



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

BIANCA RAMOS ESTEVAM

**Efeito dos sistemas de cultivo e limitações de nutrientes para o
crescimento e biossíntese de metabólitos nas microalgas *Botryococcus
terribilis* e *Chlorella* sp.**

Campinas/SP

2021

BIANCA RAMOS ESTEVAM

Efeito dos sistemas de cultivo e limitações de nutrientes para o crescimento e biossíntese de metabólitos nas microalgas *Botryococcus* *terribilis* e *Chlorella* sp.

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Vasconcelos Fregolente

Co-Orientadora: Dr^a. Luisa Fernanda Rios Pinto

Co-Orientador: Prof. Dr. Rubens Maciel Filho

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO
DE MESTRADO DEFENDIDA PELA
ALUNA BIANCA RAMOS ESTEVAM E
ORIENTADA PELO PROF. DR.
LEONARDO VASCONCELOS
FREGOLENTE.

Campinas/SP

2021

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura
Rose Meire da Silva - CRB 8/5974

Es85e Estevam, Bianca Ramos, 1995-
Efeito dos sistemas de cultivo e limitações de nutriente para o crescimento e biossíntese de metabólitos nas microalgas *Botryococcus terribilis* e *Chlorella* sp. / Bianca Ramos Estevam. – Campinas, SP : [s.n.], 2021.

Orientador: Leonardo Vasconcelos Fregolente.

Coorientador: Luisa Fernanda Rios Pinto.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Raceway. 2. Clorófitas. 3. Planejamento fatorial. 4. Microalgas. 5. Metabólitos. I. Fregolente, Leonardo Vasconcelos, 1980-. II. Rios Pinto, Luisa Fernanda, 1981-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Effects of cultivation systems and nutrient limitation on the growth and metabolite biosynthesis of *Botryococcus terribilis* and *Chlorella* sp. **Palavras-chave em inglês:**

Raceway

Chlorophytes

Factorial design

Microalgae

Metabolites

Área de concentração: Engenharia Química

Títuloção: Mestra em Engenharia Química

Banca examinadora:

Leonardo Vasconcelos Fregolente [Orientador]

Adriano Pinto Mariano

Ana Flora Dalberto Vasconcelos

Data de defesa: 15-12-2021

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Química

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-2595-5124>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/5399419502189278>

Folha de Aprovação da Dissertação de Mestrado defendida por Bianca Ramos Estevam e aprovada em 15 de dezembro de 2021 pela banca examinadora constituída pelos doutores:

Prof. Dr. Leonardo Vasconcelos Fregolente – Presidente e Orientador
FEQ-UNICAMP

Prof. Dr. Adriano Pinto Mariano
FEQ-UNICAMP

Prof^a. Dr^a. Ana Flora Dalberto Vasconcelos
FCT-UNESP

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

DEDICATÓRIA:

Dedico este trabalho a todos aqueles que, direta ou indiretamente, se beneficiarem dos conhecimentos aqui descritos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus que me capacitou e me deu ânimo para realizar esta pesquisa.

À minha família que me incentivou e me apoiou na escolha da pós graduação, sem vocês nada disso seria possível. Em especial minha mãe, Elizangela de Paula, que é o maior e melhor exemplo de mulher que eu poderia ter.

Ao meu marido, Rafael Estevam, por acreditar em mim mais do que eu mesma, por ser meu ponto de apoio e meu maior incentivador.

À equipe de orientadores e coorientadores, Prof. Dr. Leonardo Vasconcelos Fregolente, Dr^a Luisa Fernanda Rios Pinto e Prof. Dr. Rubens Maciel Filho; por me instruírem e compartilharem comigo seus conhecimentos fazendo com que esta pesquisa seja possível.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – BRASIL (CAPES) – Código de financiamento 001– Projeto Nº 88887.372659/2019-00.

À Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de São Paulo (FAPESP) – Processo nº 2015/20630-4 pelo financiamento do Projeto de Pesquisa, tornando possível a produção desta tese.

Ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica para Ensino Médio (PIBIC-EM), pelo suporte financeiro para construção do *raceway* utilizado nesta pesquisa.

À Gabriela Ferreira, por me instruir e auxiliar com as metodologias e práticas laboratoriais.

À Ma. Danubia Santiago, pela amizade e ajuda com a plotagem do *raceway*.

Ao Dr. Juliano Bicas, pelas instruções e auxílio com a metodologia de extração e quantificação dos hidrocarbonetos.

À Prof^a Dr^a Telma Teixeira Franco e ao Dr. Fernando Frederico pelo auxílio com a análise dos hidrocarbonetos por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectroscopia de Massas.

RESUMO

Microalgas são microrganismos de rápido crescimento que apresentam biomassa rica em metabólitos de interesse comercial. Elas podem ser cultivadas em sistema aberto ou fechado. Além disso, são capazes de modular seu metabolismo para se adaptar a condições de cultivo, e sob redução de nutrientes (condição de estresse), podem ampliar a biossíntese de alguns metabólitos. Este estudo analisou o cultivo das microalgas *Botryococcus terribilis* e *Chlorella* sp. em sistema fechado (utilizando Erlenmeyer), aberto (*raceway*), e em sistema fechado com condição de estresse. Nos diferentes cultivos estudados foi realizada a extração das proteínas, carboidratos, lipídios, pigmentos e – para a *B. terribilis* – hidrocarbonetos. Foram mantidas as seguintes condições experimentais: intensidade de luz de $130 \pm 5 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$; fotoperíodo de 12:12 h de claro:escuro e temperatura de $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. Para a *B. terribilis* foi utilizado meio de cultivo CHU13 modificado e para a *Chlorella* sp., o meio BG11. Em ambas as espécies o estresse foi avaliado com planejamento fatorial completo 2^2 , com três réplicas no ponto central, variando a concentração de nitrogênio e fósforo nos meios de cultivo. Para isso foi reduzida a concentração de nitrato de potássio (KNO_3) ou nitrato de sódio (NaNO_3) para suprimir nitrogênio – nos meios CHU13 E BG11, respectivamente - e de fosfato de potássio (K_2PO_4) para redução de fósforo. O cultivo em sistema fechado e aberto foi promissor, sendo que em *raceway* a taxa de crescimento específico aumentou para ambas as espécies – de $0,182 \text{ d}^{-1}$ para $0,478 \text{ d}^{-1}$ com a *B. terribilis* e de $0,439 \text{ d}^{-1}$ para $0,517 \text{ d}^{-1}$ com a *Chlorella* sp. A porcentagem de metabólitos nos cultivos em sistema fechado e aberto foi similar. Na *B. terribilis* foi obtido entre 28-30 % de lipídios; 7-10 % de hidrocarbonetos; 32-34% de proteínas e 14-15 % de carboidratos. Já na *Chlorella* sp. foi obtido 15-17 % de lipídios, 36-38 % de proteínas e 31-32 % de carboidratos. Notou-se produção de clorofilas 3 a 4 vezes maior pela *Chlorella* sp. No estudo de estresse os fatores foram significativos, a 95 % de confiança, para a produtividade de biomassa e porcentagem de lipídios na *B. terribilis*; e para a porcentagem de lipídios, proteínas e carboidratos no estudo com a *Chlorella* sp. A maior porcentagem de lipídios (49 % para a *B. terribilis* e 35 % para a *Chlorella* sp.) foi obtida, em ambas as espécies, ao manter 25 % da concentração de nitrogênio e 75 % da concentração de fósforo. A concentração

de fósforo apresentou efeito negativo para o acúmulo de carboidratos. Na *Chlorella* sp. o efeito da concentração de nitrogênio e a interação dos fatores foi significativa para a porcentagem de proteínas, apresentando maiores valores para este metabólito quando ambos os nutrientes estão em maior concentração. Com esta pesquisa pode-se compreender de forma ampla como o sistema de cultivo afeta o crescimento e acúmulo de metabólitos nas microalgas *B. terribilis* e da *Chlorella* sp. e por isso é de grande relevância para estudo de cultivo e aplicações destas espécies subsidiando análises futuras de viabilidade técnico-econômica e ampliação de escala.

Palavras-chave: Raceway; Clorófitas; Planejamento fatorial; Microalgas; Metabólitos.

ABSTRACT

Microalgae are fast-growing microorganisms that present a biomass rich in metabolites of commercial interest. It can grow in an open or closed system. It is able to modulate its metabolism to adapt to growing conditions, and under nutrient depletion (stressing condition), it can enhance the biosynthesis of some metabolites. This study analyzes the cultivation of the microalgae *Botryococcus terribilis* and *Chlorella* sp. in a closed system (using Erlenmeyer), in an open raceway and in a closed system under stress conditions. In the different species studied, were carried out the extraction of proteins, carbohydrates, lipids, pigments, and – for *B. terribilis* – hydrocarbons. The following experimental conditions were applied: light intensity of $130 \pm 5 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$; 12:12 h light:dark photoperiod and 25 ± 2 °C. For *B. terribilis*, modified CHU13 culture medium was used and for *Chlorella* sp., BG11 medium. In both species, stress was evaluated with a 2^2 full factorial design, with a central point, varying the concentration of nitrogen and phosphorus in the culture media. Thus, it was reduced the concentration of potassium nitrate (KNO_3) or sodium nitrate (NaNO_3) to suppress nitrogen – in CHU13 and BG11 media, respectively – and potassium phosphate (K_2PO_4) to reduce phosphorus. Cultivation in closed and open systems was promising, and in the raceway, the specific growth rate increased for both species – from 0.182 d^{-1} to 0.478 d^{-1} for the *B. terribilis* and from 0.439 d^{-1} to 0.517 d^{-1} for the *Chlorella* sp. The percentage of metabolites in closed and open system cultures was similar. In *B. terribilis* it was obtained between 28-30% of lipids; 7-10 % hydrocarbons; 32-34 % protein and 14-15 % carbohydrate. In *Chlorella* sp. 15-17 % of lipids, 36-38 % of proteins and 31-32 % of carbohydrates were obtained. Production 3-4 times higher of chlorophylls by *Chlorella* sp. was observed. In the stress study, the factors were significant, at 95 % confidence, for biomass productivity and lipid percentage in *B. terribilis*; and for the percentage of lipids, proteins, and carbohydrates with the *Chlorella* sp. The highest percentage of lipids (49 % for *B. terribilis* and 35 % for *Chlorella* sp.) was obtained, for both species, by keeping 25 % of the nitrogen concentration and 75 % of the phosphorus concentration. Phosphorus concentration had a negative effect on carbohydrate accumulation. In *Chlorella* sp. the effect of nitrogen concentration and the interaction of factors was significant for proteins

accumulation, with higher values for this metabolite when both nutrients are in higher concentration. With this research, it is possible to understand in a broad way how the cultivation system affects the growth and accumulation of metabolites in the microalgae *B. terribilis* and *Chlorella* sp and therefore it is of great relevance for the study of cultivation and applications of these species, subsidizing future analyzes of technical-economic feasibility and expansion of scale.

Keywords: Raceway; Chlorophytes; Factorial design; Microalgae; Metabolites.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática do estudo de cultivo e produção de metabólitos das microalgas <i>B. terribilis</i> e <i>Chlorella</i> sp.	21
Figura 2: Colônias de microalgas <i>Botryococcus terribilis</i> vista em microscópio óptico com aumento de 1.000 vezes (A) agrupamento das células e (B) mucilagem extracelular.	24
Figura 3: Rota metabólica simplificada de assimilação de CO ₂ e síntese de lipídios, hidrocarbonetos, carboidratos e pigmentos pela microalga <i>Botryococcus terribilis</i>	25
Figura 4: Cultura de microalgas <i>Chlorella</i> sp. vista em microscópio óptico com aumento de 1.000 vezes.	26
Figura 5: Representação dos hidrocarbonetos produzidos pelas <i>Botryococcus</i>	32
Figura 6: Fases do crescimento das microalgas.	38
Figura 7: Sistemas de cultivo (A) fotobiorreator de placa plana; (B) fotobiorreator tubular; (C) fotobiorreator tubular horizontal; (D) <i>raceway</i> de múltiplos canais; (E) <i>raceway</i> de com um único canal; (F) lagoas circulares.	40
Figura 8: Cultivo da microalga (A) <i>Botryococcus terribilis</i> e (B) <i>Chlorella</i> sp. em Erlenmeyer.	51
Figura 9: <i>Raceway</i> utilizado para o cultivo das microalgas (A) dimensões do <i>raceway</i> , (B) dimensões do impelidor, (C) estrutura final.	52
Figura 10: Esqualeno em heptano (A) pico de absorbância do padrão de óleo esqualeno e (B) relação entre a absorbância e a concentração de esqualeno diluído em heptano.	56
Figura 11: Etapas da metodologia de extração dos hidrocarbonetos.	57
Figura 12: Separação das fases óleo-solvente e biomassa-meio de cultivo durante o processo de extração com heptano.	57
Figura 13: Etapas da metodologia de extração de lipídios.	59
Figura 14: Separação das fases óleo, biomassa e compostos não oleosos no processo de extração por Bligh e Dyer.	59
Figura 15: Etapas da metodologia de extração de carboidratos.	61
Figura 16: Etapas da metodologia de extração de proteínas.	62
Figura 17: Etapas da metodologia de extração de pigmentos.	63

Figura 18: Curva de crescimento da microalga <i>Botryococcus terribilis</i> em sistema fechado.	64
Figura 19: Curva de crescimento da microalga <i>Chlorella</i> sp. em sistema fechado.	64
Figura 20: Extração dos pigmentos das microalgas (A) <i>Botryococcus terribilis</i> , (B) <i>Chlorella</i> sp.....	66
Figura 21: Extração de lipídios por Bligh e Dyer (A) <i>Botryococcus terribilis</i> , (B) <i>Chlorella</i> sp.	66
Figura 22: Cultivo em <i>raceway</i> (A) Ausência de contaminação no cultivo da <i>B. terribilis</i> ; (B) decantação da <i>B. terribilis</i> ; (C) Ausência de contaminação no cultivo da <i>Chlorella</i> sp.; (B) decantação da <i>Chlorella</i> sp.	68
Figura 23: Curva de crescimento da <i>Botryococcus terribilis</i> em <i>raceway</i>	69
Figura 24: Curva de crescimento da <i>Chlorella</i> sp. em <i>raceway</i>	69
Figura 25: Curva de nível para a porcentagem de lipídios no estudo de estresse da microalga <i>B. terribilis</i>	77
Figura 26: Curva de nível do planejamento 2 ² para estresse da microalga <i>Chlorella</i> sp. adotando com resposta a porcentagem de carboidratos.....	82
Figura 27: Curva de nível do planejamento 2 ² para estresse da microalga <i>Chlorella</i> sp. adotando com resposta a porcentagem de proteínas.	83
Figura 28: Cromatogramas de alguns compostos identificados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (A) C ₄₀ H ₆₆ (B) C ₃₀ H ₅₀ (C) C ₂₅ H ₄₂ (D) C ₂₈ H ₅₈	87
Figura 29: Curva de calibração para determinação da concentração de biomassa na microalga <i>Botryococcus terribilis</i>	113
Figura 30: Curva de calibração para determinação da concentração de biomassa na microalga <i>Chlorella</i> sp.....	114
Figura 31: Curva de calibração para determinação da concentração de carboidratos.....	115
Figura 32: Curva de calibração para determinação da concentração de proteínas.	116
Figura 33: Cromatograma do C ₄₀ H ₆₆ identificado no óleo da <i>B. terribilis</i> por CG-MS.....	117
Figura 34: Cromatograma do C ₃₀ H ₅₀ identificado no óleo da <i>B. terribilis</i> por CG-MS.....	117

Figura 35: Cromatograma do $C_{28}H_{58}$ identificado no óleo da <i>B. terribilis</i> por CG-MS.....	118
Figura 36: Cromatograma do $C_{25}H_{42}$ identificado no óleo da <i>B. terribilis</i> por CG-MS.....	118
Figura 37: Cromatograma do $C_{24}H_{50}$ identificado no óleo da <i>B. terribilis</i> por CG-MS.....	119
Figura 38: Cromatograma do $C_{21}H_{44}$ identificado no óleo da <i>B. terribilis</i> por CG-MS.....	119
Figura 39: Cromatograma do $C_{20}H_{42}$ identificado no óleo da <i>B. terribilis</i> por CG-MS.....	120
Figura 40: Cromatograma do $C_{18}H_{38}$ identificado no óleo da <i>B. terribilis</i> por CG-MS.....	120
Figura 41: Cromatograma do $C_{16}H_{34}$ identificado no óleo da <i>B. terribilis</i> por CG-MS.....	121
Figura 42: Cromatograma do $C_{13}H_{28}$ identificado no óleo da <i>B. terribilis</i> por CG-MS.....	121

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Principais metabólitos das microalgas e suas aplicações	23
Tabela 2: Porcentagem em massa seca dos metabólitos das microalgas <i>Botryococcus terribilis</i> e <i>Chlorella</i> sp.....	27
Tabela 3: Perfil de ácidos graxos da <i>Botryococcus terribilis</i> e da <i>Chlorella</i> sp em porcentagem.	30
Tabela 4: Hidrocarbonetos sintetizados por diferentes linhagens de <i>B. terribilis</i> em porcentagem de peso seco	32
Tabela 5: Resultados obtidos para cultivos em sistema aberto e fechado.	42
Tabela 6: Principais resultados obtidos em estudo de estresse de microalgas por variação na concentração de nutrientes.....	47
Tabela 7: Concentração dos nutrientes dos meio CHU13 modificado e BG11.	50
Tabela 8: Planejamento de experimentos fatorial completo 2 ² com pontos centrais para estresse das microalgas.	54
Tabela 9: Parâmetros de crescimento e frações de metabólitos das microalgas <i>Botryococcus terribilis</i> e <i>Chlorella</i> sp. cultivadas em sistema fechado.....	65
Tabela 10: Resultados do cultivo em <i>raceway</i> para as microalgas <i>B. terribilis</i> e <i>Chlorella</i> sp.	70
Tabela 11: Resultados do planejamento fatorial completo 2 ² para estresse da microalga <i>Botryococcus terribilis</i>	73
Tabela 12: Estimativa dos efeitos e ajustes do estudo de planejamento experimental para estresse da <i>B. terribilis</i>	74
Tabela 13: ANOVA do planejamento experimental para estresse da <i>B. terribilis</i>	76
Tabela 14: Resultados do planejamento fatorial completo 2 ² para estresse da microalga <i>Chlorella</i> sp.....	78
Tabela 15: Estimativa dos efeitos e ajustes do estudo de planejamento experimental para estresse da <i>Chlorella</i> sp.	79
Tabela 16: ANOVA do planejamento experimental para estresse da <i>Chlorella</i> sp.	81
Tabela 17: Perfil de ácidos graxos obtido nas diferentes condições de cultivo para as espécies em estudo.....	85

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
DQO	Demanda Química de Oxigênio
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ATP	Adenosina Trifosfato
NADP	Nicotinamida Adenina dinucleotídeo fosfato
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
ABS	Acrilonitrila Butadieno Estireno
PTFE	Politetrafluoroetileno
UV-VIS	Ultravioleta visível
ANOVA	Análise de variância
MQ	Média Quadrática
SQ	Soma Quadrática
GL	Grau de liberdade
pH	Potencial Hidrogeniônico
rpm	Rotações por minuto
°C	Graus Celsius
μmol	Micro mol
%	Porcentagem
ton	Toneladas
g	Gramas
mg	Miligramas
μg	Micrograma
L	Litro
mL	Mililitro
μL	Microlitro
d	Dia
h	Horas
min	Minutos
s	Segundos
há	Hectare
μm	Micrometro

m	Metro
cm	Centímetro
nm	Nanômetro
a	Ano
ln	Logaritmo natural
M	Molar
α	Alpha
γ	Gama
Pb	Produtividade de biomassa
Td	Tempo de duplicação de biomassa
μ	Taxa de crescimento específico
F _{cal}	Fator F calculado para distribuição de Fisher-Snedecor
F _{tab}	Fator F tabelado para distribuição de Fisher-Snedecor

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	19
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	22
2.1. Microalgas	22
2.1.1. <i>Botryococcus terribilis</i>	23
2.1.2. <i>Chlorella</i> sp.	25
2.2. Principais metabólitos das microalgas e suas aplicações.....	27
2.2.1. Lipídios.....	28
2.2.2. Hidrocarbonetos	31
2.2.3. Proteínas	33
2.2.4. Carboidratos	34
2.2.5. Pigmentos	36
2.3. Cultivo de microalgas	37
2.3.1. Sistemas de cultivo	39
2.3.2. Assimilação de CO ₂	44
2.3.3. Intensidade luminosa	44
2.3.4. Nutrientes no meio de cultivo.....	46
2.3.4.1. Alteração da concentração de nitrogênio	48
2.3.4.2. Alteração da concentração de fósforo	49
3. OBJETIVOS.....	49
3.1. Objetivo geral	49
3.2. Objetivos específicos	49
4. METODOLOGIA	50
4.1. Preparo do meio de cultivo	50
4.2. Cultivo em sistema fechado – Erlenmeyer	51
4.3. Cultivo em sistema aberto – <i>raceway</i>	52
4.4. Monitoramento do crescimento das espécies.....	53
4.5. Cultivo em condição de estresse.....	54
4.6. Extração e quantificação dos metabólitos.....	55
4.6.1. Hidrocarbonetos	55
4.6.2. Lipídios.....	58

4.6.3. Carboidratos	60
4.6.4. Proteínas	61
4.6.5. Pigmentos	62
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
5.1. Cultivo em sistema fechado – Erlenmeyer	63
5.2. Cultivo em sistema aberto – Raceway	67
5.3. Cultivo em condição de estresse.....	71
5.3.1. <i>Botryococcus terribilis</i>	71
5.3.2. <i>Chlorella</i> sp.	77
5.4. Caracterização do óleo	83
5.4.1. Ácidos graxos	83
5.4.2. Hidrocarbonetos	86
6. CONCLUSÕES	88
7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	89
REFERÊNCIAS.....	90
ANEXO 1.....	110
ANEXO 2.....	113
ANEXO 3.....	115
ANEXO 4.....	116
ANEXO 5.....	117

1. INTRODUÇÃO

As microalgas são organismos que apresentam elevada eficiência fotossintética, rápido crescimento e alta produtividade de metabólitos (MISHRA; MOHANTY, 2019). Esses microrganismos são capazes de assimilar entre 5 e 50 vezes mais CO₂ do que plantas de cultivo terrestres – o que pode auxiliar a conter os avanços do aquecimento global – além de não competirem por espaço com terras agricultáveis, podendo ainda ser cultivadas em águas residuárias ou salobras (JEEVAN KUMAR et al., 2017; SUNDARRAJAN et al., 2019). Os principais produtos do metabolismo das microalgas são: proteínas, carboidratos, pigmentos, lipídios e, no caso do gênero *Botryococcus*, hidrocarbonetos. Estes podem ser utilizados como matéria prima para diversos produtos de valor agregado, como nutracêuticos, biocombustíveis, cosméticos e suplementos alimentares (LAM et al., 2018).

Uma das espécies mais estudadas de microalgas é a *Chlorella* sp. Este gênero já é cultivado em larga escala, com aplicações na indústria alimentícia (SAFI et al., 2014). Entretanto, sua produtividade de lipídios (com perfil de ácidos graxos apropriados para síntese de biocombustíveis) abre a possibilidade de utilização desta espécie em um contexto de biorrefinaria - mercado que ainda não se encontra estabelecido e requer mais avanços nos estudos de cultivos e extração de metabólitos (BRASIL; SILVA; SIQUEIRA, 2017; LAM et al., 2018).

As microalgas do gênero *Botryococcus* tem a capacidade de expelir hidrocarbonetos, similares a combustíveis fósseis, para o meio extracelular, sem rompimento da membrana plasmática (GUY-OHLSON, 1992; HEGEDUS et al., 2014), e por isso têm despertado atenção de pesquisadores. Dentre as espécies deste gênero pode-se destacar a *Botryococcus terribilis*, a qual possui elevada resistência à condições adversas, alta capacidade de assimilação de CO₂ e elevada produtividade de lipídios e hidrocarbonetos (CABANELAS et al., 2013; FERREIRA et al., 2019a; GOH et al., 2019; NASCIMENTO et al., 2015). Esta microalga tem sido pouco abordada na literatura, mas demonstra fortes indícios de ser um fonte promissora para síntese de biocombustíveis, podendo encontrar ainda aplicações nas indústrias de cosméticos e suplementos alimentares (CABANELAS et al., 2013; FERREIRA et al., 2019a).

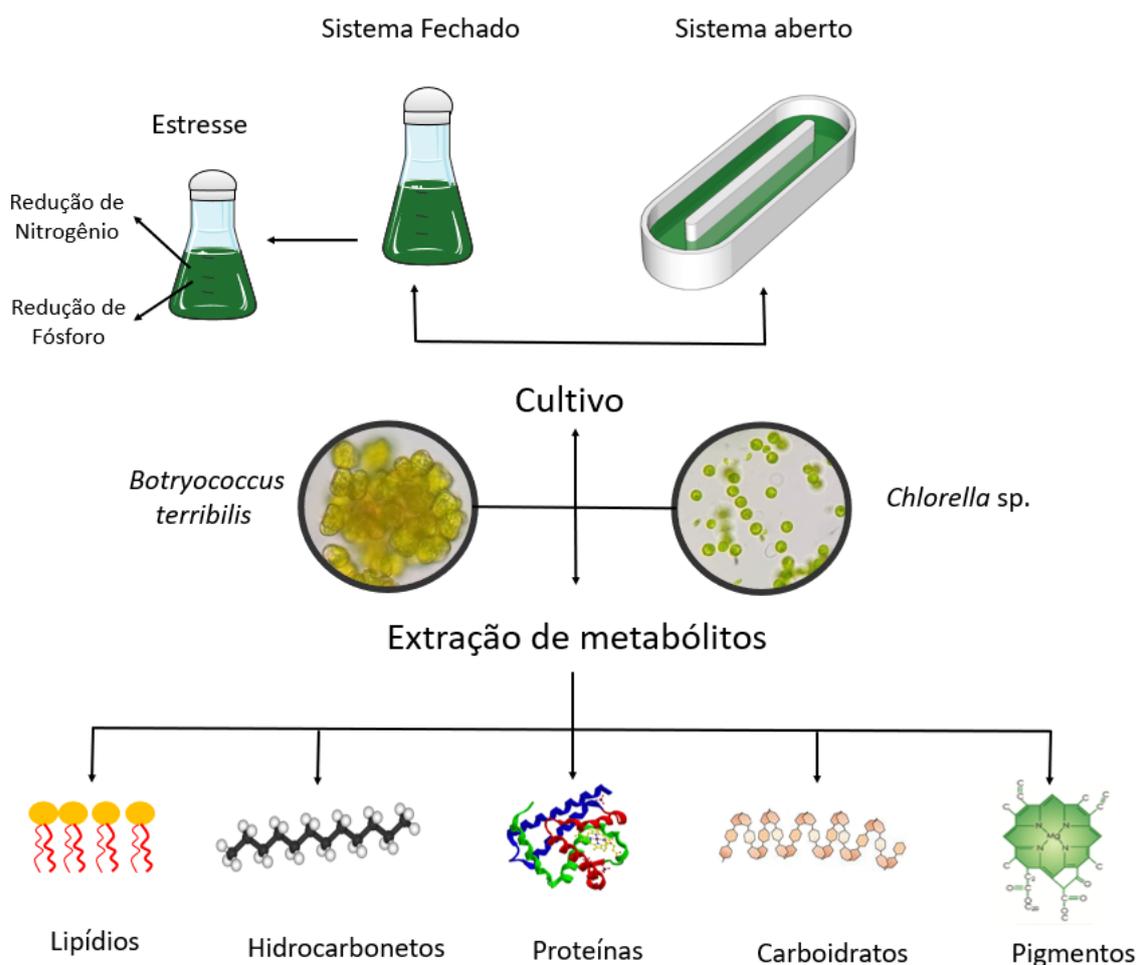
O cultivo de microalgas pode se dar em sistemas abertos (lagoas circulares ou *raceways*), fechados (fotobiorreatores) ou híbridos (fechado seguido de aberto) (RIOS PINTO; FERREIRA; TASIC, 2021). Os sistemas abertos possuem custos de instalação e operação significativamente inferiores aos sistemas fechados (MONCADA B; ARISTIZÁBAL M; CARDONA A, 2016; LAM et al., 2018; AZIZ et al., 2020). Em contrapartida, há menor controle das condições de cultivo, visto que se tem dependência do meio externo (FERREIRA et al., 2019a). Já nos sistemas fechados, a possibilidade de contaminação é reduzida e as condições de cultivo podem ser controladas; entretanto este cultivo está associado a um elevado custo (BRASIL; SILVA; SIQUEIRA, 2017; COLLING KLEIN; BONOMI; MACIEL FILHO, 2018; KHOO et al., 2019). Os sistemas híbridos, por sua vez, tem sido reportados como mais apropriados para o cultivo pois reduzem os custos ao passo que mantem o cultivo concentrado, evitando contaminações (ADESANYA et al., 2014; NARALA et al., 2016; COLLING KLEIN; BONOMI; MACIEL FILHO, 2018).

Além do sistema de cultivo, o crescimento e produtividade de metabólitos nas microalgas sofre influência da temperatura, pH, intensidade de luz, fotoperíodo, concentração de CO₂ e de nutrientes (ZHU; LI; HILTUNEN, 2016). Esses parâmetros podem ser alterados com o intuito de direcionar a atividade celular para beneficiar a síntese de determinado metabólito (MINHAS et al., 2016; ZHU; LI; HILTUNEN, 2016; CHEN et al., 2017). Nesse caso, diz-se que a cultura está submetida à condição de estresse. Embora a produtividade de determinados metabólitos possa aumentar durante o estresse, esta condição frequentemente afeta negativamente o crescimento das microalgas (CHEN et al., 2017). Por este motivo, recomenda-se o cultivo em duas etapas: inicialmente visando à divisão celular e aumento da concentração de biomassa e, em seguida, aplicando as condições de estresse para ampliar a síntese do metabólito de interesse (GUIHÉNEUF; KHAN; TRAN, 2016).

Na Figura 1 é apresentado um esquema representativo desta pesquisa, a qual se propõe a avaliar o cultivo das microalgas *Botryococcus terribilis* e *Chlorella* sp. em sistema fechado (utilizando Erlenmeyer), aberto (*raceway*) e em condição de estresse (por redução na concentração de nitrogênio e fósforo), seguido da extração e quantificação dos lipídios, proteínas, carboidratos, pigmentos e hidrocarbonetos (no caso da *B. terribilis*). Com isso pode-se fazer

uma análise completa de como as condições de cultivo afetam a produção de cada um dos metabólitos pelas espécies analisadas. Essa abordagem é pouco explorada na literatura, que comumente se atenta apenas a produção de apenas um metabólito – geralmente lipídios (AZIZ et al., 2020; JACKSON; BAHRI; MOHEIMANI, 2019; PRAVEENKUMAR et al., 2016). Além disso, para a microalga *B. terribilis* não há estudo em sistema aberto ou em condição de estresse com manipulação da concentração deste nutrientes. Dessa forma, este trabalho visa contribuir com a elucidação das condições que afetam o crescimento e síntese de biocompostos pelas microalgas em estudo, servindo como subsídio para tomada de decisão sobre os parâmetros de cultivo e aplicações da *B. terribilis* e da *Chlorella* sp. em um contexto de biorrefinaria.

Figura 1: Representação esquemática do estudo de cultivo e produção de metabólitos das microalgas *B. terribilis* e *Chlorella* sp.



Fonte: Autora, 2021.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Microalgas

O grupo taxonômico das algas abrange organismos procarióticos e eucarióticos com uma ampla gama genética e metabólica. Apenas no Brasil, tem-se mais de 3.500 espécies de algas catalogadas (BRASIL; SILVA; SIQUEIRA, 2017). Estruturalmente, as espécies variam de unicelulares, coloniais e filamentosas até estruturas multicelulares de grande porte. As algas são comumente setorizadas em microalgas (com tamanho entre 2 e 200 μm) e macroalgas – maiores que 200 μm (GRIFFITHS et al., 2016). As microalgas são classificadas em dois filós procarióticos (*Cyanophyta* e *Phrochlorophyta*) e nove eucarióticos (*Chlorophyta*, *Chlorarachniophyta*, *Glaucophyta*, *Dinophyta*, *Rhodophyta*, *Euglenophyta*, *Heterokontophyta*, *Cryptophyta* e *Haptophyta*). As microalgas verdes (*Chlorophytas*) e as cianobactérias (*Cyanophyta*) são os grupos mais abundantes na terra e por isso estão entre os mais estudados (GALANTE, 2018).

Estes microrganismos apresentam elevada eficiência fotossintética aliada ao rápido crescimento e a alta produtividade de metabólitos (MISHRA; MOHANTY, 2019). Vale destacar que as microalgas podem assimilar entre 5 e 50 vezes mais carbono que as plantas terrestres (ZHOU et al., 2017). Além disso, são capazes de utilizar carbono orgânico, com algumas espécies – como as *Chlorella*, *Botryococcus*, *Scenedesmus*, *Nannochloropsis*, *Spirulina* e *Oscillatoriales* - podendo ser cultivadas em águas salobras ou efluentes (BRASIL; SILVA; SIQUEIRA, 2017; KADIR et al., 2018; RAJESH BANU et al., 2020). Assim, podem ser utilizadas concomitantemente para o sequestro de carbono, tratamento de efluentes e produção metabólitos de interesse comercial; sem competir por espaço com terras aráveis.

Alguns dos produtos do metabolismo das microalgas são: proteínas, carboidratos, pigmentos e lipídios. Devido ao rico perfil nutricional desses compostos as microalgas passaram a ser estudadas, em um primeiro momento, como suplemento alimentar (GRIFFITHS et al., 2016). O avanço dos estudos com esses organismos mostrou que eles podem ser utilizados em uma diversa gama de produtos de alto valor agregado, como biocombustíveis, cosméticos e

produtos farmacêuticos (LAM et al., 2018). A Tabela 1 apresenta alguns gêneros de microalgas e as possíveis aplicações de seus metabólitos.

Tabela 1: Principais metabólitos de microalgas e suas aplicações (GRIFFITHS et al., 2016; RIOS PINTO; FERREIRA; TASIC, 2021).

