. Desenvolvem-se em águas doces e marinhas, alguns dizem que a espécie é universal por desenvolver em diferentes habitats, encontram-se geralmente na água das lagoas e das valas, no solo úmido, na superfície dos troncos de árvore. A *Chlorella parasitica*, por exemplo é encontrada simbioticamente nas células de *Paramecium* e *Hydra*. *Chlorella vulgaris*, *Chlorella conductrix*, *Chlorella gonglomerata* e *C. parasitica* são as espécies indianas comuns. (Chapman e Chapman 1973, Kay e Barton 1991, Phukan et al. 2011).

5.1.3 Comportamento de crescimento do Inóculo

A avaliação do comportamento do cultivo microalgal deve ser feita para posterior avaliação do desempenho, e um dos métodos utilizados para fazer esta verificação é a partir do acompanhamento diário de medidas de densidade, onde as quatro fases são observadas: indução, crescimento, estacionária e declínio.

A figura 9 mostra o comportamento da microalga no período de 240 horas, onde se pode observar que houve crescimento exponencial até às 144 horas iniciais do experimento. A partir deste tempo a curva de crescimento entrou em fase estacionária. Portanto optou-se por realizar os experimentos com glicerol até 240 horas do desenvolvimento das microalgas.

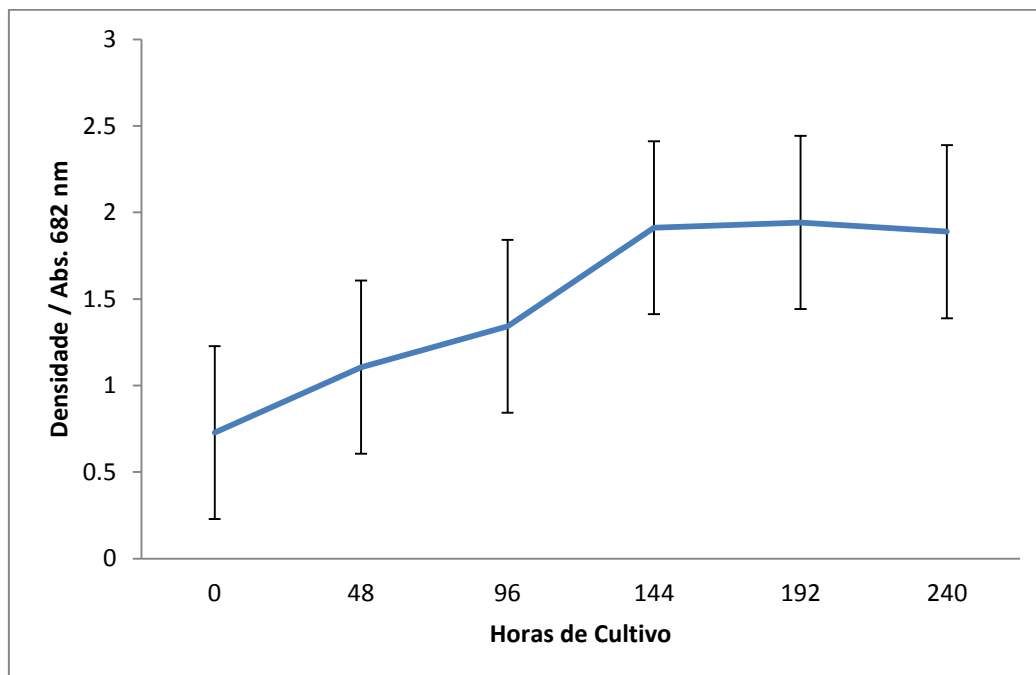


Figura 8. Comportamento das microalgas do efluente sem adição de glicerol.

Na fase de crescimento, também conhecida como exponencial ou fase log, a biomassa aumenta gradativamente pela multiplicação das células das microalgas. A fase estacionária, é a fase em que a taxa de crescimento é constante, onde ocorre equilíbrio entre crescimento e mortalidade celular; e por fim a fase de morte, onde ocorre o aumento de células mortas que liberam substâncias inibidoras de crescimento (Maigua e Lourdes 2015).

5.2 Comportamento microalgal

O comportamento do crescimento microalgal nas concentrações de 2,6; 5,2 e 10,4 g.L⁻¹ de glicerol, especificados como G2, G5 e G10, pode ser observado na figura 10.

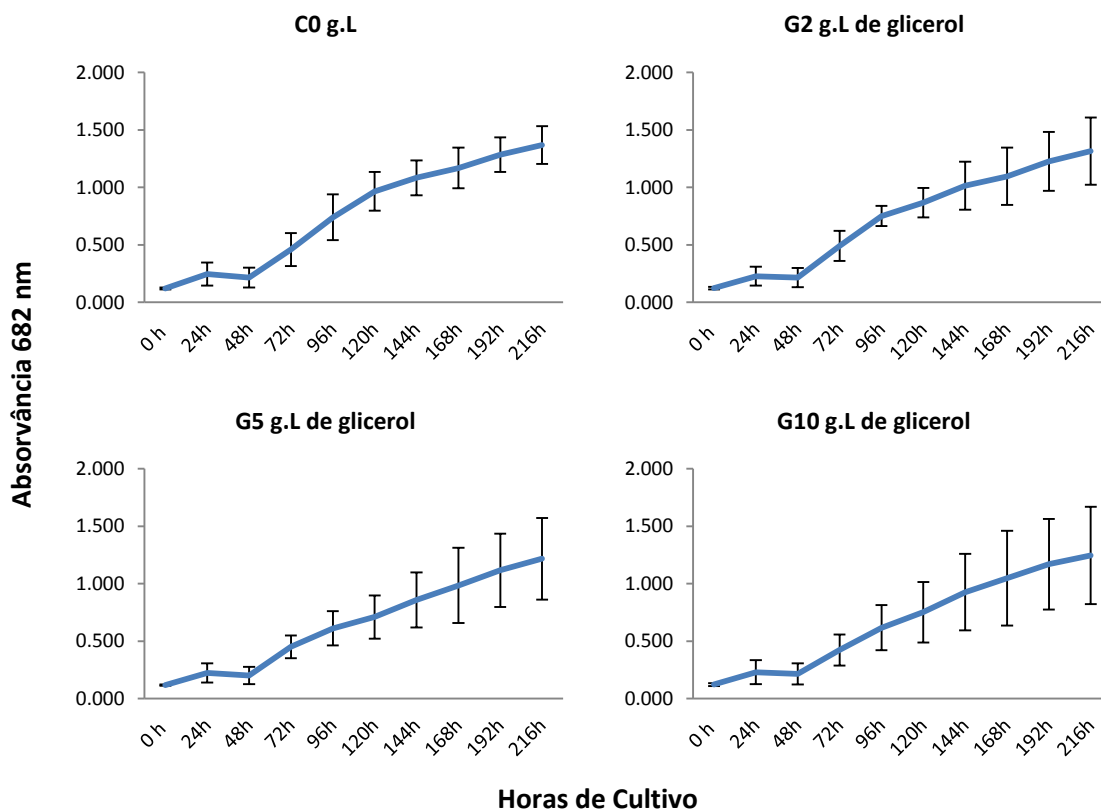


Figura 9. Comportamento de crescimento das microalgas em efluente doméstico suplementado com diferentes concentrações de glicerol (g.L^{-1}). Os dados são expostos como média \pm desvio-padrão, $n=3$.

Observa-se uma influência positiva nas concentrações de 2,6 e $10,4 \text{ g.L}^{-1}$ de glicerol, embora estatisticamente não foi observado a influência das diferentes concentrações de glicerol no aumento da densidade microalgal.

A partir da adição do glicerol, ocorrido nas 48 h após o início do experimento, pode-se observar que o cultivo entra diretamente na fase exponencial seguindo a tendência do controle. Estes dados corroboram com Gupta et al. (2013), que realizaram experimento em pequena escala utilizando glicerol e glicose como fontes de carbono, por 168 horas e observaram que nas 48 h iniciais a microalga com suplementação de glicerol atingiu a fase exponencial de crescimento, enquanto no meio suplementado com a glicose o crescimento foi mais lento.

O cultivo com a suplementação de glicerol em pequena escala mostrou-se eficiente, uma vez que não influenciou negativamente o crescimento

microalgal, mesmo que não tenha apresentado diferença significativa em relação ao controle.

Na etapa II, representada pela figura 11, pode-se observar claramente a diferença entre a amostra controle (C0) comparada com as amostras suplementadas com 7,5; 10,4 e 12,5 g.L⁻¹ de glicerol, nomeados de G7, G10 e G12.

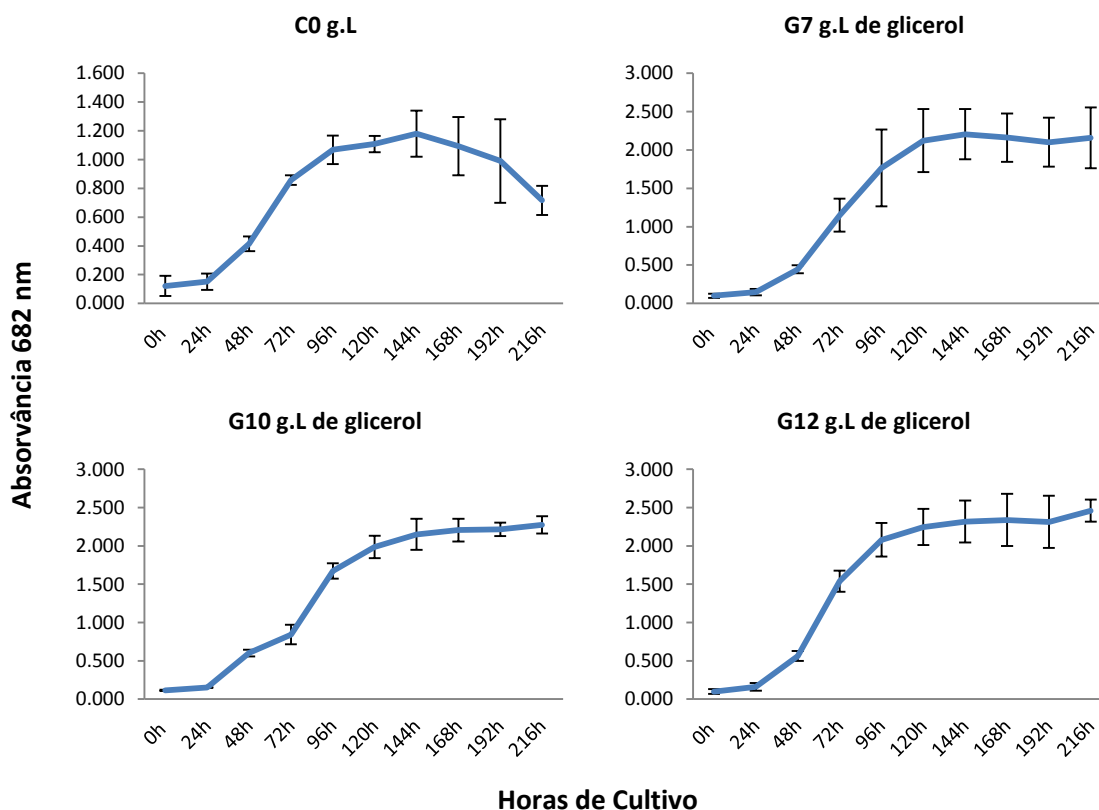


Figura 10. Comportamento de crescimento das microalgas em efluente doméstico suplementado com diferentes concentrações de glicerol (g.L⁻¹). Os dados são expostos como média ± desvio-padrão, n=3.

Nota-se que a amostra controle sem adição de glicerol (C0), teve comportamento oposto às amostras com adição de glicerol, não obtendo um desenvolvimento crescente como as amostras com 7,5; 10,4 e 12,5 g.L⁻¹ de glicerol. A amostra com maior destaque foi a de 12,5 g.L⁻¹ de glicerol, seguida das concentrações de 10,4 e 7,5 g.L⁻¹.

Leite et al. (2015) realizaram um experimento com diferentes cepas de microalgas, entre elas (LB1H09, LB1H10, LB1H12, MA2H01, PCH03, PCH05,

PCH06, PCH36, PCH44 e PCH90) e relataram que elas são capazes de ter metabolismos de crescimento mixotrófico e heterotrófico com suplementação de xilose, onde encontraram um aumento na taxa de crescimento (μ) de 2,8 vezes em relação ao crescimento fotoautotrófico, chegando a $\mu = 1,1/d$. Com a suplementação de glicerol, os autores relataram um aumento maior do que o suplementado com xilose, as taxas de crescimento atingiram um valor elevado de $\mu = 1,52/d$.

Liang et al. (2009) realizaram experimento com diferentes concentrações de glicerol, sendo 1,2 e 5%, onde observaram maior crescimento com 1% de glicerol.

Comparando-se as duas etapas I e II, os melhores resultados foram obtidos com os experimentos da etapa II, sendo possível observar a eficiência de crescimento com o glicerol como fonte de carbono suplementar.

5.3 Rendimento de biomassa

Os rendimentos obtidos na etapa I, com suplementações de 2,6; 5,2 e 10,4 g/L de glicerol, juntamente com C0 (amostra controle) estão representadas na figura 12:

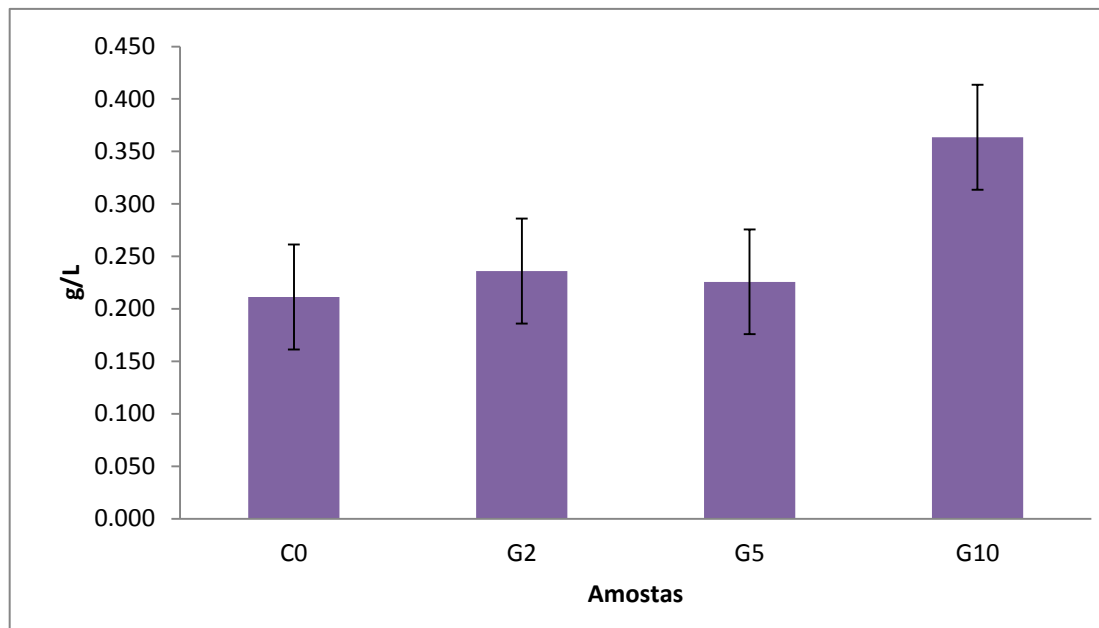


Figura 11. Rendimentos de biomassas secas da etapa I, suplementadas com diferentes concentrações de glicerol (g.L⁻¹). Os valores representam a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes.

A amostra que obteve maior concentração de biomassa foi a com suplementação de 10,4 g.L⁻¹ de glicerol, seguida de 2,6 e 5,2 g.L⁻¹ e por fim a amostra controle (C0).

Comparando as amostras ao controle (C0), pode-se afirmar que o glicerol não exerce efeito inibitório no crescimento das microalgas, logo, mostra-se viável como suplemento nutricional, uma vez que favoreceu o crescimento microalgal, e conseqüentemente o maior acúmulo de biomassa.

O teor médio da maior concentração de biomassa foi de 0,364 g.L⁻¹ \pm 0,082 na amostra 10,4 g.L⁻¹, seguida da 2,6 g.L⁻¹ com média de 0,236 g.L⁻¹ \pm 0,054 e de 5,2 g.L⁻¹ com 0,226 g.L⁻¹ \pm 0,066. A amostra sem glicerol (C0) apresentou média de 0,211 g.L⁻¹ \pm 0,015, mesmo observando uma influencia positiva do glicerol no rendimento não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre as variáveis. Os dados obtidos neste trabalho na etapa I, diferem dos encontrados por Choi e Yu (2015), que realizaram experimento com a microalga *C. vulgaris*, *Scenedesmus* sp. e *B. Braunii*, suplementando-as com glicerol bruto nas concentrações de 2; 5 e 10 g.L⁻¹ encontrando

respectivamente 1,61; 1,91 e 1,72 g.L⁻¹ de biomassa, afirmando que a concentração de glicerol influencia a concentração de biomassa e a taxa de crescimento de *C. vulgaris*. As maiores concentrações de biomassa foram obtidas em condições mixotróficas na presença de 5 g.L⁻¹ de glicerol para *C. vulgaris*, *Scenedesmus* sp. e *B. braunii* sendo, respectivamente, 39,42%, 60% e 57,82% maiores do que os correspondentes em condições autotróficas. Cabe ressaltar que os autores acima citados, exploraram 3 microalgas distintas, diferindo do presente estudo que utilizou efluente como meio de cultivo o qual apresenta organismos variados.

Liang et al. (2009) que realizaram experimento com diferentes concentrações de glicose e glicerol sendo, 1; 2; 5 e 10%, encontraram maior produtividade de biomassa para ambas as fontes de carbono com a concentração de 1%, com valores para glicose de 254 ± 3 mg.L⁻¹ e para glicerol de 102 ± 0 mg.L⁻¹ respectivamente.

Na etapa II as suplementações de 7,5; 10,4 e 12,5 g.L⁻¹ de glicerol são apresentadas na figura 13.

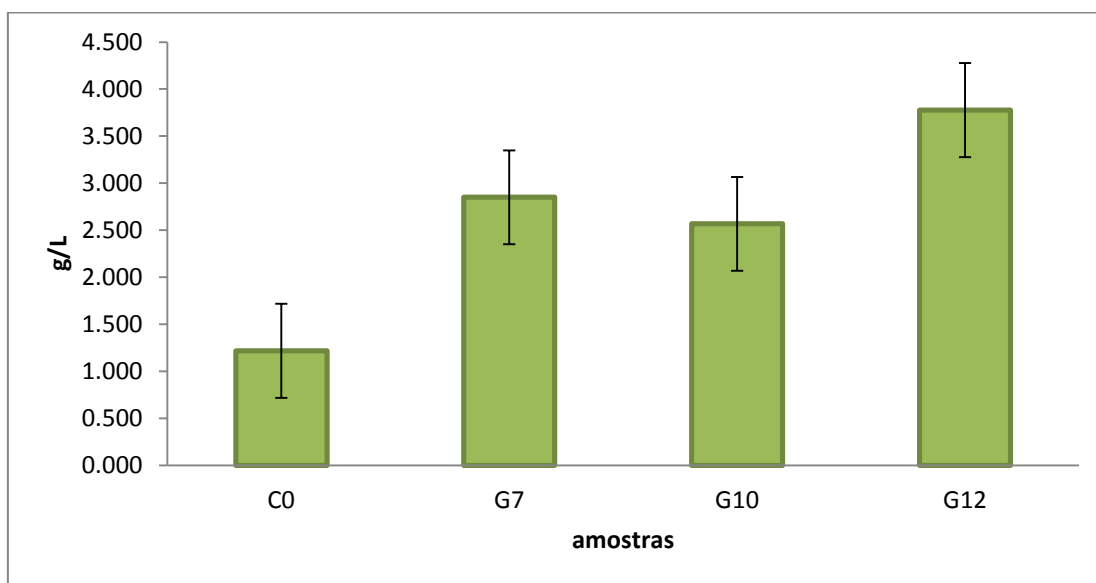


Figura 12. Rendimentos de biomassas secas da etapa II, suplementadas com diferentes concentrações de glicerol (g.L⁻¹). Os valores representam a média ± desvio padrão de três experimentos independentes.