Gênero de microalga	Metabólito	Aplicação
<i>Chlorella</i>	Proteínas	Alimentação humana e animal
<i>Chlorella</i>	Lipídios	Nutracêuticos e biocombustíveis
<i>Chlorella</i>	Carboidratos	Fármacos e biocombustível
<i>Chlorella</i>	Pigmentos	Nutracêuticos
<i>Botryococcus</i>	Hidrocarbonetos	Biocombustíveis e cosméticos
<i>Botryococcus</i>	Lipídios	Biocombustíveis e nutracêutico
<i>Botryococcus</i>	Carboidratos	Cosméticos, biomateriais e biocombustíveis
<i>Scenedesmus</i>	Proteínas	Alimentação humana e animal
<i>Scenedesmus</i>	Lipídios	Biocombustíveis e nutracêuticos
<i>Dunaliella</i>	Carboidratos	Fármacos
<i>Dunaliella</i>	Pigmento	Fármacos e cosméticos
<i>Spirulina</i>	Proteínas	Alimentação humana e animal
<i>Spirulina</i>	Pigmentos	Fármacos, nutracêuticos e cosméticos
<i>Hematococcus</i>	Pigmentos	Fármacos, nutracêuticos e cosméticos

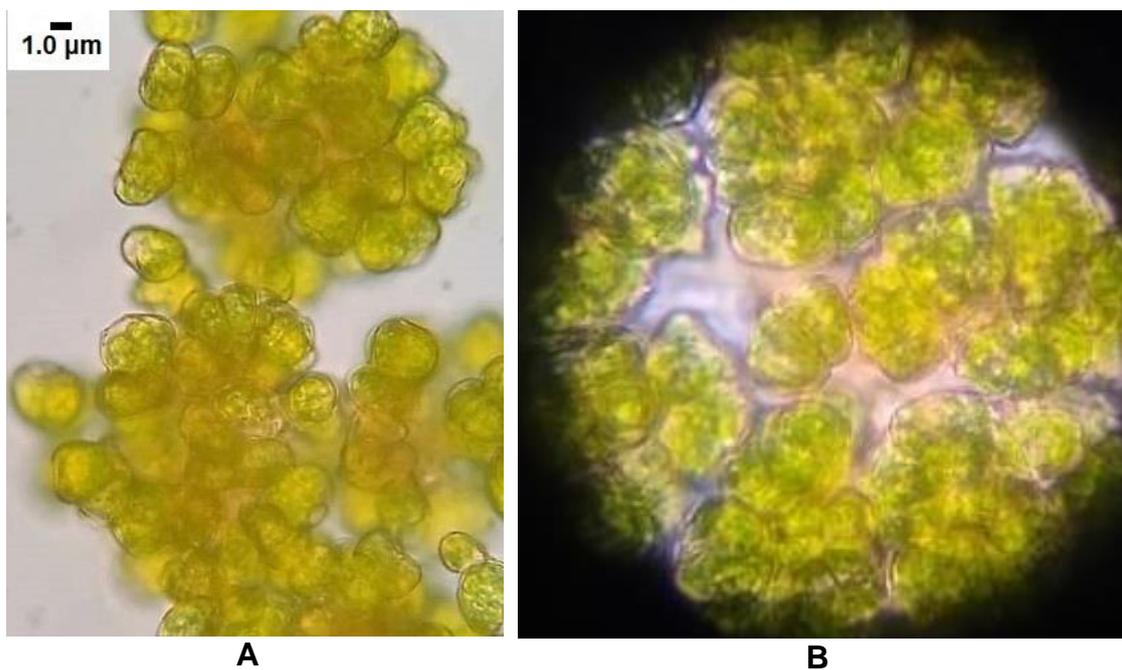
A quantidade de cada metabólito, bem como suas aplicações, varia de acordo com a espécie e conforme as condições de cultivo; fatores que serão explorados nas próximas sessões deste trabalho. A seguir é abordada de forma mais detalhada as duas espécies utilizadas nesse estudo: *Botryococcus terribilis* e *Chlorella* sp.; ambas do filo *Chlorophyta*.

2.1.1. *Botryococcus terribilis*

O gênero *Botryococcus* é composto por 13 espécies: *B. braunii*, *B. terribilis*, *B. protuberans*, *B. canadensis*, *B. comperei*, *B. australis*, *B. fernandoi*, *B. neglectus*, *B. pila*, e quatro tipos de *Botryococcus* sp. (KOMÁREK; MARVAN, 1992). Essas espécies são típicas de regiões tropicais, e podem se desenvolver

em águas doce, estuários e fiordes (MORAIS JUNIOR et al., 2020). A microalga *B. terribilis* apresenta morfologia irregular com células de dimensão entre 2-4 x 2-6 μm (KOMÁREK; MARVAN, 1992) (Figura 2-A). Esta microalga se agrupa em colônias (*clusters*) completamente envolvidas por mucilagem (Figura 2-B) (DE QUEIROZ MENDES et al., 2012; HEGEDŰS et al., 2015). O gênero *Botryococcus* tem como particularidade a liberação de lipídeos e hidrocarbonetos no meio extracelular sem rompimento da membrana plasmática; sendo estes seus principais metabólitos de interesse comercial (JIN et al., 2015). Os hidrocarbonetos extracelulares envolvem as colônias de células e são delimitados por uma matriz extracelular. Essa estrutura tem a função de proteger a colônia e auxiliar na captura de nutrientes (DE QUEIROZ MENDES et al., 2012; HEGEDŰS et al., 2015).

Figura 2: Colônias de microalgas *Botryococcus terribilis* vista em microscópio óptico com aumento de 1.000 vezes (A) agrupamento das células e (B) mucilagem extracelular.

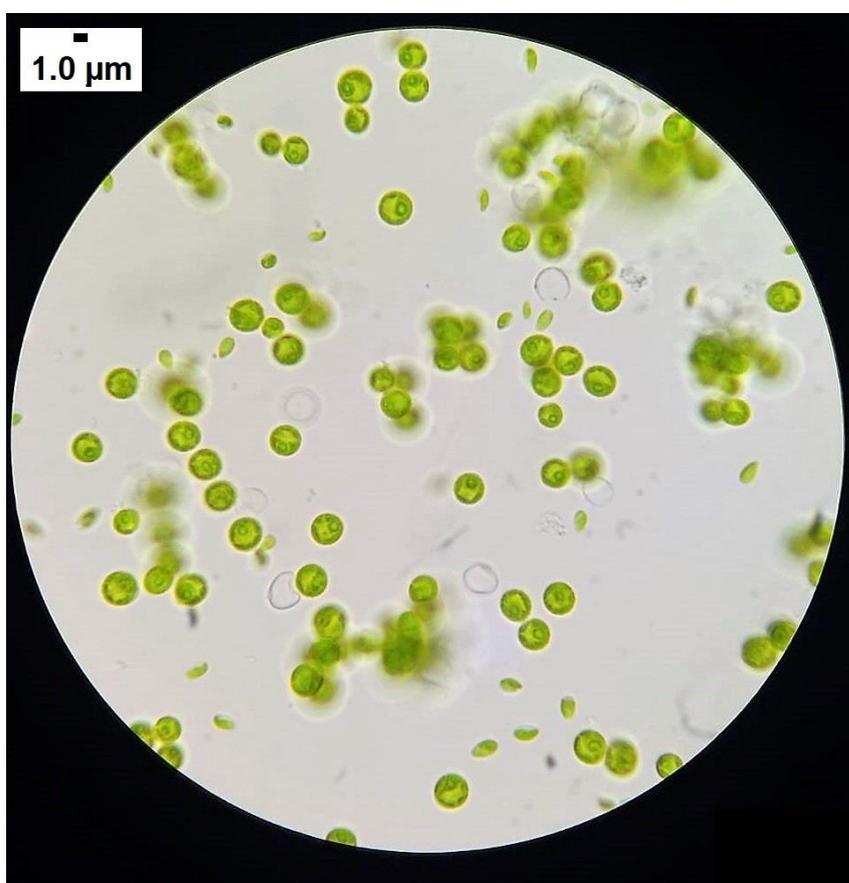


Fonte: Autora 2021.

A maioria das espécies de microalga utilizam em torno de 80 % do CO_2 consumido para reprodução - aumentando a produtividade de biomassa – e apenas 5 % para produção de terpenóides (BABA et al., 2012). Em contrapartida, as microalgas *Botryococcus* utilizam quantidades similares de CO_2 para o

assimilação de carbono e produção de metabólitos pelas microalgas em geral (SAFI et al., 2014; IKARAN et al., 2015; BERNARD; MAIRET; CHACHUAT, 2016). Essa espécie possui morfologia esférica (Figura 4), com diâmetro entre 2 e 10 μm , podendo se agrupar em colônias ou permanecer como células isoladas. São comumente encontradas em ambientes de água doce, porém algumas linhagens têm capacidade de se desenvolver em águas salgadas (SAFI et al., 2014).

Figura 4: Cultura de microalgas *Chlorella* sp. vista em microscópio óptico com aumento de 1.000 vezes.



Fonte: Autora, 2021.

O cultivo da *Chlorella* em larga escala já acontece a mais de uma década para produção de biomassa proteica e nutracêuticos (IKARAN et al., 2015). As espécies de *Chlorella* mais abordadas na literatura são: *Chlorella vulgaris*, *Chlorella* sp. e *Chlorella pyrenoidosa* (MORAIS JUNIOR et al., 2020). A biomassa da *Chlorella* sp. é rica em proteínas, carotenoides, vitaminas, sais minerais, e ácidos graxos; e por isso grande parte dos estudos com essa espécie

tem enfoque em suplementação alimentar. Entretanto, devido ao teor de lipídios e ao perfil de ácido graxos metabolizados por essa microalga, ela também é uma fonte promissora para produção de biocombustíveis (FERREIRA et al., 2019a; MORAIS JUNIOR et al., 2020).

2.2. Principais metabólitos das microalgas e suas aplicações

As microalgas podem produzir diversos metabólitos de interesse comercial. Nessa sessão será abordada a biossíntese destes metabólitos, suas especificações para as espécies em estudo, e suas possíveis aplicações. A Tabela 2 apresenta as porcentagens de lipídios, proteínas e carboidratos que podem ser obtidos com as espécies em estudo neste trabalho. Pode-se notar que a *Chlorella* sp. apresenta maior produtividade de biomassa, podendo atingir $0,77 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, enquanto o maior valor reportado para a *B. terribilis* foi de $0,28 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$. A maioria dos estudos com a *B. terribilis* alcança mais de 30 % de lipídios, enquanto que na *Chlorella* sp. tem-se em torno de 20 %. Quanto às proteínas, com ambas as espécies foi possível obter mais que 30 % deste metabólito. No que se refere aos carboidratos, nota-se que a *B. terribilis* apresenta porcentagem significativamente menores, variando entre 5-15 % enquanto com a *Chlorella* sp. pode-se obter até 47 % de carboidratos na biomassa.

Tabela 2: Porcentagem em massa seca dos metabólitos das microalgas *Botryococcus terribilis* e *Chlorella* sp.

Espécie	Pb ($\text{g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$)	Lipídios ^a (%)	Proteínas ^b (%)	Carboidratos ^c (%)	Referencia
<i>B. terribilis</i>	0,11-0,24	30-31	37-39	14-15	NASCIMENTO et al., 2015
<i>B. terribilis</i>	0,11-0,18	18-40	46-61	7-11	CABANELAS et al., 2015
<i>B. terribilis</i>	0,015	37	13	13	FERREIRA et al., 2019b
<i>B. terribilis</i>	0,20	49	N.R.	N.R.	NASCIMENTO et al., 2013

<i>B. terribilis</i>	0,10–0,28	9-26	67-75	5-8	CABANELAS et al., 2013
<i>Chlorella</i> sp.	0,21	23	N.R.	30	NAYAK et al., 2020a
<i>Chlorella</i> sp.	0,06-0,25	15-26	51-68	15-27	LU et al., 2015
<i>Chlorella</i> sp.	0,20-0,77	9-18	36-58	15-37	NORDIN; YUSOF; SAMSUDIN, 2017
<i>Chlorella</i> sp.	0,04	22	19	47	FERREIRA et al., 2019b
<i>Chlorella</i> sp.	0,77	44	N.R.	35	NAYAK et al., 2020a

Nota: N.R.: não reportado; Pb: produtividade volumétrica de biomassa; ^a quantificado pelo método de Bligh & Dyer (1959); ^b quantificado pelo método de Bradford (1976); ^c quantificado pelo método fenol-sulfúrico (DUBOIS et al., 1956).

2.2.1. Lipídios

As microalgas sintetizam dois tipos de lipídios: os neutros (monoglicerol, diglicerol, triglicerol e esteróis), os quais possuem a função de armazenamento energético; e os polares (fosfolipídeos e glicolipídeos), que formam a membrana celular (DESHMUKH; KUMAR; BALA, 2019). Dentre os lipídios neutros o mais comum é o triacilglicerol, que é constituído por três moléculas de ácidos graxos ligada à glicerol (HALIM; DANQUAH; WEBLEY, 2012).

A biosíntese de lípidios pode ser dividida em dois estágios de acumúlo e maturação (HIROSE et al., 2013; CHENG et al., 2019b). No primeiro estágio os lipídios são armazenados próximo ao ápice celular, onde aumentam em tamanho e quantidade. Quando estes são secretados, inicia-se o segundo estágio, em que o fenômeno passa a acontecer na região basolateral da célula, a qual se torna o local permanente de armazenamento de lipídios (CHENG et al., 2019b).

Os ácidos graxos são metabolizados pelos plastídeos e secretados pelo retículo endoplasmático ou pelo sistema de Golgi (HIROSE et al., 2013). Eles são classificados em saturados ou insaturados – este ultimo é subdividido em

monoinsaturados e poliinsaturados. A Tabela 3 apresenta o perfil de ácidos graxos das microalgas *Botryococcus terribilis* e *Chlorella* sp. obtidos por diferentes autores.

Apesar da biosíntese de ácidos graxos variar conforme as condições de cultivo, pode-se verificar que, de modo geral, a *Botryococcus terribilis* sintetiza maiores quantidades de ácidos graxos saturados ou monoinsaturados; enquanto que a *Chlorella* sp. apresenta quantidades semelhantes de ácidos graxos saturados e insaturados – com frações similares de monoinsaturados e polinsaturados. Nas duas espécies os ácidos graxos de maior relevância e abundância são ácido palmítico (quantidade entre 24-40 % na *Botryococcus terribilis* e entre 14-33 % na *Chlorella* sp.) e o ácido oléico (entre 18-40 % na *Botryococcus terribilis* e entre 20-26 % na *Chlorella* sp.).

Tabela 3: Perfil de ácidos graxos da *Botryococcus terribilis* e da *Chlorella* sp. em porcentagem.

Ácido graxo (%)		<i>B. terribilis</i>	<i>B. terribilis</i>	<i>B. terribilis</i>	<i>B. terribilis</i>	<i>Chlorella</i> sp.	<i>Chlorella</i> sp.	<i>Chlorella</i> sp.	<i>Chlorella</i> sp.
		CABANELAS et al., 2013	NASCIMENTO et al., 2013	NASCIMENTO et al., 2015	FERREIRA et al., 2019b	MALIBARI et al., 2018	MATHIMANI et al., 2021	FERREIRA et al., 2019b	ANDRULEVICIUT E et al., 2014
Butírico	C4:0	2,45	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Mirístico	C14:0	1,70-2,60	0,73	N.D.	N.D.	0,5	7,87	N.D.	0,31
Palmítico	C16:0	23,90-37,60	40,31	33,32-35,40	9,61	14,5	33,42	18,60	15,54
Palmitoléico	C16:1	2,46-5,89	3,16	2,86-3,23	4,27	4,1	15,42	23,63	2,1
Heptadecanoico	C17:0	8,16-16,62	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1,71
Heptadecenoico	C17:1	3,04	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Esteárico	C18:0	6,96-20,70	3,12	2,40-5,42	18,39	2,7	N.D.	N.D.	5,76
Oléico	C18:1c	18,00-29,21	39,74	27,20-37,91	2,41	19,3	20,30	4,02	26,2
Linoléico	C18:2w6	7,32-11,51	5,02	3,87-18,15	11,98	24,9	10,96	9,39	16,76
α-linolênico	C18:3w3	7,44	7,22	5,87-9,94	N.D.	12,8	12,01	22,37	8,42
Ácido araquídico	C20:0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	4,13
Gadoléico	C20:1w9	N.D.	2,81	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	2,9
Tetracosenoico	C24:1w9	3,17-14,60	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	3,03
Saturados		48,56-71,81	43,15	39,30-41,05	28,00	17,70	41,29	18,60	34,94
Insaturados		26,49-51,44	56,85	48,47-69,94	21,07	77,90	58,69	59,41	65,06
Monoinsaturados		26,49-36,68	44,29	35,60-44,90	6,68	31,20	35,72	27,65	39,88
Poliinsaturados		14,76 – 18,95	12,56	12,87-25,04	14,39	46,70	22,97	31,76	25,18

Nota: N.D.: Não Detectado.

Ao sintetizar um combustível a partir de lipídios de microalgas, o perfil de ácidos graxos tem grande influência na qualidade do produto. Os ácidos graxos saturados geram biodiesel com número de cetano maior, ou seja, com maior qualidade na combustão interna (DESHMUKH; KUMAR; BALA, 2019). Entretanto, também possuem maior ponto de entupimento, sendo pouco adequados para regiões de clima frio. Em contrapartida, elevada quantidade de insaturações torna a molécula mais instável quimicamente; sendo mais suscetível à oxidação e polimerização do combustível (NASCIMENTO et al., 2015; DESHMUKH; KUMAR; BALA, 2019). Dessa forma, os perfis de ácidos graxos com maiores quantidades de mono-insaturações são mais adequados para síntese de biodiesel (NASCIMENTO et al., 2015).

As espécies em estudo também acumulam quantidades relevantes de ácido oléico (C18:1), linoléico (C18:2) e α -linolênico (C18:3); também conhecidos como ômega 9, -6; -3; respectivamente. Estes ácidos graxos são associados a benefícios cardiovasculares, controle de colesterol, melhora da imunidade, entre outros benefícios à saúde (FERREIRA et al., 2019a). Sendo por isso, interessante sua aplicação como nutracêutico.

2.2.2. Hidrocarbonetos

Qin (2010) mostrou que, na maioria das microalgas verdes, os hidrocarbonetos de cadeia longa (com mais de 24 carbonos) representam menos de 1 % do peso seco da biomassa. Até o momento, apenas nas espécies do gênero *Botryococcus* foram identificadas quantidades significativas desses hidrocarbonetos (QIN, 2010; HEGEDUS et al., 2014; CHENG et al., 2019b).

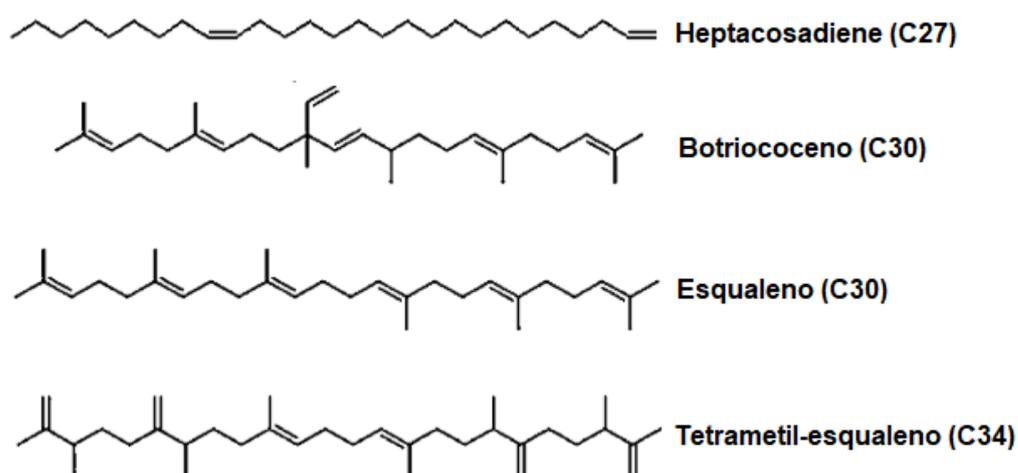
A síntese dos hidrocarbonetos extracelulares pode ocorrer por duas vias: com maturação no retículo endoplasmático, sendo liberados pelas organelas celulares; ou secretados como material precursor, atingindo a maturação apenas no espaço extracelular (CHENG et al., 2019b) (Figura 3 – sessão 2.1.1). O perfil de hidrocarbonetos das *B. terribilis* foi determinado por Hegedús et al., (2015) (Tabela 4). Os autores analisaram oito linhagens de *B. terribilis* e afirmaram que todas elas metabolizam em maior quantidade botriococenos e metilesqualenos, com pequenas frações de alcadienos (Figura 5). Os botriococenos são triterpenos polimetilados e possuem fórmula geral C_nH_{2n-10} com n variando de 30

a 37, que podem se apresentar em vários isômeros (EROGLU; MELIS, 2010; QIN, 2010). Já os alcadienos são hidrocarbonetos de cadeia aberta que apresentam duplas ligações e são representados pela fórmula geral C_nH_{2n-2} , sendo que nas *Botryococcus* tem-se alcadienos de 23 a 33 carbonos (HEGEDŪS et al., 2015).

Tabela 4: Hidrocarbonetos sintetizados por diferentes linhagens de *B. terribilis* em porcentagem de peso seco (HEGEDŪS et al., 2015).

Linhagem	C29	C30	C31	C32	Total de hidrocarbonetos (%)
413	5.03	0.39	10.13	10.19	25.74
414	2.66	0.02	0.67	10.65	14.00
416	4.93	0.00	8.26	5.76	18.95
418	0.87	1.96	6.94	7.60	17.37
440	1.02	0.23	15.46	8.40	25.11
442	2.84	0.35	11.41	6.58	21.18
870	0.88	0.00	0.32	7.26	8.46
870	0.85	0.32	1.56	15.85	18.58

Figura 5: Representação dos hidrocarbonetos produzidos pelas *Botryococcus*.



Fonte: Adaptado de Qin (2010).

Os hidrocarbonetos sintetizados pela *B. terribilis* são descritos como bons precursores para combustíveis com alto poder calorífico (CABANELAS et al.,

2015). Alguns estudos sugerem a participação desta espécie na biossíntese de hidrocarbonetos encontrados em depósitos geológicos e em sedimentos de petróleo (GUY-OHLSON, 1992; VOLKMAN, 2014). Isso reforça as semelhanças entre os hidrocarbonetos produzidos pela *B. terribilis* e os combustíveis fósseis (HEGEDUS et al., 2014). Esses hidrocarbonetos podem ser processados para obter combustível para aviação, biodiesel, diesel verde ou biogasolina (DE QUEIROZ MENDES et al., 2012; HEGEDUS et al., 2014). Eles também podem ser uma fonte sustentável para a indústria de cosméticos, como hidratante de pele e agente rejuvenescedor (NIEHAUS et al., 2012; CHAUDRY; BAHRI; MOHEIMANI, 2017).

2.2.3. Proteínas

As proteínas são moléculas de grande relevância na composição das microalgas visto que estão envolvidas em funções vitais para a célula, tais como crescimento, reparo e manutenção, regulação das atividades celulares e defesa contra invasores e patógenos (SAFI et al., 2014). A qualidade nutricional de uma proteína é determinada pelo perfil de aminoácidos que a compõe.

Na *Chlorella* sp., as proteínas podem corresponder a mais de 50 % da biomassa (GALARZA, 2019). Aproximadamente 20 % das proteínas da microalga estão ligadas à parede celular, 50 % são internas e 30 % migram entre o interior e o exterior da célula (VIEGAS et al., 2015). As proteínas sintetizadas pela *Chlorella* sp. são ricas em aminoácidos essenciais e não essenciais. Pode-se destacar os seguintes aminoácidos e porcentagens em peso seco: ácido glutâmico (12 %), ácido aspártico (9%), arginina (8 %), alanina (8 %), leucina (8 %), lisina (8 %), fenilalanina (5 %); isoleucina (4 %) e histidina (2 %) (VIEGAS et al., 2015). Assim, as proteínas metabolizadas pela *Chlorella* sp. se comparam favoravelmente ao padrão de nutrição humana (GALARZA, 2019). Outra importante aplicação das proteínas desta microalga é como emulsificante. Visto que, nos mais diversos métodos de extração de proteínas, os emulsificantes confeccionados a partir da proteína da *Chlorella* tem apresentado qualidade comparável aqueles atualmente comercializados (DESAI et al., 2014; GALANTE, 2018; LAM et al., 2018).

As proteínas, tanto estruturais quanto enzimáticas, representam entre 30-40 % do peso seco da *B. terribilis* (NASCIMENTO et al., 2013, 2015; CABANELAS et al., 2015). Elas compõem a parede celular e a bainha fibrilar da matriz extracelular (WEISS et al., 2012; TATLI et al., 2018). As proteínas da matriz extracelular têm papel fundamental na polimerização de monômeros ou oligômeros de açúcar e formam as fibras polissacarídicas que se estendem sob a colônia, interligando as células (TATLI et al., 2018). Além disso, as glicoproteínas podem servir de apoio as fibras polissacarídicas, uma vez que estão ligadas aos carboidratos até a parede de retenção que limita a colônia (WEISS et al., 2012; XIAO; ZHENG, 2016; TATLI et al., 2018). Alguns estudos têm sugerido que as enzimas extracelulares têm um papel importante na degradação de biopolímeros, permitindo que as células das colônias os utilizem como fonte de energia e nutriente (FLEMMING; WINGENDER, 2010).

As proteínas das microalgas podem ser uma fonte de biopeptídeos, os quais proporcionam benefícios à saúde além do valor nutricional, sendo utilizados pela indústria farmacêutica (KORHONEN; PIHLANTO, 2006). Os biopeptídeos tem, entre outras funções, as seguintes propriedades: redução do apetite, imunorregulação, anti-hipertensiva, antioxidante, antimicrobiana, antiosteoporótica, anticoagulante; e proteção contra radiação (KORHONEN; PIHLANTO, 2006; FAN et al., 2014; BEAULIEU et al., 2015). Vale ressaltar que a incorporação de metabólitos de *Botryococcus* na suplementação alimentar – humana ou animal - requer mais ensaios clínicos para avaliação do impacto na saúde.

2.2.4. Carboidratos

Os carboidratos representam um grupo de açúcares redutores e polissacarídeos (DUBOIS et al., 1956). O polissacarídeo mais abundante tanto na *Chlorella* como na *Botryococcus* é o amido, o qual é composto por amilose, amilopectina e demais polímeros com função de armazenamento energético (HEGEDŰS et al., 2015; VIEGAS et al., 2015; LAM et al., 2018). Ambas as microalgas analisadas neste estudo, metabolizam ramnose, arabinose e glicose. Além disso, a *Botryococcus terribilis* também sintetiza ácido glucurônico e alguns carboidratos incomuns, como metil ramnose e metil hexose (ARÉVALO-

GALLEGOS et al., 2018; CHENG et al., 2019b). Já na *Chlorella* sp. são também identificados galactose, xilose, e manose (HERNÁNDEZ et al., 2015; VIEGAS et al., 2015; KOYANDE et al., 2019).

A *Chlorella* sp. possui parede celular de alta resistência, composta por quitosana, celulose e hemicelulose – além de proteínas, lipídios e minerais (GALANTE, 2018). Esta estrutura atua como uma barreira fibrosa na proteção e estruturação da célula. Na *Botryococcus*, destacam-se a camada fibrilar interna - composta por polissacarídeos mucilaginosos - e a camada externa (na estrutura das colônias) de polissacarídeos associados a proteínas (TANOI; KAWACHI; WATANABE, 2011; GARCÍA-CUBERO et al., 2018). Esse arranjo tem a função de limitar o ataque de predadores e patógenos, facilitar o acesso à energia luminosa, ajudar na interação com o meio de cultura - o que conseqüentemente aumenta a troca de nutrientes e CO₂ - e ampliar o reconhecimento entre a célula de algas e as espécies simbióticas (TATLI et al., 2018; HUSSAIN et al., 2020).

Conforme mostrado na Figura 3, os lipídios e os carboidratos possuem o glicerol-3-fosfato como um precursor para sua síntese. Assim, esses metabólitos podem ser interconvertíveis (MEHRABADI; FARID; CRAGGS, 2017). Como as *Botryococcus* apresentam alto percentual de lipídios, a fração de carboidratos na célula é menor. No entanto, os monômeros e as proporções dos polissacarídeos podem variar significativamente com as condições fisiológicas, fazendo com que as microalgas modulem sua biossíntese de polissacarídeos para se adaptarem ao ambiente (TANOI; KAWACHI; WATANABE, 2011; WILLIS et al., 2013; XIAO; ZHENG, 2016).

Os carboidratos das microalgas podem ser usados como prebióticos, alimentos funcionais, estabilizantes, geleificantes e espessantes, com aplicação nas indústrias alimentícia, cosmecêutica e farmacêutica (TANOI; KAWACHI; WATANABE, 2011; GARCÍA-CUBERO et al., 2018; GALARZA, 2019). No entanto, ensaios clínicos são necessários para estabelecer seu uso no mercado (TANG et al., 2020). O comportamento pseudoplástico destes carboidratos também permite sua aplicação em tintas de parede ou têxteis, produtos de lavanderia, adesivos e papel (CHENG et al., 2013, 2019b; TATLI et al., 2018). Estudos recentes analisaram a capacidade de utilização dos exopolissacarídeos secretados por espécies de *Botryococcus* na produção de poliéster (GARCÍA-CUBERO et al., 2018). Além disso, Gallegos *et al.* (2018) sugerem que esses

exopolissacarídeos podem atuar como agentes redutores e capeadores para a síntese de nanopartículas.

Os carboidratos das microalgas também podem ser utilizados para produzir bioetanol por rota de fermentação (HO et al., 2013; GÜNERKEN et al., 2015; HERNÁNDEZ et al., 2015). A principal vantagem do bioetanol de microalgas sobre o etanol lignocelulósico é a conversão de seus monossacarídeos mais facilmente - uma vez que os carboidratos de microalgas não estão ligados à lignina (ABBA et al., 2020). Atualmente, alguns estudos avaliam a produção de bioetanol com microalgas; no entanto, essa rota ainda não está consolidada (MARKOU; ANGELIDAKI; GEORGAKAKIS, 2012; SIMAS-RODRIGUES et al., 2015; KOYANDE et al., 2019). Vale ressaltar que a produção de bioetanol a partir de biomassa de microalgas está integrada à produção de biodiesel para maior aproveitamento da biomassa (HO et al., 2013; HERNÁNDEZ et al., 2015; ASHOKKUMAR et al., 2017).

2.2.5. Pigmentos

As microalgas são uma fonte sustentável de pigmentos: biomoléculas que são essenciais no metabolismo fotossintético (CHENG et al., 2019b). Os pigmentos das *Chlorophyta* podem ser divididos em clorofilas e carotenóides (ANUNCIATO; DA ROCHA FILHO, 2012). As clorofilas são pigmentos verdes não covalentemente ligados a apoproteínas (XIAO; ZHENG, 2016), que são solúveis em óleos e responsáveis pela conversão da luz em energia química, representando, em geral, entre 0,5 e 1,0 % da massa seca das microalgas (VIEGAS et al., 2015; GALARZA, 2019). A clorofila pode apresentar quatro tipos de estruturas, a saber, a, b, c ou d; sendo que as microalgas verdes sintetizam as clorofilas do tipo a e b (BABA et al., 2012). Os carotenóides são pigmentos amarelos ou laranja. Eles absorvem luz nos espectros em que as clorofilas são menos eficientes e protegem a estrutura de irradiância excessiva ou oxigênio reativo (BABA et al., 2012).

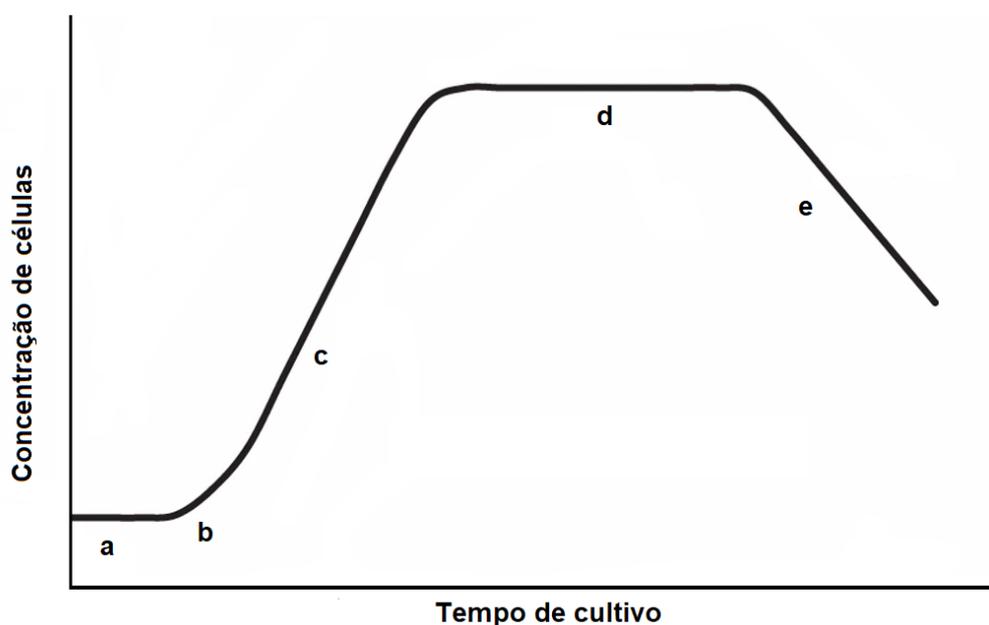
O perfil de carotenóides da *B. terribilis* não se encontra detalhado na literatura; no entanto, a *B. braunii* raça B (a espécie mais semelhante a *B. terribilis*) sintetiza principalmente luteína, com frações de α e β -carotenos, loraxantina, cantaxantina, neoxantina, equinenona e violaxantina (CHENG et al.,

2019b). Também é possível obter pigmentos no meio extracelular, como cetocarotenóide e equinenona (ANUNCIATO; DA ROCHA FILHO, 2012). A quantidade de pigmentos na *B. terribilis* foi determinada por Cabanelas *et al.* (2013), atingindo $3,73 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de clorofilas e $0,84 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de carotenóides.

Na *Chlorella* sp. foi obtido em torno de $14 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de clorofilas a e b (FERREIRA *et al.*, 2019b). Quanto aos carotenóides, Viegas *et al.*, (2015) afirmam que a *Chlorella* sp. é rica em luteína. A luteína é utilizada como nutracêutico, pois atua na prevenção de doenças degenerativas, cardiovasculares e alguns tipos de câncer (ANUNCIATO; DA ROCHA FILHO, 2012; VIEGAS *et al.*, 2015; CHENG *et al.*, 2019c). Estes pigmentos também encontram aplicações como agentes antiinflamatórios, antioxidantes, antimicrobianos, e como reguladores da atividade imunomoduladora (ASHOKKUMAR; RENGASAMY, 2012; MA *et al.*, 2015; KHOO *et al.*, 2019). Além disso podem ser utilizados como agentes de tingimento em indústrias de cosméticos (VIEGAS *et al.*, 2015).

2.3. Cultivo de microalgas

O crescimento das microalgas e a produtividade dos metabólitos é dependente das condições de cultivo. Durante o cultivo das microalgas, pode-se identificar cinco fases de crescimento (Figura 6): (a) lag, fase na qual a espécie está se adaptando ao meio e por isso não há aumento significativo de células; (b) aceleração, na qual se inicia o incremento de células no meio; (c) exponencial, caracterizada pela obtenção da máxima taxa de crescimento durante o cultivo; (d) estacionária, na qual a população de microalga atinge seu auge e não mais aumenta, nessa etapa a taxa de reprodução é igual a taxa de morte; (e) declínio, onde há a morte das células (MATA; NIO MARTINS; CAETANO, 2010).

Figura 6: Fases do crescimento das microalgas.

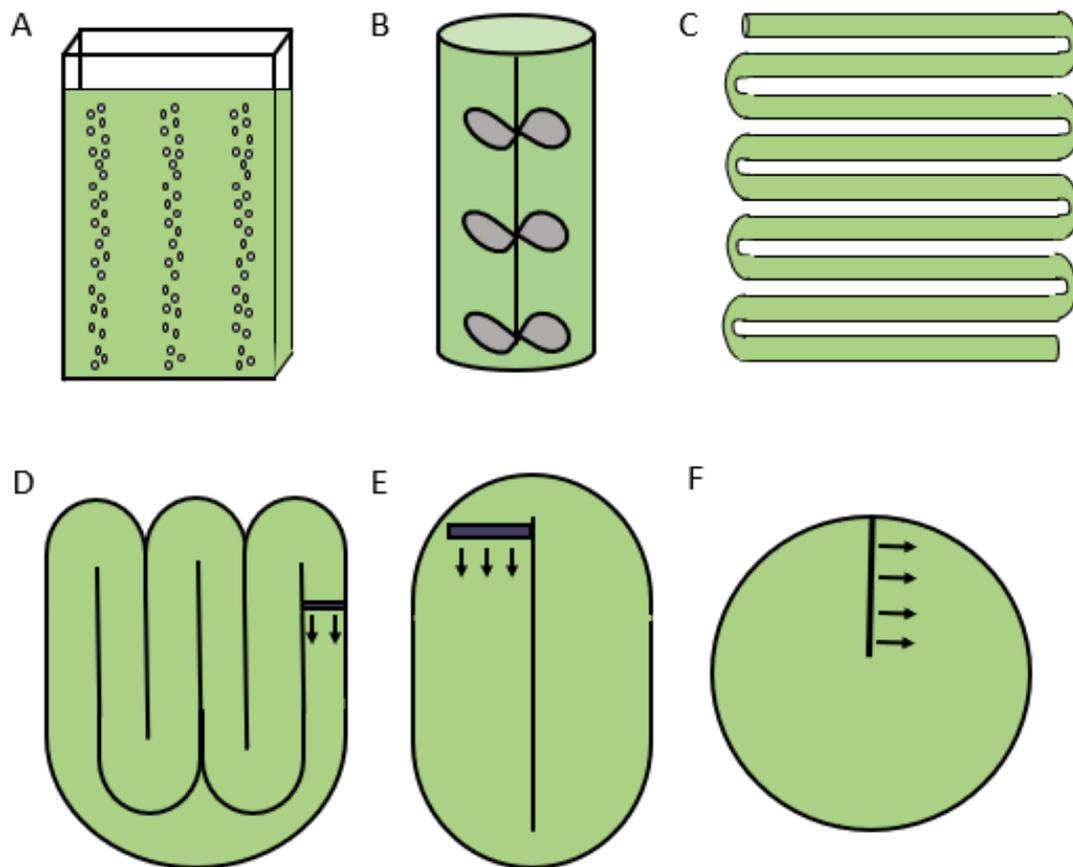
Fonte: Adaptado de Klein (2013).

O cultivo das microalgas pode acontecer por três tipos de metabolismo: autotrófico, heterotrófico ou mixotrófico (KLEIN, 2013). No regime autotrófico a microalga utiliza a luz solar como única fonte de energia, e utiliza apenas o CO₂ como fonte de carbono (SPIJKERMAN; LUKAS; WACKER, 2017). Este cultivo é o de menor risco de contaminação (FERREIRA et al., 2019a). Já no regime heterotrófico a cultura é mantida no escuro durante todo o período, metabolizando fontes externas de carbono orgânico – como açúcares e ácido acético (KLEIN, 2013; FERREIRA et al., 2019a). O cultivo heterotrófico costuma atingir maior produtividade (BRASIL; SILVA; SIQUEIRA, 2017), porém é mais suscetível a contaminação por fungos, bactérias ou outras espécies de algas (SPIJKERMAN; LUKAS; WACKER, 2017). O cultivo mixotrófico une as duas abordagens, podendo apresentar períodos de claro e de escuro, em que a microalga metaboliza tanto o CO₂ como fontes de carbono orgânico (MORENO-GARCIA et al., 2017). Este método tem se mostrado mais viável economicamente (JUDD et al., 2017; ZHOU et al., 2017) e mais apropriado para aplicações em larga escala (BRASIL; SILVA; SIQUEIRA, 2017). Vale ressaltar que a mesma espécie de microalga pode se desenvolver com diferentes metabolismos, modulando-o conforme as condições de cultivo aplicadas (KLEIN, 2013).

2.3.1. Sistemas de cultivo

O cultivo de microalgas pode se dar em sistemas abertos ou fechados (Figura 7). Os sistemas abertos são compostos por lagoas artificiais, as quais podem ser circulares ou do tipo *raceways*, sendo a última a mais utilizada em larga escala. Os *raceways* são formados por um ou mais canais de recirculação de meio, em ciclo fechado, com profundidade entre 20-50 cm (para melhor assimilação da luz) e dezenas de metros de comprimento (KLEIN, 2013). Neste sistema é acoplado um impelidor para agitação do meio, o qual promove a circulação da cultura. Essa rotação auxilia no acesso aos nutrientes do meio e no aporte de CO₂, além de evitar a sedimentação e fazer com que as células possam ter acesso mais igualitário à luz (KLEIN, 2013; AMARAL, 2014; CHENG et al., 2019a). Os sistemas fechados são constituídos por fotobiorreatores em diferentes formatos (planos, em sacos, em tubos horizontais ou verticais) com os mais variados sistemas de agitação e aeração (CHENG et al., 2019a). Pode-se utilizar luz solar ou artificial nos fotobiorreatores. Recomenda-se que a espessura dos fotobiorreatores não excedam 10 cm, devido à dificuldade de penetração da luz; principalmente em meios com alta concentração de biomassa (KLEIN, 2013; NARALA et al., 2016).

Figura 7: Sistemas de cultivo (A) fotobiorreator de placa plana; (B) fotobiorreator tubular; (C) fotobiorreator tubular horizontal; (D) *raceway* de múltiplos canais; (E) *raceway* de com um único canal; (F) lagoas circulares.



Fonte: Autora 2021 – Retirado de artigo em fase de revisão.

Os sistemas abertos possuem menor custo de instalação e operação, tem baixo consumo de energia, e manutenção simplificada. Entretanto, são suscetíveis às variações ambientais – como temperatura e regime de chuvas – apresentam maiores riscos de contaminação e perdem grandes volumes de água por evaporação (LIU et al., 2013; FERREIRA et al., 2019a). As maiores vantagens do uso de fotobiorreatores são o controle das condições de cultivo, a otimização da assimilação de CO_2 e o menor risco de contaminação (FERREIRA et al., 2019b). Por outro lado, as desvantagens estão associadas a custos de implementação e consumo de energia (LIU et al., 2013); além do acúmulo de oxigênio – produto da fotossíntese – e altas tensões de cisalhamento sobre as células (ADESANYA et al., 2014).

Alguns autores têm sugerido maior viabilidade econômica ao utilizar sistemas híbridos (ADESANYA et al., 2014; MONCADA B; ARISTIZÁBAL M; CARDONA A, 2016; NARALA et al., 2016; FERREIRA et al., 2019a), o qual consiste em manter um inóculo resistente sendo cultivado em fotobiorreator enquanto o cultivo em larga escala acontece em *raceways*. Essa abordagem se mostrou vantajosa para diversas microalgas, reduzindo custos e mantendo o cultivo resistente à contaminações (ADESANYA et al., 2014; NARALA et al., 2016; AZIZ et al., 2020; DASAN et al., 2019).

A Tabela 5 apresenta resultados obtidos por diferentes autores em sistemas de cultivo fechado ou aberto com as microalgas em estudo. Como o crescimento da *Botryococcus terribilis* em *raceway* foi analisado apenas por modelagem matemática – até onde é de nosso conhecimento – foram adicionados estudos com a espécie *Botryococcus braunii* a nível de comparação. Pode-se notar que com o cultivo a *B. terribilis* possui taxa de crescimento específico ($0,11 - 0,16 \text{ d}^{-1}$) consideravelmente menor que a *Chlorella* sp. ($0,26 - 0,73 \text{ d}^{-1}$), fazendo com que o tempo de duplicação da *B. terribilis* também seja maior. Nascimento et al. (2014) utilizou os resultados obtidos em escala laboratorial para estimar a produtividade volumétrica da *B. terribilis* em *raceway* e em fotobiorreator tubular. Os autores estimaram que, com o fotobiorreator, pode-se obter quase o dobro da produtividade de biomassa por área do *raceway*. Entretanto, deve-se levar em conta que os *raceways* comumente requerem uma maior área de cultivo, o que pode ter influenciado no valor obtido pelos autores. Os resultados experimentais com a *Botryococcus braunii* mostraram resultados promissores com o cultivo em *raceway*, atingindo taxa de crescimento maior que nos sistemas fechados (ASHOKKUMAR; RENGASAMY, 2012; RUANGSOMBOON et al., 2020). O cultivo da *Chlorella* sp. em *raceway* apresentou taxa de crescimento específico, tempo de duplicação de biomassa e produtividade de biomassa comparáveis ao cultivo em sistema fechado utilizando Erlenmeyer. A maior produtividade de biomassa foi obtida com fotobiorreator tubular (NAYAK et al., 2020a). Vale ressaltar que a baixa produtividade por unidade de área obtida para a *Chlorella* sp. por Raeisossadati et al. (2019) deve-se ao tipo de reator utilizado, visto que o fotobiorreatores de camada fina tem espessura de aproximadamente 1,0 cm, o que eleva a área requerida.

Tabela 5: Resultados obtidos para cultivos em sistema aberto e fechado.

Espécie	Sistema de cultivo	Tipo de reator	Taxa de crescimento específico (d ⁻¹)	Tempo de duplicação de biomassa (d)	Produtividade volumétrica de biomassa (g.L ⁻¹ .d ⁻¹)	Produtividade de biomassa por área (ton.ha ⁻¹ .a ⁻¹)	Referência
<i>B. terribilis</i>	Aberto	Raceway	0,12	N.R.	0,20	29,8 ¹	NASCIMENTO et al., 2014
<i>B. terribilis</i>	Fechado	Fotobioreator tubular	0,12	N.R.	0,20	57,5 ¹	NASCIMENTO et al., 2014
<i>B. terribilis</i>	Fechado	Erlenmeyer	0,14	5,04	0,01	N.R.	FERREIRA et al., 2019b
<i>B. terribilis</i>	Fechado	Erlenmeyer	0,15	4,62	0,11	N.R.	CABANELAS et al., 2015
<i>B. terribilis</i>	Fechado	Erlenmeyer	0,11	N.R.	0,56	N.R.	CABANELAS et al., 2013
<i>B. terribilis</i>	Fechado	Erlenmeyer	0,13	5,33	0,20	N.R.	NASCIMENTO et al., 2013
<i>B. terribilis</i>	Fechado	Erlenmeyer	0,16	4,31	0,24	N.R.	NASCIMENTO et al., 2015
<i>B. braunii</i>	Aberto	Raceway	0,30	2,3	0,10	N.R.	RUANGSOMBOON; SORNCHAI; PRACHOM, 2018
<i>B. braunii</i>	Fechado	Fotobiorreato de placa plana	0,09	N.R.	0,02	N.R.	BAZAES et al., 2012
<i>B. braunii</i>	Aberto	Raceway	0,26	2,64	0,11	N.R.	ASHOKKUMAR; RENGASAMY, 2012
<i>Chlorella</i> sp.	Aberto	Raceway	N.R.	N.R.	0,45	6,20	RAEISSADATI et al., 2019

<i>Chlorella</i> sp.	Fechado	Fotobiorreator de camada fina	N.R.	N.R.	0,61	2,00	RAEISSADATI et al., 2019
<i>Chlorella</i> sp.	Aberto	<i>Raceway</i>	0,26	2,66	0,38	46,3	ASHOKKUMAR et al., 2019
<i>Chlorella</i> sp.	Aberto	<i>Raceway</i>	0,60	1,15	0,21	N.R.	NAYAK et al., 2020b
<i>Chlorella</i> sp.	Fechado	Fotobiorreator de coluna de bolhas	0,73	0,95	0,77	N.R.	NAYAK et al., 2020b
<i>Chlorella</i> sp.	Fechado	Erlenmeyer	0,56	1,23	0,04	N.R.	FERREIRA et al., 2019b
<i>Chlorella</i> sp.	Fechado	Erlenmeyer	0,28	2,47	0,17	N.R.	SKORUPSKAITE; MAKAREVICIENE; LEVISAUSKAS, 2015
<i>Chlorella</i> sp.	Fechado	Erlenmeyer	0,34	2,01	0,29	N.R.	ZHU et al., 2017

Nota: ¹ Valores estimados matematicamente de acordo com a produtividade obtida em laboratório com cultivo em Erlenmeyer; N.R. Não Reportado.

2.3.2. Assimilação de CO₂

As microalgas assimilam carbono inorgânico na forma de CO₂, o qual pode advir da atmosfera ou ser injetado no meio de cultura (MORAIS JUNIOR et al., 2020). A fonte de CO₂ pode ser do ar, de uma emissão industrial, como CO₂ puro, ou ainda na forma de carbonatos solúveis em água (SPIJKERMAN; LUKAS; WACKER, 2017; LAM et al., 2018). Embora o CO₂ puro tenha alto potencial para aumento da produtividade da biomassa, o uso de efluentes apresenta mais vantagens ambientais e técnicas, pois proporciona tratamento a um resíduo, reduzindo as emissões de CO₂ da indústria (COLLING KLEIN; BONOMI; MACIEL FILHO, 2018; KADIR et al., 2018; FERREIRA et al., 2019a; KOYANDE et al., 2019).

Para regimes autotróficos os níveis de CO₂ atmosférico (aproximadamente 420 ppm (NOAA, 2021)) não suprem as necessidades das microalgas a ponto de atingir as taxas de produtividade de biomassa requeridas industrialmente. Por isso, mesmo em sistemas abertos, é interessante a suplementação de CO₂ (KLEIN, 2013). Vale destacar que, devido à alta taxa de assimilação de CO₂ pelas microalgas, a suplementação deste gás para o cultivo em sistema aberto ou fechado, pode ajudar a limitar o avanço do aquecimento global e ser usada como crédito de carbono (ZHOU et al., 2017).

2.3.3. Intensidade luminosa

A intensidade e o período de energia da luz são fundamentais para o fenômeno da fotossíntese, sendo por isso um fator decisivo para o crescimento e produtividade de biomassa e metabólitos nas microalgas (MORENO-GARCIA et al., 2017). A fotossíntese possui duas etapas: a fase clara e a fase escura. A primeira ocorre nos cloroplástos, por meio dos pigmentos fotossintetizantes e dos fotossistemas. Os pigmentos são moléculas responsáveis pela absorção de luz em comprimentos de onda específico, enquanto que os fotossistemas realizam a estocagem da energia luminosa como Adenosina Trifosfato (ATP) e do acceptor de elétrons Nicotinamida-Adeninucleotídeo-Fosfato (NADP) (BABA et al., 2012; KLEIN, 2013). Já a fase escura ocorre no estroma do cloroplásto, utilizando a energia estocada na fase clara, na forma de ATP e

NADP. Nesta etapa o CO₂ é convertido à molécula orgânica de glicose (BABA et al., 2012).

A energia luminosa disponível é uma relação entre a área iluminada e o volume da cultura (SPIJKERMAN; LUKAS; WACKER, 2017). A necessidade de luz afeta diretamente a conformação dos sistemas de cultivo aberto e fechado, fazendo com que o primeiro não tenha profundidade expressiva e o segundo não tenha demasiada largura. Vale ressaltar que, se o meio possuir alta densidade de células, o sistema pode apresentar um caminho de luz raso, o que pode reduzir a produtividade volumétrica (SPIJKERMAN; LUKAS; WACKER, 2017).

A intensidade de luz em níveis apropriados – entre 120-220 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ para a maioria das microalgas (YOSHIMURA; OKADA; HONDA, 2013) – favorece a produtividade de biomassa e de metabólitos, possibilitando o armazenamento do excedente de fotoassimilados, que serão posteriormente convertidos em energia química (ZHU; LI; HILTUNEN, 2016). Entretanto, uma exposição excessiva à luz – geralmente acima de 850 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ - pode trazer danos aos centros reacionais fotossintéticos, promovendo o fenômeno de fotoinibição, o que leva à redução da produtividade de biomassa (KLEIN, 2013; YOSHIMURA; OKADA; HONDA, 2013; BUX; CHISTI, 2016). Vale ressaltar que a intensidade de luz que promove o melhor crescimento e produtividade de metabólitos, bem como a que causa fotoinibição, varia entre as espécies de microalgas, e sofre influência dos demais parâmetros de cultivo (KLEIN, 2013; YOSHIMURA; OKADA; HONDA, 2013; ZHU; LI; HILTUNEN, 2016).

Outro fator importante é o período de exposição à luz, chamado de fotoperíodo. Este parâmetro expressa a relação de horas por dia em que o cultivo permanece na luz ou no escuro. Normalmente, com maior período de exposição à luz tem-se maior produtividade de biomassa, uma vez que a microalga pode realizar a fotossíntese por um maior período de tempo (RUANGSOMBOON, 2012; BUX; CHISTI, 2016). Entretanto, fornecer um período de escuro tem se mostrado favorável para a biossíntese de lipídios (RUANGSOMBOON, 2012). Nesse contexto, é interessante utilizar o fotoperíodo de 12:12h a fim de simular o período natural de exposição ao sol nas regiões tropicais, como no Brasil.

2.3.4. Nutrientes no meio de cultivo

O cultivo de algas requer um suprimento de macronutrientes (carbono, nitrogênio, fósforo, potássio e enxofre) e micronutrientes (vitaminas e traços de metais). A concentração destes pode variar de acordo com as necessidades e tolerância do microrganismo. Além disso, pode-se variar a concentração de nutrientes para causar estresse à cultura e aumentar a produtividade de um metabólito (CHEN et al., 2017).

Os meios de cultura comumente usados para o cultivo da *B. terrestris* são CHU13 (CHU, 1942) ou CHU13 modificado (LARGEAU, C; CASADEVALL, E; BERKALOFF, 1980), que adicionam concentrações traços de metais. Já a *Chlorella* sp. é comumente cultivada em meio BG11 (STANIER et al., 1971) ou BBM (NICHOLS; BOLD, 1965).

Considerando a possibilidade de dar uma destinação ecológica aos resíduos líquidos, alguns autores estudam a integração entre o cultivo de microalgas e o tratamento de efluentes (CABANELAS et al., 2013; LIU et al., 2013; MISHRA; MOHANTY, 2019). Nesses sistemas, as microalgas consomem nutrientes das águas residuárias, substituindo o uso de produtos químicos. Além disso, as microalgas oxigenam a água, reduzindo a Demanda Química e Bioquímica de Oxigênio (DQO e DBO) (ÓRPEZ et al., 2009; KADIR et al., 2018). As concentrações de águas residuais variam de acordo com a fonte de poluição (LEKSHMI et al., 2015; LUO et al., 2016; HENKANATTE-GEDERA et al., 2017); portanto, é importante observar que o meio pode ser tóxico para a cultura em concentração muito elevada ou na presença de amônio ou amônia (MISHRA; MOHANTY, 2019). Assim, para utilizar águas residuárias como meio de cultura, a espécie de microalga precisa ser resistente a compostos amoniacais e ser capaz de crescer em concentrações variadas de nutrientes (MENNA; ARBIB; PERALES, 2015; MEHRABADI; FARID; CRAGGS, 2017).

O cultivo pode ser realizado em condições sub ou supra ótimas, nestes casos, a cultura é submetida a estresse (CHEN et al., 2017). Essas mudanças ambientais levam a uma modificação no metabolismo das microalgas para proteger a cultura, o que pode estimular a síntese de alguns metabólitos (CHEN et al., 2017; HO et al., 2017). O aumento da produção de determinado metabólito está relacionado ao método de estresse aplicado (CHENG et al., 2019a). Dentre

os fatores de estresse, destacam-se as alterações de temperatura, pH, salinidade, presença de metais ou mudanças na concentração dos nutrientes essenciais (por exemplo, nitrogênio, fósforo ou enxofre) (MARTIN et al., 2014; SHARMA et al., 2015; MINHAS et al., 2016; PRAVEENKUMAR et al., 2016; CHEN et al., 2017; AZIZ et al., 2020). Dentre estes fatores, a redução na concentração de nutrientes no meio tem se mostrado o mais vantajoso para promover acúmulo de lipídios (LUO et al., 2016; ZHU; LI; HILTUNEN, 2016).

Deve-se levar em consideração que, sob estresse, o crescimento pode diminuir ou cessar (CHEN et al., 2017) e por isso deve ser aplicado após maximizar o crescimento (HO et al., 2017; AZIZ et al., 2020). Ao utilizar essa abordagem, a concentração de biomassa é aumentada no primeiro estágio, enquanto os metabólitos de interesse têm sua biossíntese estimulada no segundo estágio. Vale ressaltar que diferentes respostas metabólicas podem ser obtidas por cepas diferentes pertencentes ao mesmo gênero (IKARAN et al., 2015).

A Tabela 6 apresenta estudos que aplicaram estresse no cultivo de microalgas e seus principais resultados. Como a espécie *Botryococcus terribilis* foi utilizada em apenas um estudo com condição de estresse – até onde é de nosso conhecimento – foram apresentados também estudos com uma espécie similar a esta, a *Brotryococcus braunii*.

Tabela 6: Principais resultados obtidos em estudo de estresse de microalgas por variação na concentração de nutrientes.

Espécie	Condição de estresse	Resultados obtidos	Referencia
<i>B. terribilis</i>	Variação na concentração do meio de cultivo CHU13, em 75% e em 200%	Aumento de 1,44 vezes na produtividade de lipídios com 75% da concentração padrão.	CABANELAS et al., 2015
<i>B. braunii</i>	Remoção total de nitrogênio	Aumento de 1,52 vezes nos lipídios e de 1,45 vezes nos hidrocarbonetos	CHENG et al., 2013
<i>B. braunii</i>	Variação na concentração do meio de cultivo CHU13, em 75% e em 200%	Queda de 10% na produção de lipídios e aumento de 1,40 vezes nos carboidratos quando em condição de meio menos concentrado.	CABANELAS et al., 2015

<i>B. braunii</i>	Varição na concentração de nitrogênio (0,04-3,66mM)		Maior produção de lipídios (63 %) na condição de menor concentração de nitrogênio	CHOI et al., 2011
<i>Chlorella</i> sp.	Varição na concentração de nitrogênio e fósforo (0-1.000 %)		Aumento de 1,53 vezes na produtividade de lipídios na ausência de nitrogênio e concentração de fósforo em 500 %	NAYAK et al., 2020b
<i>Chlorella</i> sp.	Remoção total de nitrogênio do meio	de	Aumento de 1,89 vezes na porcentagem de lipídios	ANTO; PUGAZHENDHI; MATHIMANI, 2019
<i>Chlorella</i> sp.	Remoção total de nitrogênio e fósforo	de	Aumento de 1,31 vezes na produtividade de lipídios	PRAVEENKUMAR et al., 2012
<i>Chlorella</i> sp.	Remoção de 100 % de nitrogênio e variação na concentração de fósforo de 0,2-10 mM		Aumento de 1,22 vezes na porcentagem de lipídios e redução de 1,17 vezes na de carboidratos em condição baixa concentração de nitrogênio e alta de fósforo	ZHU et al., 2015

2.3.4.1. Alteração da concentração de nitrogênio

O nitrogênio é amplamente utilizado pela célula para biossíntese de aminoácidos, participando do crescimento da cultura (MARTIN et al., 2014; CHEN et al., 2017). Em condições apropriadas para o crescimento, o metabolismo da alga direciona por volta de 60 % do acetil-CoA na produção de ATP ou de biomassa, e apenas 36 % para síntese de lipídeos, atendendo o requisito mínimo da célula (GOPALAKRISHNAN et al., 2015). Em falta de nitrogênio, a biossíntese de proteínas e aminoácidos diminui, o que leva a redistribuição do acetil-CoA para outras rotas metabólicas (MANDOTRA et al., 2016). O excesso de acetil-CoA e de energia passa a favorecer a biossíntese lipídica, canalizando mais de 70 % do acetil-CoA para este fim (GOPALAKRISHNAN et al., 2015). Assim, o metabolismo em condições limitadas de nitrogênio é reajustado para maximizar a produção de lipídios e otimizar o uso de energia dentro da célula (HUSSAIN et al., 2020).

2.3.4.2. Alteração da concentração de fósforo

O fósforo é um nutriente essencial para síntese de ácido desoxirribonucleico (DNA), adenosina trifosfato (ATP), e de enzimas, sendo de grande importância para a multiplicação celular e transferência de energia (WU; YU; HU, 2013). A remoção de fósforo pode levar a uma queda na fotossíntese, fazendo com que o excesso de carbono seja convertido em ácidos graxos em detrimento da síntese de carboidratos (ARORA et al., 2016). Além disso, a diminuição da taxa fotossintética promove o acúmulo de NADH, que inibe a citrato sintase e impede que o acetil CoA entre no ciclo de Krebs (ARORA et al., 2016). Com isso, o acetil-CoA passa a ser convertido em malonil-CoA, o que amplia o acúmulo lipídico (PRAVEENKUMAR et al., 2016). Vale ressaltar que a maioria dos estudos com remoção de fósforo do meio de cultura aponta para o favorecimento do acúmulo lipídico quando este fator de estresse está associado a remoção de nitrogênio (ARORA et al., 2016; MANDOTRA et al., 2016; CHEN et al., 2017; DANESH et al., 2017).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Estudar o crescimento e o acúmulo dos principais metabólitos nas espécies *Botryococcus terribilis* e *Chlorella* sp. em sistema fechado (Erlenmeyer), aberto (*raceway*) e em condição de estresse.

3.2. Objetivos específicos

- Traçar a curva de crescimento das espécies no cultivo em Erlenmeyer;
- Monitorar o crescimento das espécies no cultivo em *raceway*;
- Calcular a taxa de crescimento específico, tempo de duplicação de biomassa e produtividade de biomassa;
- Extrair e quantificar os metabólitos (proteínas, lipídios, carboidratos, hidrocarbonetos e pigmentos) nos diferentes sistemas de cultivo;

- Estudar a produção de metabólitos em condições de estresse, com variação na concentração de nitrogênio e fósforo;

4. METODOLOGIA

4.1. Preparo do meio de cultivo

As cepas de microalgas *Botryococcus terribilis* (CCMA-UFSCar 481) e *Chlorella* sp. (CCMA-UFSCar 085) foram fornecidas pela coleção de microalgas de água doce da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). O cultivo da microalga *B. terribilis*, em Erlenmeyer e em *raceway*, foi realizado com o meio de cultivo CHU13 modificado e concentrado 8 vezes. Já para a microalga *Chlorella* sp. foi utilizado o meio de cultivo BG11. A utilização de meios de cultivo distintos se faz necessária devido às diferentes exigências nutricionais das espécies. A Tabela 7 apresenta a concentração dos nutrientes utilizados nos meios de cultivo. Ambos os meios tiveram o pH ajustado para 7,5 utilizando solução de hidróxido de potássio (KOH) a 1,0 M ou de ácido clorídrico (HCl) 0,1 M. Antes de inocular as microalgas, o meio de cultivo foi autoclavado a 121 °C por 15 minutos.

Tabela 7: Concentração dos nutrientes dos meio CHU13 modificado e BG11. (LARGEAU, C; CASADEVALL, E; BERKALOFF, 1980; STANIER et al., 1971).

Nutriente	Concentração (mg.L ⁻¹)	
	CHU13-8X	BG11
KNO ₃	400,00	-
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	-	1,00
K ₂ HPO ₄	80,00	30,50
MgSO ₄ .7H ₂ O	200,00	75,00
NaNO ₃	-	1.500,0
CaCl ₂ .6H ₂ O	160,00	36,00
(NH ₄) ₅ .[Fe(C ₆ H ₄ O ₇) ₂]	20,00	6,00
C ₆ H ₈ O ₇	200,00	6,00
Na ₂ CO ₃	-	20,0
H ₃ BO ₃	0,10	2,86
MnCl ₂ .4.H ₂ O	-	1,81
MnSO ₄ .4.H ₂ O	0,10	-
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,10	0,22
CoSO ₄ .7H ₂ O	0,04	0,05
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,04	0,08
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,04	0,39

4.2. Cultivo em sistema fechado – Erlenmeyer

O cultivo em sistema fechado (Figura 8) foi realizado em quintuplicata (partindo de um mesmo inóculo) com concentração inicial de aproximadamente $0,16 \text{ g.L}^{-1}$ para a *B. terribilis* e $0,04 \text{ g.L}^{-1}$ ($1,38 \times 10^6 \text{ células.mL}^{-1}$) para a *Chlorella* sp. Estes valores foram baseados em dados reportados na literatura (NASCIMENTO et al., 2015; CABANELAS et al., 2015; FERREIRA et al., 2019b; LI et al., 2021). Assim, os inóculos - já adaptados às condições de temperatura, intensidade de luz e fotoperíodo utilizadas neste estudo - foram divididos em cinco frações de aproximadamente 36 mL e completados com meio de cultivo para o volume utilizado em cada espécie. Para a microalga *B. terribilis*, utilizouse Erlenmeyer de 500 mL com 300 mL de cultivo. Já para a *Chlorella* sp. foi utilizado Erlenmeyer de 250 mL com volume de 200 mL de cultivo. O cultivo da *B. terribilis* foi realizado em maior volume devido ao maior período em que foi monitorado e a necessidade de amostra para quantificação de hidrocarbonetos – análise que não é pertinente à *Chlorella* sp. Foram estabelecidas as seguintes condições de cultivo: intensidade de luz de $130 \pm 5 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$; fotoperíodo de 12:12 h de claro:escuro; temperatura ambiente (aproximadamente $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$) e agitação constante de 150 rpm. A inoculação do cultivo foi realizada em câmara de fluxo laminar previamente higienizada com álcool 70 % e esterilizada com luz ultravioleta.

Figura 8: Cultivo da microalga (A) *Botryococcus terribilis* e (B) *Chlorella* sp. em Erlenmeyer.



A



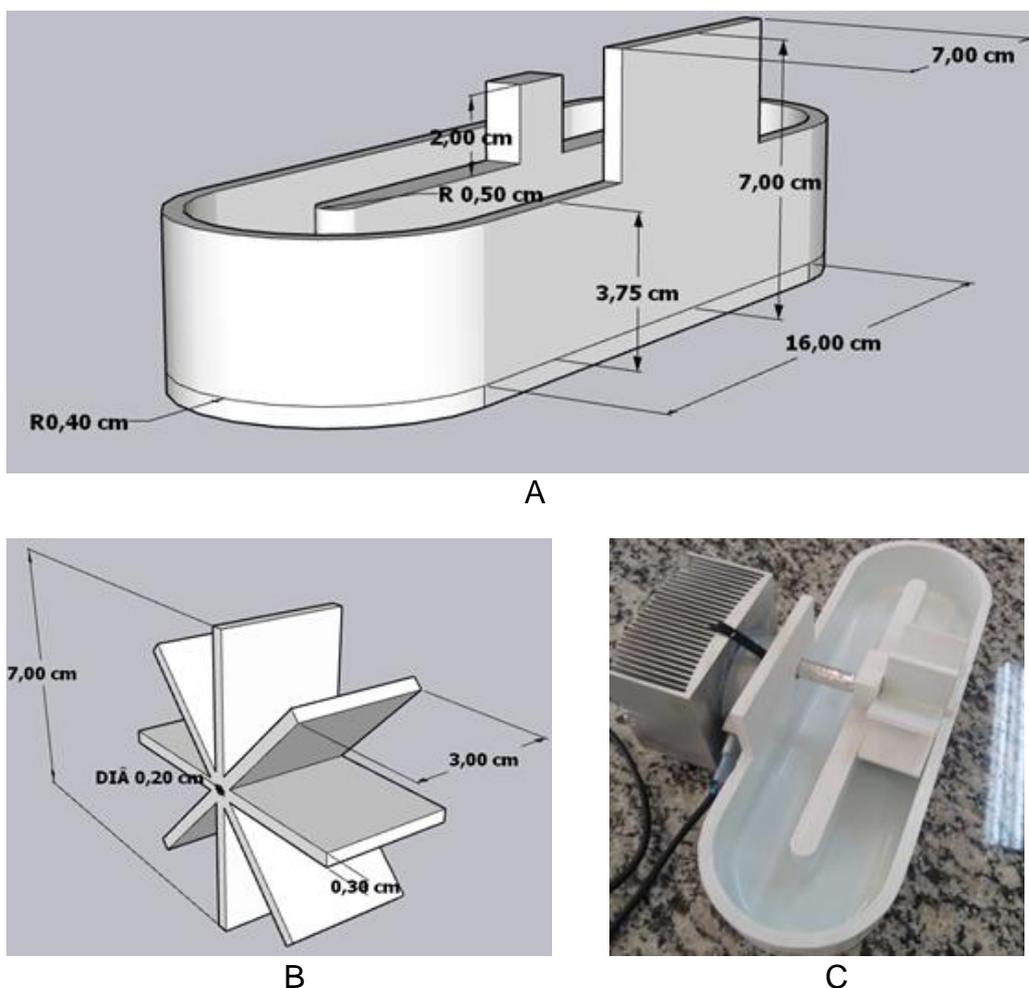
B

Fonte: Autora, 2021.

4.3. Cultivo em sistema aberto – *raceway*

O cultivo em sistema aberto foi realizado em um *raceway* de escala laboratorial dimensionado pelo grupo de pesquisa e impresso em Acrilonitrila Butadieno Estireno (ABS) por manufatura aditiva pela empresa AgnoLab. Foi acoplado ao *raceway* um impelidor com motor rotativo de 5-6 rpm e um dissipador de calor – visto que o uso contínuo do motor levava ao aquecimento da peça. O volume total do *raceway* é de 500 mL, sendo utilizado para o cultivo das microalgas um volume de 250 mL. A Figura 9 apresenta o *raceway* e suas dimensões.

Figura 9: *Raceway* utilizado para o cultivo das microalgas (A) dimensões do *raceway*, (B) dimensões do impelidor, (C) estrutura final.



Fonte: NOVAIS et al., 2021.

Antes de inocular a microalga, o *raceway* foi lavado, enxaguado com água destilada, com hipoclorito de sódio (5 %), e novamente com água destilada. Após, foi mantido em câmara de fluxo laminar sob incidência de luz ultravioleta por 15 minutos. O cultivo em *raceway* foi realizado sob as mesmas condições aplicadas ao sistema fechado: temperatura ambiente ($25\pm 2^\circ\text{C}$), fotoperíodo de 12:12h de claro:escuro e intensidade luminosa de $130\pm 5\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. O cultivo foi iniciado com a cultura em fase exponencial (entre 0,40 e 0,60 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de concentração de biomassa) e monitorado diariamente por sete dias. Para cada espécie, foram realizados dois cultivos não simultâneos em *raceway*, a fim de verificar a reprodutibilidade dos resultados. Devido ao contato da superfície com o ambiente, houve considerável evaporação do meio, sendo necessária a reposição de meio de cultivo diariamente. Este foi repostado até atingir o volume inicial de cultivo, 250 mL.