Observa-se que o maior rendimento foi obtido no experimento suplementado com 12,5 g.L⁻¹ de glicerol, com um rendimento médio de 3,78

$\text{g.L}^{-1} \pm 1.11$ seguido das suplementações de $7,5 \text{ g.L}^{-1}$ com $2.84 \text{ g.L}^{-1} \pm 0.672$, de $10,4 \text{ g.L}^{-1}$ de glicerol tendo $2.56 \text{ g.L}^{-1} \pm 0.326$ e o C0, com rendimento de $1.20 \text{ g.L}^{-1} \pm 0.216$ de biomassa. Embora não foi observada diferença estatística ($p > 0,05$) entre as amostras, é claramente observada a influência positiva da suplementação do glicerol no cultivo.

Foi testada a adição de diferentes concentrações de glicerol por Cerón-García et al. (2013) em cultivo de *Phaeodactylum tricornutum*. A maior concentração de biomassa foi atingida com a suplementação de $11,45 \text{ g.L}^{-1}$ de glicerol, com a obtenção de $12,08 \text{ g.L}^{-1}$ de biomassa. Segundo os autores, a adição de nutrientes juntamente com um aumento gradual de intensidade de luz tem sido considerada a melhor estratégia para a cultura mixotrófica da microalga testada quando suplementada com glicerol.

Os autores Ma et al. (2016) realizaram o experimento utilizando a microalga *C. vulgaris* com três tipos diferentes de tratamentos de glicerol, sendo: glicerol bruto, glicerol pré-tratado e glicerol puro, nas concentrações de 1; 5 e 10 g.L^{-1} . Os autores ressaltam que a concentração ótima de glicerol bruto foi de 5 g.L^{-1} com a concentração máxima de biomassa de $1,82 \text{ g.L}^{-1}$. Já com o glicerol pré-tratado a concentração que obteve maior rendimento de biomassa foi com 10 g.L^{-1} .

Comparando as etapas I e II em relação à produção da biomassa, de maneira geral pode-se observar um comportamento similar na medida em que as concentrações de glicerol foram aumentadas.

Embora não tenha ficado clara a influência direta do glicerol sobre o rendimento de biomassa em ambas as etapas, na prática pode-se inferir que cultivos de maior volume representam uma maior produção de biomassa, viabilizando a caracterização da biomassa nas análises subsequentes.

5.4 Rendimento de lipídios na biomassa

Na figura 14, são apresentados os teores de óleo extraídos com as diferentes suplementações de glicerol referentes à etapa I.

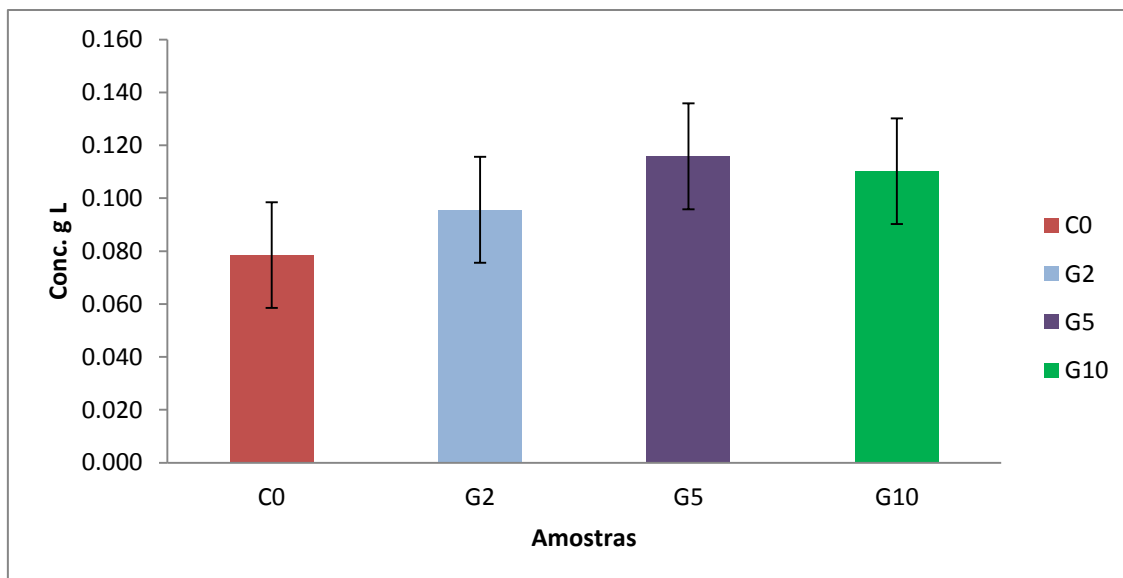


Figura 13. Teores de lipídios extraídos da biomassa microalgal em crescimento contendo diferentes concentrações de glicerol (C0, G2, G5 e G10 g.L⁻¹).

Os rendimentos lipídicos foram de 0,078 g.L⁻¹ ± 0.038; 0,096 g.L⁻¹ ± 0.032; 0.116 g.L⁻¹ ± 0.030 e 0,12 g.L⁻¹ ± 0.031 para as suplementações de glicerol a 0, 2,6; 5,2 e 10,4 g.L⁻¹ respectivamente. Pode-se observar que nas concentrações de 5,2 e 10,4 g.L⁻¹ de glicerol, foram encontradas as maiores quantidades de lipídios, mesmo não havendo diferença significativa ($p > 0,05$) entre as amostras.

Os autores Liang et al. (2010) observaram um aumento lipídico com concentrações crescentes de glicerol, em estudo realizado com *Schizochytrium limacinum* SR21. O teor de lipídios aumentou de 22% com 1 g.L⁻¹ de glicerol e 32% com 2 g.L⁻¹ de glicerol. Entretanto, em seu estudo, a maior quantidade (10 g.L⁻¹) de glicerol apresentou efeito negativo sobre o crescimento e conteúdo de triacilgliceróis.

O maior rendimento de lipídios na etapa II foi do experimento com concentração 12,5 g.L⁻¹ de glicerol, como pode ser observado na Figura 15.

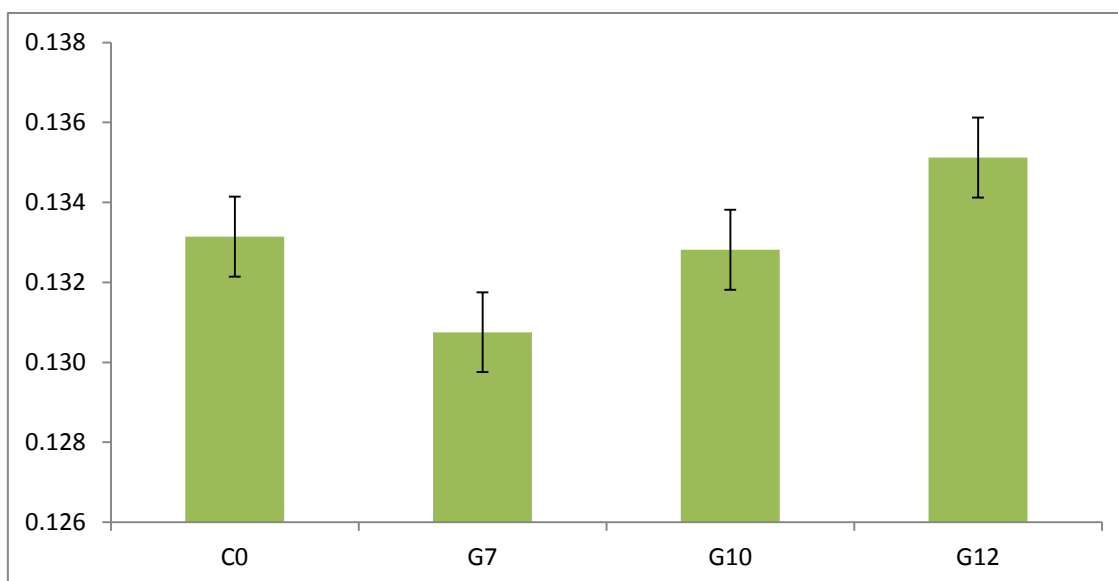


Figura 14. Teores de lipídios extraídos da biomassa microalgal em crescimento contendo diferentes concentrações de glicerol (C0, G7, G10 e G12 g.L).

O maior rendimento obtido foi o com a suplementação de 12,5 g.L⁻¹, apresentando uma média de 0,135 g.L⁻¹ ± 0,08. As concentrações de 7,5; 10,4 e 0 g.L⁻¹ apresentaram rendimentos de 0,133 g.L⁻¹ ± 0.007, 0.131 g.L⁻¹ ± 0.013 e 0,133 g.L⁻¹ ± 0.016, respectivamente. Embora não foi comprovada diferença estatística ($p > 0,05$) entre as variáveis.