4.4. Monitoramento do crescimento das espécies

O crescimento da *B. terribilis* foi monitorado por 30 dias, colhendo alíquotas a cada dois dias. Já a microalga *Chlorella* sp., por apresentar um crescimento mais rápido, foi monitorada diariamente por 13 dias. Para análise do crescimento de ambas as espécies, foram colhidas alíquotas de aproximadamente 6,0 mL com pipeta esterilizada. A coleta de alíquotas em sistema fechado aconteceu em câmara de fluxo laminar higienizada com álcool 70 % e esterilizada com luz ultravioleta. As amostras passaram por homogeneização celular e em seguida foram submetidas à espectroscopia no ultravioleta visível (equipamento AgilentCary 60 UV-Vis) com leitura da absorbância em 680 nm. A medida da absorbância foi relacionada com a concentração de biomassa ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) mediante curva de calibração previamente realizada (Anexo 2). No caso da *Chlorella* sp. fez-se contagem de células em câmara de Neubauer, determinando a densidade de células no meio. Este procedimento não foi possível com a *B. terribilis* uma vez que suas células se aglutinam nas colônias. Com os valores de concentração de biomassa foi calculada a taxa de crescimento específico (Equação 1) na fase exponencial, o tempo de duplicação de biomassa (Equação 2) e a produtividade de biomassa (Equação 3) obtida em ambas as microalgas (FERREIRA et al., 2019b).

$$\mu = \frac{C_{fexp} - C_{iexp}}{C_{iexp} * tempo} \quad \text{Equação 1}$$

$$td = \frac{\ln(2)}{\mu} \quad \text{Equação 2}$$

$$Pb = \frac{C_f - C_i}{t_f - t_i} \quad \text{Equação 3}$$

Em que: μ é a taxa de crescimento específico (d^{-1}), C_f e C_i são as concentrações final e inicial de células ($g.L^{-1}$) sendo C_{iexp} e C_{fexp} as concentrações ao início e ao final da fase exponencial ($g.L^{-1}$), Pb é a produtividade de biomassa ($g.L^{-1}.d^{-1}$); td é o tempo de duplicação de biomassa; e t_f e t_i são os tempos finais e iniciais de cultivo (d).

4.5. Cultivo em condição de estresse

As culturas de *B. terribilis* e *Chlorella* sp. foram submetidas à condição de estresse, conforme planejamento fatorial completo 2^2 (Tabela 8) com três réplicas no ponto central. Este estudo tem como variável a concentração dos nutrientes nitrogênio e fósforo no meio de cultivo – CHU13 modificado para a microalga *B. terribilis* e BG11 para a microalga *Chlorella* sp. - seguindo os níveis recomendados por Chen et al., (2017). No meio CHU13 a maior fração de nitrogênio provém do nitrato de potássio (KNO_3), e a de fósforo do fosfato de potássio (K_2PO_4); assim estes compostos foram reduzidos do cultivo para o estudo do estresse. Para o BG11 foi reduzida a concentração de nitrato de sódio ($NaNO_3$) – a fim de suprimir o nitrogênio – e K_2PO_4 ; para supressão de fósforo.

Tabela 8: Planejamento de experimentos fatorial completo 2^2 com pontos centrais para estresse das microalgas.

Variável	Limite inferior (-1)	Ponto central (0)	Limite superior (+1)
Concentração nitrogênio (%)	25	50	75
Concentração fósforo (%)	25	50	75

Nota: Concentração de nutrientes baseada nos meio de CHU13 modificado ou no meio BG11.

As variáveis resposta deste estudo foram: produtividade de biomassa; porcentagem de lipídios, carboidratos e proteínas; e concentração de clorofilas e de carotenoides. Além disso, para a microalga *B. terribilis* também foi utilizada a porcentagem de hidrocarbonetos como resposta. Dessa forma pôde-se fazer uma análise completa de como o estresse impacta na produção de cada um dos metabólitos de interesse das microalgas em estudo.

Uma vez que o estresse foi aplicado com variação na concentração de nutrientes, os inóculos utilizados para este cultivo foram centrifugados e a biomassa foi lavada por quatro vezes com água destilada e autoclavada, a fim de remover os resquícios de nutrientes no meio de cultivo. As demais condições de cultivo foram mantidas as mesmas da curva de crescimento em sistema fechado. Foi utilizado um volume total de 180 mL para ambas as microalgas (em Erlenmeyer de 250 mL) com concentração inicial de aproximadamente $0,50 \text{ g.L}^{-1}$ – condição em que as microalgas em estudo se encontravam no meio da fase exponencial. O cultivo foi mantido sob condição de estresse por sete dias.

4.6. Extração e quantificação dos metabólitos

Foi realizada a extração dos metabólitos - lipídios, proteínas, carboidratos, carotenoides e clorofila a e b – de ambas as microalgas cultivadas em sistema fechado, aberto e em condição de estresse. Para a microalga *B. terribilis* foi realizada também a extração dos hidrocarbonetos. A metodologia utilizada para extração e quantificação de cada um destes metabólitos encontra-se apresentada nos tópicos subsequentes.

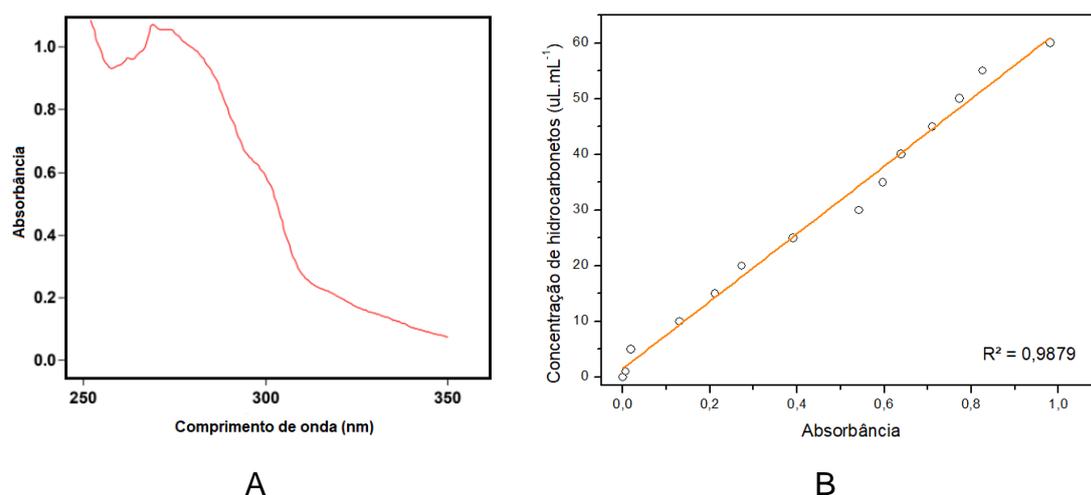
4.6.1. Hidrocarbonetos

A extração dos hidrocarbonetos foi realizada apenas com a microalga *Botryococcus terribilis*. Esta metodologia foi adaptada dos experimentos de Eroglu e Melis (2010) e se baseia na absorvância do óleo esqualeno diluído em heptano. Vale ressaltar que apenas os hidrocarbonetos com duplas ligações podem produzir um sinal de absorvância no UV-VIS, o que não contempla a totalidade de hidrocarbonetos produzidos pelas *Botryococcus*, mas possibilita a

identificação daqueles encontrados em maior escala, como os botriococenos (MOHEIMANI et al., 2014).

Primeiramente fez-se a varredura do esqualeno entre 350-250 nm (Figura 10-A). Foi possível identificar um pico de absorvância em torno de 280 nm. Vale ressaltar que em comprimentos de onda inferior a 250 nm há elevada absorvância do solvente, inviabilizando o método. Fez-se então uma curva de calibração do óleo esqualeno diluído em heptano – com concentrações variando de 1-60 $\mu\text{L}.\text{mL}^{-1}$ – e sua absorvância no ultravioleta-visível (UV-VIS) a 280 nm (Figura 10-B). Com esta, foi possível estabelecer a relação entre a absorvância obtida no óleo extraído da *B. terribilis* e sua concentração de hidrocarbonetos.

Figura 10: Esqualeno em heptano (A) pico de absorvância do padrão de óleo esqualeno e (B) relação entre a absorvância e a concentração de esqualeno diluído em heptano.

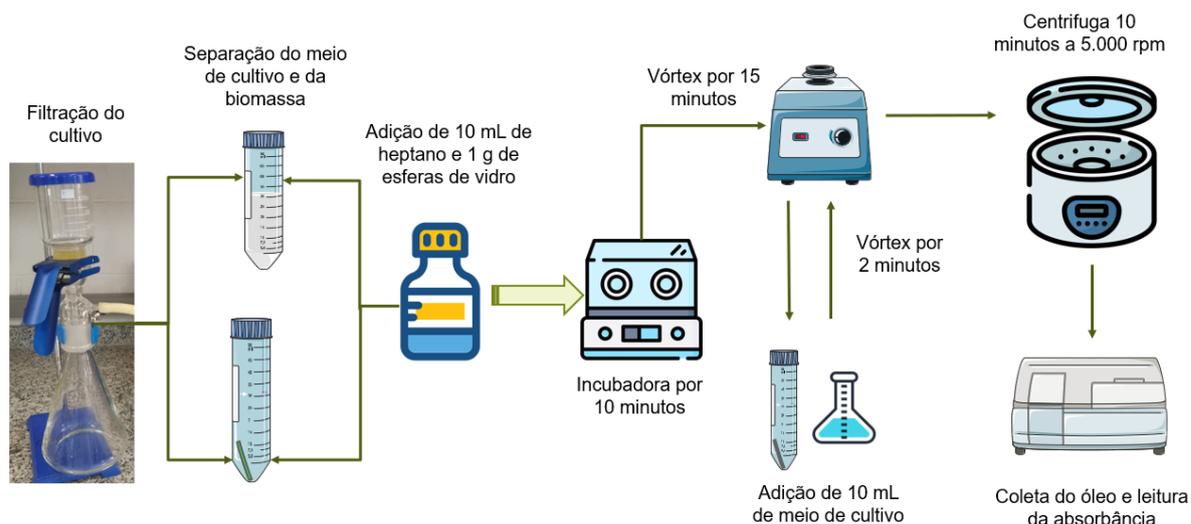


Fonte: Autora, 2021.

A metodologia de extração dos hidrocarbonetos encontra-se esquematizada na Figura 11. Primeiramente, a biomassa foi separada do meio de cultivo por filtração utilizando membrana filtrante de politetrafluoroetileno (PTFE). A membrana com a biomassa e o meio de cultivo foram acondicionados em tubos de centrifuga distintos. Sobre ambos foi adicionado 10 mL de heptano e aproximadamente 1,0 g de esferas de vidro. As amostras foram incubadas em banho quente por 10 minutos a 100 °C. Após atingirem temperatura ambiente, foram agitadas em vórtex por 15 minutos. Em seguida foi adicionado 10 mL de meio de cultivo, sob as amostras com a biomassa, a fim de promover a

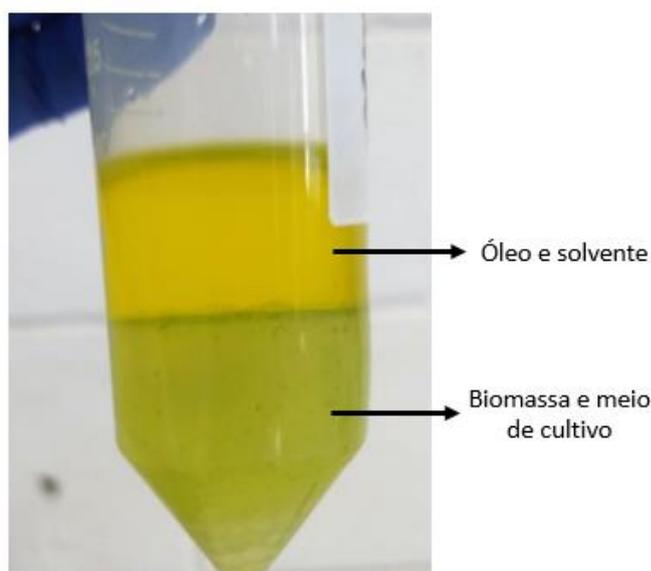
separação das fases (Figura 12). Seguiu-se com agitação no vórtex por 2 minutos e centrifugação a 5.000 rpm por 10 minutos. A fase heptano-hidrocarbonetos foi coletada, para mensurar a absorbância a 280 nm e calcular a concentração dos hidrocarbonetos de acordo com a curva de calibração estabelecida no método.

Figura 11: Etapas da metodologia de extração dos hidrocarbonetos.



Fonte: Autora, 2021 – criado com ícones de uso livre.

Figura 12: Separação das fases óleo-solvente e biomassa-meio de cultivo durante o processo de extração com heptano.



Fonte: Autora, 2021.

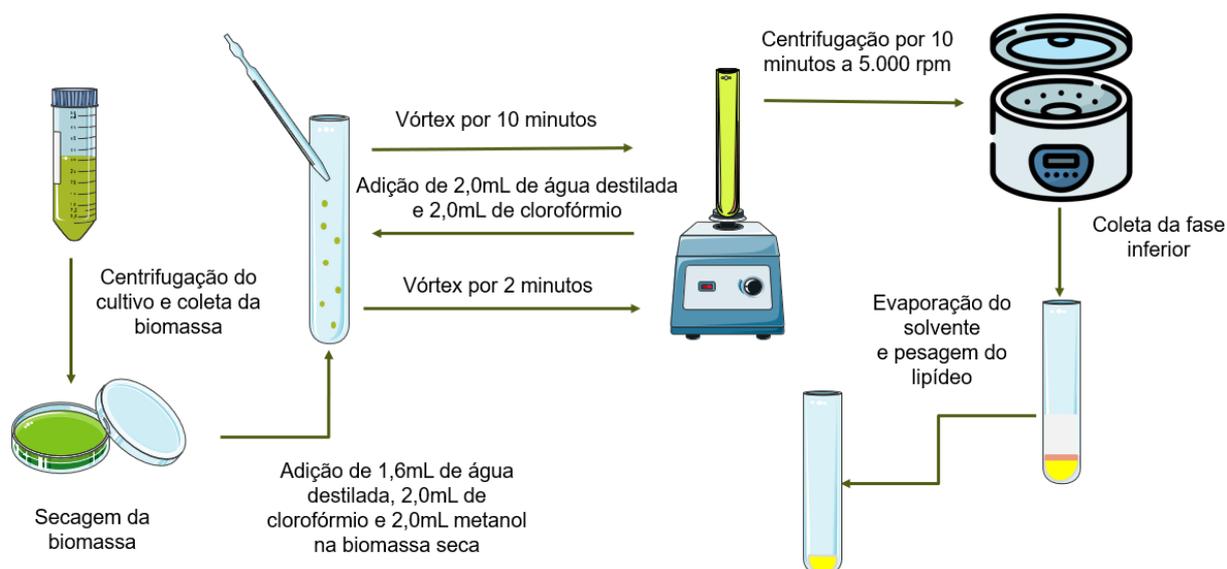
A fim de validar o método de extração de hidrocarbonetos, o óleo extraído foi caracterizado por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-MS) da Agilent-7890A em coluna tipo RTX-5MS (30 m x 0,25 mm; 0,25 µm); com programação do forno iniciando em 35 °C e aquecendo até 230° C - a uma taxa de 5 °C.min⁻¹, e após sendo mantido nesta temperatura por 10 minutos. A identificação dos compostos foi realizada com banco de dados NIST08. Para a análise, a amostra foi diluída em hexano em proporção de 10 vezes.

4.6.2. Lipídios

O teor de lipídios intracelular foi verificado pelo método de Bligh e Dyer (1959) (Figura 13). Neste, são utilizados os solventes clorofórmio e metanol a fim de promover a ruptura da membrana plasmática e extração de lipídios polares e apolares na célula. Para este método, 50 mL de cultivo foram centrifugados a 5.000 rpm por 10 minutos. A biomassa foi coletada e seca em estufa a 60 °C até peso constante. Após, a biomassa seca foi homogeneizada com 1,6 mL de água destilada, 2,0 mL de clorofórmio e 2,0 mL de metanol, e agitada em vórtex por 10 minutos. Em seguida, foram adicionados 2 mL de água e 2 mL de clorofórmio ao meio, o qual foi novamente agitado em vórtex por 2 minutos. O material foi centrifugado a 5.000 rpm por 10 minutos, promovendo a separação das fases: lipídio em clorofórmio; biomassa; e água, metanol e demais componentes não oleosos (Figura 14). A fase óleo foi removida com pipeta e acondicionada em tubos de ensaio previamente secos e pesados. O solvente foi evaporado por secagem em estufa a 60 °C até peso constante e a massa de lipídeos determinada por gravimetria. A porcentagem de lipídios foi calculada em porcentagem de biomassa seca segundo a Equação 4.

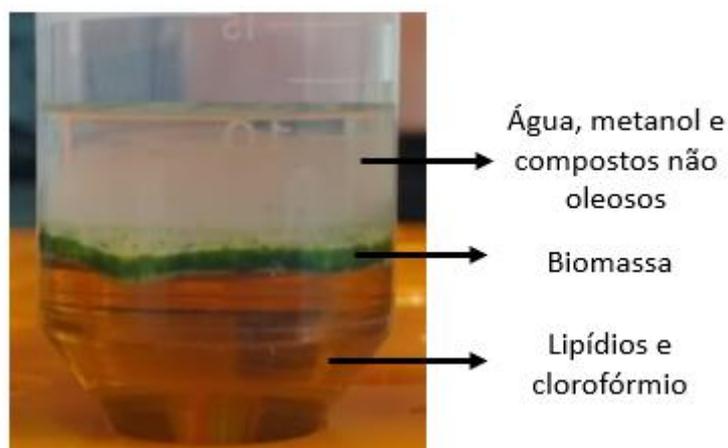
$$\% \text{ lipídios} = \frac{\text{massa de lipídios}}{\text{massa de microalga}} \quad \text{Equação 4}$$

Figura 13: Etapas da metodologia de extração de lipídios.



Fonte: Autora, 2021 – criado com ícones de uso livre.

Figura 14: Separação das fases óleo, biomassa e compostos não oleosos no processo de extração por Bligh e Dyer.



Fonte: Autora, 2021.

Após a evaporação dos solventes utilizados no método de Bligh e Dyer, as amostras de lipídios extraídas da *B. terribilis* foram solubilizadas em heptano e analisadas no UV-VIS, com leitura da absorvância a 280 nm, a fim de identificar a quantidade de hidrocarbonetos presentes na amostra.

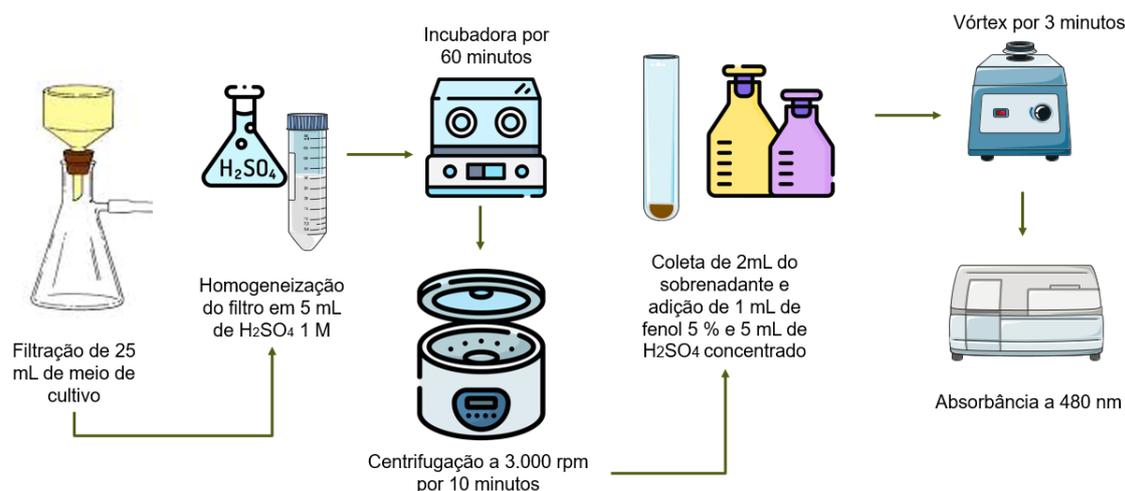
O lipídio foi caracterizado quanto ao perfil de ácidos graxos utilizando a técnica de cromatografia gasosa acoplada a detector de ionização de chama (CG-FID Agilent 6850, EUA) equipada com coluna capilar Agilent DB-23 (50 %

cianopropil e 50 % metilpolisiloxano). A análise foi conduzida nas seguintes condições: 1 mL.min⁻¹ de fluxo de gás de arraste (He), 24 cm.s⁻¹ de velocidade linear, 280 °C de temperatura do detector, 250 °C de temperatura do injetor, 110 – 215 °C de temperatura do forno (com rampa de aquecimento de 5 °C.min⁻¹), e em seguida mantida a 215 °C por 24 minutos, com volume de injeção de 1,0 µL e razão de divisão de 1:50. Para isso, os triglicerídeos foram previamente esterificados através do método de Hartman e Lago (1973).

4.6.3. Carboidratos

Para a determinação dos carboidratos totais (metodologia de Dubois et al., (1956) – representada na Figura 15) foi montado um sistema de filtração a vácuo utilizando filtro de fibra de vidro, o qual foi fixado ao funil de Büchner com ácido sulfúrico (H₂SO₄) a 1,0 M. Foi então filtrado 25 mL de meio de cultivo. Em seguida, os filtros foram acondicionados em tubos de centrifuga, homogeneizados com 5,0 mL de H₂SO₄ 1,0 M e incubados em banho quente (100 °C) por 60 minutos. Após resfriarem, as amostras foram centrifugadas a 3.000 rpm por 10 minutos. Coletou-se 2 mL de sobrenadante, os quais foram acondicionados em tubos de ensaio de vidro e, sobre estes, adicionou-se 1,0 mL de solução de fenol 5 % (preparada no mesmo dia). Seguiu-se com agitação no vórtex por 30 segundos. Em seguida, adicionou-se 5,0 mL de H₂SO₄ concentrado (P.A. 98 %) e agitou-se no vórtex por mais 30 segundos. As amostras foram mantidas a temperatura ambiente até que resfriassem e então foram novamente agitadas no vórtex por 3 minutos. Foi lida a absorbância a 485 nm e determinada a concentração de carboidratos de acordo com curva de calibração (Anexo 3) previamente estabelecida pelo grupo de pesquisa tendo o zero foi ajustado com prova em branco.

Figura 15: Etapas da metodologia de extração de carboidratos.

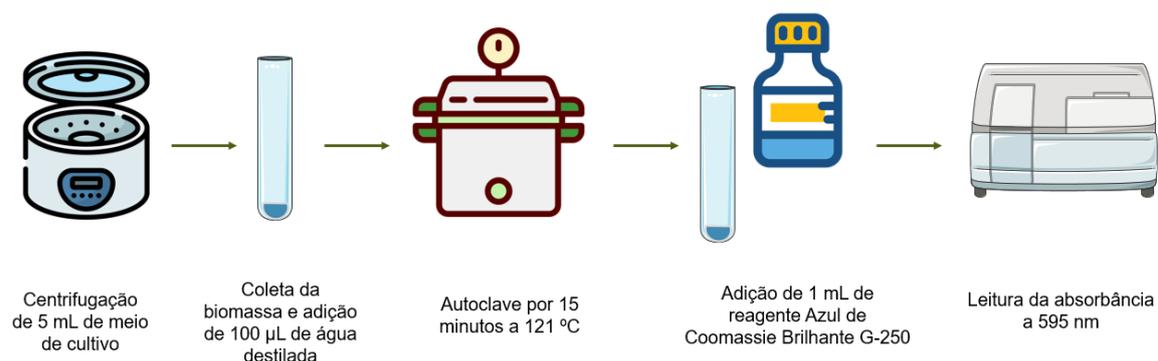


Fonte: Autora, 2021 – criado com ícones de uso livre.

4.6.4. Proteínas

A metodologia utilizada para extração das proteínas totais foi a de Bradford (1976), a qual encontra-se representada esquematicamente na Figura 16. Para esta, coletou-se 5,0 mL de cultivo, os quais foram centrifugados a 5.000 rpm por 10 minutos. A biomassa foi coletada e transferida para tubo de ensaio de vidro, onde foi adicionado 100 μ L de água destilada. Após, as amostras foram autoclavadas a 120 $^{\circ}$ C por 15 minutos. Em seguida, foram mantidas a temperatura ambiente até resfriarem e então adicionou-se 1 mL de reagente Azul de Coomassie Brilhante G-250. Seguiu-se com agitação no vórtex por 30 segundos e leitura da absorbância a 595 nm utilizando cubeta plástica descartável. A concentração de proteínas foi estabelecida de acordo com curva de calibração (Anexo 4) previamente estabelecida pelo grupo de pesquisa tendo o zero foi ajustado com prova em branco.

Figura 16: Etapas da metodologia de extração de proteínas.

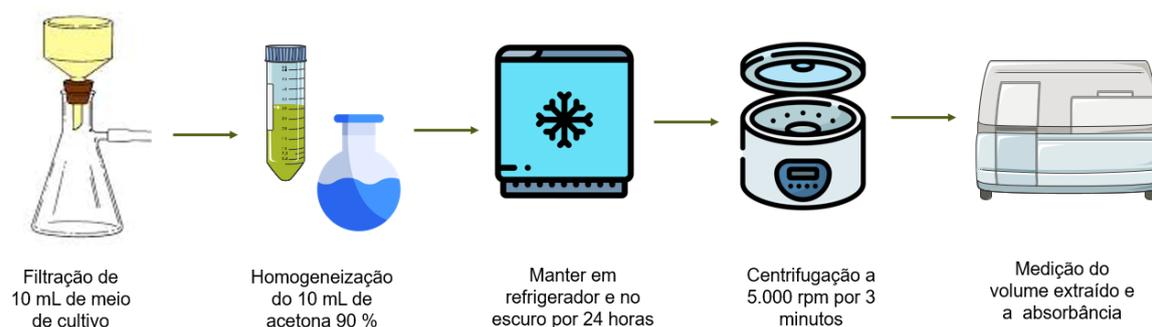


Fonte: Autora, 2021 – criado com ícones de uso livre.

4.6.5. Pigmentos

A metodologia de extração das clorofilas a e b e dos carotenoides de ambas as microalgas se encontra representada esquematicamente na Figura 17. Para a extração destes pigmentos, 10 mL de cultivo foram filtrados utilizando bomba a vácuo e filtro de fibra de vidro. Os filtros foram acondicionados em tubos de centrífuga e macerados com bastão de vidro. Sobre estes foi adicionado 10 mL de acetona 90 %. As amostras foram cobertas com papel alumínio – a fim de evitar degradação pela luz - e mantidas em refrigerador por 24 horas. Após, foram agitadas em vórtex por 2 minutos, novamente maceradas com bastão de vidro e então centrifugadas a 3.000 rpm e 5 °C por 3 minutos. Foi coletado o sobrenadante e mensurado seu volume. As amostras foram submetidas à Espectroscopia no Ultravioleta Visível, com leitura da absorbância em 664 nm, 647 nm e 452 nm. Em seguida, fez-se cálculo das concentrações de clorofila a (Equação 5); clorofila b (Equação 6) e carotenoides (Equação 7) (DANESH et al., 2017; FERREIRA et al., 2019b).

Figura 17: Etapas da metodologia de extração de pigmentos.



Fonte: Autora, 2021 – criado com ícones de uso livre.

$$\text{Clorofila a} = 11,93 * \text{ABS}_{664} - 1,93 * \text{ABS}_{647} \quad \text{Equação 5}$$

$$\text{Clorofila b} = 20,36 * \text{ABS}_{647} - 5,50 * \text{ABS}_{664} \quad \text{Equação 6}$$

$$\text{Carotenoides} = 3,86 * \text{ABS}_{452} * \frac{V_{\text{extraído}}}{V_{\text{cultivo}}} \quad \text{Equação 7}$$

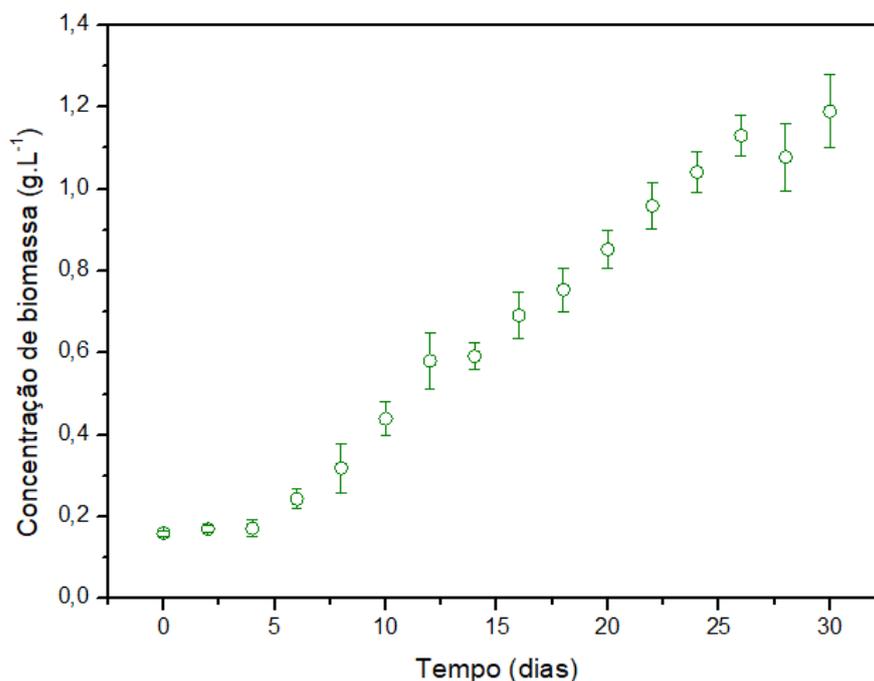
Em que: ABS é a absorvância nos comprimentos de onda definidos; e $V_{\text{extraído}}$ e V_{cultivo} são o volume extraído de pigmento e o volume de cultivo utilizado na análise, ambos em mL.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Cultivo em sistema fechado – Erlenmeyer

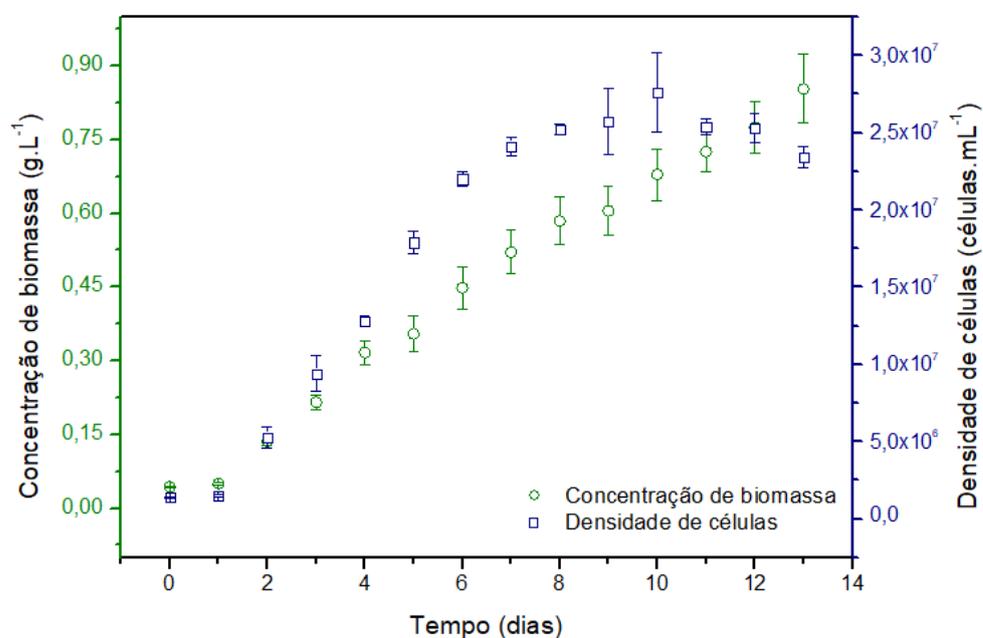
A curva de crescimento da *Botryococcus terribilis* encontra-se apresentada na Figura 18 e a da *Chlorella* sp. na Figura 19. Pode-se notar que a *B. terribilis* inicia a fase exponencial apenas no sexto dia de cultivo, e ao vigésimo sexto dia começa a apresentar uma redução no crescimento, indicando que a cultura está se aproximando da fase estacionária. Já a *Chlorella* sp. atinge a fase exponencial no segundo dia de cultivo, e no décimo primeiro passa a apresentar redução na densidade de células - de $2,76 \cdot 10^7$ células.mL⁻¹ no décimo primeiro dia para $2,34 \cdot 10^7$ células.mL⁻¹ no décimo terceiro dia - o que indica que a cultura pode ter iniciado a fase de decaimento.

Figura 18: Curva de crescimento da microalga *Botryococcus terrebilis* em sistema fechado.



Fonte: Autora, 2021.

Figura 19: Curva de crescimento da microalga *Chlorella* sp. em sistema fechado.



Fonte: Autora, 2021.

A Tabela 9 apresenta os parâmetros de crescimento das duas espécies bem como a porcentagem ou concentração (no caso dos pigmentos) dos

metabólitos extraídos ao final do período de crescimento. A taxa de crescimento específico da *Chlorella* sp. é aproximadamente 2,4 vezes maior que a da *B. terribilis*, fazendo com que o tempo de duplicação de biomassa caia em mais da metade no caso da *Chlorella* sp. A elevada taxa de crescimento da *Chlorella* sp. também faz com que sua produtividade de biomassa seja quase o dobro da *B. terribilis*.

Tabela 9: Parâmetros de crescimento e frações de metabólitos das microalgas *Botryococcus terribilis* e *Chlorella* sp. cultivadas em sistema fechado.

Parâmetro	<i>B. terribilis</i>	<i>Chlorella</i> sp.
Máxima concentração de biomassa (mg.mL ⁻¹)	1,190 ± 0,088	0,853 ± 0,069
Máxima densidade de células (células.mL ⁻¹)	Não se aplica	2,760.10 ⁷ ± 0,026.10 ⁷
Taxa de crescimento específico (d ⁻¹)	0,182 ± 0,031	0,439 ± 0,017
Tempo de duplicação de biomassa (d)	3,803 ± 0,066	1,577 ± 0,059
Produtividade de biomassa (mg.mL ⁻¹ .d ⁻¹)	0,034 ± 0,003	0,058 ± 0,005
Lipídios (%)	31,54 ± 0,78	15,74 ± 1,05
Hidrocarbonetos (%)	10,16 ± 0,52	Não se aplica
Proteínas (%)	32,23 ± 0,87	36,26 ± 2,57
Carboidratos (%)	14,97 ± 0,61	32,14 ± 0,78
Clorofila a (µg.mL ⁻¹)	1,40 ± 0,15	5,29 ± 0,36
Clorofila b (µg.mL ⁻¹)	2,51 ± 0,39	7,75 ± 0,19
Carotenoides (µg.mL ⁻¹)	3,37 ± 0,24	2,55 ± 0,26

Quanto à porcentagem dos metabólitos, nota-se que a fração de proteínas nas duas espécies é similar, entre 32-36 %, valor que é obtido em grande parte das espécies de microalgas (LAM et al., 2018; FERREIRA et al., 2019a; KHOO et al., 2019). A porcentagem de carboidratos na *Chlorella* sp. foi maior do que o dobro da *B. terribilis*. Estes valores também estão de acordo com a literatura, que comumente reporta baixa concentração de carboidratos nas *B. terribilis* (CABANELAS et al., 2015; NASCIMENTO et al., 2015; FERREIRA et al., 2019b) e porcentagens de carboidratos entre 15 e 47 % na *Chlorella* sp. (SAMSUDIN, 2017; FERREIRA et al., 2019b; NAYAK et al., 2020a; NORDIN; YUSOF). A concentração de pigmentos é bastante distinta entre as espécies analisadas (Figura 20), sendo quantificado na ordem de três a quatro vezes mais clorofilas (a e b) na *Chlorella* sp. em relação à *B. terribilis*. Já a concentração de carotenoides é levemente maior na *B. terribilis*.