No estudo de Sengmee et al. (2016), foi testada a microalga *Chlorella* sp com suplementação de glicerol bruto para produção de oxigênio e aumento lipídico na biomassa. Concentrações de 4, 8, 12, 16 e 20 g.L⁻¹ de glicerol foram testadas a fim de avaliar a melhor condição. Segundo o autor, a condição ótima para a produção de hidrogênio e lipídios por esta microalga foi na concentração de 16 g.L de glicerol, apresentando um teor de 4,08 g.L⁻¹ de óleo obtido, correspondendo ao maior teor de lipídios de (43,2 ± 7,6%) quando comparado às demais concentrações testadas.

De maneira geral, as diferentes concentrações de glicerol estudadas nas etapas I e II não influenciaram significativamente o rendimento de lipídios na biomassa. Considerando os estudos descritos acima pode-se prever uma influência positiva de concentrações maiores de glicerol do que as empregadas neste estudo. Ainda, é importante ressaltar que poucas pesquisas avaliam as condições de cultivo utilizando o efluente como meio de cultura.

5.5 Consumo de glicerol no cultivo das microalgas

Constatou-se que o glicerol foi consumido pela microalga como fonte de carbono. Na tabela 5 encontram-se os resultados obtidos.

Tabela 5. Quantidade de glicerol (g.L⁻¹) consumidas durante o experimento.

Amostra 400 mL	g.L ⁻¹	Amostra 2,5 L	g.L ⁻¹
2,6 g.L de glicerol	1	7,5 g.L de glicerol	3,84
5,2 g.L de glicerol	0,42	10,4 g.L de glicerol	6,05
10,4 g.L de glicerol	3,35	12,5 g.L de glicerol	5,05

Na etapa I (escala de 400 mL) a amostra que teve maior consumo de glicerol foi a de suplementação com 2,6 g.L⁻¹ de glicerol (38%), seguida das amostras com a suplementação de 10,4 e 5,2 g.L⁻¹ de glicerol com 32% e 8% de assimilação, respectivamente. Na etapa II (escala de 2,5 L) a suplementação de 10,4 g.L⁻¹ foi a que teve maior consumo apresentando 58%, seguido de 7,5 e 12,5 g.L de glicerol com 40% e 51%, respectivamente.

Em estudo recente, Paranjape et al. (2016), utilizaram as microalgas *Chlorella sorokiniana* (PCH02) e *Chlorella vulgaris* (PCH05) com suplementação de 2.30 g.L⁻¹ de glicerol e relatam que o glicerol foi consumido por ambas as espécies, sendo que a PCH02 consumiu 51% e a PCH02 47% do glicerol inicial, resultados similares ao que foi obtido nos experimentos da etapa I do presente trabalho.

Para ambas etapas analisadas neste trabalho, os resultados obtidos foram superiores aos encontrados por Sengmee et al. (2016), que utilizando glicerol bruto como fonte de carbono, em cultivo com a microalga *Chlorella* sp., com suplementações de 4, 8, 12, 16 e 20 g.L⁻¹, os resultados mostraram que o consumo de glicerol nos experimentos variou entre 10 e 20%.

5.6 Caracterização de ácidos graxos presentes na fração lipídica da biomassa

No geral das etapas I e II, a análise de cromatografia a partir do óleo de microalgas mostrou que o teor de ácidos graxos foi elevado, para o cultivo com adição de glicerol. O principal ácido graxo produzido foi o ácido linoleico com (37,31%), seguido do ácido palmítico (34,62%), ácido oleico (12,40%) e ácido esteárico (9,75%). Já no cultivo sem glicerol, os ácidos graxos com maiores teores encontrados foram o ácido palmítico (39,4%), ácido linolênico (28,36%), ácido linoleico (24,34%), entre outros representados na tabela 6.

Tabela 6. Proporção relativa (%) dos principais ácidos graxos encontrados nos experimentos com e sem glicerol.

Ácido Graxo	Tempo de retenção (min.)	Área relativa (%) sem glicerol	Área relativa (%) com glicerol
C14:0	20,6	1,23	2,37
C16:0	24,8	39,4	34,62
C16:1	24,3	2,5	3,76
C17:0	26,6	0,89	0,70
C18:0	28,5	4,10	9,75
C18:1	28,2	13,20	12,40
C18:2	27,9	24,34	37,31
C20:0	31,9	0,65	1,63

O perfil cromatográfico para a etapa I (figura 16) mostra que em todos os experimentos, para as diferentes concentrações de glicerol testadas, obteve-se o mesmo perfil cromatográfico, com destaque para os picos de C14:0, C16:0, C16:1, C17:0, C18:0, C18:1, C18:2 e C20:0, com tempos de retenção apresentados na tabela 6.

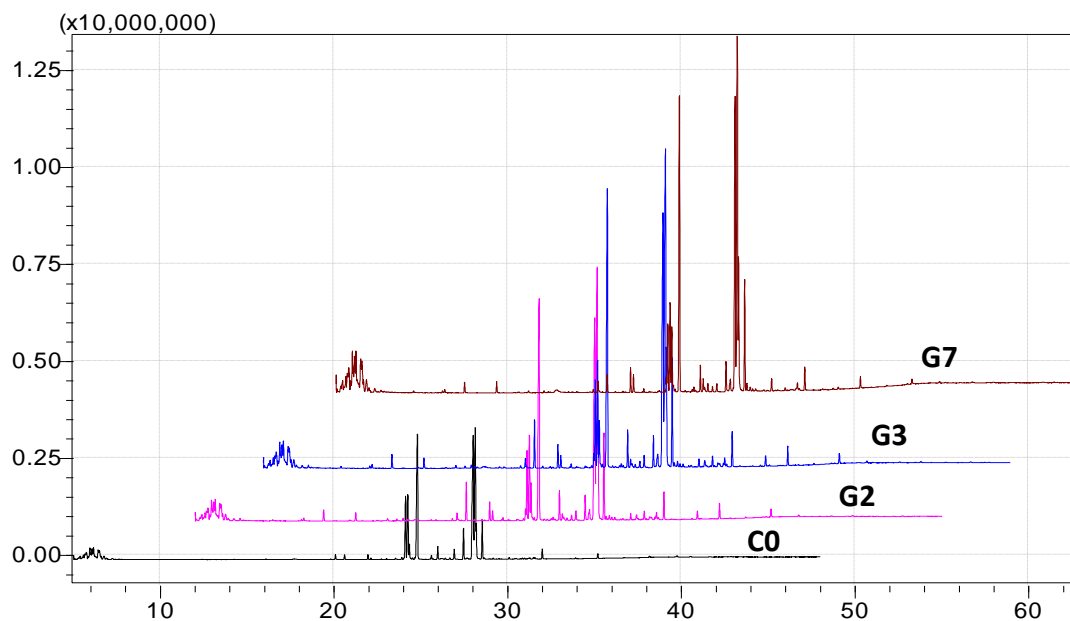


Figura 15. Perfil cromatográfico da escala de 400 mL – Etapa I

Para os experimentos da etapa II, os ácidos graxos em destaque foram os mesmos obtidos na etapa I, sendo, C14:0, C16:0, C16:1, C17:0, C18:0, C18:1, C18:2 e C20:0 (figura 17).

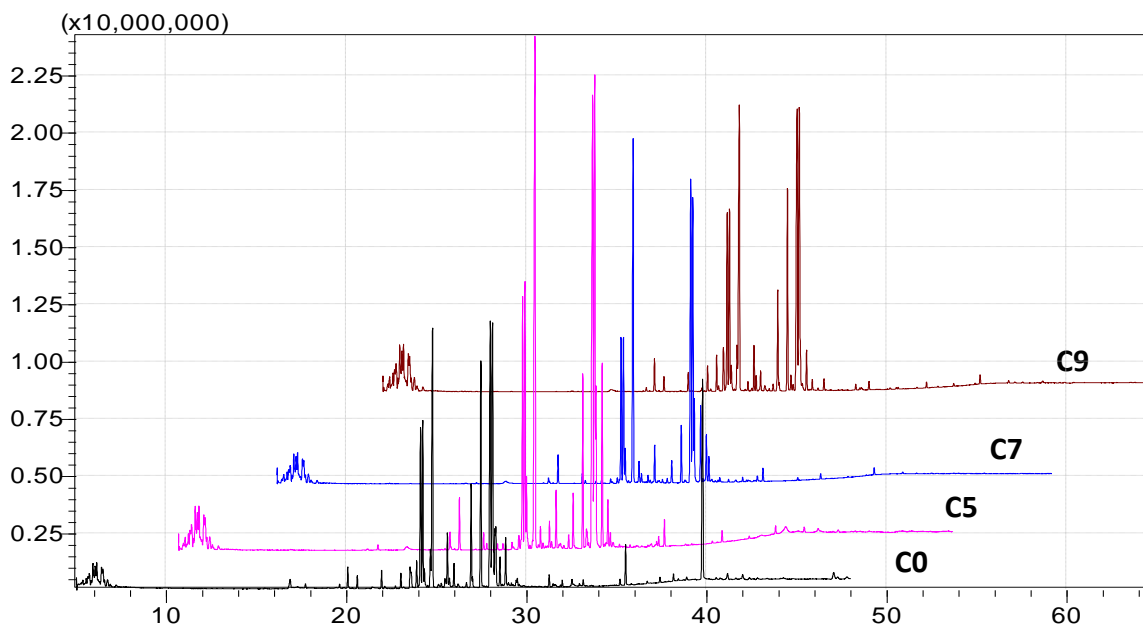


Figura 16. Perfil cromatográfico do experimento de escala 2,5L – Etapa II.

Gupta et al. (2016) em recente estudo reportam que os ácidos graxos, ácido palmítico (C16:0) e ácido oleico (C18:1) melhoram a qualidade e o desempenho do biodiesel. O teor elevado de ácido oleico (C18:1) foi citado como essencial para garantir a alta qualidade do biodiesel. O ácido oleico é considerado por conferir maior qualidade aos combustíveis tais como estabilidade, fluxo a frio, viscosidade e ignição (Knothe 2008).

Frações de ácido mirístico (C14:0), ácido palmítico (C16:0) e ácido esteárico (C18:0), que são em grande parte considerados por aumentar a qualidade e o melhor desempenho do biodiesel, a abundância destes ácidos foi observada neste estudo, indicando que os ácidos graxos obtidos foram potencialmente favorável à produção de biodiesel.

De acordo com o percentual de cada ácido graxo encontrado em cada condição de cultivo da etapa I suplementados com 2, 3 e 7 g.L⁻¹ de glicerol, constatou-se que o ácido graxo de maior concentração foi o ácido palmítico, seguido dos ácidos oleico e linoleico (Figura 18). Já na etapa II pode-se observar que o maior rendimento foi de ácido palmítico para as amostras com 7 e 9 g.L⁻¹ de glicerol, seguido do ácido linoleico (Figura 19).

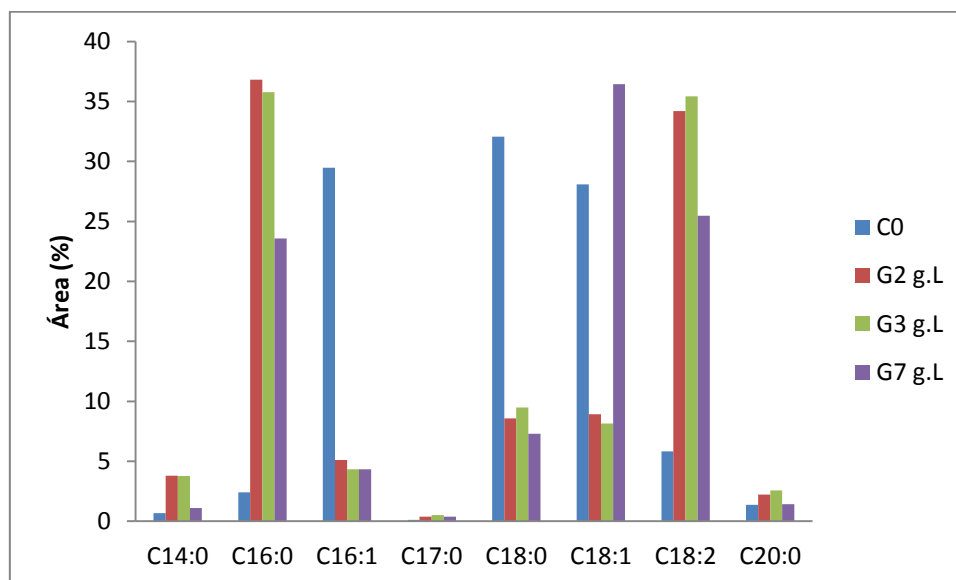


Figura 17. Áreas relativas dos ácidos graxos majoritários encontrados na etapa I- 400 mL com diferentes concentrações de glicerol.

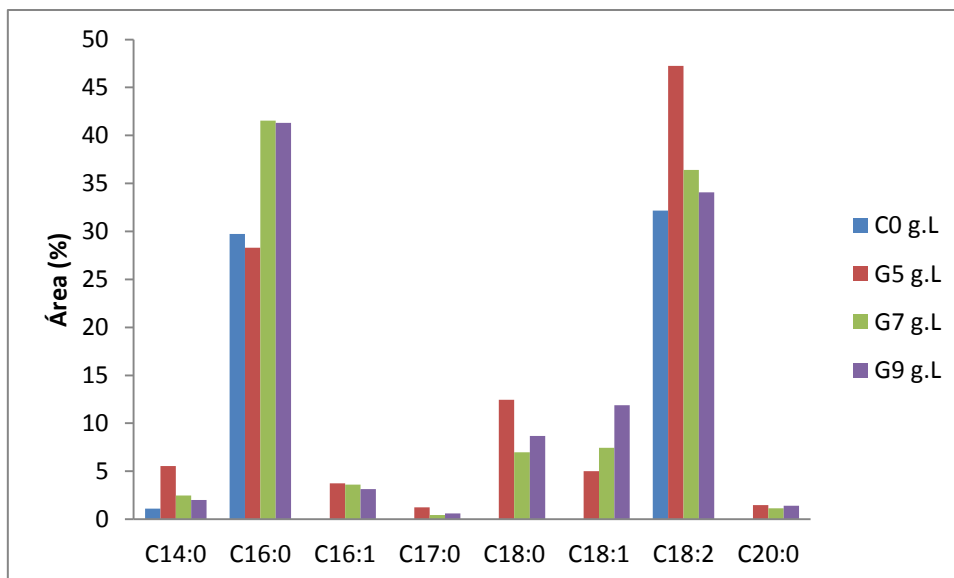


Figura 18. Áreas relativas dos ácidos graxos majoritários encontrados na etapa II- 2,5 L com diferentes concentrações de glicerol.

Existem vários estudos com objetivo de potencializar o crescimento de microalgas, assim como melhorar o nível de petróleo ou de outros produtos de valor agregado ((Sun et al. 2014), Ummalyma e Sukumaran (2014), (Singh et al. 2016). No entanto, a credibilidade do biodiesel de óleo de microalgas não depende apenas da quantidade de óleo produzido, mas sim no tipo de ácidos graxos presentes neste óleo. Deste modo, o teor de lipídios e o perfil de ácidos graxos são fatores fundamentais a serem considerados ao selecionar algas para a produção de combustível (Chen et al. 2012). Os ácidos graxos indicados para biodiesel de boas propriedades incluem C14:0, C16:0, C16:1, C18:0, C18:1 e C18:2 (Schenk et al. 2008).

No experimento de Gupta et al. (2013), com suplementação de glicose e glicerol, à medida que as concentrações de glicerol aumentaram, o perfil de ácidos graxos revelou uma diminuição na proporção de ácidos graxos poli-insaturados de 62,9% para 47,2% de ácidos graxos totais. O maior acúmulo foi na concentração de 0,5% de glicerol, o que demonstrou a ineficiência do isolado ao traduzir as maiores concentrações de glicerol em mais ácidos graxos poli-insaturados.

Observar-se que as diferentes concentrações de glicerol analisadas na etapa I não influenciaram diretamente o teor de ácidos graxos. Isso ocorreu

provavelmente em função da dificuldade de robustez na análise em função pequena quantidade de biomassa gerada. Já na etapa II, observa-se que houve uma influência em determinados tipos de ácidos graxos como o C16:1, C18:0 e C18:1 que só pode ser observado nos experimentos com suplementação de glicerol e C16:0 e C18:2 que tiveram maior concentração em relação à amostra controle.

5.7 Análises de carbono orgânico total – COT

Os resultados encontrados para COT, CI, CT e NT são demonstrados na tabela 7, onde se encontram os resultados referentes às amostras em escala de 400 mL e 2,5 L.

Tabela 7. Resultados obtidos na análise de COT para amostras sem e com glicerol.

Amostras	COT mg/ L	CT mg/ L	CI mg/ L	NT mg/ L
C0 – 400 mL	24,25	56,72	32,47	1,71
G2 – 400 mL	439	463,8	24,8	3,18
G3 – 400 mL	1276	1293,5	17,2	2,94
G7 – 400 mL	1738,5	1748,5	9,81	3,49
C0 – 2,5 L	42,4	76,8	34,7	5,63
G5 – 2,5 L	1015,5	1049,5	33,9	7,62
G7 – 2,5 L	549	561,5	12,5	6,31
G9 – 2,5 L	1695,5	1725	29,4	2,75

Com a adição do glicerol, observa-se que o teor de carbono orgânico total aumentou nas amostras em relação ao experimento C0 (sem glicerol). Segundo Wang et al. (2010), algumas espécies de algas podem utilizar altos níveis de COT de águas residuais para prover rápido crescimento sendo fotoheterotrófico ou mixotrófico. De acordo com Zhou et al. (2011), o COT em águas residuais inclui ácido acético, ácido propiônico, ácido butírico e etanol.

Na etapa I, em termos de carbono a amostra que mostrou uma influência no comportamento foi a de concentração de 2 g.L⁻¹ de glicerol e na etapa II, a amostra que mostrou o mesmo comportamento foi a com 7 g.L⁻¹ de glicerol. Provavelmente estes experimentos apresentaram um consumo de glicerol.

5.8 Análise físico-química do meio de cultivo após etapa II

Para verificar a possível biorremediação do efluente a partir dos cultivos, foi selecionado o experimento da etapa II referente a 7 g.L^{-1} de glicerol. Os resultados podem ser observados na tabela 8.

Tabela 8. Parâmetros analíticos do efluente da ETE e do sobrenadante do experimento com glicerol.

Parâmetros	Efluente ETE	Com glicerol
Alcalinidade Total $\text{mg L}^{-1} \text{CaCo}_3$	514,6	135,1
Alcalinidade Carbonatos $\text{mg L}^{-1} \text{CaCo}_3$	0,0	0,0
Alcalinidade Hidróxidos $\text{mg L}^{-1} \text{CaCo}_3$	0,0	0,0
Alcalinidade Bicarbonatos $\text{mg L}^{-1} \text{CaCo}_3$	514,6	135,1
DBO ₅ $\text{mg L}^{-1} (\text{O}_2)$	8,0	284,7
DQO mg L^{-1}	23,35	2412,54
Fósforo Total mg L^{-1}	5,19	0,49
Nitrogênio Total Kjeldahl mg L^{-1}	64,9	102,8

A concentração de bicarbonatos e a alcalinidade total apresentaram uma redução de 26% nos experimentos envolvendo o glicerol quando comparados com a amostra apenas do efluente. Essa diferença deve-se possivelmente ao crescimento microalgal mais acentuado observado nesta condição.