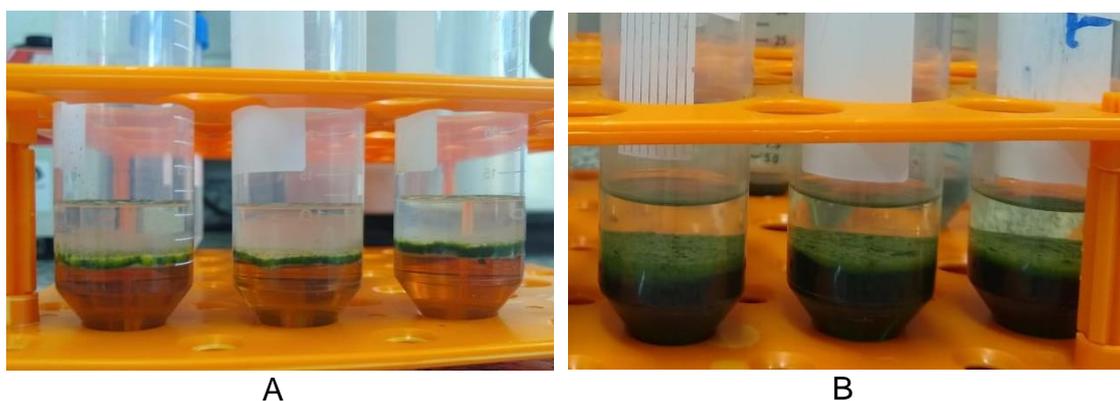
Figura 20: Extração dos pigmentos das microalgas (A) *Botryococcus terribilis*, (B) *Chlorella* sp.



Fonte: Autora, 2021.

A *B. terribilis* apresentou porcentagem de lipídios duas vezes maior que a *Chlorella* sp. Vale ressaltar que os lipídios extraídos da *Botryococcus* também foram analisados quanto a concentração de hidrocarbonetos, identificando que aproximadamente 3 % do óleo extraído com clorofórmio e metanol (BLIGH; DYER, 1959) se referia à hidrocarbonetos. Além disto, a extração de lipídios da *Chlorella* sp. carregou certa quantidade de clorofila, o que não foi observado na *Botryococcus* (Figura 21).

Figura 21: Extração de lipídios por Bligh e Dyer (A) *Botryococcus terribilis*, (B) *Chlorella* sp.



Fonte: Autora, 2021.

A extração de hidrocarbonetos foi realizada com a biomassa da *B. terribilis* e sob o meio de cultivo, a fim de verificar possíveis frações de hidrocarbonetos expelidos pela microalga. Verificou-se que em torno de 75 % dos hidrocarbonetos sintetizados pela microalga permaneceram no entorno da colônia, sendo retidos na membrana filtrante (e utilizados para quantificar a

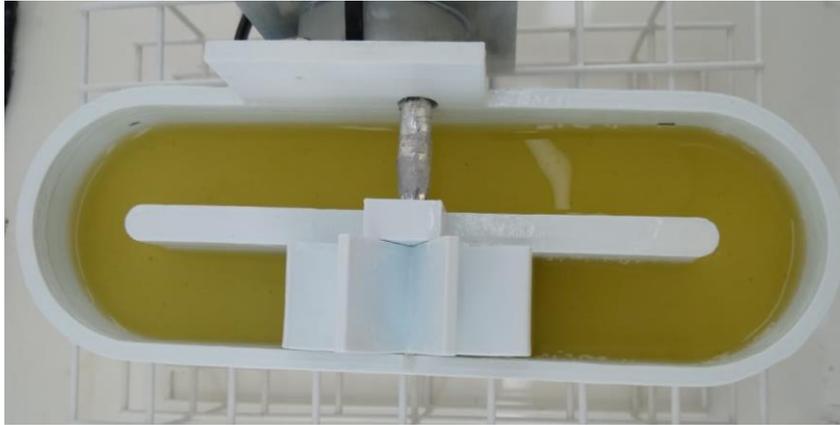
porcentagem de hidrocarbonetos na biomassa), enquanto os 25 % restante foram liberados no meio de cultivo durante o desenvolvimento da espécie. Wan et al., (2019) também constataram que em torno de 70 % dos hidrocarbonetos metabolizados pelas *Botryococcus* permanecem no entorno da colônia.

5.2. Cultivo em sistema aberto – *Raceway*

No cultivo em sistema aberto fez-se necessária a reposição de meio de cultivo, uma vez que houve elevada evaporação da água: na ordem de 45-50 mL por dia para a *Botryococcus terribilis* e de 55-60 mL por dia para a *Chlorella* sp. A diferença no volume de evaporação entre os cultivos pode dever-se as condições ambientais e climáticas, visto que os cultivos foram realizados em dias distintos, ou ainda as diferenças de taxa de fotossíntese nas espécies. Outro fator relevante foi a decantação da biomassa em ambas as espécies a partir do segundo dia de cultivo (Figura 22). Isto dificulta o acesso das células aos nutrientes do meio e ao CO₂ atmosférico, por isso é importante analisar outra conformação do sistema ou uma velocidade de rotação maior do motor. Devido à decantação, o cultivo foi diariamente homogeneizado com pipeta esterilizada, antes da coleta das alíquotas para determinação da concentração de biomassa e densidade de células. Nota-se ainda que não houve contaminação aparente em nenhum dos cultivos (Figura 22), de modo que a concentração inicial do cultivo foi apropriada para manter o predomínio da espécie.

A curva de crescimento da *B. terribilis* encontra-se apresentada na Figura 23 e a da *Chlorella* sp. na Figura 24. Pode-se notar que o comportamento das espécies durante o cultivo é semelhante nas duas repetições e as concentração a partir do sexto dia se tornam bastante próximas. Após o sexto dia a *Chlorella* sp. aparenta iniciar a fase estacionária. A Tabela 10 apresenta os resultados dos parâmetros de crescimento e produção de metabólitos pela *B. terribilis* e pela *Chlorella* sp. no cultivo em *raceway*.

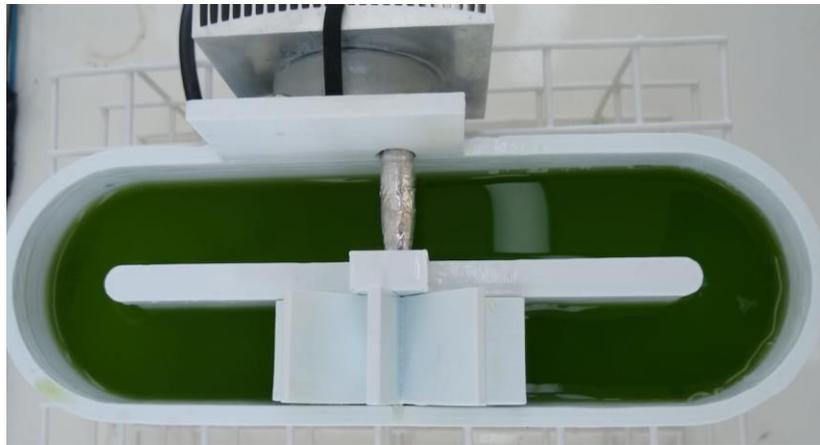
Figura 22: Cultivo em *raceway* (A) Ausência de contaminação no cultivo da *B. terribilis*; (B) decantação da *B. terribilis*; (C) Ausência de contaminação no cultivo da *Chlorella* sp.; (D) decantação da *Chlorella* sp.



A



B



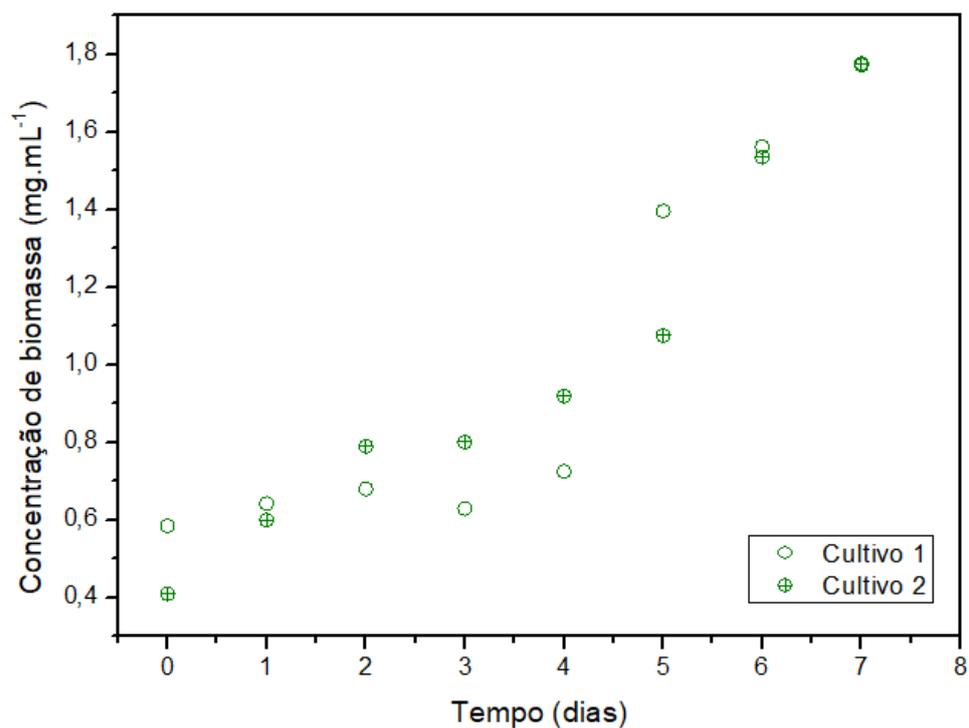
C



D

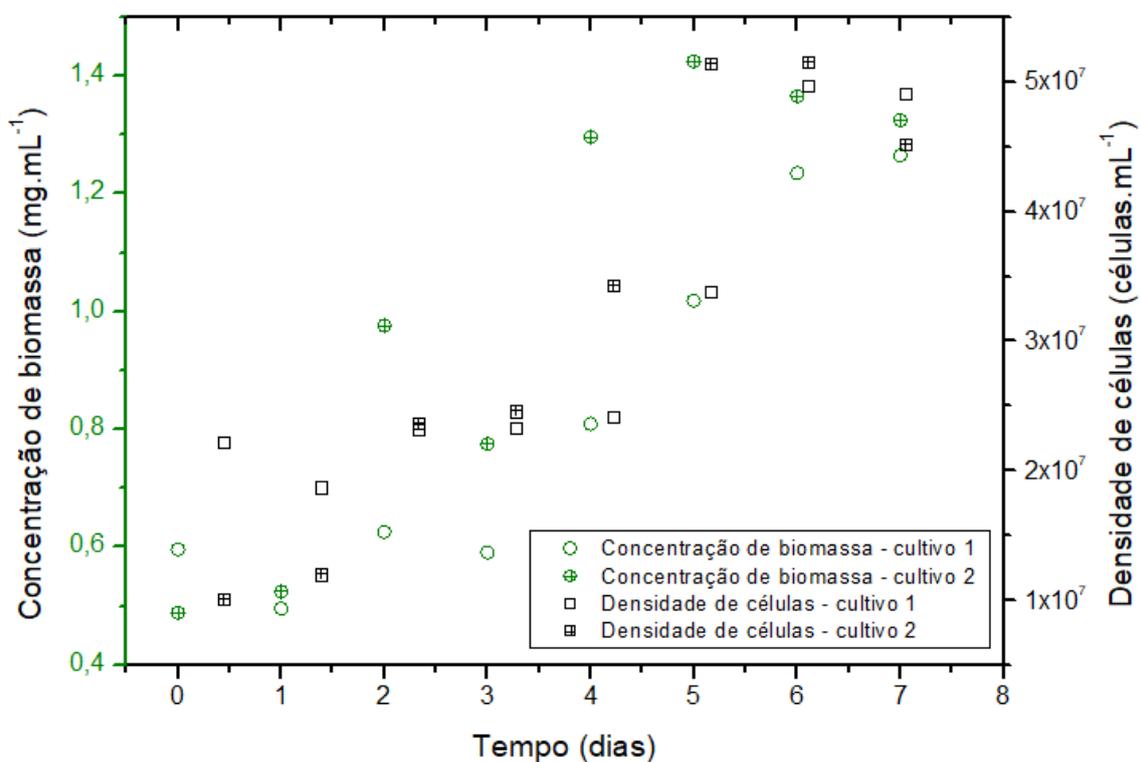
Fonte: Autora, 2021.

Figura 23: Curva de crescimento da *Botryococcus terribilis* em *raceway*.



Fonte: Autora, 2021.

Figura 24: Curva de crescimento da *Chlorella* sp. em *raceway*.



Fonte: Autora, 2021.

Tabela 10: Resultados do cultivo em *raceway* para as microalgas *B. terribilis* e *Chlorella* sp.

Parâmetro	<i>B. terribilis</i>	<i>Chlorella</i> sp.
Máxima concentração de biomassa (mg.mL ⁻¹)	1,773 ± 0,003	1,296 ± 0,044
Máxima densidade de células (células.mL ⁻¹)	Não se aplica	5,060x10 ⁷ ± 0,129.10 ⁷
Taxa de crescimento específico (d ⁻¹)	0,478 ± 0,003	0,517 ± 0,018
Tempo de duplicação de biomassa (d)	1,449 ± 0,010	1,342 ± 0,047
Produtividade de biomassa (mg.mL ⁻¹ .d ⁻¹)	0,182 ± 0,018	0,107 ± 0,017
Lipídios (%)	31,48 ± 0,97	16,99 ± 0,08
Hidrocarbonetos (%)	6,58 ± 0,04	Não se aplica
Proteínas (%)	33,74 ± 0,09	38,17 ± 0,73
Carboidratos (%)	14,06 ± 0,16	31,67 ± 0,94
Clorofila a (µg.mL ⁻¹)	6,57 ± 0,31	17,52 ± 0,29
Clorofila b (µg.mL ⁻¹)	1,17 ± 0,59	12,25 ± 1,39
Carotenoides (µg.mL ⁻¹)	4,15 ± 0,06	3,06 ± 0,05

O cultivo da *B. terribilis* em sistema aberto foi promissor, aumentando em 2,6 vezes a taxa de crescimento específico - em relação ao cultivo em Erlenmeyer – e com isso reduzindo o tempo de duplicação de biomassa de 3,803 dias para 1,449 dias. A produtividade de biomassa aumentou 5,3 vezes no sistema aberto. Notou-se queda na porcentagem de hidrocarbonetos (reduzido 4 %), entretanto, a porcentagem de hidrocarbonetos retidos na biomassa e liberados no meio de cultivo também foi alterada: em torno de 68 % dos hidrocarbonetos permanecem no entorno da colônia e 32 % são liberados no meio. As proteínas, carboidratos e lipídios permaneceram em porcentagens semelhantes no cultivo em sistema aberto e fechado, com variações de em torno de 1 %. Quanto a concentração de pigmentos, houve aumento da clorofila a em 4,5 vezes, e redução na clorofila b, em 2,14 vezes. Assim, a porcentagem de clorofila a na biomassa passou de 0,11±0,02 % no cultivo fechado para 0,37±0,02 % no cultivo aberto; e a clorofila b passou de 0,21±0,02 % para 0,06±0,03 %. A concentração de carotenoides teve aumento menos significativo, de apenas 1,23 vezes na concentração; o que corresponde a 0,04 % de diferença na porcentagem de biomassa.

Na *Chlorella* sp. a produtividade de biomassa dobrou no cultivo em sistema aberto e a taxa de crescimento específico foi 1,17 vezes maior, levando a redução do tempo de duplicação de biomassa na mesma proporção. A

porcentagem de lipídios permaneceu semelhante, com aumento de 1 % em relação ao cultivo em sistema fechado. O mesmo pode ser observado com a porcentagem de carboidratos, a qual apresentou variação de menos de meio por cento. Quanto às proteínas, houve um aumento de aproximadamente 2 % no cultivo aberto. Houve maior concentração de pigmentos, entretanto, deve-se levar em conta que a concentração de biomassa também aumentou no sistema aberto. Verificando a porcentagem destes metabólitos tem-se que a apenas a clorofila a apresentou uma variação expressiva, representando $1,35 \pm 0,02$ % da biomassa em cultivo aberto e apenas $0,60 \pm 0,03$ % no cultivo em sistema fechado. A clorofila b, representou $0,95 \pm 0,14$ % da biomassa em sistema aberto e $0,89 \pm 0,08$ % em sistema fechado; enquanto os carotenoides representaram $0,24 \pm 0,01$ % da biomassa em sistema aberto e $0,31 \pm 0,03$ % em sistema fechado.

O beneficiamento do crescimento das espécies em sistema aberto pode estar relacionado a maior disponibilidade de CO₂ atmosférico no sistema aberto e a menor profundidade e espessura da coluna d'água – facilitando a penetração da luz (SPIJKERMAN; LUKAS; WACKER, 2017; LAM et al., 2018). Deve-se considerar ainda que o cultivo em sistema aberto foi realizado com concentração inicial maior que o fechado e monitorado por um menor tempo, fatores que são utilizados nos cálculos de produtividade de biomassa e podem refletir nos valores mais elevados obtidos em sistema aberto. Além disto, as variações obtidas nos cultivos podem estar relacionada a evaporação do meio de cultivo, levando ao aumento da concentração dos metabólitos.

5.3. Cultivo em condição de estresse

5.3.1. *Botryococcus terribilis*

A Tabela 11 apresenta os resultados do estresse para a *B. terribilis* utilizando como resposta a porcentagem ou concentração de metabólitos. Comparando os resultados obtidos no sistema fechado com e sem estresse nota-se um aumento na porcentagem de lipídios (de 31,54 % para até 49,51 %) e de hidrocarbonetos (de 10,16 % para 29,14 %). Assim, o estresse causado pela redução de nitrogênio e fósforo levou ao aumento da biossíntese dos dois

metabólitos de maior interesse comercial na *B. terribilis*. Nota-se ainda que a porcentagem de proteínas foi menor no cultivo em estresse, uma vez que a biossíntese deste metabólito é altamente dependente dos nutrientes em análise. A porcentagem de carboidratos e de pigmentos permaneceu similar para o cultivo com e sem estresse. A produtividade de biomassa foi maior no cultivo com estresse, entretanto deve-se levar em conta que este cultivo foi avaliado por um menor tempo e iniciando com maior concentração – parâmetros utilizados no cálculo de produtividade – o que pode ter interferido no valor obtido.

.

Tabela 11: Resultados do planejamento fatorial completo 2² para estresse da microalga *Botryococcus terribilis*.

Ponto	Nível dos fatores ¹		Resposta							
	N	P	Produtividade de biomassa (mg.mL ⁻¹ .d ⁻¹)	Lipídios (%)	Proteínas (%)	Carboidratos (%)	Hidrocarbonetos (%)	Carotenoides (µg.mL ⁻¹)	Clorofila a (µg.mL ⁻¹)	Clorofila b (µg.mL ⁻¹)
1	-1	-1	0,066	29,85	18,06	14,51	26,35	0,28	0,42	1,37
2	+1	-1	0,149	32,78	19,82	14,18	23,64	0,28	0,62	1,26
3	-1	+1	0,216	49,50	11,83	10,74	21,45	0,47	0,56	0,41
4	+1	+1	0,120	27,60	22,47	15,19	29,14	0,27	0,41	0,78
5 (C)	0	0	0,091	35,49	25,17	15,43	15,02	0,44	0,80	0,67
6 (C)	0	0	0,138	37,92	24,01	14,38	14,03	0,48	0,74	0,59
7 (C)	0	0	0,124	37,15	25,65	15,01	15,66	0,47	0,82	0,38

Nota: Fatores baseados na porcentagem dos nutrientes nitrogênio (N) e fósforo (P) no meio de cultivo CHU13-8x modificado, sendo -1 com 25 %, +1 com 75 % e 0 com 50%; C: Ponto central.

A Tabela 12 apresenta a estimativa dos efeitos obtidos para cada resposta em análise. Com esta, pode-se notar que houve fatores significativos (p -valor menor que 0,05) a 95 % de confiança, apenas para a produtividade de biomassa e porcentagem de lipídios. Os fatores estatisticamente significativos são mostrados em negrito na Tabela 12.

O efeito das variáveis independentes não foram significativos para as demais variáveis dependentes, na região experimental explorada. Desta forma, a Tabela 13 apresenta a Análise de Variância (ANOVA) do planejamento 2^2 com ponto central para estresse da microalga *B. terribilis*, para as duas respostas em que alguns dos fatores foram significativas, ou seja, para produtividade de biomassa e percentual de lipídios. Através da ANOVA, pôde-se verificar que um modelo linear de previsão de produtividade de biomassa não se ajustou bem aos dados experimentais, uma vez que o fator F_{calc} foi menor do que o F_{tab} . Sendo assim, caso fosse o objetivo fosse a obtenção de um modelo para a predição de produtividade de biomassa, novos pontos experimentais seguindo um planejamento composto central rotacional seriam necessários para se testar um modelo de segunda ordem. Verificou-se que, para esta variável de resposta a interação entre nitrogênio e fósforo foi significativa, com efeito negativo, apontando que quando há uma redução dos dois nutrientes conjuntamente, a produtividade de biomassa diminui significativamente. Com isso evidencia-se a importância destes nutrientes para o crescimento da espécie, visto que sua redução promove uma queda na divisão celular levando a menores valores de produtividade de biomassa.

Já o modelo linear de previsão de porcentagem de lipídios descrito pela equação 8, em que todos os fatores foram significativos, apresentou um melhor ajuste aos dados experimentais. Neste caso, o F_{cal} foi maior que o F_{tab} e o coeficiente de determinação (R^2) foi igual a 0,9692. Para este metabólito, a concentração de nitrogênio e a interação entre os fatores nitrogênio e fósforo apresentaram efeito negativo, ao passo que a concentração de fósforo apresentou efeito positivo. Assim, a maior porcentagem de lipídio foi obtida quando nitrogênio está no nível -1 e fósforo no nível +1 (conforme mostrado na curva de nível, Figura 25). Faz-se interessante estudos subsequentes de otimização na concentração destes nutrientes por meio de planejamento composto central rotacional, a fim de estabelecer os níveis ótimos de cada um

dos parâmetros. O aumento na porcentagem de lipídios ao reduzir a concentração de nitrogênio é amplamente reportada na literatura, com resultados similares ao desta pesquisa para a microalga *Botryococcus braunii* (ANTO; PUGAZHENDHI; MATHIMANI, 2019; CHENG et al., 2013; CHOI et al., 2011; NAYAK et al., 2020a). E uma série de estudos tem mostrado que o efeito no nitrogênio no aumento da biossíntese de lipídios está intimamente ligada a manutenção de fósforo em níveis mais elevados (ARORA et al., 2016; CHEN et al., 2017; DANESH et al., 2017; MANDOTRA et al., 2016). Quanto aos demais metabólitos, recomenda-se o estudo dos fatores em outros níveis, de modo a obter uma região em que estes possam ser significativos, aliado ao estudo de modelos quadráticos quando a superfície não puder se enquadrar no modelo linear.

$$\% \text{ Lipídios} = 35,76 - 4,74x + 3,62y - 6,21xy \quad \text{Equação 8}$$

Em que: x é o fator nitrogênio e y o fator fósforo em variáveis codificadas

Tabela 12: Estimativa dos efeitos e ajustes do estudo de planejamento experimental para estresse da *B. terrabilis*.

Resposta	Fator	Efeito	Desvio padrão	t(3)	p-valor	Coefficiente
Produtividade de biomassa	Nitrogênio (N)	-7,13	24,97	-0,29	0,7939	-3,56
	Fósforo (P)	60,69	24,97	2,49	0,0933	30,34
	Interação N e P	-89,40	24,97	-3,57	0,0374	-44,70
Lipídios	Nitrogênio (N)	-9,48	1,77	-5,35	0,0127	-4,74
	Fósforo (P)	7,23	1,77	4,08	0,0265	3,62
	Interação N e P	-12,41	1,77	-7,01	0,0059	6,21
Proteínas	Nitrogênio (N)	6,20	5,25	1,18	0,3234	3,10
	Fósforo (P)	-1,79	5,25	-0,34	0,7561	-0,89
	Interação N e P	4,44	5,25	0,84	0,4606	2,22
Carboidratos	Nitrogênio (N)	2,06	1,06	1,94	0,1480	1,03

	Fósforo (P)	-1,38	1,06	-1,30	0,2850	-0,69
	Interação N e P	2,39	1,06	2,25	0,1101	1,19
Hidrocarbonetos	Nitrogênio (N)	2,49	7,77	0,32	0,7697	1,24
	Fósforo (P)	0,30	7,77	0,03	0,9716	0,15
	Interação N e P	5,20	7,77	0,67	0,5513	2,60
Clorofila a	Nitrogênio (N)	0,02	0,22	0,11	0,9157	0,01
	Fósforo (P)	-0,03	0,22	-0,16	0,8824	-0,01
	Interação N e P	-0,17	0,22	-0,80	0,4799	-0,09
Clorofila b	Nitrogênio (N)	0,13	0,33	0,39	0,7215	0,06
	Fósforo (P)	-0,72	0,33	-2,16	0,1186	-0,36
	Interação N e P	0,24	0,33	0,72	0,5220	0,12
Carotenoides	Nitrogênio (N)	-0,10	0,10	-0,94	0,4148	-0,05
	Fósforo (P)	0,09	0,10	0,85	0,4581	0,04
	Interação N e P	-0,10	0,10	-0,94	0,4148	-0,05

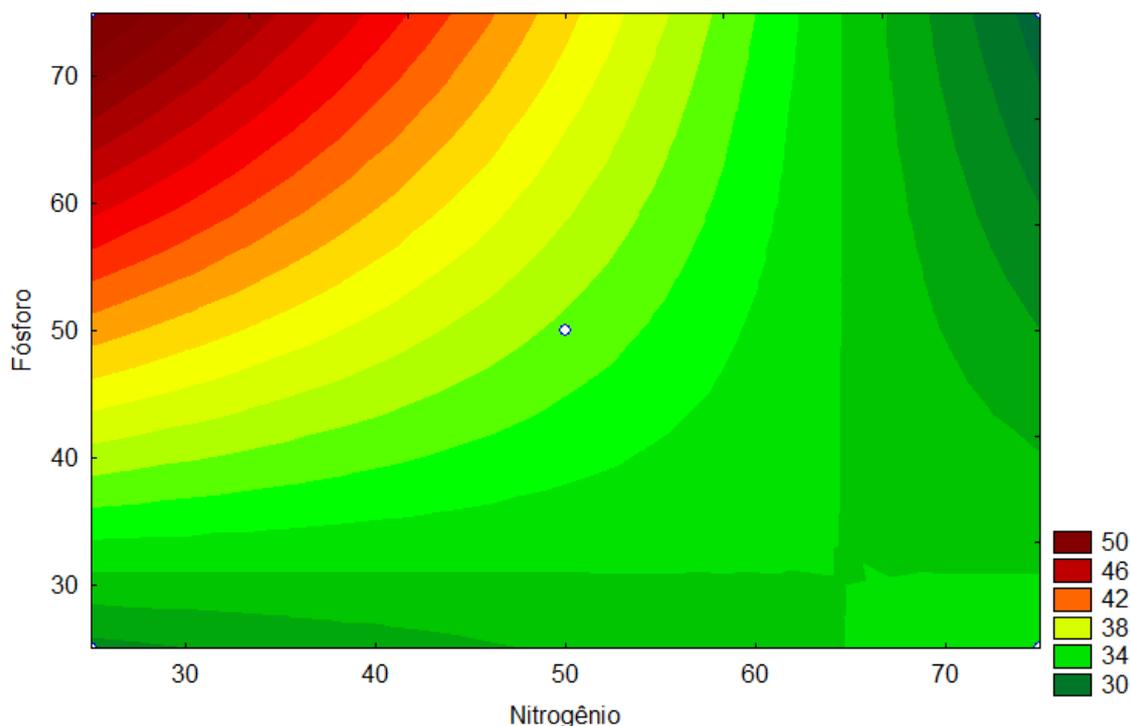
Nota: t(3) refere-se à distribuição t de Student em função do grau de liberdade, que neste caso é 3.

Tabela 13: ANOVA do planejamento experimental para estresse da *B. terrestris*.

Resposta	Fonte de variação	SQ	GL	MQ	Ajuste		
					R ²	F _{cal}	F _{tab}
Produtividade de biomassa	Regressão	11.726,47	3	3.908,82	-	-	-
	Resíduos	1.871,63	3	623,88	-	-	-
	Total	13.598,10	6	-	0,8624	6,26	9,28
Lipídios	Regressão	296,44	3	98,81	-	-	-
	Resíduos	9,41	3	3,14	-	-	-
	Total	305,85	6	-	0,9692	31,50	9,28

Nota: SQ: Soma Quadrática; GL: Grau de Liberdade; MQ: Média Quadrática; R² coeficiente de determinação; F_{cal}=MQ_{Regressão}/MQ_{Resíduo} e F_{tab}: valor tabelado correspondente a distribuição de Fisher-Snedecor.

Figura 25: Curva de nível para a porcentagem de lipídios no estudo de estresse da microalga *B. terribilis*.



Fonte: Autora, 2021.

5.3.2. *Chlorella* sp.

A Tabela 14 apresenta os resultados do estresse por redução na porcentagem de nitrogênio e fósforo para a microalga *Chlorella* sp. Nesta pode-se notar um aumento expressivo na porcentagem de lipídios (de aproximadamente 17 % para 35 %) e de proteínas (de 38 % para 62 %). Estes metabólitos são de grande interesse no estudo da *Chlorella* sp. com enfoque em suplementação alimentar, e este estudo de estresse pode ampliar ambos simultaneamente. Em contrapartida, houve redução na porcentagem de carboidratos, o qual foi reduzido para menos da metade do valor obtido sem estresse. A porcentagem de pigmentos permaneceu similar nos estudos, variando entre 2,24 % e 2,54 %. De forma similar à *B. terribilis* houve um aumento na produtividade de biomassa, o que pode também estar relacionado as condições experimentais, sendo interessante adicionar um experimento controle em ensaios futuros.

Tabela 14: Resultados do planejamento fatorial completo 2² para estresse da microalga *Chlorella* sp.

Ponto	Fatores ¹ (%)		Resposta						
	N	P	Produtividade de biomassa (mg.mL ⁻¹ .d ⁻¹)	Lipídios (%)	Proteínas (%)	Carboidratos (%)	Carotenoides (µg.mL ⁻¹)	Clorofila a (µg.mL ⁻¹)	Clorofila b (µg.mL ⁻¹)
1	-1	-1	0,065	20,35	57,53	13,32	2,71	6,07	2,55
2	+1	-1	0,063	21,41	57,77	11,06	2,56	5,63	3,32
3	-1	+1	0,063	34,99	54,43	5,19	2,56	5,82	3,21
4	+1	+1	0,044	29,95	62,16	5,71	4,58	7,34	4,23
5 (PC)	0	0	0,067	29,25	57,66	8,97	3,43	7,61	3,52
6 (PC)	0	0	0,069	30,80	56,28	7,57	3,45	6,87	3,80
7 (PC)	0	0	0,069	30,47	58,18	8,50	3,97	7,86	3,72

Nota: Fatores baseados na porcentagem dos nutrientes nitrogênio (N) e fósforo (P) no meio de cultivo BG-11; Pb: Produtividade de biomassa; C: Ponto central.

A Tabela 15 apresenta a estimativa dos efeitos obtidos para cada resposta em análise. Com esta, pode-se notar que houve fatores significativos (p -valor menor que 0,05), a 95 % de confiança, para a porcentagem de lipídios, proteínas e carboidratos. O efeito da concentração de fósforo foi significativo para os lipídios e carboidratos, sendo positivo para lipídios e negativo para carboidratos. A porcentagem de proteínas apresentou efeito positivo para a concentração de nitrogênio e a interação entre os fatores.

A Tabela 16 apresenta a Análise de Variância (ANOVA) do planejamento fatorial completo 2^2 com ponto central para estresse da microalga *Chlorella* sp., para as respostas que apresentaram fatores significativos. Para a porcentagem de proteínas e carboidratos o F_{cal} foi maior que o F_{tab} , indicando um bom ajuste ao modelo linear e alcançando R^2 de 0,9226 para proteínas e 0,9717 para carboidratos (Equações 9 e 10). Já para a porcentagem de lipídios o modelo linear não é apropriado visto que o F_{cal} foi menor que o F_{tab} .

$$\% \text{ Proteínas} = 57,72 + 1,99x + 0,32y + 1,87xy \quad \text{Equação 9}$$

$$\% \text{ Carboidratos} = 8,62 - 0,43x - 3,37y + 0,69xy \quad \text{Equação 10}$$

Em que: x é o fator nitrogênio e y o fator fósforo em variáveis codificadas

Tabela 15: Estimativa dos efeitos e ajustes do estudo de planejamento experimental para estresse da *Chlorella* sp.

Resposta	Fator	Efeito	Desvio padrão	t(3)	p-valor	Coefficiente
Produtividade de biomassa	Nitrogênio (N)	-10,46	6,96	-1,50	0,2299	-5,23
	Fósforo (P)	-10,82	6,96	-1,55	0,2180	-5,41
	Interação N e P	-8,13	6,96	-1,17	0,3272	-4,07
Lipídios	Nitrogênio (N)	-1,99	2,73	-0,73	0,5184	-0,99
	Fósforo (P)	11,59	2,73	4,25	0,0239	5,79

	Interação N e P	-3,05	2,73	-1,12	0,3449	-1,52
	Nitrogênio (N)	3,98	0,92	4,33	0,0227	1,99
Proteínas	Fósforo (P)	0,64	0,92	0,70	0,5341	0,32
	Interação N e P	3,74	0,92	4,07	0,0268	1,87
	Nitrogênio (N)	-0,87	0,68	-1,27	0,2924	-0,43
Carboidratos	Fósforo (P)	-6,74	0,68	-9,87	0,0022	-3,37
	Interação N e P	1,39	0,68	2,03	0,1347	0,69
	Nitrogênio (N)	0,54	1,02	0,53	0,6337	0,27
Clorofila a	Fósforo (P)	0,73	1,02	0,71	0,5264	0,36
	Interação N e P	0,98	1,02	0,96	0,4082	0,49
	Nitrogênio (N)	0,89	0,29	3,07	0,0545	0,45
Clorofila b	Fósforo (P)	0,78	0,29	2,69	0,0741	0,39
	Interação N e P	0,12	0,29	0,43	0,6968	0,06
	Nitrogênio (N)	0,93	0,46	2,02	0,1362	0,47
Carotenoides	Fósforo (P)	0,93	0,46	2,02	0,1362	0,47
	Interação N e P	1,08	0,46	2,35	0,1005	0,54

Nota: t(3) refere-se à distribuição t de Student em função do grau de liberdade, que neste caso é 3.