Nos parâmetros de DBO₅ e DQO houve aumento no experimento com suplementação de glicerol, possivelmente em decorrência de haver glicerol em excesso na amostra do sobrenadante do término do experimento, amostra na qual foi analisada. Quanto aos parâmetros analíticos de fósforo houve diminuição de 9,4% e nitrogênio total ocorreu aumento.

O crescimento intenso que o glicerol provocou no experimento, permitiu, por conseguinte, maior remoção de fósforo existente por meio de assimilação. De acordo com Sañudo-Wilhelmy et al. (2004) a redução do fósforo total indica que o nível de fósforo fornecido tem um efeito na produção de biomassa das microalgas. A absorção de fósforo por células de microalgas é principalmente influenciada pela fisiologia celular, fluxo metabólico, concentração de fosfato,

forma química do fosfato disponível e outros parâmetros, como a intensidade da luz, pH e temperatura.

Em estudos realizados por Prathima Devi et al. (2013), reportam que a utilização a partir de 5 g.L^{-1} de glicose não há uma redução significativa de nitrogênio total. O aumento na absorção de nitrogênio pode ser atribuída à rápida proliferação de novas células, uma vez que a formação de novas células requer proteínas. O nitrogênio biodisponível na forma de NO_3 e/ou NH_4 pode ser assimilado por células algais ou pode ser reduzido a nitrogênio elementar (N_2) e perdido como gás.

Estudo recente realizado por Gupta et al. (2016), utilizando suplementações com diversas fontes de carbono entre elas glicerol e glicose, mostrou que a adição de glicose às águas residuais contribuíram para o aumento da DQO, porém a glicose suplementada no efluente foi metabolizada por microalgas e acabou resultando na remoção de DQO. Os autores relatam que embora os valores de DQO gerados pela suplementação de glicose (2 e 5 g/L) tenham sido superiores aos valores-limite legais das diretrizes de conformidade regulamentadas pela Diretriz Europeia, deve-se ressaltar que a suplementação de glicose também aumentou as taxas de remoção de DQO, promovendo a produção de biomassa promoveu remoção de nitrogênio total e fósforo total.

Os autores Lau et al. (1995) reportam que o tempo necessário para remover o nitrogênio em outros estudos foram mais longos do que 8 dias para *C. vulgaris*. AlMomani e Örmeci (2016), alegam que diferenças nas eficiências de remoção de DQO entre diferentes amostras de águas residuais podem ser atribuídas às diferenças em suas composições químicas. Além disso, o teor de matéria orgânica facilmente biodegradável das amostras afetaria a taxa de remoção de DQO. Por exemplo, o efluente secundário proveniente do tratamento biológico teria um teor de matéria orgânica biodegradável muito menor em comparação com o concentrado obtido a partir da desidratação de lamas.

O mecanismo de remoção de fósforo de águas residuais por microalgas pode envolver uma série de processos, tais como remoção de fósforo por

adsorção, complexação/precipitação e assimilação/captação. As algas assimilam fósforo como ortofosfato inorgânico, de preferência como H_2PO_4^- ou HPO_4^{2-} . Os fosfatos orgânicos podem também ser convertidos em ortofosfatos por fosfatases na superfície celular, e isto ocorre especialmente quando os ortofosfatos são escassos (Oliver e Ganf 2002).

Segundo AlMomani e Örmeci (2016), em geral, o que é importante no tratamento de águas residuais com base em microalgas, é conseguir a remoção de nitrogênio e fósforo das águas residuais. Além da absorção por microalgas, parte da remoção de nutrientes pode ser devida à volatilização, precipitação, adsorção ou outros processos físicos e químicos similares, e eles contribuiriam para a eficiência geral de remoção de nitrogênio e fósforo.

6. CONCLUSÕES

A microalga predominante no efluente utilizado neste estudo foi a *Chlorella sp.*, entretanto, sabe-se que nesse tipo de sistema há uma variedade de espécies microbianas que podem interagir e influenciar o predomínio de um organismo sobre o outro.

O uso do glicerol como suplemento nutricional no cultivo de microalgas se mostrou viável, uma vez que não apresentou efeito inibitório no crescimento do microrganismo. Em ambas as escalas testadas, laboratorial e piloto, o glicerol gerou um rendimento maior de biomassa em comparação aos experimentos onde não foi adicionado, sendo mais proeminente na etapa II (escala piloto), onde se obteve um rendimento de 0,104%.

Os cultivos de microalgas com suplementação de glicerol não produziram maior teor lipídico, entretanto o teor de ácidos graxos foi influenciado pelas concentrações de glicerol testadas principalmente na escala piloto. O perfil de ácidos graxos encontrados mostrou maior potencial para a produção de biocombustíveis, como por exemplo o biodiesel.

Considerando as produções de biomassa, lipídios e rendimento de ácidos graxos, conclui-se que a melhor concentração estudada foi a de 10,4 g.L⁻¹ de glicerol em escala de 2,5 L.

O ácido linoleico foi o principal ácido graxo produzido, nas escalas laboratorial e piloto, a partir do uso do glicerol como fonte de carbono.

7. REFERÊNCIAS

Abad, S. e X. Turon (2012). "Valorization of biodiesel derived glycerol as a carbon source to obtain added-value metabolites: Focus on polyunsaturated fatty acids." Biotechnology Advances **30**(3): 733-741.

Aflalo, C., Y. Meshulam, A. Zarka e S. Boussiba (2007). "On the relative efficiency of two- vs. one-stage production of astaxanthin by the green alga *Haematococcus pluvialis*." Biotechnology and Bioengineering **98**(1): 300-305.

Ahmad, A. L., N. H. M. Yasin, C. J. C. Derek e J. K. Lim (2011). "Microalgae as a sustainable energy source for biodiesel production: A review." Renewable and Sustainable Energy Reviews **15**(1): 584-593.

Akkerman, I., M. Janssen, J. Rocha e R. H. Wijffels (2002). "Photobiological hydrogen production: photochemical efficiency and bioreactor design." International Journal of Hydrogen Energy **27**(11–12): 1195-1208.

AlMomani, F. A. e B. Örmeci (2016). "Performance Of *Chlorella Vulgaris*, *Neochloris Oleoabundans*, and mixed indigenous microalgae for treatment of primary effluent, secondary effluent and centrate." Ecological Engineering **95**: 280-289.

Amaro, H. M., A. C. Guedes e F. X. Malcata (2011). "Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel." Applied Energy **88**(10): 3402-3410.

Azma, M., M. S. Mohamed, R. Mohamad, R. A. Rahim e A. B. Ariff (2011). "Improvement of medium composition for heterotrophic cultivation of green microalgae, *Tetraselmis suecica*, using response surface methodology." Biochemical Engineering Journal **53**(2): 187-195.

Baierle, F., D. K. John, M. P. Souza, T. R. Bjerk, M. S. A. Moraes, M. Hoeltz, A. L. B. Rohlfs, M. E. Camargo, V. A. Corbellini e R. C. S. Schneider (2015). "Biomass from microalgae separation by electroflotation with iron and aluminum spiral electrodes." Chemical Engineering Journal **267**: 274-281.

Banerjee, A., R. Sharma, Y. Chisti e U. C. Banerjee (2002). "Botryococcus braunii: A Renewable Source of Hydrocarbons and Other Chemicals." Critical Reviews in Biotechnology **22**(3): 245-279.

Brennan, L. e P. Owende (2010). "Biofuels from microalgae—a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products." Renewable and sustainable energy reviews **14**(2): 557-577.

Cabanelas, I. T. D., Z. Arbib, F. A. Chinalia, C. O. Souza, J. A. Perales, P. F. Almeida, J. I. Druzian e I. A. Nascimento (2013). "From waste to energy: Microalgae production in wastewater and glycerol." Applied Energy **109**: 283-290.

Cerón-García, M. C., J. M. Fernández-Sevilla, A. Sánchez-Mirón, F. García-Camacho, A. Contreras-Gómez e E. Molina-Grima (2013). "Mixotrophic growth of *Phaeodactylum tricornutum* on fructose and glycerol in fed-batch and semi-continuous modes." Bioresource Technology **147**: 569-576.

Cerón Garcí, M. C., J. M. Fernández Sevilla, F. G. Acien Fernández, E. Molina Grima e F. García Camacho (2000). "Mixotrophic growth of *Phaeodactylum tricornutum* on glycerol: growth rate and fatty acid profile." Journal of Applied Phycology **12**(3): 239-248.

Chapman, V. e D. Chapman (1973). *The algae* 2nd ed, Macmillan: London.

Cheirsilp, B., W. Suwannarat e R. Niyomdecha (2011). "Mixed culture of oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* and microalga *Chlorella vulgaris* for lipid production from industrial wastes and its use as biodiesel feedstock." New Biotechnology **28**(4): 362-368.

Chen, C.-Y., K.-L. Yeh, R. Aisyah, D.-J. Lee e J.-S. Chang (2011). "Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review." Bioresource Technology **102**(1): 71-81.

Chen, Y.-H., B.-Y. Huang, T.-H. Chiang e T.-C. Tang (2012). "Fuel properties of microalgae (*Chlorella protothecoides*) oil biodiesel and its blends with petroleum diesel." Fuel **94**: 270-273.

Chi, Z., D. Pyle, Z. Wen, C. Frear e S. Chen (2007). "A laboratory study of producing docosahexaenoic acid from biodiesel-waste glycerol by microalgal fermentation." Process Biochemistry **42**(11): 1537-1545.