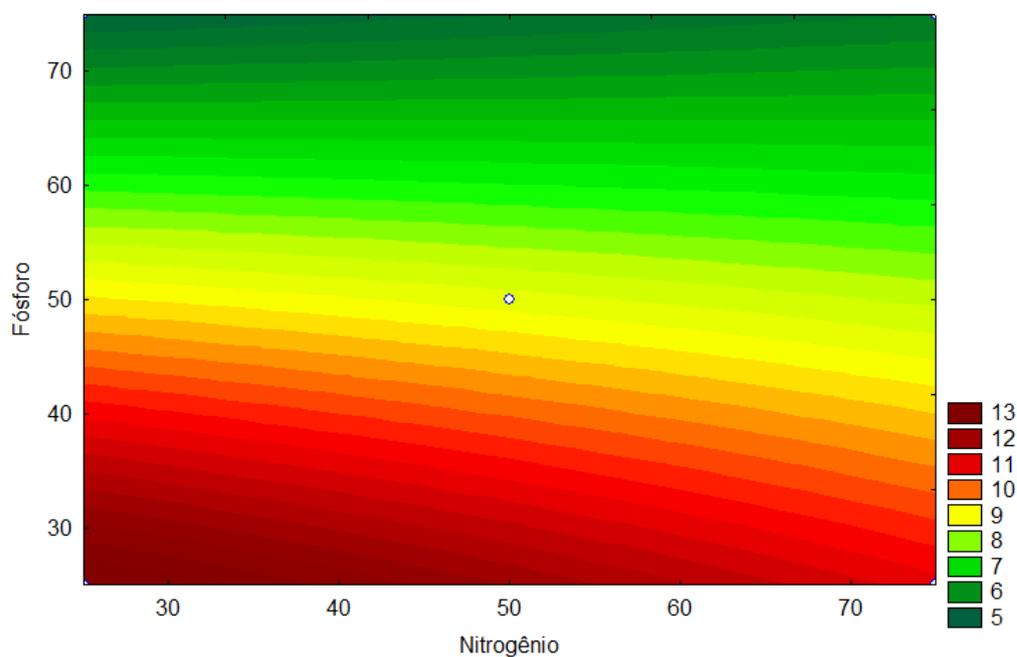
Tabela 16: ANOVA do planejamento experimental para estresse da *Chlorella* sp.

Resposta	Fonte de variação	SQ	GL	MQ	Ajuste		
					R ²	F _{cal}	F _{tab}
Lipídios	Regressão	147,59	3	49,20	-	-	-
	Resíduos	22,31	3	7,44	-	-	-
	Total	169,90	6	-	0,8687	6,61	9,28
Proteínas	Regressão	30,33	3	10,11	-	-	-
	Resíduos	2,54	3	0,85	-	-	-
	Total	32,87	6	-	0,9226	11,89	9,28
Carboidratos	Regressão	48,11	3	16,04	-	-	-
	Resíduos	1,40	3	0,47	-	-	-
	Total	49,51	6	-	0,9717	34,12	9,28

Nota: SQ: Soma Quadrática; GL: Grau de Liberdade; MQ: Média Quadrática; R² coeficiente de determinação; $F_{cal} = \frac{MQ_{Regressão}}{MQ_{Resíduo}}$ e F_{tab}: valor tabelado correspondente a distribuição de Fisher-Snedecor.

Para os carboidratos, apenas o fósforo apresentou efeito significativo, e a máxima porcentagem deste metabólito foi obtida quando este nutriente estava no nível -1. Pela Figura 26 nota-se que a variação da resposta para fator fósforo é bastante expressiva, enquanto não há variações significativas para a faixa analisada de concentração de nitrogênio. A concentração de fósforo apresentou efeito oposto para a porcentagem de carboidratos e de lipídios. A redução de carboidratos em condições de aumento na porcentagem de lipídios também foram reportadas por Zhu *et al.* (2015) e por Arora *et al.* (2016) e podem indicar que estes compostos são interconvertíveis, visto que possuem o mesmo precursor em seu metabolismo, o glicerol-3-fosfato (MEHRABADI; FARID; CRAGzGS, 2017).

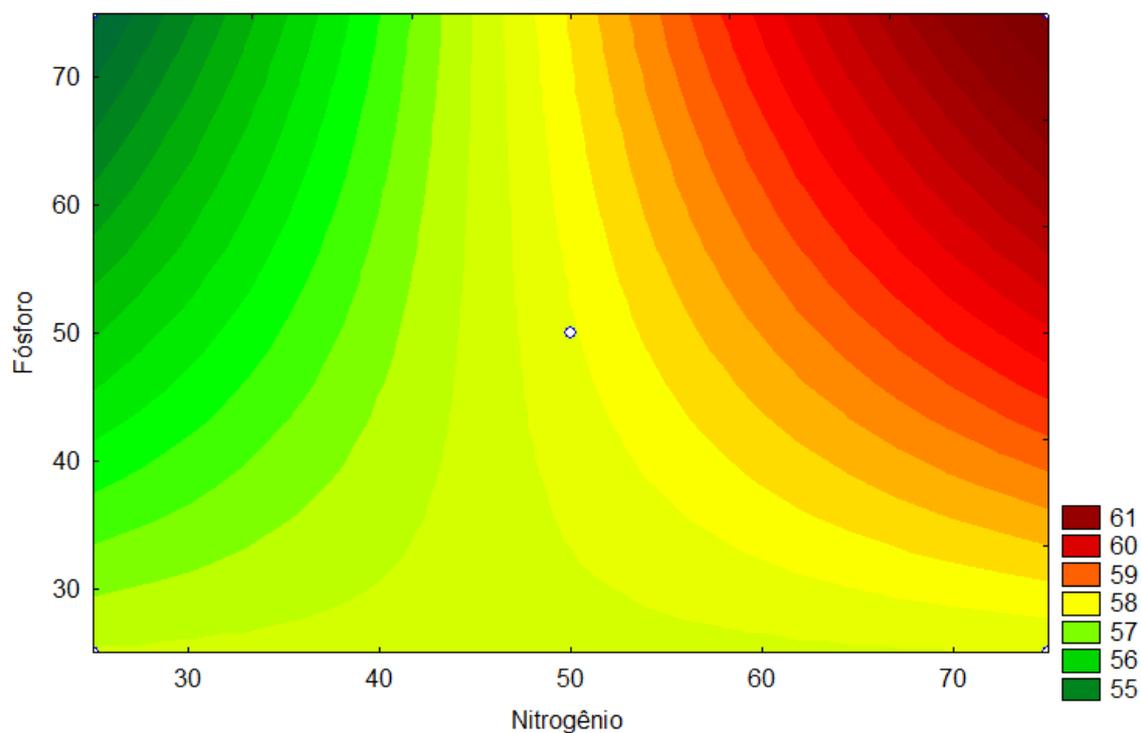
Figura 26: Curva de nível do planejamento 2² para estresse da microalga *Chlorella* sp. adotando com resposta a porcentagem de carboidratos.



Fonte: Autora, 2021.

Quanto as proteínas, tem-se que a concentração de nitrogênio e a interação entre os fatores foram significativos, apresentando efeito positivo, com maior valor quando ambos os fatores se encontram no nível +1 (Figura 27). Assim, nota-se que a biossíntese de proteínas na microalga é altamente dependente da disponibilidade de nitrogênio, entretanto, requer a presença de fósforo, visto que este nutriente é essencial no metabolismo das enzimas e demais proteínas (ARORA et al., 2016; DANESH et al., 2017; HUSSAIN et al., 2020).

Figura 27: Curva de nível do planejamento 2^2 para estresse da microalga *Chlorella* sp. adotando com resposta a porcentagem de proteínas.



Fonte: Autora, 2021.

5.4. Caracterização do óleo

5.4.1. Ácidos graxos

Foi verificado o perfil de ácidos graxos (Tabela 17) dos lipídios extraídos das duas espécies em estudo, nos sistemas aberto e fechado além da condição de maior produção de lipídios no estudo de estresse (concentração de fósforo em 75 % e de nitrogênio em 25 % para ambas as espécies). Pode-se notar que ambas as espécies sintetizam maiores frações de ácido palmítico, oléico e alfa linolênico. Também foram obtidas porcentagens relevantes do ácido linoléico e gama linolênico para na *Chlorella* sp., e de ácido nervônico na *B. terribilis*. A *B. terribilis* apresenta maior fração de ácidos graxos saturados e monoinsaturados, enquanto a *Chlorella* sp. sintetiza maiores quantidades de ácidos graxos poliinsaturados. Assim, estes resultados estão em acordo com os valores comumente reportados na literatura (Tabela 3 – sessão 2.2.1.).

Nota-se ainda que não houve variações expressivas no perfil de ácidos graxos dentro das condições analisadas para cada espécie. Vale ressaltar que esta análise tem propósito qualitativo, identificando os principais ácidos graxos presentes na amostra. A porcentagem obtida pode variar com a quantidade de amostra utilizada para a análise, os parâmetros operacionais e a sensibilidade do método. Além disso alguns compostos não foram identificados pelo método, sendo necessário análises complementares. E, para o caso da *B. terribilis* deve-se considerar que uma fração do óleo extraído por Bligh e Dyer se refere a hidrocarbonetos que não foram identificados pela análise de CG-FID.

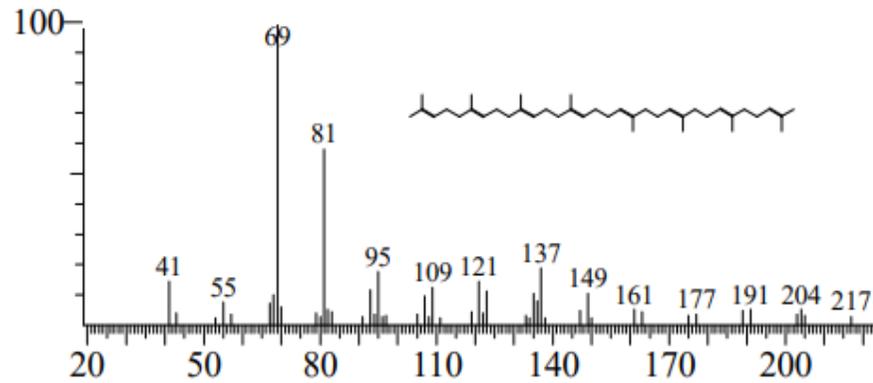
Tabela 17: Perfil de ácidos graxos obtido nas diferentes condições de cultivo para as espécies em estudo.

Ácido graxo (%)		<i>B. Terribilis</i>			<i>Chlorella sp.</i>		
		Sistema fechado	Sistema aberto	Estresse	Sistema fechado	Sistema aberto	Estresse
Mirístico	C14:0	0,00	0,97	0,00	1,57	0,00	0,00
Palmítico	C16:0	10,32	10,96	10,08	13,93	14,56	14,51
Palmitoléico	C16:1	0,00	0,00	0,00	1,26	4,51	3,82
Margárico	C17:0	0,79	1,07	1,00	0,47	3,70	1,67
Esteárico	C18:0	0,40	0,00	0,00	2,75	0,00	0,00
Oléico	C18:1c	7,66	8,04	8,63	20,33	13,71	12,65
Linoléico	C18:2c	0,00	0,00	0,00	18,63	16,79	22,41
α -linolênico	C18:3 α	7,38	6,23	6,89	6,04	7,73	7,91
γ -linolênico	C18:3 γ	0,00	0,00	0,00	12,94	10,31	11,75
Nervônico	C24:1	9,77	10,58	10,91	1,57	0,00	0,00
Saturados		11,51	13,00	11,08	18,72	18,26	16,18
Monoinsaturados		17,43	18,62	19,54	21,59	21,59	16,47
Poliinsaturados		7,38	6,23	6,89	37,61	37,71	42,07

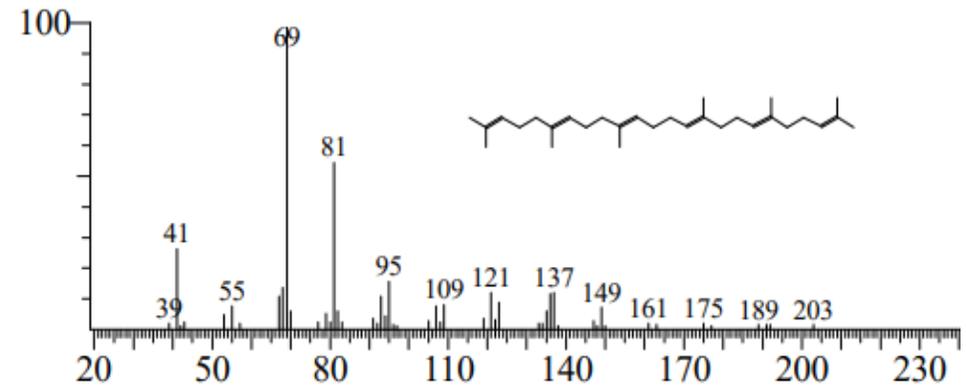
5.4.2. Hidrocarbonetos

Os hidrocarbonetos da extraídos da microalga *B. terribilis* foram caracterizados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-MS). Foram identificados: esqualeno ($C_{30}H_{50}$), octacosano ($C_{28}H_{58}$), pentacosapentaene ($C_{25}H_{42}$), tetracosane ($C_{24}H_{50}$), heneicosane ($C_{21}H_{44}$), eicosano ($C_{20}H_{42}$), octadecane ($C_{18}H_{38}$), hexadecano ($C_{16}H_{34}$) e nonano ($C_{13}H_{28}$). Assim, foram identificados botriococenos, alcadienos e alguns alcanos. Além disso foi identificada a presença de carotenoides no óleo extraído ($C_{40}H_{66}$), o que pode justificar a coloração alaranjada na extração de hidrocarbonetos. Os cromatogramas de alguns dos hidrocarbonetos encontram-se apresentados na Figura 28 juntamente com a representação estrutural dos compostos. Os demais hidrocarbonetos identificados possuem o cromatograma apresentado no Anexo 5.

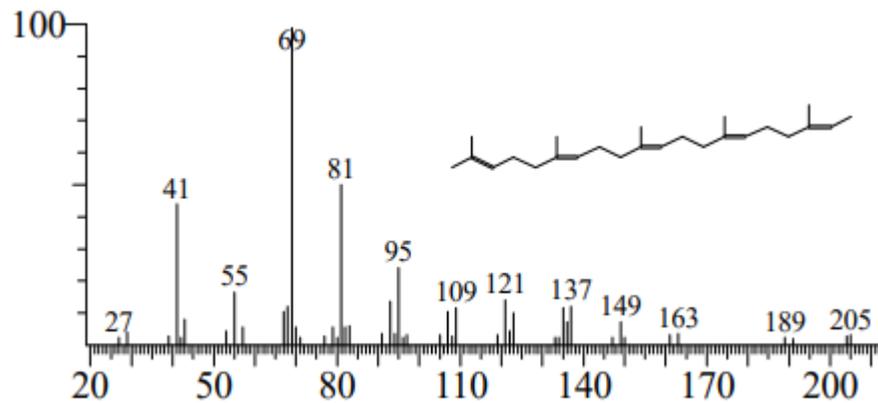
Figura 28: Cromatogramas de alguns compostos identificados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (A) $C_{40}H_{66}$ (B) $C_{30}H_{50}$ (C) $C_{25}H_{42}$ (D) $C_{28}H_{58}$.



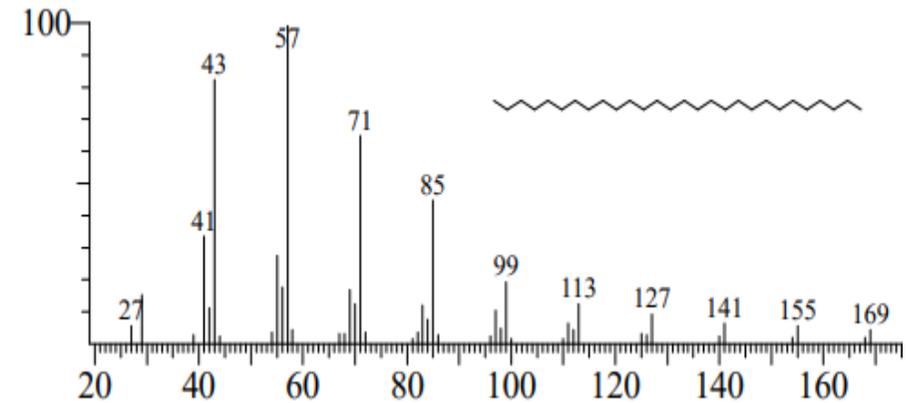
A



B



C



D

Fonte: Autora, 2021.

6. CONCLUSÕES

O estudo do cultivo das microalgas *Botryococcus terribilis* e *Chlorella* sp. se mostrou promissor em sistema fechado e aberto. No cultivo em sistema fechado a *B. terribilis* iniciou a fase exponencial apenas no sexto dia de cultivo, e a *Chlorella* sp. no segundo dia, o que levou a maior produtividade de biomassa para a *Chlorella* sp. No sistema aberto houve aumento na taxa de crescimento específico (atingindo $0,478 \text{ d}^{-1}$ para a *B. terribilis* e $0,517 \text{ d}^{-1}$ para a *Chlorella* sp.) e redução no tempo de duplicação de biomassa (1,577 dias para a *B. terribilis* e 1,342 dias para a *Chlorella* sp.) em ambas as espécies. Isto pode ter relação com a maior facilidade de acesso ao CO_2 atmosférico, intensificando o processo de fotossíntese. Não houve contaminação aparente do cultivo em sistema aberto, indicando que a concentração inicial de biomassa foi apropriada para manter o cultivo com predomínio da microalga. A porcentagem de metabólitos nos cultivos em sistema fechado e aberto foi similar. Na *B. terribilis* foi obtido entre 28-30 % de lipídios; 7-10 % de hidrocarbonetos; 32-34% de proteínas e 14-15 % de carboidratos. Já na *Chlorella* sp. foi obtido 15-17 % de lipídios, 36-38 % de proteínas e 31-32 % de carboidratos. Notou-se ainda que a *Chlorella* sp. produz entre 3 e 4 vezes mais clorofilas a e b do que a *B. terribilis*. No estudo de estresse foram obtidos fatores significativos, a 95 % de confiança, para a produtividade de biomassa e porcentagem de lipídios na *B. terribilis*; e para a porcentagem de lipídios, proteínas e carboidratos no estudo com a *Chlorella* sp. Ao manter o nitrogênio no nível -1 (25 %) e fósforo no nível +1 (75 %) foram obtidas as maiores porcentagem de lipídios: 49 % para a *B. terribilis* e 35 % para a *Chlorella* sp. Observou-se um efeito negativo quanto a concentração de fósforo para o acúmulo de carboidratos, o qual é ampliado quando este nutriente se encontra no nível -1. Na *Chlorella* sp. a porcentagem de proteínas apresentou a concentração de nitrogênio e a interação entre os fatores como significativa, obtendo maior valor (62 %) quando ambos os nutrientes se encontram no nível +1. Com este estudo foi possível analisar a forma com o cultivo (em sistema aberto, fechado e em condição de estresse) afeta o crescimento e porcentagem de metabólitos nas espécies *B. terribilis* e *Chlorella* sp. Estes resultados são relevantes para a tomada de decisão sobre o cultivo e aplicações destas espécies em um contexto de biorrefinaria.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Otimizar as condições de cultivo em sistema fechado em função de parâmetros como: intensidade de luz, fotoperíodo, concentração de nutrientes, temperatura e pH.
- Avaliar o efeito da suplementação de CO₂ nos sistemas fechado e aberto.
- Avaliar o sistema fechado com maior agitação e maior volume de ar.
- Avaliar o cultivo em *raceway* com maior velocidade do impelidor ou outra conformação do sistema.
- Otimizar o cultivo em *raceway*, em função de parâmetros como: intensidade de luz, concentração de nutrientes e pH.
- Verificar ausência de contaminação no cultivo por métodos mais precisos, como coloração de gram.
- Analisar a ampliação de escala do cultivo em *raceway*.
- Estudar outros níveis para os fatores que não foram significativos no planejamento de experimentos para estresse das microalgas;
- Otimizar o estresse da microalga, em função das concentrações de nitrogênio e fósforo.
- Estudar outros fatores de estresse para as microalgas, como pH, temperatura, salinidade, concentração de metais ou de compostos sulfonados.

REFERÊNCIAS

ABBA, Zubainatu; MOHAMMAD FUZI, Siti Fatimah Zahrah; MATIAS PERALTA, Hazel Monica; MUHAMMAD NIMAYA, Muhammad. Significance of Carbohydrate Pathway in the Maximization of Biofuel Production in *Botryococcus* sp: A Brief Review. **CLSU International Journal of Science & Technology**, [S. l.], v. 4, n. 1, p. 18–29, 2020. DOI: 10.22137/ijst.2020.v4n1.02. Disponível em: https://www.clsu-ijst.org/index.php/ijst3/article/view/v4n1_02/37. Acesso em: 9 dez. 2020.

ADESANYA, Victoria O.; CADENA, Erasmo; SCOTT, Stuart A.; SMITH, Alison G. Life cycle assessment on microalgal biodiesel production using a hybrid cultivation system. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 163, p. 343–355, 2014. DOI: 10.1016/j.biortech.2014.04.051.

AMARAL, Mateus de Souza. **Cultivo da microalga marinha *Chlorella* sp. como fonte de matéria prima para produção de biodiesel**. 2014. Universidade de São Paulo, Lorena, 2014.

ANDRULEVICIUTE, Vaida; MAKAREVICIENE, Violeta; SKORUPSKAITE, Virginija; GUMBYTE, Milda. Biomass and oil content of *Chlorella* sp., *Haematococcus* sp., *Nannochloris* sp. and *Scenedesmus* sp. under mixotrophic growth conditions in the presence of technical glycerol. **J Appl Phycol**, [S. l.], v. 26, p. 83–90, 2014. DOI: doi.org/10.1007/s10811-013-0048-x.

ANTO, Susaimanickam; PUGAZHENDHI, Arivalagan; MATHIMANI, Thangavel. Lipid enhancement through nutrient starvation in *Chlorella* sp. and its fatty acid profiling for appropriate bioenergy feedstock. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, [S. l.], v. 20, p. 101179, 2019. DOI: 10.1016/j.bcab.2019.101179. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S187881811930307X>.

ANUNCIATO, Talita Pizza; DA ROCHA FILHO, Pedro Alves. Carotenoids and polyphenols in nutricosmetics, nutraceuticals, and cosmeceuticals. **Journal of Cosmetic Dermatology**, [S. l.], v. 11, n. 1, p. 51–54, 2012. DOI: 10.1111/j.1473-2165.2011.00600.x. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1473-2165.2011.00600.x>.

ARÉVALO-GALLEGOS, Alejandra; GARCIA-PEREZ, J. Saul; CARRILLO-NIEVES, Danay; RAMIREZ-MENDOZA, R. A.; IQBAL, Hafiz M. N.; PARRA-

- SALDÍVAR, Roberto. Botryococcus braunii as a bioreactor for the production of nanoparticles with antimicrobial potentialities. **International Journal of Nanomedicine**, [S. l.], v. 13, p. 5591–5604, 2018. DOI: 10.2147/IJN.S174205.
- ARORA, Neha; PATEL, Alok; PRUTHI, Parul A.; PRUTHI, Vikas. Synergistic dynamics of nitrogen and phosphorous influences lipid productivity in Chlorella minutissima for biodiesel production. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 213, p. 79–87, 2016. DOI: 10.1016/j.biortech.2016.02.112.
- ASHOKKUMAR, Veeramuthu; CHEN, Wei-Hsin; KAMYAB, Hesam; KUMAR, Gopalakrishnan; AL-MUHTASEB, Ala'a H.; NGAMCHARUSSRIVICHAI, Chawalit. Cultivation of microalgae Chlorella sp. in municipal sewage for biofuel production and utilization of biochar derived from residue for the conversion of hematite iron ore (Fe₂O₃) to iron (Fe) – Integrated algal biorefinery. **Energy**, [S. l.], v. 189, p. 116128, 2019. DOI: 10.1016/j.energy.2019.116128. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0360544219318237>.
- ASHOKKUMAR, Veeramuthu; RENGASAMY, Ramasamy. Mass culture of Botryococcus braunii Kutz. under open raceway pond for biofuel production. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 104, p. 394–399, 2012. DOI: 10.1016/j.biortech.2011.10.093.
- ASHOKKUMAR, Veeramuthu; SALIM, Mohd Razman; SALAM, Zainal; SIVAKUMAR, Pandian; CHONG, Cheng Tung; ELUMALAI, Sanniyasi; SURESH, Veeraperumal; ANI, Farid Nasir. Production of liquid biofuels (biodiesel and bioethanol) from brown marine macroalgae Padina tetrastratica. **Energy Conversion and Management**, [S. l.], v. 135, p. 351–361, 2017. DOI: 10.1016/j.enconman.2016.12.054. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0196890416311281>.
- AZIZ, Md Maniruzzaman A.; KASSIM, Khairul Anuar; SHOKRAVI, Zahra; JAKARNI, Fauzan Mohd; LIEU, Hong Yu; ZAINI, Nabilah; TAN, Lian See; ISLAM, Saiful; SHOKRAVI, Hoofar. **Two-stage cultivation strategy for simultaneous increases in growth rate and lipid content of microalgae: A review** **Renewable and Sustainable Energy Reviews** Elsevier Ltd, , 2020. DOI: 10.1016/j.rser.2019.109621.
- BABA, Masato; KIKUTA, Fumie; SUZUKI, Iwane; WATANABE, Makoto M.; SHIRAIWA, Yoshihiro. Wavelength specificity of growth, photosynthesis, and hydrocarbon production in the oil-producing green alga Botryococcus braunii.

Bioresource Technology, [S. l.], v. 109, p. 266–270, 2012. DOI: 10.1016/j.biortech.2011.05.059.

BAZAES, Jazmin; SEPULVEDA, Claudia; ACIÉN, F. Gabriel; MORALES, Juan; GONZALES, Leonel; RIVAS, Mariella; RIQUELME, Carlos. Outdoor pilot-scale production of *Botryococcus braunii* in panel reactors. **Journal of Applied Phycology**, [S. l.], v. 24, n. 6, p. 1353–1360, 2012. DOI: 10.1007/s10811-012-9787-3.

BEAULIEU, Lucie; BONDU, Stéphanie; DOIRON, Kim; RIOUX, Laurie-Eve; TURGEON, Sylvie L. Characterization of antibacterial activity from protein hydrolysates of the macroalga *Saccharina longicuris* and identification of peptides implied in bioactivity. **Journal of Functional Foods**, [S. l.], v. 17, p. 685–697, 2015. DOI: 10.1016/j.jff.2015.06.026. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1756464615003205>.

BERNARD, Olivier; MAIRET, Francis; CHACHUAT, Benoît. **Microalgae Biotechnology**. Cham: Springer International Publishing, 2016. v. 153 DOI: 10.1007/978-3-319-23808-1. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-23808-1>.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A RAPID METHOD OF TOTAL LIPID EXTRACTION AND PURIFICATION. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, [S. l.], v. 37, n. 8, p. 911–917, 1959. DOI: 10.1139/o59-099. Disponível em: <http://www.nrcresearchpress.com/doi/10.1139/o59-099>.

BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, [S. l.], v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976. DOI: 10.1016/0003-2697(76)90527-3. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0003269776905273>.

BRASIL, B. S. A. F.; SILVA, F. C. P.; SIQUEIRA, F. G. Microalgae biorefineries: The Brazilian scenario in perspective. **New Biotechnology**, [S. l.], v. 39, p. 90–98, 2017. DOI: 10.1016/j.nbt.2016.04.007.

BUX, Faizal; CHISTI, Yusuf. **Green Energy and Technology Algae Biotechnology Products and Processes**. [s.l.: s.n.]. DOI: 10.1007/978-3-319-12334-9 ISSN. Disponível em: <http://www.springer.com/series/8059>.

CABANELAS, Iago Teles Dominguez; ARBIB, Zouhayr; CHINALIA, Fábio A.; SOUZA, Carolina Oliveira; PERALES, José A.; ALMEIDA, Paulo Fernando;

DRUZIAN, Janice Izabel; NASCIMENTO, Iracema Andrade. From waste to energy: Microalgae production in wastewater and glycerol. **Applied Energy**, [S. l.], v. 109, p. 283–290, 2013. DOI: 10.1016/j.apenergy.2013.04.023.

CABANELAS, Iago Teles Dominguez; MARQUES, Sheyla Santa Isabel; DE SOUZA, Carolina Oliveira; DRUZIAN, Janice Isabel; NASCIMENTO, Iracema Andrade. Botryococcus, what to do with it? Effect of nutrient concentration on biorefinery potential. **Algal Research**, [S. l.], v. 11, p. 43–49, 2015. DOI: 10.1016/j.algal.2015.05.009.

CHAUDRY, Sofia; BAHRI, Parisa A.; MOHEIMANI, Navid R. Superstructure optimization and energetic feasibility analysis of process of repetitive extraction of hydrocarbons from Botryococcus braunii – a species of microalgae. **Computers & Chemical Engineering**, [S. l.], v. 97, p. 36–46, 2017. DOI: 10.1016/j.compchemeng.2016.11.018. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0098135416303520>.

CHEN, Bailing; WAN, Chun; MEHMOOD, Muhammad Aamer; CHANG, Jo-shu; BAI, Fengwu; ZHAO, Xinqing. Manipulating environmental stresses and stress tolerance of microalgae for enhanced production of lipids and value-added products-A review State Key Laboratory of Microbial Metabolism and School of Life Science and School of Life Science and Biotechnology. **Bioresource Technology**, [S. l.], 2017. DOI: 10.1016/j.biortech.2017.05.170. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.170>.

CHENG, Pengfei; JI, Bei; GAO, Lili; ZHANG, Wei; WANG, Junfeng; LIU, Tianzhong. The growth, lipid and hydrocarbon production of Botryococcus braunii with attached cultivation. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 138, p. 95–100, 2013. DOI: 10.1016/j.biortech.2013.03.150. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852413005361>.

CHENG, Pengfei; MUYLAERT, Koenraad; CHENG, Jay J.; LIU, Hui; CHEN, Paul; ZHOU, Chengxu; YAN, Xiaojun; RUAN, Roger. Journal Pre-proofs. [S. l.], 2019. a.

CHENG, Pengfei; OKADA, Shigeru; ZHOU, Chengxu; CHEN, Paul; HUO, Shuhao; LI, Kun; ADDY, Min; YAN, Xiaojun; RUAN, Roger R. High-value chemicals from Botryococcus braunii and their current applications – A review. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 291, n. July, 2019. b. DOI: 10.1016/j.biortech.2019.121911.

CHENG, Sze Yin; SHOW, Pau-Loke; LAU, Beng Fye; CHANG, Jo-Shu; LING, Tau Chuan. New Prospects for Modified Algae in Heavy Metal Adsorption. **Trends in Biotechnology**, [S. l.], v. 37, n. 11, p. 1255–1268, 2019. c. DOI: 10.1016/j.tibtech.2019.04.007. Disponível em:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016777991930085X>.

CHOI, Gang-Guk; KIM, Byung-Hyuk; AHN, Chi-Yong; OH, Hee-Mock. Effect of nitrogen limitation on oleic acid biosynthesis in *Botryococcus braunii*. **Journal of Applied Phycology**, [S. l.], v. 23, n. 6, p. 1031–1037, 2011. DOI: 10.1007/s10811-010-9636-1. Disponível em:

<http://link.springer.com/10.1007/s10811-010-9636-1>.

CHU, S. P. The Influence of the Mineral Composition of the Medium on the Growth of Planktonic Algae: Part I. Methods and Culture Media. **The Journal of Ecology**, [S. l.], v. 30, n. 2, p. 284, 1942. DOI: 10.2307/2256574. Disponível em: <https://www.jstor.org/stable/2256574?origin=crossref>.

COLLING KLEIN, Bruno; BONOMI, Antonio; MACIEL FILHO, Rubens. **Integration of microalgae production with industrial biofuel facilities: A critical review** *Renewable and Sustainable Energy Reviews* Elsevier Ltd, , 2018. DOI: 10.1016/j.rser.2017.04.063.

DANESH, Azadeh Fazeli; EBRAHIMI, Sirous; SALEHI, Abolfazl; PARSA, Alireza. Impact of nutrient starvation on intracellular biochemicals and calorific value of mixed microalgae. **Biochemical Engineering Journal**, [S. l.], v. 125, p. 56–64, 2017. DOI: 10.1016/j.bej.2017.05.017.

DASAN, Yaleeni Kanna; LAM, Man Kee; YUSUP, Suzana; LIM, Jun Wei; LEE, Keat Teong. Life cycle evaluation of microalgae biofuels production: Effect of cultivation system on energy, carbon emission and cost balance analysis. **Science of the Total Environment**, [S. l.], v. 688, p. 112–128, 2019. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2019.06.181.

DE QUEIROZ MENDES, Maria Cristina; GONZÁLEZ, Augusto Abilio Comas; MORENO, Maria Lucia Vieira; FIGUEIRA, Claudio Pereira; DE CASTRO NUNES, Jose Marcos. Morphological and ultrastructural features of a strain of *botryococcus terribilis* (trebouxiophyceae) from brazil. **Journal of Phycology**, [S. l.], v. 48, n. 5, p. 1099–1106, 2012. DOI: 10.1111/j.1529-8817.2012.01181.x.

DESAI, Rupali K.; STREEFLAND, Mathieu; WIJFFELS, Rene H.; EPPINK, Michel H. M. Extraction and stability of selected proteins in ionic liquid based

aqueous two phase systems. **Green Chemistry**, [S. l.], v. 16, n. 5, p. 2670–2679, 2014. DOI: 10.1039/c3gc42631a.

DESHMUKH, Suchit; KUMAR, Ritunesh; BALA, Kiran. Microalgae biodiesel: A review on oil extraction, fatty acid composition, properties and effect on engine performance and emissions. **Fuel Processing Technology**, [S. l.], v. 191, n. November 2018, p. 232–247, 2019. DOI: 10.1016/j.fuproc.2019.03.013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2019.03.013>.

DUBOIS, Michel; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, Fred. **Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances**. [s.l: s.n.].

EROGLU, Ela; MELIS, Anastasios. Extracellular terpenoid hydrocarbon extraction and quantitation from the green microalgae *Botryococcus braunii* var. Showa. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 101, n. 7, p. 2359–2366, 2010. DOI: 10.1016/j.biortech.2009.11.043. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852409015478>.

FAN, Xiaodan; BAI, Lu; ZHU, Liang; YANG, Li; ZHANG, Xuwu. Marine Algae-Derived Bioactive Peptides for Human Nutrition and Health. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [S. l.], v. 62, n. 38, p. 9211–9222, 2014. DOI: 10.1021/jf502420h. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf502420h>.

FERREIRA, G. F.; RÍOS PINTO, L. F.; MACIEL FILHO, R.; FREGOLENTE, L. V. A review on lipid production from microalgae: Association between cultivation using waste streams and fatty acid profiles. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [S. l.], v. 109, n. April, p. 448–466, 2019. a. DOI: 10.1016/j.rser.2019.04.052.

FERREIRA, Gabriela F.; RÍOS PINTO, Luisa F.; CARVALHO, Patrícia O.; COELHO, Mirela B.; EBERLIN, Marcos N.; MACIEL FILHO, Rubens; FREGOLENTE, Leonardo V. Biomass and lipid characterization of microalgae genera *Botryococcus*, *Chlorella*, and *Desmodesmus* aiming high-value fatty acid production. **Biomass Conversion and Biorefinery**, [S. l.], n. 1, 2019. b. DOI: 10.1007/s13399-019-00566-3.

FLEMMING, Hans-Curt; WINGENDER, Jost. The biofilm matrix. **Nature Reviews Microbiology**, [S. l.], v. 8, n. 9, p. 623–633, 2010. DOI: 10.1038/nrmicro2415. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/nrmicro2415>.

GALANTE, Joana Raquel Almeida. **Indução da carotenogénese em *Chlorella sp.* para alteração da cor da biomassa.** 2018. Peniche Instituto Politécnico de Leiria, [S. l.], 2018.

GALARZA, Valeria Olmedo. Carbohydrates and proteins in microalgae: Potential functional foods. **Brazilian Journal of Food Technology**, [S. l.], v. 22, p. 2019043, 2019. DOI: 10.1590/1981-6723.04319. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1981-67232019000100304&lng=en&nrm=iso&tlng=es. Acesso em: 23 out. 2020.