Chisti, Y. (2007). "Biodiesel from microalgae." Biotechnology Advances **25**(3): 294-306.

Cho, D.-H., R. Ramanan, J. Heo, J. Lee, B.-H. Kim, H.-M. Oh e H.-S. Kim (2015). "Enhancing microalgal biomass productivity by engineering a microalgal–bacterial community." Bioresource Technology **175**: 578-585.

Choi, H.-J. e S.-W. Yu (2015). "Influence of crude glycerol on the biomass and lipid content of microalgae." Biotechnology & Biotechnological Equipment **29**(3): 506-513.

Cooper, M. B. e A. G. Smith (2015). "Exploring mutualistic interactions between microalgae and bacteria in the omics age." Current Opinion in Plant Biology **26**: 147-153.

Croft, M. T., A. D. Lawrence, E. Raux-Deery, M. J. Warren e A. G. Smith (2005). "Algae acquire vitamin B12 through a symbiotic relationship with bacteria." Nature **438**(7064): 90-93.

da Silva, G. P., M. Mack e J. Contiero (2009). "Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology." Biotechnology Advances **27**(1): 30-39.

Del Río, E., F. G. Acién, M. C. García-Malea, J. Rivas, E. Molina-Grima e M. G. Guerrero (2008). "Efficiency assessment of the one-step production of astaxanthin by the microalga *Haematococcus pluvialis*." Biotechnology and Bioengineering **100**(2): 397-402.

Demirbas, A. (2011). "Competitive liquid biofuels from biomass." Applied Energy **88**(1): 17-28.

Demirbas, A. e M. Fatih Demirbas (2011). "Importance of algae oil as a source of biodiesel." Energy Conversion and Management **52**(1): 163-170.

Demirbas, A. H. (2009). "Inexpensive oil and fats feedstocks for production of biodiesel." Energy Education Science and Technology Part A-Energy Science and Research **23**(1-2): 1-13.

Demirbas, M. F. (2010). "Microalgae as a feedstock for biodiesel." Energy Education Science and Technology Part A-Energy Science and Research **25**(1-2): 31-43.

Demirbas, M. F. (2011). "Biofuels from algae for sustainable development." Applied Energy **88**(10): 3473-3480.

Dobson, R., V. Gray e K. Rumbold (2012). "Microbial utilization of crude glycerol for the production of value-added products." Journal of industrial microbiology & biotechnology **39**(2): 217-226.

Du, Z., Y. Li, X. Wang, Y. Wan, Q. Chen, C. Wang, X. Lin, Y. Liu, P. Chen e R. Ruan (2011). "Microwave-assisted pyrolysis of microalgae for biofuel production." Bioresource Technology **102**(7): 4890-4896.

Feng, X., T. H. Walker, W. C. Bridges, C. Thornton e K. Gopalakrishnan (2014). "Biomass and lipid production of *Chlorella protothecoides* under heterotrophic cultivation on a mixed waste substrate of brewer fermentation and crude glycerol." Bioresource Technology **166**: 17-23.

Fenton, O. e D. Ó hUallacháin (2012). "Agricultural nutrient surpluses as potential input sources to grow third generation biomass (microalgae): A review." Algal Research **1**(1): 49-56.

Foster, R. A., M. M. M. Kuypers, T. Vagner, R. W. Paerl, N. Musat e J. P. Zehr (2011). "Nitrogen fixation and transfer in open ocean diatom-cyanobacterial symbioses." ISME J **5**(9): 1484-1493.

Gouveia, L., A. E. Marques, T. L. da Silva e A. Reis (2009). "Neochloris oleabundans UTEX #1185: a suitable renewable lipid source for biofuel production." Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology **36**(6): 821-826.

Gouveia, L. e A. Oliveira (2009). "Microalgae as a raw material for biofuels production." Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology **36**(2): 269-274.

Griffiths, M. J. e S. T. L. Harrison (2009). "Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production." Journal of Applied Phycology **21**(5): 493-507.

Gupta, A., D. Singh, C. J. Barrow e M. Puri (2013). "Exploring potential use of Australian thraustochytrids for the bioconversion of glycerol to omega-3 and carotenoids production." Biochemical Engineering Journal **78**: 11-17.

Gupta, P. L., H.-J. Choi, R. R. Pawar, S. P. Jung e S.-M. Lee (2016). "Enhanced biomass production through optimization of carbon source and utilization of wastewater as a nutrient source." Journal of Environmental Management **184, Part 3**: 585-595.

Guschina, I. A. e J. L. Harwood (2006). "Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae." Progress in Lipid Research **45**(2): 160-186.

Hemaiswarya, S., R. Raja, R. Ravi Kumar, V. Ganesan e C. Anbazhagan (2011). "Microalgae: a sustainable feed source for aquaculture." World Journal of Microbiology and Biotechnology **27**(8): 1737-1746.

Heredia-Arroyo, T., W. Wei, R. Ruan e B. Hu (2011). "Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* and its potential application for the oil accumulation from non-sugar materials." Biomass and Bioenergy **35**(5): 2245-2253.

Hirano, A., R. Ueda, S. Hirayama e Y. Ogushi (1997). "CO₂ fixation and ethanol production with microalgal photosynthesis and intracellular anaerobic fermentation." Energy **22**(2): 137-142.

Hom, E. F. Y., P. Aiyar, D. Schaeme, M. Mittag e S. Sasso "A Chemical Perspective on Microalgal–Microbial Interactions." Trends in Plant Science **20**(11): 689-693.

Hu, Q., M. Sommerfeld, E. Jarvis, M. Ghirardi, M. Posewitz, M. Seibert e A. Darzins (2008). "Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances." The Plant Journal **54**(4): 621-639.

Huang, G., F. Chen, D. Wei, X. Zhang e G. Chen (2010). "Biodiesel production by microalgal biotechnology." Applied Energy **87**(1): 38-46.

Huber, G. W., S. Iborra e A. Corma (2006). "Synthesis of transportation fuels from biomass: chemistry, catalysts, and engineering." Chemical reviews **106**(9): 4044-4098.

Illman, A. M., A. H. Scragg e S. W. Shales (2000). "Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium." Enzyme and Microbial Technology **27**(8): 631-635.

Kay, R. A. e L. L. Barton (1991). "Microalgae as food and supplement." Critical reviews in food science & nutrition **30**(6): 555-573.

Khan, S. A., Rashmi, M. Z. Hussain, S. Prasad e U. C. Banerjee (2009). "Prospects of biodiesel production from microalgae in India." Renewable and Sustainable Energy Reviews **13**(9): 2361-2372.

Kirrolia, A., N. R. Bishnoi e R. Singh (2013). "Microalgae as a boon for sustainable energy production and its future research & development aspects." Renewable and Sustainable Energy Reviews **20**: 642-656.

Knothe, G. (2008). "'Designer' biodiesel: optimizing fatty ester composition to improve fuel properties." Energy & Fuels **22**(2): 1358-1364.

Kong, W.-B., H. Yang, Y.-T. Cao, H. Song, S.-F. Hua e C.-G. Xia (2013). "Effect of glycerol and glucose on the enhancement of biomass, lipid and soluble carbohydrate production by *Chlorella vulgaris* in mixotrophic culture." Food technology and biotechnology **51**(1): 62-69.

Kothari, R., R. Prasad, V. Kumar e D. P. Singh (2013). "Production of biodiesel from microalgae *Chlamydomonas polypyrenoideum* grown on dairy industry wastewater." Bioresource Technology **144**: 499-503.

Lau, P. S., N. F. Y. Tam e Y. S. Wong (1995). "Effect of algal density on nutrient removal from primary settled wastewater." Environmental Pollution **89**(1): 59-66.

Leite, G. B., K. Paranjape, A. E. M. Abdelaziz e P. C. Hallenbeck (2015). "Utilization of biodiesel-derived glycerol or xylose for increased growth and lipid production by indigenous microalgae." Bioresource Technology **184**: 123-130.

Li, X., H. Xu e Q. Wu (2007). "Large-scale biodiesel production from microalga *Chlorella protothecoides* through heterotrophic cultivation in bioreactors." Biotechnology and Bioengineering **98**(4): 764-771.

Li, Y., D. Han, M. Sommerfeld e Q. Hu (2011). "Photosynthetic carbon partitioning and lipid production in the oleaginous microalga *Pseudochlorococcum* sp. (Chlorophyceae) under nitrogen-limited conditions." Bioresource Technology **102**(1): 123-129.

Li, Y., M. Horsman, B. Wang, N. Wu e C. Q. Lan (2008). "Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochloris oleoabundans*." Applied Microbiology and Biotechnology **81**(4): 629-636.

Li, Y., M. Horsman, N. Wu, C. Q. Lan e N. Dubois-Calero (2008). "Biofuels from Microalgae." Biotechnology Progress **24**(4): 815-820.

Li, Y., W. Zhou, B. Hu, M. Min, P. Chen e R. R. Ruan (2011). "Integration of algae cultivation as biodiesel production feedstock with municipal wastewater treatment: Strains screening and significance evaluation of environmental factors." Bioresource Technology **102**(23): 10861-10867.

Liang, Y., N. Sarkany e Y. Cui (2009). "Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions." Biotechnology Letters **31**(7): 1043-1049.

Liang, Y., N. Sarkany, Y. Cui e J. W. Blackburn (2010). "Batch stage study of lipid production from crude glycerol derived from yellow grease or animal fats through microalgal fermentation." Bioresource Technology **101**(17): 6745-6750.

Ma, X., H. Zheng, M. Addy, E. Anderson, Y. Liu, P. Chen e R. Ruan (2016). "Cultivation of *Chlorella vulgaris* in wastewater with waste glycerol: Strategies for improving nutrients removal and enhancing lipid production." Bioresource Technology **207**: 252-261.