GARCÍA-CUBERO, Rafael; CABANELAS, Iago Teles Dominguez; SIJTSMA, Lolke; KLEINEGRIS, Dorinde M. M.; BARBOSA, María J. Production of exopolysaccharide by *Botryococcus braunii* CCALA 778 under laboratory simulated Mediterranean climate conditions. **Algal Research**, [S. l.], v. 29, p. 330–336, 2018. DOI: 10.1016/j.algal.2017.12.003. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211926417305465>.

GOH, Brandon Han Hoe; ONG, Hwai Chyuan; CHEAH, Mei Yee; CHEN, Wei Hsin; YU, Kai Ling; MAHLIA, Teuku Meurah Indra. Sustainability of direct biodiesel synthesis from microalgae biomass: A critical review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [S. l.], v. 107, p. 59–74, 2019. DOI: 10.1016/j.rser.2019.02.012.

GOPALAKRISHNAN, Saratram; BAKER, Jordan; KRISTOFFERSEN, Linda; BETENBAUGH, Michael J. Redistribution of metabolic fluxes in *Chlorella protothecoides* by variation of media nitrogen concentration. **Metabolic Engineering Communications**, [S. l.], v. 2, p. 124–131, 2015. DOI: 10.1016/j.meteno.2015.09.004. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2214030115300109>.

GRIFFITHS, Melinda; HARRISON, Susan T. L.; SMIT, Monique; MAHARAJH, Dheepak. Major Commercial Products from Micro- and Macroalgae. *In*: [s.l.: s.n.]. p. 269–300. DOI: 10.1007/978-3-319-12334-9_14. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-12334-9_14.

GUIHÉNEUF, Freddy; KHAN, Asif; TRAN, Lam-Son P. Genetic Engineering: A Promising Tool to Engineer Physiological, Biochemical, and Molecular Stress Resilience in Green Microalgae. **Frontiers in Plant Science**, [S. l.], v. 7, 2016. DOI: 10.3389/fpls.2016.00400. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fpls.2016.00400/abstract>.

- GÜNERKEN, E.; D'HONDT, E.; EPPINK, M. H. M.; GARCIA-GONZALEZ, L.; ELST, K.; WIJFFELS, R. H. **Cell disruption for microalgae biorefineries** *Biotechnology Advances* Elsevier Inc., , 2015. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2015.01.008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25656098/>. Acesso em: 22 jun. 2020.
- GUY-OHLSON, Dorothy. Botryococcus as an aid in the interpretation of palaeoenvironment and depositional processes. **Review of Palaeobotany and Palynology**, [S. l.], v. 71, n. 1–4, p. 1–15, 1992. DOI: 10.1016/0034-6667(92)90155-A. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/003466679290155A>.
- HALIM, Ronald; DANQUAH, Michael K.; WEBLEY, Paul A. **Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: A review** *Biotechnology Advances* Elsevier, , 2012. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2012.01.001.
- HARTMAN, L.; LAGO, R. C. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. **Lab Pract**, [S. l.], v. 22, n. 6, p. 475–476, 1973.
- HEGEDUS, Adriana; COMAN, Cristian; DRUGA, Bogdan; SICORA, Cosmin; DRAGOS, Nicolaie. Botryococcus terribilis – A microalga capable to produce hydrocarbons similar to fossil fuel. **Journal of Biotechnology**, [S. l.], v. 185, p. S121–S122, 2014. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2014.07.416. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168165614007615>.
- HEGEDŰS, Adriana; MOCAN, Aurel; BARBU-TUDORAN, Lucian; COMAN, Cristian; DRUGĂ, Bogdan; SICORA, Cosmin; DRAGOȘ, Nicolaie. Morphological, biochemical, and phylogenetic assessments of eight Botryococcus terribilis strains collected from freshwaters of Transylvania. **Journal of Applied Phycology**, [S. l.], v. 27, n. 2, p. 865–878, 2015. DOI: 10.1007/s10811-014-0387-2.
- HENKANATTE-GEDERA, S. M.; SELVARATNAM, T.; KARBAKHSHRAVARI, M.; MYINT, M.; NIRMALAKHANDAN, N.; VAN VOORHIES, W.; LAMMERS, Peter J. Removal of dissolved organic carbon and nutrients from urban wastewaters by Galdieria sulphuraria: Laboratory to field scale demonstration. **Algal Research**, [S. l.], v. 24, p. 450–456, 2017. DOI: 10.1016/j.algal.2016.08.001. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211926416302582>.
- HERNÁNDEZ, D.; RIAÑO, B.; COCA, M.; GARCÍA-GONZÁLEZ, M. C.

Saccharification of carbohydrates in microalgal biomass by physical, chemical and enzymatic pre-treatments as a previous step for bioethanol production. **Chemical Engineering Journal**, [S. l.], v. 262, p. 939–945, 2015. DOI: 10.1016/j.cej.2014.10.049.

HIROSE, Mana; MUKAIDA, Fukiko; OKADA, Sigeru; NOGUCHI, Tetsuko. Active hydrocarbon biosynthesis and accumulation in a green alga, *Botryococcus braunii* (race A). **Eukaryotic Cell**, [S. l.], v. 12, n. 8, p. 1132–1141, 2013. DOI: 10.1128/EC.00088-13.

HO, Shih-Hsin et al. Dynamic metabolic profiling together with transcription analysis reveals salinity-induced starch-to-lipid biosynthesis in alga *Chlamydomonas* sp. JSC4. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 7, n. 1, p. 45471, 2017. DOI: 10.1038/srep45471. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/srep45471>.

HO, Shih Hsin; HUANG, Shu Wen; CHEN, Chun Yen; HASUNUMA, Tomohisa; KONDO, Akihiko; CHANG, Jo Shu. Bioethanol production using carbohydrate-rich microalgae biomass as feedstock. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 135, p. 191–198, 2013. DOI: 10.1016/j.biortech.2012.10.015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23116819/>. Acesso em: 22 jun. 2020.

HUSSAIN, Javid; WANG, Xiaoqing; SOUSA, Leandro; ALI, Roshan; RITTMANN, Bruce E.; LIAO, Wei. Using non-metric multi-dimensional scaling analysis and multi-objective optimization to evaluate green algae for production of proteins, carbohydrates, lipids, and simultaneously fix carbon dioxide. **Biomass and Bioenergy**, [S. l.], v. 141, p. 105711, 2020. DOI: 10.1016/j.biombioe.2020.105711. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0961953420302452>.

IKARAN, Z.; SUÁREZ-ALVAREZ, S.; URRETA, I.; CASTAÑÓN, S. The effect of nitrogen limitation on the physiology and metabolism of *Chlorella vulgaris* var L3. **Algal Research**, [S. l.], v. 10, p. 134–144, 2015. DOI: 10.1016/J.ALGAL.2015.04.023.

JACKSON, Brent A.; BAHRI, Parisa A.; MOHEIMANI, Navid R. Repetitive extraction of botryococcene from *Botryococcus braunii*: a study of the effects of different solvents and operating conditions. **Journal of Applied Phycology**, [S. l.], v. 31, n. 6, p. 3491–3501, 2019. DOI: 10.1007/s10811-019-01883-w.

JIN, Jian; DUPRÉ, Catherine; YONEDA, Kohei; WATANABE, Makoto M.;

LEGRAND, Jack; GRIZEAU, Dominique. Characteristics of extracellular hydrocarbon-rich microalga *Botryococcus braunii* for biofuel production: Recent advances and opportunities. **Process Biochemistry**, [S. l.], p. 9, 2015.

JUDD, S. J.; AL MOMANI, F. A. O.; ZNAD, H.; AL KETIFE, A. M. D. The cost benefit of algal technology for combined CO₂ mitigation and nutrient abatement. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [S. l.], v. 71, p. 379–387, 2017. DOI: 10.1016/j.rser.2016.12.068. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1364032116311236>.

KADIR, Wan Nadiah Amalina; LAM, Man Kee; UEMURA, Yoshimitsu; LIM, Jun Wei; LEE, Keat Teong. Harvesting and pre-treatment of microalgae cultivated in wastewater for biodiesel production: A review. **Energy Conversion and Management**, [S. l.], v. 171, n. May, p. 1416–1429, 2018. DOI: 10.1016/j.enconman.2018.06.074.

KHOO, Choon Gek; DASAN, Yaleeni Kanna; LAM, Man Kee; LEE, Keat Teong. Algae biorefinery: Review on a broad spectrum of downstream processes and products. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 292, n. August, 2019. DOI: 10.1016/j.biortech.2019.121964.

KLEIN, Bruno Colling. **Cultivo de microalgas para produção de bioetanol de terceira geração**. 2013. Universidade Estadual de Campinas, [S. l.], 2013.

KOMÁREK, Jiří; MARVAN, Petr. Morphological Differences in Natural Populations of the Genus *Botryococcus* (Chlorophyceae). **Archiv fur Protistenkunde**, [S. l.], v. 141, n. 1–2, p. 65–100, 1992. DOI: 10.1016/S0003-9365(11)80049-7.

KORHONEN, Hannu; PIHLANTO, Anne. Bioactive peptides: Production and functionality. **International Dairy Journal**, [S. l.], v. 16, n. 9, p. 945–960, 2006. DOI: 10.1016/j.idairyj.2005.10.012. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958694605002426>.

KOYANDE, Apurav Krishna; SHOW, Pau-Loke; GUO, Ruixin; TANG, Bencan; OGINO, Chiaki; CHANG, Jo-Shu. Bio-processing of algal bio-refinery: a review on current advances and future perspectives. **Bioengineered**, [S. l.], v. 10, n. 1, p. 574–592, 2019. DOI: 10.1080/21655979.2019.1679697. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/21655979.2019.1679697>. Acesso em: 25 nov. 2020.

LAM, G. P.; VERMUE, M. H.; EPPINK, M. H. M.; WIJFFELS, R. H.; VAN DEN

BERG, C. **Multi-Product Microalgae Biorefineries: From Concept Towards Reality** *Trends in Biotechnology* Elsevier Ltd, , 2018. DOI: 10.1016/j.tibtech.2017.10.011.

LARGEAU, C; CASADEVALL, E; BERKALOFF, C. The biosynthesis of long-chain hydrocarbons in the green alga *Botryococcus braunii*. **Phytochemistry**, [S. l.], v. 19, p. 1081–1085, 1980.

LEKSHMI, B.; JOSEPH, Rebekah S.; JOSE, Anitta; ABINANDAN, S.; SHANTHAKUMAR, S. Studies on reduction of inorganic pollutants from wastewater by *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus abundans*. **Alexandria Engineering Journal**, [S. l.], v. 54, n. 4, p. 1291–1296, 2015. DOI: 10.1016/j.aej.2015.09.013. Disponível em:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1110016815001519>.

LI, Jun; PAN, Kehou; TANG, Xuexi; LI, Yun; ZHU, Baohua; ZHAO, Yan. The molecular mechanisms of *Chlorella* sp. responding to high CO₂: A study based on comparative transcriptome analysis between strains with high- and low-CO₂ tolerance. **Science of The Total Environment**, [S. l.], v. 763, p. 144185, 2021. DOI: 10.1016/J.SCITOTENV.2020.144185.

LIU, Junzhi; GE, Yaming; CHENG, Haixiang; WU, Lianghuan; TIAN, Guangming. Aerated swine lagoon wastewater: A promising alternative medium for *Botryococcus braunii* cultivation in open system. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 139, p. 190–194, 2013. DOI: 10.1016/j.biortech.2013.04.036.

LU, Qian et al. Growing *Chlorella* sp. on meat processing wastewater for nutrient removal and biomass production. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 198, p. 189–197, 2015. DOI: 10.1016/j.biortech.2015.08.133. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852415012390>.

LUO, Le; HE, Huijun; YANG, Chunping; WEN, Shan; ZENG, Guangming; WU, Mengjie; ZHOU, Zili; LOU, Wei. Nutrient removal and lipid production by *Coelastrella* sp. in anaerobically and aerobically treated swine wastewater. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 216, p. 135–141, 2016. DOI: 10.1016/j.biortech.2016.05.059. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S096085241630699X>.

MA, Jingwei; ZHAO, Quan Bao; LAURENS, Lieve L. M.; JARVIS, Eric E.; NAGLE, Nick J.; CHEN, Shulin; FREAR, Craig S. Mechanism, kinetics and microbiology of inhibition caused by long-chain fatty acids in anaerobic digestion

of algal biomass. **Biotechnology for Biofuels**, [S. l.], v. 8, n. 1, p. 141, 2015. DOI: 10.1186/s13068-015-0322-z. Disponível em: <https://biotechnologyforbiofuels.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13068-015-0322-z>. Acesso em: 22 jun. 2020.

MALIBARI, Raghdah; SAYEGH, Fotoon; ELAZZAZY, Ahmed M.; BAESHEN, Mohamed N.; DOUROU, Marianna; AGGELIS, George. Reuse of shrimp farm wastewater as growth medium for marine microalgae isolated from Red Sea – Jeddah. **Journal of Cleaner Production**, [S. l.], v. 198, p. 160–169, 2018. DOI: 10.1016/J.JCLEPRO.2018.07.037.

MANDOTRA, S. K.; KUMAR, Pankaj; SUSEELA, M. R.; NAYAKA, S.; RAMTEKE, P. W. Evaluation of fatty acid profile and biodiesel properties of microalga *Scenedesmus abundans* under the influence of phosphorus, pH and light intensities. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 201, p. 222–229, 2016. DOI: 10.1016/j.biortech.2015.11.042.

MARKOU, Giorgos; ANGELIDAKI, Irini; GEORGAKAKIS, Dimitris. **Microalgal carbohydrates: An overview of the factors influencing carbohydrates production, and of main bioconversion technologies for production of biofuels** *Applied Microbiology and Biotechnology* Springer, , 2012. DOI: 10.1007/s00253-012-4398-0. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-012-4398-0>. Acesso em: 25 nov. 2020.

MARTIN, Gregory J. O. et al. Lipid profile remodeling in response to nitrogen deprivation in the microalgae *Chlorella* sp. (Trebouxiophyceae) and *Nannochloropsis* sp. (Eustigmatophyceae). **PLoS ONE**, [S. l.], v. 9, n. 8, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0103389.

MATA, Teresa M.; NIO MARTINS, Antó A.; CAETANO, Nidia S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. [S. l.], v. 14, p. 217–232, 2010. DOI: 10.1016/j.rser.2009.07.020.

MATHIMANI, Thangavel; SEKAR, Manigandan; SHANMUGAM, Sabarathinam; SABIR, Jamal S. M.; CHI, Nguyen Thuy Lan; PUGAZHENDHI, Arivalagan. Relative abundance of lipid types among *Chlorella* sp. and *Scenedesmus* sp. and ameliorating homogeneous acid catalytic conditions using central composite design (CCD) for maximizing fatty acid methyl ester yield. **Science of The Total Environment**, [S. l.], v. 771, p. 144700, 2021. DOI:

- 10.1016/j.scitotenv.2020.144700. Disponível em:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0048969720382334>.
- MEHRABADI, Abbas; FARID, Mohammed M.; CRAGGS, Rupert. Potential of five different isolated colonial algal species for wastewater treatment and biomass energy production. **Algal Research**, [S. l.], v. 21, p. 1–8, 2017. DOI: 10.1016/j.algal.2016.11.002. Disponível em:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211926416306154>.
- MENDES, Rui L.; NOBRE, Beatriz P.; CARDOSO, Miguel T.; PEREIRA, Ana P.; PALAVRA, António F. Supercritical carbon dioxide extraction of compounds with pharmaceutical importance from microalgae. **Inorganica Chimica Acta**, [S. l.], v. 356, p. 328–334, 2003. DOI: 10.1016/S0020-1693(03)00363-3.
- MENNAA, Fatima Zahra; ARBIB, Zouhayr; PERALES, José Antonio. Urban wastewater treatment by seven species of microalgae and an algal bloom: Biomass production, N and P removal kinetics and harvestability. **Water Research**, [S. l.], v. 83, p. 42–51, 2015. DOI: 10.1016/j.watres.2015.06.007. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0043135415300592>.
- MINHAS, Amritpreet K.; HODGSON, Peter; BARROW, Colin J.; ADHOLEYA, Alok. A Review on the Assessment of Stress Conditions for Simultaneous Production of Microalgal Lipids and Carotenoids. **Frontiers in Microbiology**, [S. l.], v. 7, 2016. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00546. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fmicb.2016.00546/abstract>.
- MISHRA, Sanjeev; MOHANTY, Kaustubha. Comprehensive characterization of microalgal isolates and lipid-extracted biomass as zero-waste bioenergy feedstock: An integrated bioremediation and biorefinery approach. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 273, n. October 2018, p. 177–184, 2019. DOI: 10.1016/j.biortech.2018.11.012.
- MOHEIMANI, Navid R.; MATSUURA, Hiroshi; WATANABE, Makoto M.; BOROWITZKA, Michael A. Non-destructive hydrocarbon extraction from *Botryococcus braunii* BOT-22 (race B). **Journal of Applied Phycology**, [S. l.], v. 26, n. 3, p. 1453–1463, 2014. DOI: 10.1007/s10811-013-0179-0.
- MONCADA B, Jonathan; ARISTIZÁBAL M, Valentina; CARDONA A, Carlos A. Design strategies for sustainable biorefineries. **Biochemical Engineering Journal**, [S. l.], v. 116, p. 122–134, 2016. DOI: 10.1016/j.bej.2016.06.009.
- MORAIS JUNIOR, Wilson G.; GORGICH, Malihe; CORRÊA, Priscila S.;

MARTINS, António A.; MATA, Teresa M.; CAETANO, Nídia S. Microalgae for biotechnological applications: Cultivation, harvesting and biomass processing. **Aquaculture**, [S. l.], v. 528, p. 735562, 2020. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2020.735562.

MORENO-GARCIA, L.; ADJALLÉ, K.; BARNABÉ, S.; RAGHAVAN, G. S. V. Microalgae biomass production for a biorefinery system: Recent advances and the way towards sustainability. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [S. l.], v. 76, p. 493–506, 2017. DOI: 10.1016/j.rser.2017.03.024. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1364032117303465>.

NARALA, Rakesh R.; GARG, Sourabh; SHARMA, Kalpesh K.; THOMAS-HALL, Skye R.; DEME, Miklos; LI, Yan; SCHENK, Peer M. Comparison of Microalgae Cultivation in Photobioreactor, Open Raceway Pond, and a Two-Stage Hybrid System. **Frontiers in Energy Research**, [S. l.], v. 4, n. AUG, p. 29, 2016. DOI: 10.3389/fenrg.2016.00029. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fenrg.2016.00029/abstract>. Acesso em: 23 jun. 2020.

NASCIMENTO, Iracema Andrade; CABANELAS, Iago Teles Dominguez; SANTOS, Jacson Nunes Dos; NASCIMENTO, Mauricio A.; SOUSA, Leandro; SANSONE, Giovanni. Biodiesel yields and fuel quality as criteria for algal-feedstock selection: Effects of CO₂-supplementation and nutrient levels in cultures. **Algal Research**, [S. l.], v. 8, p. 53–60, 2015. DOI: 10.1016/j.algal.2015.01.001.

NASCIMENTO, Iracema Andrade; MARQUES, Sheyla Santa Izabel; CABANELAS, Iago Teles Dominguez; DE CARVALHO, Gilson Correia; NASCIMENTO, Maurício A.; DE SOUZA, Carolina Oliveira; DRUZIAN, Janice Isabel; HUSSAIN, Javid; LIAO, Wei. Microalgae Versus Land Crops as Feedstock for Biodiesel: Productivity, Quality, and Standard Compliance. **Bioenergy Research**, [S. l.], v. 7, n. 3, p. 1002–1013, 2014. DOI: 10.1007/s12155-014-9440-x.

NASCIMENTO, Iracema Andrade; MARQUES, Sheyla Santa Izabel; CABANELAS, Iago Teles Dominguez; PEREIRA, Solange Andrade; DRUZIAN, Janice Isabel; DE SOUZA, Carolina Oliveira; VICH, Daniele Vital; DE CARVALHO, Gilson Correia; NASCIMENTO, Maurício Andrade. Screening Microalgae Strains for Biodiesel Production: Lipid Productivity and Estimation of

Fuel Quality Based on Fatty Acids Profiles as Selective Criteria. **Bioenergy Research**, [S. l.], v. 6, n. 1, p. 1–13, 2013. DOI: 10.1007/s12155-012-9222-2.

NAYAK, Manoranjan; SUH, William I.; CHO, Jun Muk; KIM, Hee Su; LEE, Bongsoo; CHANG, Yong Keun. Strategic implementation of phosphorus repletion strategy in continuous two-stage cultivation of *Chlorella* sp. HS2: Evaluation for biofuel applications. **Journal of Environmental Management**, [S. l.], v. 271, p. 111041, 2020. a. DOI: 10.1016/j.jenvman.2020.111041. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301479720309695>.

NAYAK, Manoranjan; SUH, William I.; CHO, Jun Muk; KIM, Hee Su; LEE, Bongsoo; CHANG, Yong Keun. Strategic implementation of phosphorus repletion strategy in continuous two-stage cultivation of *Chlorella* sp. HS2: Evaluation for biofuel applications. **Journal of Environmental Management**, [S. l.], v. 271, p. 111041, 2020. b. DOI: 10.1016/J.JENVMAN.2020.111041.

NICHOLS, H. WAYNE; BOLD, HAROLD C. *Trichosarcina polymorpha* Gen. et Sp. Nov. **Journal of Phycology**, [S. l.], v. 1, n. 1, p. 34–38, 1965. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.1965.tb04552.x>.

NIEHAUS, Tom D.; KINISON, Scott; OKADA, Shigeru; YEO, Yun Soo; BELL, Stephen A.; CUI, Ping; DEVARENNE, Timothy P.; CHAPPELL, Joe. Functional identification of triterpene methyltransferases from *Botryococcus braunii* race B. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 287, n. 11, p. 8163–8173, 2012. DOI: 10.1074/jbc.M111.316059. Disponível em: <http://www.jbc.org/>. Acesso em: 23 out. 2020.

NIEHAUS, Tom D.; OKADA, Shigeru; DEVARENNE, Timothy P.; WATT, David S.; SVIRIPA, Vitaliy; CHAPPELL, Joe. Identification of unique mechanisms for triterpene biosynthesis in *Botryococcus braunii*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 108, n. 30, p. 12260–12265, 2011. DOI: 10.1073/pnas.1106222108. Disponível em: www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/. Acesso em: 23 out. 2020.

NOAA, National Oceanic and Atmospheric Administration. **Trends in Atmospheric Carbon Dioxide**. 2021. Disponível em: <https://gml.noaa.gov/ccgg/trends/monthly.html>. Acesso em: 8 out. 2021.

NORDIN, Norazela; YUSOF, Norjan; SAMSUDIN, Syakirah. Biomass Production of *Chlorella* sp., *Scenedesmus* sp., and *Oscillatoria* sp. in Nitrified Landfill Leachate. **Waste and Biomass Valorization**, [S. l.], v. 8, n. 7, p. 2301–2311,

2017. DOI: 10.1007/s12649-016-9709-8. Disponível em:
<http://link.springer.com/10.1007/s12649-016-9709-8>.

NOVAIS, Marcos Teixeira; DA SILVA, Vinícius; RAMOS, Bianca de Paula; FERREIRA, Gabriela Filipini; JARDINI, André L.; RIOS PINTO, Luisa Fernanda;; FREGOLENTE, Leonardo V. **Estudo do cultivo de microalgas em sistema aberto construído por manufatura aditiva**. Campinas-SP. Brasil. XXIX Congresso de Iniciação Científica da UNICAMP, , 2021. Disponível em: <https://proceedings.science/p/137056>.

OKADA, Shigeru; DEVARENNE, Timothy P.; CHAPPELL, Joseph. Molecular characterization of squalene synthase from the green microalga *Botryococcus braunii*, race B. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [S. l.], v. 373, n. 2, p. 307–317, 2000. DOI: 10.1006/abbi.1999.1568.

ÓRPEZ, Rafael; MARTÍNEZ, Ma Eugenia; HODAIFA, Gassan; EL YOUSFI, Farida; JBARI, Nohman; SÁNCHEZ, Sebastián. **Growth of the microalga *Botryococcus braunii* in secondarily treated sewageDesalination**, 2009. DOI: 10.1016/j.desal.2008.07.016.

PRAVEENKUMAR, Ramasamy; KIM, Bohwa; LEE, Jiye; VIJAYAN, Durairaj; LEE, Kyubock; NAM, Bora; JEON, Sang Goo; KIM, Dong Myung; OH, You Kwan. Mild pressure induces rapid accumulation of neutral lipid (triacylglycerol) in *Chlorella* spp. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 220, p. 661–665, 2016. DOI: 10.1016/j.biortech.2016.09.025.

PRAVEENKUMAR, Ramasamy; SHAMEERA, Kalifulla; MAHALAKSHMI, Gopalakrishnan; AKBARSHA, Mohammad Abdulkader; THAJUDDIN, Nooruddin. Influence of nutrient deprivations on lipid accumulation in a dominant indigenous microalga *Chlorella* sp., BUM11008: Evaluation for biodiesel production. **Biomass and Bioenergy**, [S. l.], v. 37, p. 60–66, 2012. DOI: 10.1016/j.biombioe.2011.12.035. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0961953411006544>.

QIN, J. G. Hydrocarbons from Algae. *In*: **Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology**. [s.l.] : Springer, Berlin, Heidelberg, 2010. p. 2817–2826. DOI: 10.1007/978-3-540-77587-4_209. Disponível em: https://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007/978-3-540-77587-4_209. Acesso em: 19 set. 2021.

RAEISOSSADATI, Mohammadjavad; VADIVELLOO, Ashiwin; BAHRI, Parisa A.;

PARLEVLIT, David; MOHEIMANI, Navid Reza. Treating anaerobically digested piggery effluent (ADPE) using microalgae in thin layer reactor and raceway pond. **Journal of Applied Phycology**, [S. l.], v. 31, n. 4, p. 2311–2319, 2019. DOI: 10.1007/s10811-019-01760-6. Disponível em:

<http://link.springer.com/10.1007/s10811-019-01760-6>.

RAJESH BANU, J.; PREETHI; KAVITHA, S.; GUNASEKARAN, M.; KUMAR, Gopalakrishnan. **Microalgae based biorefinery promoting circular bioeconomy-techno economic and life-cycle analysis** **Bioresource Technology** Elsevier Ltd, , 2020. DOI: 10.1016/j.biortech.2020.122822.

RIOS PINTO, Luisa Fernanda.; FERREIRA, Gabriela Filipini.; TASIC, Marija. Cultivation techniques. *In*: OSBORN, Patricia (org.). **Microalgae: Cultivation, Recovery of Compounds and Applications**. 1st. ed. [s.l.] : Academic Press, 2021. p. 1–34. DOI: 10.1016/B978-0-12-821218-9.00001-3.

RUANGSOMBOON, Suneerat. Effect of light, nutrient, cultivation time and salinity on lipid production of newly isolated strain of the green microalga, *Botryococcus braunii* KMITL 2. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 109, p. 261–265, 2012. DOI: 10.1016/j.biortech.2011.07.025. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852411009515>.

RUANGSOMBOON, Suneerat; DIMAK, Jantra; JONGPUT, Buppha; WIWATANARATANABUTR, Itsanun; KANYAWONGHA, Pornthiwa. Outdoor open pond batch production of green microalga *Botryococcus braunii* for high hydrocarbon production: enhanced production with salinity. **Sci Rep**, [S. l.], v. 10, n. 2731, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59645-5>.

RUANGSOMBOON, Suneerat; SORNCHAI, Piyanuch; PRACHOM, Noratat. Enhanced hydrocarbon production and improved biodiesel qualities of *Botryococcus braunii* KMITL 5 by vitamins thiamine, biotin and cobalamin supplementation. **Algal Research**, [S. l.], v. 29, p. 159–169, 2018. DOI: 10.1016/j.algal.2017.11.028. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211926417302333>.

SAFI, Carl; ZEBIB, Bachar; MERAH, Othmane; PONTALIER, Pierre Yves; VACA-GARCIA, Carlos. Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [S. l.], v. 35, p. 265–278, 2014. DOI: 10.1016/J.RSER.2014.04.007.

SHARMA, Tamanna; GOUR, Rakesh Singh; KANT, Anil; CHAUHAN, Rajinder Singh. Lipid content in *Scenedesmus* species correlates with multiple genes of fatty acid and triacylglycerol biosynthetic pathways. **Algal Research**, [S. l.], v. 12, p. 341–349, 2015. DOI: 10.1016/j.algal.2015.09.006.

SIMAS-RODRIGUES, Cíntia; VILLELA, Helena D. M.; MARTINS, Aline P.; MARQUES, Luiza G.; COLEPICOLO, Pio; TONON, Angela P. **Microalgae for economic applications: Advantages and perspectives for bioethanol** *Journal of Experimental Botany* Oxford University Press, , 2015. DOI: 10.1093/jxb/erv130. Disponível em: <https://academic.oup.com/jxb/article/66/14/4097/2893380>. Acesso em: 25 nov. 2020.

SKORUPSKAITE, Virginija; MAKAREVICIENE, Violeta; LEVISAUSKAS, Donatas. Optimization of mixotrophic cultivation of microalgae *Chlorella* sp. for biofuel production using response surface methodology. **Algal Research**, [S. l.], v. 7, p. 45–50, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.algal.2014.12.001>.

SPIJKERMAN, Elly; LUKAS, Marcus; WACKER, Alexander. Ecophysiological strategies for growth under varying light and organic carbon supply in two species of green microalgae differing in their motility. **Phytochemistry**, [S. l.], v. 144, p. 43–51, 2017. DOI: 10.1016/j.phytochem.2017.08.018. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0031942217302935>.

STANIER, R. Y.; KUNISAWA, R.; MANDEL, M.; COHEN-BAZIRE, G. Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales). **Bacteriological reviews**, [S. l.], v. 35, n. 2, p. 171–205, 1971. DOI: 10.1128/mnbr.35.2.171-205.1971. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC378380/>. Acesso em: 22 jun. 2020.

TANG, Doris Ying Ying; YEW, Guo Yong; KOYANDE, Apurav Krishna; CHEW, Kit Wayne; VO, Dai-Viet N.; SHOW, Pau Loke. Green technology for the industrial production of biofuels and bioproducts from microalgae: a review. **Environmental Chemistry Letters**, [S. l.], v. 18, n. 6, p. 1967–1985, 2020. DOI: 10.1007/s10311-020-01052-3.

TANOI, Takako; KAWACHI, Masanobu; WATANABE, Makoto M. Effects of carbon source on growth and morphology of *Botryococcus braunii*. **Journal of Applied Phycology**, [S. l.], v. 23, n. 1, p. 25–33, 2011. DOI: 10.1007/s10811-

010-9528-4. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s10811-010-9528-4>.

TATLI, Mehmet; ISHIHARA, Mayumi; HEISS, Christian; BROWNE, Daniel R.; DANGOTT, Lawrence J.; VITHA, Stanislav; AZADI, Parastoo; DEVARENNE, Timothy P. Polysaccharide associated protein (PSAP) from the green microalga *Botryococcus braunii* is a unique extracellular matrix hydroxyproline-rich glycoprotein. **Algal Research**, [S. l.], v. 29, p. 92–103, 2018. DOI: 10.1016/j.algal.2017.11.018. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211926417307658>.

VIEGAS, Carolina Vieira et al. Algal products beyond lipids: Comprehensive characterization of different products in direct saponification of green alga *Chlorella* sp. **Algal Research**, [S. l.], v. 11, p. 156–164, 2015. DOI: 10.1016/j.algal.2015.06.014. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211926415001642>.

VOLKMAN, John K. Acyclic isoprenoid biomarkers and evolution of biosynthetic pathways in green microalgae of the genus *Botryococcus*. **Organic Geochemistry**, [S. l.], v. 75, p. 36–47, 2014. DOI: 10.1016/j.orggeochem.2014.06.005. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0146638014001557>.

WAN, Minxi; ZHANG, Zhen; WANG, Ruixuan; BAI, Wenmin; HUANG, Jianke; WANG, Weiliang; SHEN, Guomin; YU, Anquan; LI, Yuanguang. High-yield cultivation of *Botryococcus braunii* for biomass and hydrocarbons. **Biomass and Bioenergy**, [S. l.], v. 131, p. 105399, 2019. DOI: 10.1016/j.biombioe.2019.105399. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0961953419303484>.

WEISS, Taylor L. et al. Colony organization in the green alga *Botryococcus braunii* (Race B) is specified by a complex extracellular matrix. **Eukaryotic Cell**, [S. l.], v. 11, n. 12, p. 1424–1440, 2012. DOI: 10.1128/EC.00184-12.

WILLIS, Anusuya; CHIOVITTI, Anthony; DUGDALE, Tony M.; WETHERBEE, Richard. Characterization of the extracellular matrix of *Phaeodactylum tricorutum* (Bacillariophyceae): structure, composition, and adhesive characteristics. **Journal of Phycology**, [S. l.], v. 49, n. 5, p. n/a-n/a, 2013. DOI: 10.1111/jpy.12103. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/jpy.12103>. Acesso em: 23 out. 2020.

WU, Yin Hu; YU, Yin; HU, Hong Ying. Potential biomass yield per phosphorus and lipid accumulation property of seven microalgal species. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 130, p. 599–602, 2013. DOI: 10.1016/j.biortech.2012.12.116.

XIAO, Rui; ZHENG, Yi. **Overview of microalgal extracellular polymeric substances (EPS) and their applications** *Biotechnology Advances* Elsevier Inc., , 2016. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2016.08.004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27576096/>. Acesso em: 22 jun. 2020.

YOSHIMURA, Takeshi; OKADA, Shigeru; HONDA, Masaki. Culture of the hydrocarbon producing microalga *Botryococcus braunii* strain Showa: Optimal CO₂, salinity, temperature, and irradiance conditions. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 133, p. 232–239, 2013. DOI: 10.1016/j.biortech.2013.01.095.

ZHOU, Wenguang; WANG, Jinghan; CHEN, Paul; JI, Chengcheng; KANG, Qiuyun; LU, Bei; LI, Kun; LIU, Jin; RUAN, Roger. Bio-mitigation of carbon dioxide using microalgal systems: Advances and perspectives. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [S. l.], v. 76, p. 1163–1175, 2017. DOI: 10.1016/j.rser.2017.03.065. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1364032117303817>.

ZHU, L. D.; LI, Z. H.; HILTUNEN, E. Strategies for Lipid Production Improvement in Microalgae as a Biodiesel Feedstock. **BioMed Research International**, [S. l.], v. 2016, p. 7–9, 2016. DOI: 10.1155/2016/8792548.

ZHU, L. D.; LIA, Z. H.; GUO, D. B.; HUANG, F.; NUGROHO, Y.; XIA, B. Cultivation of *Chlorella* sp. with livestock waste compost for lipid production. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 223, p. 296–300, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.09.094>.

ZHU, Shunni; WANG, Yajie; XU, Jin; SHANG, Changhua; WANG, Zhongming; XU, Jingliang; YUAN, Zhenhong. Luxury uptake of phosphorus changes the accumulation of starch and lipid in *Chlorella* sp. under nitrogen depletion. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 198, p. 165–171, 2015. DOI: 10.1016/j.biortech.2015.08.142. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852415012584>.

ANEXO 1

Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
 ASSOCIADO

Certidão

Cadastro nº A66CC02

Declaramos, nos termos do art. 41 do Decreto nº 8.772/2016, que o cadastro de acesso ao patrimônio genético ou conhecimento tradicional associado, abaixo identificado e resumido, no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado foi submetido ao procedimento administrativo de verificação e não foi objeto de requerimentos admitidos de verificação de indícios de irregularidades ou, caso tenha sido, o requerimento de verificação não foi acatado pelo CGen.