Maigua, M. e M. Lourdes (2015). Evaluación de cultivos de Diatomeas (Bacillariophyta) colectadas en el Archipiélago Schetland del sur de la Antártida para la producción de lípidos, Quito: UCE.

Mandal, S. e N. Mallick (2009). "Microalga *Scenedesmus obliquus* as a potential source for biodiesel production." Applied Microbiology and Biotechnology **84**(2): 281-291.

Mansour, M. P., D. M. F. Frampton, P. D. Nichols, J. K. Volkman e S. I. Blackburn (2005). "Lipid and fatty acid yield of nine stationary-phase microalgae: Applications and unusual C24–C28 polyunsaturated fatty acids." Journal of Applied Phycology **17**(4): 287-300.

Markou, G. e E. Nerantzis (2013). "Microalgae for high-value compounds and biofuels production: A review with focus on cultivation under stress conditions." Biotechnology Advances **31**(8): 1532-1542.

MARTÍNEZ, F., C. ASCASO e M. I. ORÚS (1991). "Morphometric and Stereologic Analysis of *Chlorella vulgaris* Under Heterotrophic Growth Conditions." Annals of Botany **67**(3): 239-245.

Mata, T. M., A. A. Martins e N. S. Caetano (2010). "Microalgae for biodiesel production and other applications: A review." Renewable and Sustainable Energy Reviews **14**(1): 217-232.

Miao, X. e Q. Wu (2004). "High yield bio-oil production from fast pyrolysis by metabolic controlling of *Chlorella protothecoides*." Journal of Biotechnology **110**(1): 85-93.

Miao, X. e Q. Wu (2006). "Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil." Bioresource Technology **97**(6): 841-846.

Minowa, T., S.-y. Yokoyama, M. Kishimoto e T. Okakura (1995). "Oil production from algal cells of *Dunaliella tertiolecta* by direct thermochemical liquefaction." Fuel **74**(12): 1735-1738.

Mitra, D., J. van Leeuwen e B. Lamsal (2012). "Heterotrophic/mixotrophic cultivation of oleaginous *Chlorella vulgaris* on industrial co-products." Algal Research **1**(1): 40-48.

Neilson, A. e R. Lewin (1974). "The uptake and utilization of organic carbon by algae: an essay in comparative biochemistry*." Phycologia **13**(3): 227-264.

O'Grady, J. e J. A. Morgan (2011). "Heterotrophic growth and lipid production of *Chlorella protothecoides* on glycerol." Bioprocess and Biosystems Engineering **34**(1): 121-125.

Oliver, R. L. e G. G. Ganf (2002). Freshwater Blooms. The Ecology of Cyanobacteria: Their Diversity in Time and Space. B. A. Whitton e M. Potts. Dordrecht, Springer Netherlands: 149-194.

Ozkurt, I. (2009). "Qualifying of safflower and algae for energy." Energy Education Science and Technology Part a-Energy Science and Research **23**(1-2): 145-151.

Paranjape, K., G. B. Leite e P. C. Hallenbeck (2016). "Effect of nitrogen regime on microalgal lipid production during mixotrophic growth with glycerol." Bioresource Technology **214**: 778-786.

Perez-Garcia, O., F. M. E. Escalante, L. E. de-Bashan e Y. Bashan (2011). "Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products." Water Research **45**(1): 11-36.

Phukan, M. M., R. S. Chutia, B. K. Konwar e R. Kataki (2011). "Microalgae *Chlorella* as a potential bio-energy feedstock." Applied Energy **88**(10): 3307-3312.

Pittman, J. K., A. P. Dean e O. Osundeko (2011). "The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources." Bioresource Technology **102**(1): 17-25.

Prathima Devi, M., Y. V. Swamy e S. Venkata Mohan (2013). "Nutritional mode influences lipid accumulation in microalgae with the function of carbon sequestration and nutrient supplementation." Bioresource Technology **142**: 278-286.

Prathima Devi, M., G. Venkata Subhash e S. Venkata Mohan (2012). "Heterotrophic cultivation of mixed microalgae for lipid accumulation and wastewater treatment during sequential growth and starvation phases: Effect of nutrient supplementation." Renewable Energy **43**: 276-283.

Rawat, I., R. R. Kumar, T. Mutanda e F. Bux (2011). "Dual role of microalgae: phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production." Applied Energy **88**(10): 3411-3424.

Rawat, I., R. Ranjith Kumar, T. Mutanda e F. Bux (2013). "Biodiesel from microalgae: A critical evaluation from laboratory to large scale production." Applied Energy **103**: 444-467.

Safi, C., B. Zebib, O. Merah, P.-Y. Pontalier e C. Vaca-Garcia (2014). "Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review." Renewable and Sustainable Energy Reviews **35**: 265-278.

Sañudo-Wilhelmy, S. A., A. Tovar-Sanchez, F.-X. Fu, D. G. Capone, E. J. Carpenter e D. A. Hutchins (2004). "The impact of surface-adsorbed phosphorus on phytoplankton Redfield stoichiometry." Nature **432**(7019): 897-901.

Schenk, P. M., S. R. Thomas-Hall, E. Stephens, U. C. Marx, J. H. Mussgnug, C. Posten, O. Kruse e B. Hankamer (2008). "Second Generation Biofuels: High-Efficiency Microalgae for Biodiesel Production." BioEnergy Research **1**(1): 20-43.

Sengmee, D., B. Cheirsilp, T. T. Suksaroge e P. Prasertsan (2016). "Biophotolysis-based hydrogen and lipid production by oleaginous microalgae using crude glycerol as exogenous carbon source." International Journal of Hydrogen Energy.

Singh, A., P. S. Nigam e J. D. Murphy (2011). "Renewable fuels from algae: An answer to debatable land based fuels." Bioresource Technology **102**(1): 10-16.

Singh, P., S. Kumari, A. Guldhe, R. Misra, I. Rawat e F. Bux (2016). "Trends and novel strategies for enhancing lipid accumulation and quality in microalgae." Renewable and Sustainable Energy Reviews **55**: 1-16.

Spolaore, P., C. Joannis-Cassan, E. Duran e A. Isambert (2006). "Commercial applications of microalgae." Journal of Bioscience and Bioengineering **101**(2): 87-96.

Stephenson, A. L., J. S. Dennis, C. J. Howe, S. A. Scott e A. G. Smith (2010). "Influence of nitrogen-limitation regime on the production by *Chlorella vulgaris* of lipids for biodiesel feedstocks." Biofuels **1**(1): 47-58.

Suali, E. e R. Sarbatly (2012). "Conversion of microalgae to biofuel." Renewable and Sustainable Energy Reviews **16**(6): 4316-4342.

Sun, Y., J. Liu, T. Xie, X. Xiong, W. Liu, B. Liang e Y. Zhang (2014). "Enhanced lipid accumulation by *Chlorella vulgaris* in a two-stage fed-batch culture with glycerol." Energy & Fuels **28**(5): 3172-3177.

Tamburic, B., F. W. Zemichael, G. C. Maitland e K. Hellgardt (2011). "Parameters affecting the growth and hydrogen production of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*." International Journal of Hydrogen Energy **36**(13): 7872-7876.

Ummalyma, S. B. e R. K. Sukumaran (2014). "Cultivation of microalgae in dairy effluent for oil production and removal of organic pollution load." Bioresource Technology **165**: 295-301.

Vanelslander, B., C. Paul, J. Grueneberg, E. K. Prince, J. Gillard, K. Sabbe, G. Pohnert e W. Vyverman (2012). "Daily bursts of biogenic cyanogen bromide (BrCN) control biofilm formation around a marine benthic diatom." Proceedings of the National Academy of Sciences **109**(7): 2412-2417.

Walker, T. L., S. Purton, D. K. Becker e C. Collet (2005). "Microalgae as bioreactors." Plant Cell Reports **24**(11): 629-641.

Wang, L., M. Min, Y. Li, P. Chen, Y. Chen, Y. Liu, Y. Wang e R. Ruan (2010). "Cultivation of Green Algae *Chlorella* sp. in Different Wastewaters from Municipal Wastewater Treatment Plant." Applied Biochemistry and Biotechnology **162**(4): 1174-1186.

Williams, P. J. I. B. e L. M. L. Laurens (2010). "Microalgae as biodiesel & biomass feedstocks: Review & analysis of the biochemistry, energetics & economics." Energy & Environmental Science **3**(5): 554-590.

Xiong, W., X. Li, J. Xiang e Q. Wu (2008). "High-density fermentation of microalga *Chlorella protothecoides* in bioreactor for microbio-diesel production." Applied Microbiology and Biotechnology **78**(1): 29-36.

Xu, H., X. Miao e Q. Wu (2006). "High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters." Journal of Biotechnology **126**(4): 499-507.

Yen, H.-W., P.-W. Chen e L.-J. Chen (2015). "The synergistic effects for the co-cultivation of oleaginous yeast-*Rhodotorula glutinis* and microalgae-*Scenedesmus obliquus* on the biomass and total lipids accumulation." Bioresource Technology **184**: 148-152.

Yoo, C., S.-Y. Jun, J.-Y. Lee, C.-Y. Ahn e H.-M. Oh (2010). "Selection of microalgae for lipid production under high levels carbon dioxide." Bioresource Technology **101**(1, Supplement): S71-S74.

Zhang, X., S. Yan, R. D. Tyagi, R. Y. Surampalli e J. R. Valéro (2016). "Energy balance of biofuel production from biological conversion of crude glycerol." Journal of Environmental Management **170**: 169-176.

Zhou, W., Y. Li, M. Min, B. Hu, P. Chen e R. Ruan (2011). "Local bioprospecting for high-lipid producing microalgal strains to be grown on concentrated municipal wastewater for biofuel production." Bioresource Technology **102**(13): 6909-6919.