Número do cadastro:	A66CC02
Usuário:	UNICAMP
CPF/CNPJ:	46.068.425/0001-33
Objeto do Acesso:	Patrimônio Genético
Finalidade do Acesso:	Pesquisa

Espécie

Lactobacillus rhamnosus
Lactobacillus casei rhamnosus
Lactobacillus rhamnosus
Botryococcus braunii
Propionibacterium acidipropionici
Lactobacillus plantarum
Lactobacillus delbrueckii
Bacillus coagulans
Botryococcus terribilis
Chlorella sp
Chlorella vulgaris
Desmodesmus brasiliensis
Chlorella pyrenoidosa
Saccharomyces cerevisiae
Lactobacillus plantarum
Impossibilidade de identificação
Chlorella vulgaris
Spathaspora arborariae
Spathaspora passalidarum

Aspergillus niger

Leuconostoc mesenteroides

Ipomoea batatas

Euterpe oleracea

Equipe

Rubens Maciel Filho	UNICAMP
Maria Regina Wolf Maciel	UNICAMP
Maria Ingrid Rocha Barbosa Schiavon	UNICAMP
Betânia Hoss Lunelli	UNICAMP
William Eduardo Herrera Agudelo	UNICAMP
Celina Kiyomi Yamakawa	UNICAMP
Gustavo Henrique Santos Flores Ponce	UNICAMP
Bruno Colling Klein	UNICAMP
Laura Plazas Tovar	UNICAMP
Luisa Fernanda Rios Pinto	UNICAMP
Marina Oliveira de Souza Dias	UNICAMP
John Hervin Bermudez Jaimes	UNICAMP
Sérgio Santos de Jesus	UNICAMP
Aline Santana Scotelari de Souza	UNICAMP
Yurani Camacho Ardilla	UNICAMP
Ana Paula Gimenez Peres Fernandes	UNICAMP
Julio César de Carvalho Miranda	UNICAMP
Andrea Komesu	UNICAMP
Ana Livia Chemeli Senedese	Unicamp
Ana Karina Brambilla Costa	UNICAMP
Fabrcia Farias de Menezes	UNICAMP
Bruna Torres da Silva	UNICAMP
Luisa Helena Perez Nascimento	UNICAMP
Johnatt Allan Rocha de Oliveira	UNICAMP
Anderson de Jesus Bonon	Unicamp
Emília Savioli Lopes	UNICAMP
Kallyana Moraes Carvalho Dominices	UNICAMP
Pablo Andres Alvarez Gomez	UNICAMP
Regiane Alves de Oliveira	UNICAMP
André Luiz Jardim Munhoz	UNICAMP
Elmer Alberto Ccopa Rivera	UNICAMP
Marija Tasic	UNICAMP
Jean Felipe Leal Silva	UNICAMP
Daniel Santos Fernandes	UNICAMP
Adriano Pinto Mariano	UNICAMP
Eduardo Francisco Almeida Benálcazar	UNICAMP

Bruna Soares Fernandes	UNICAMP
Thuany de Brito Melo	UNICAMP
Ana Maria Zetty Arenas	UNICAMP
Oscar Maurício Díaz Rodrigues	UNICAMP
Dayana de Gusmão Côelho	UNICAMP
Tássia Lopes Junqueira	UNICAMP
Arturo González Quiroga	UNICAMP
Jaiver Efren Jaimes Figueroa	UNICAMP
Carla Soares da Silva	UNICAMP
Vanessa Ferreira de Almeida	UNICAMP
Natália Osiro	UNICAMP
Gabriela Filipini Ferrerira	UNICAMP
Leonardo Vasconcelos Fregolente	UNICAMP
Vitor Bezerra Lopes	UNICAMP
Vinícius de França Vieira	UNICAMP
Liliane Pires Andrade	UNICAMP
Yurany Camacho Ardila	UNICAMP
Francisco Maugeri Filho	UNICAMP
Rafael Ramos de Andrade	UNICAMP
Bianca de Paula Ramos	UNICAMP

Resultados Obtidos

Divulgação de resultados em meios científicos ou de comunicação

Identificação do meio onde foi **CV Lattes Prof. Dr. Rubens Maciel Filho**: <http://lattes.cnpq.br/2238947545394339> divulgado:

Identificação do meio onde foi <http://lattes.cnpq.br/0146291251418497> divulgado:

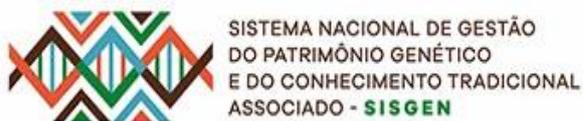
Identificação do meio onde foi <http://lattes.cnpq.br/0146291251418497> divulgado:

Data do Cadastro: **05/11/2018 18:17:19**

Situação do Cadastro: **Concluído**

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético

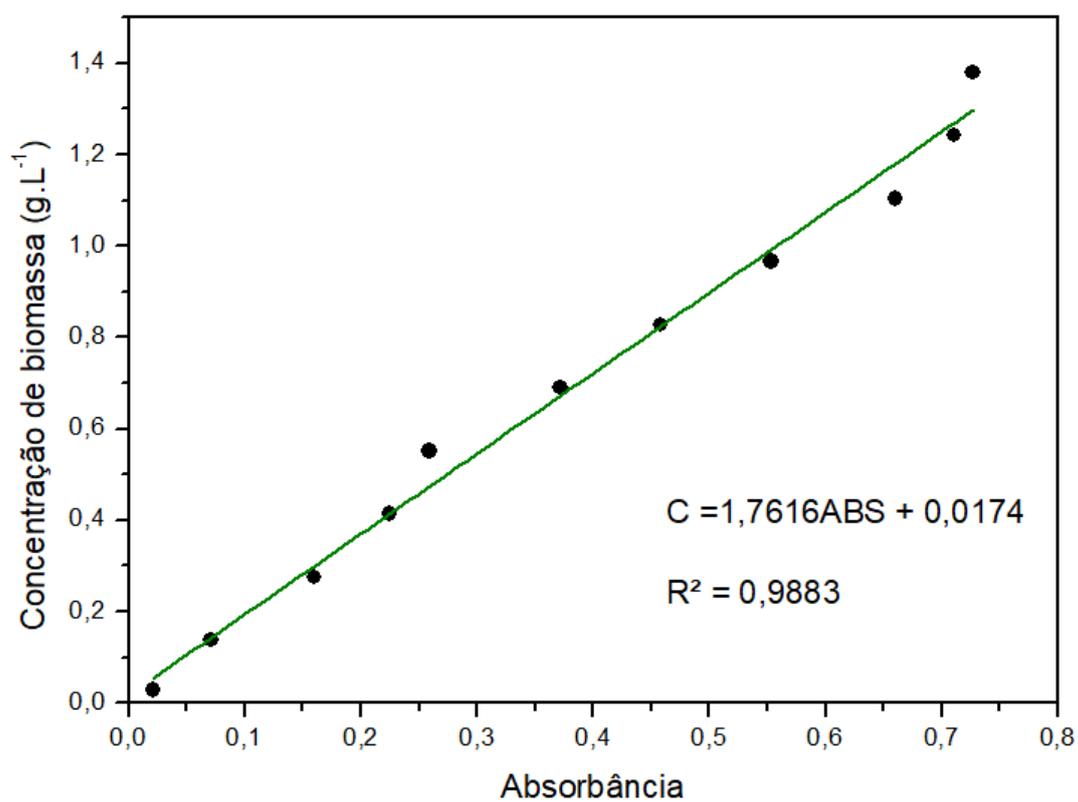
Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **18:40** de **12/05/2020**.



ANEXO 2

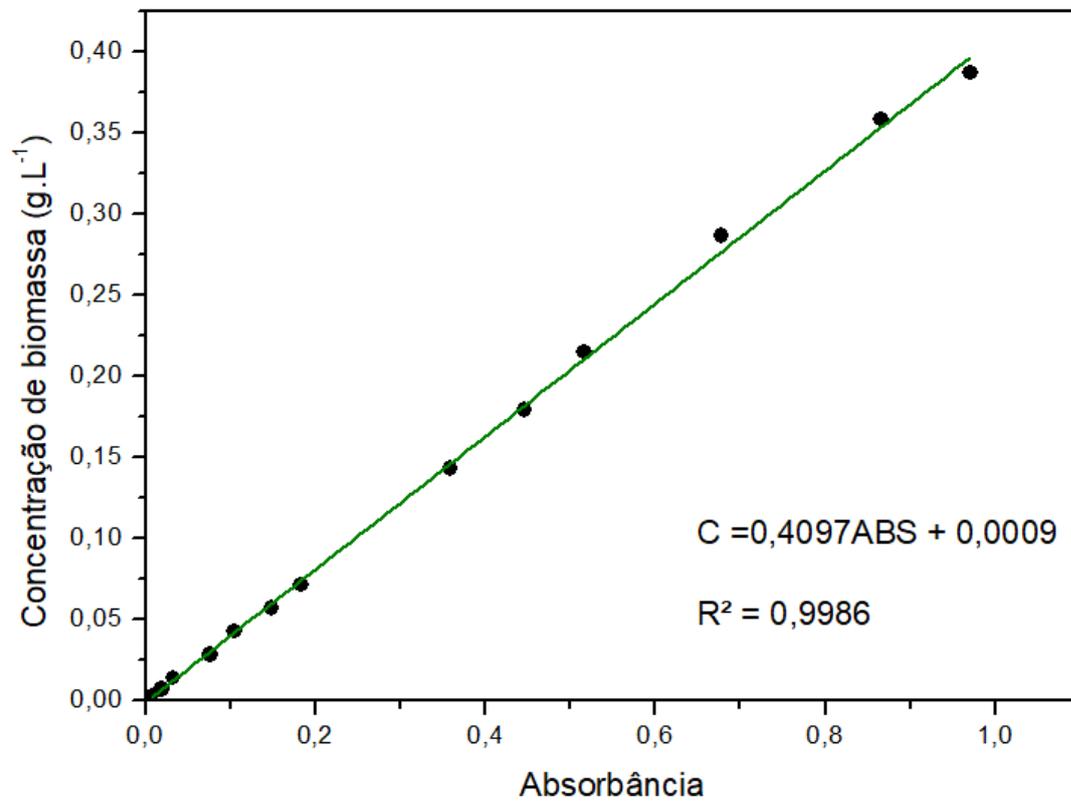
Curvas de calibração para determinação da concentração de biomassa nas microalgas *Botryococcus terribilis* (Figura 29) e *Chlorella* sp. (Figura 30).

Figura 29: Curva de calibração para determinação da concentração de biomassa na microalga *Botryococcus terribilis*.



Fonte: Autora, 2021.

Figura 30: Curva de calibração para determinação da concentração de biomassa na microalga *Chlorella* sp.

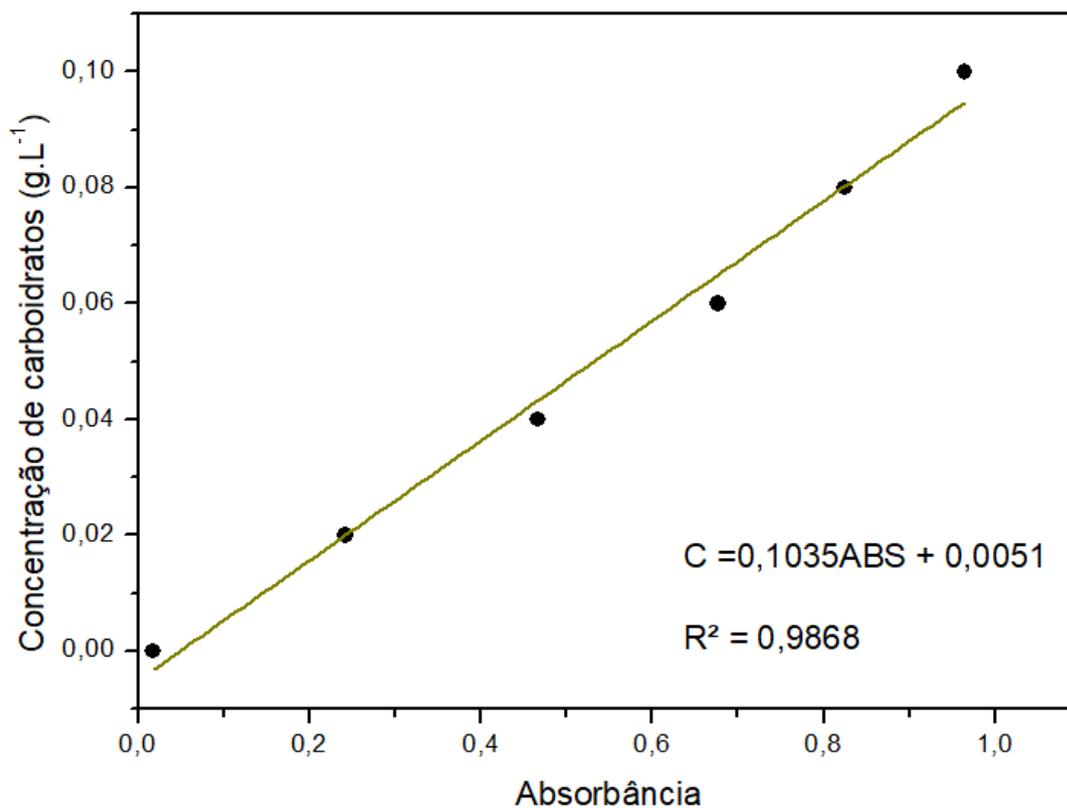


Fonte: Autora, 2021.

ANEXO 3

Curva de calibração para a determinação da concentração de carboidratos (Figura 31).

Figura 31: Curva de calibração para determinação da concentração de carboidratos.

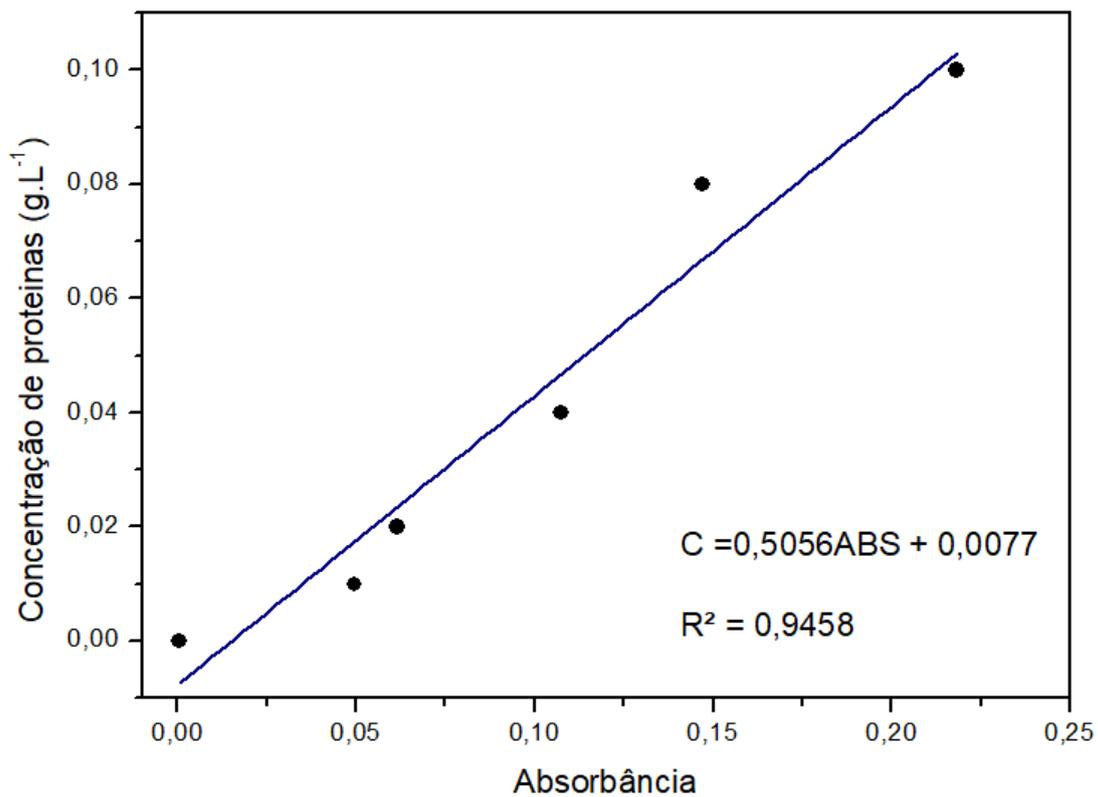


Fonte: Autora, 2021.

ANEXO 4

Curva de calibração para determinação da concentração de proteínas
(Figura 32)

Figura 32: Curva de calibração para determinação da concentração de proteínas.

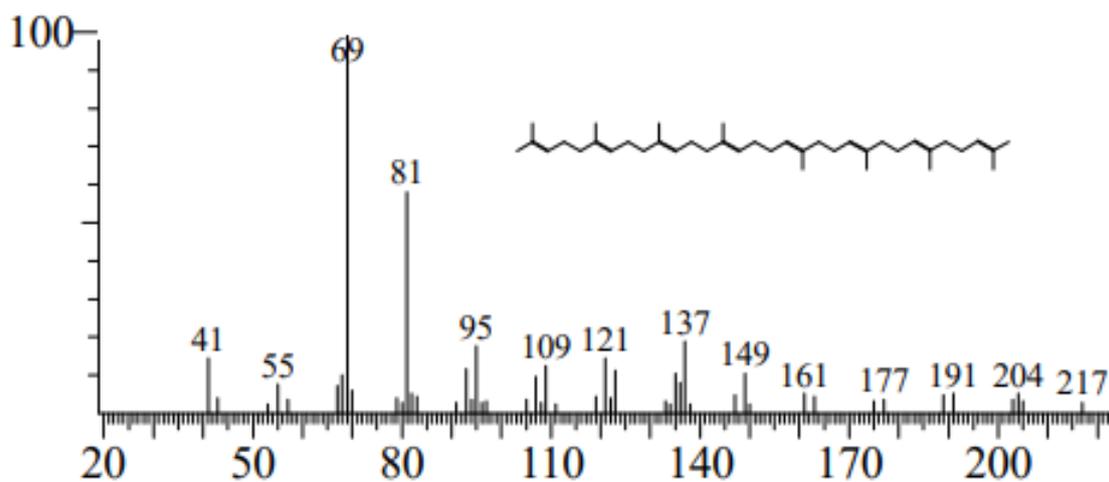


Fonte: Autora, 2021.

ANEXO 5

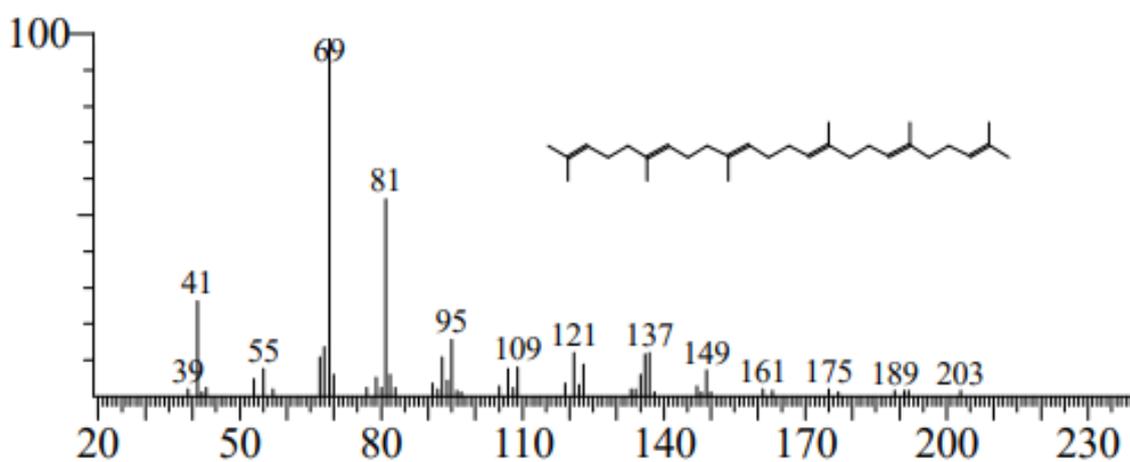
As Figuras de 33 a 42 apresentam os cromatogramas obtidos no estudo de CG-MS para os hidrocarbonetos extraídos da microalga *Botryococcus terribilis*.

Figura 33: Cromatograma do $C_{40}H_{66}$ identificado no óleo da *B. terribilis* por CG-MS.



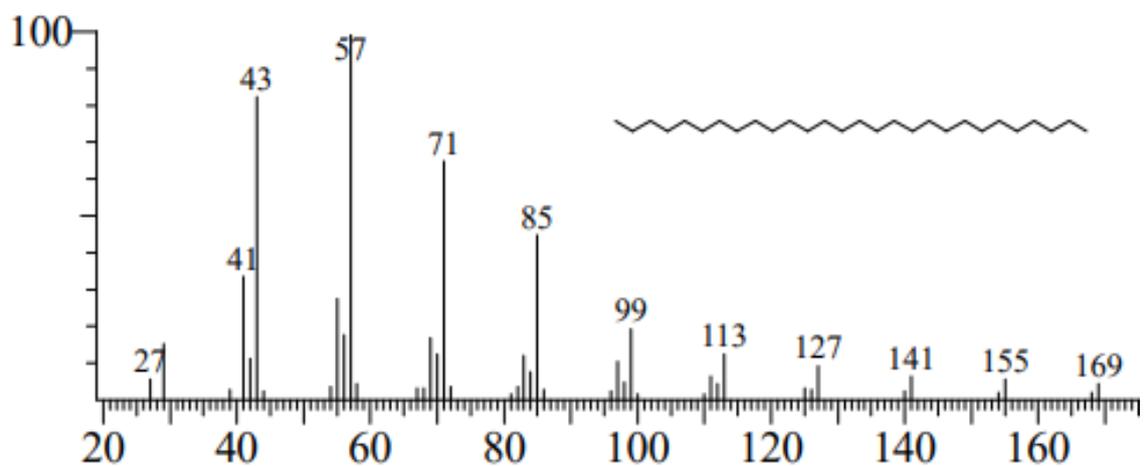
Fonte: Autora, 2021.

Figura 34: Cromatograma do $C_{30}H_{50}$ identificado no óleo da *B. terribilis* por CG-MS.



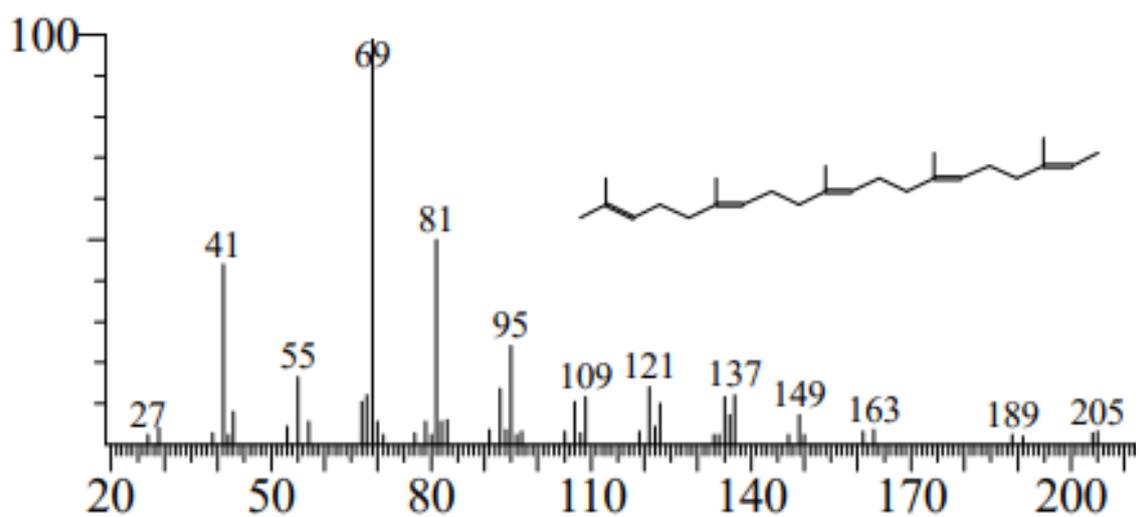
Fonte: Autora, 2021.

Figura 35: Cromatograma do $C_{28}H_{58}$ identificado no óleo da *B. terribilis* por CG-MS.



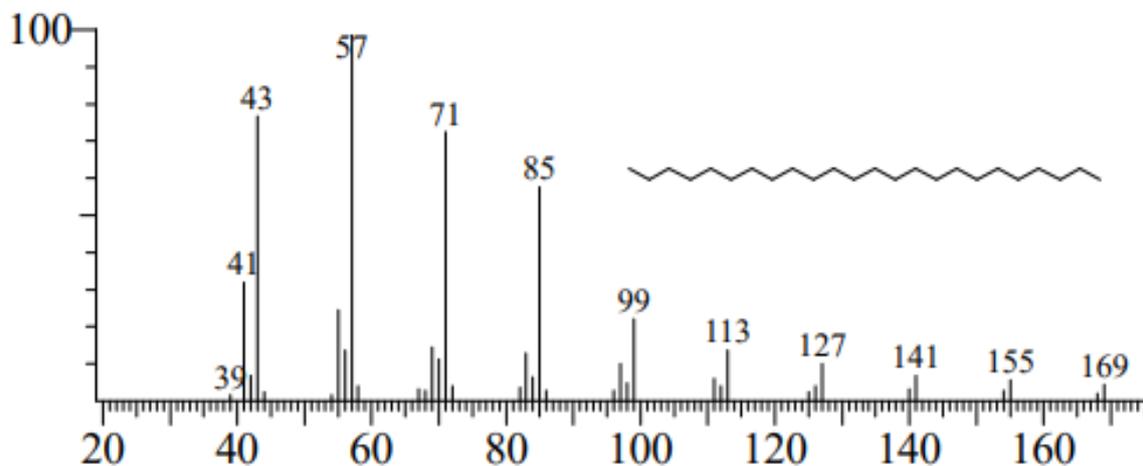
Fonte: Autora, 2021.

Figura 36: Cromatograma do $C_{25}H_{42}$ identificado no óleo da *B. terribilis* por CG-MS.



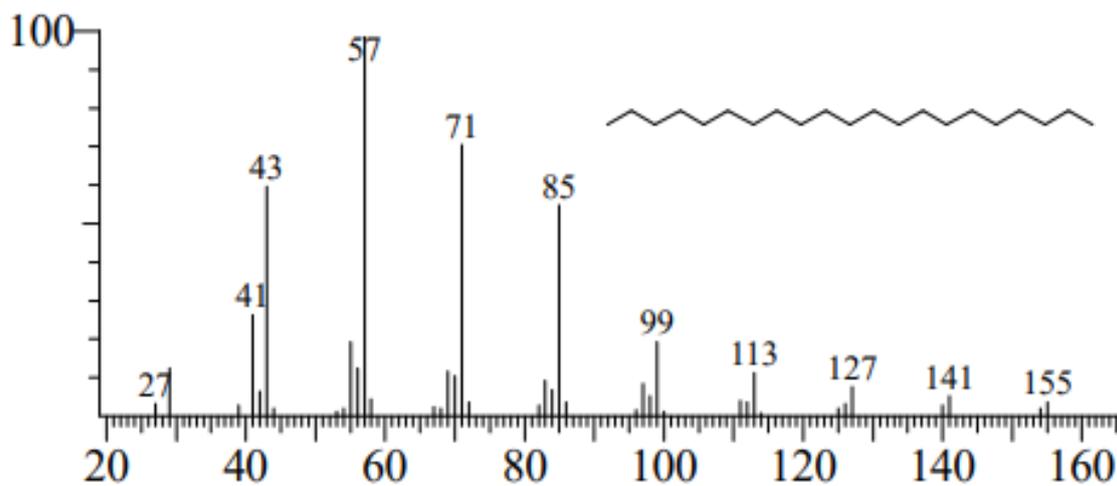
Fonte: Autora, 2021.

Figura 37: Cromatograma do $C_{24}H_{50}$ identificado no óleo da *B. terribilis* por CG-MS.



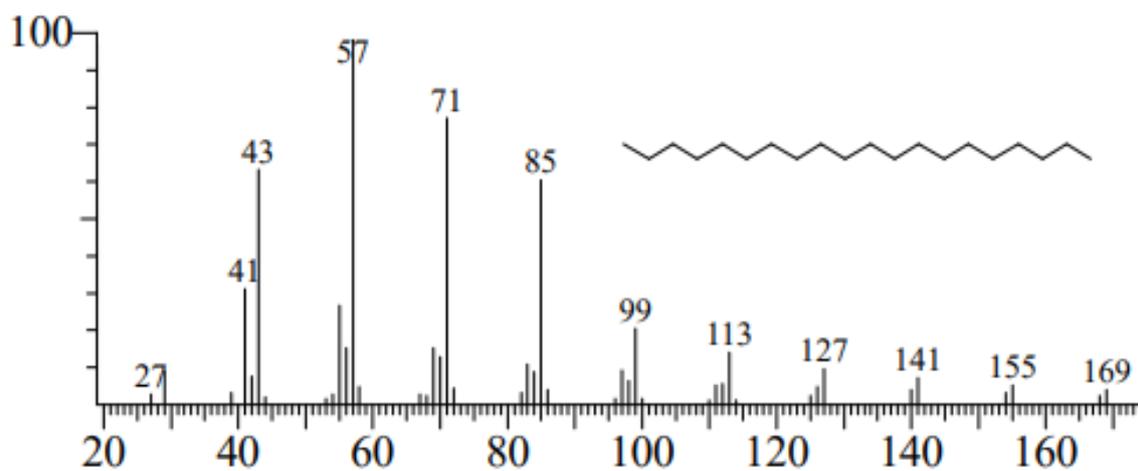
Fonte: Autora, 2021.

Figura 38: Cromatograma do $C_{21}H_{44}$ identificado no óleo da *B. terribilis* por CG-MS.



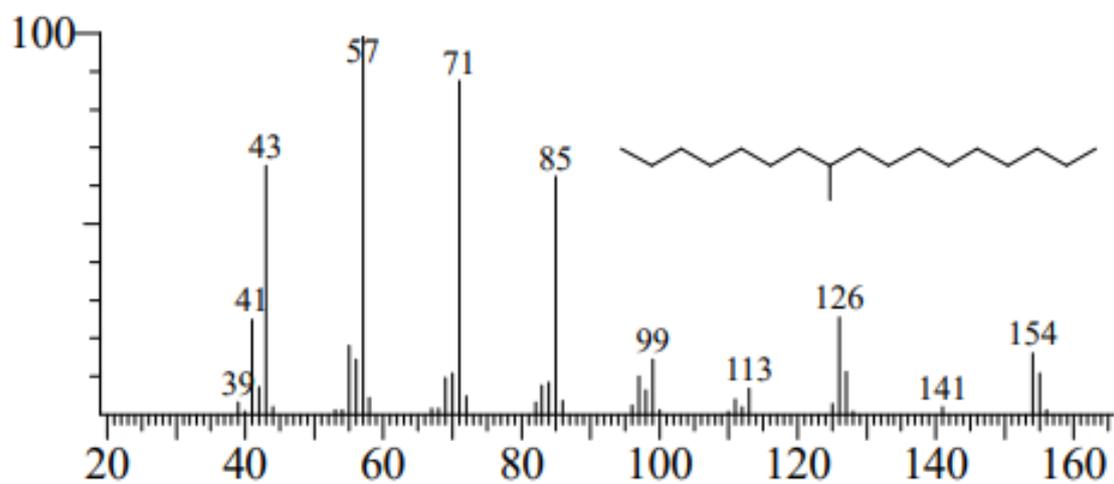
Fonte: Autora, 2021.

Figura 39: Cromatograma do $C_{20}H_{42}$ identificado no óleo da *B. terribilis* por CG-MS.



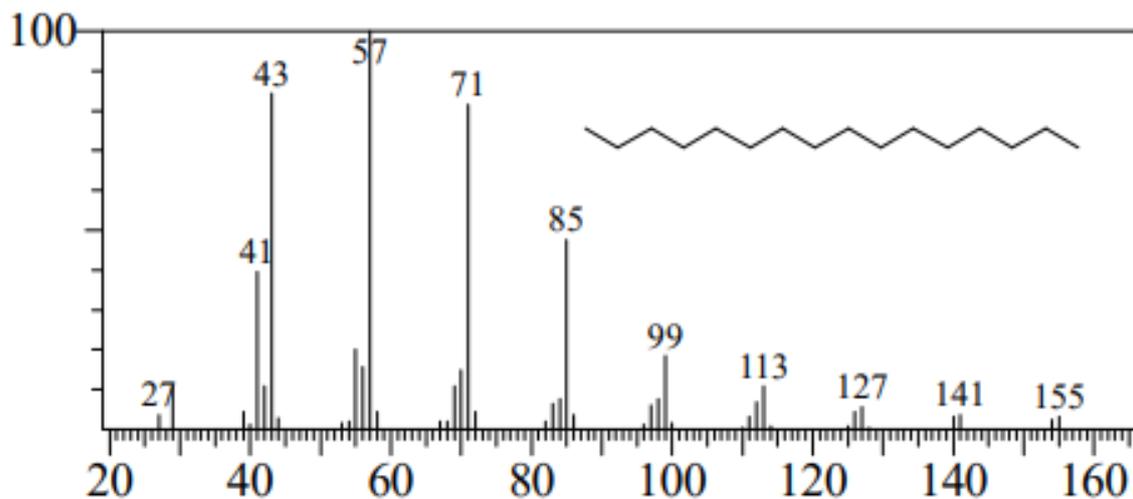
Fonte: Autora, 2021.

Figura 40: Cromatograma do $C_{18}H_{38}$ identificado no óleo da *B. terribilis* por CG-MS.



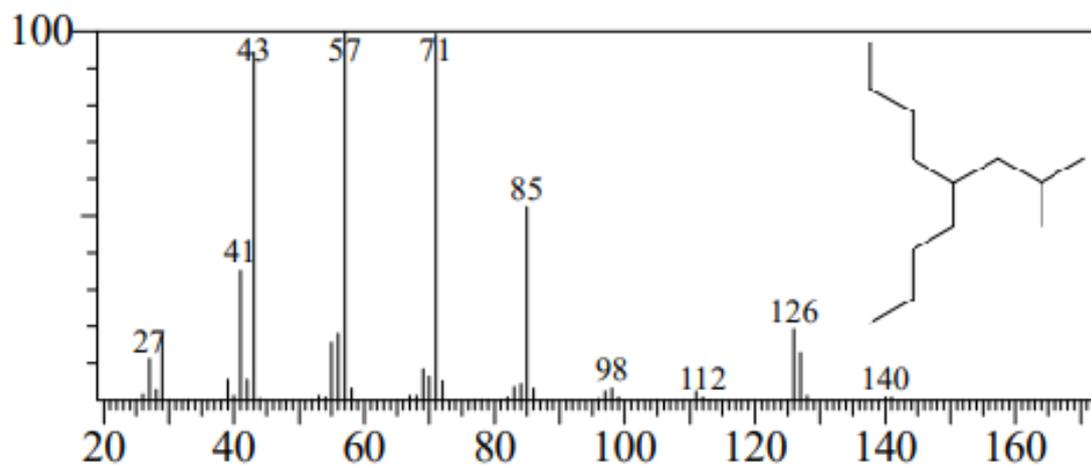
Fonte: Autora, 2021.

Figura 41: Cromatograma do $C_{16}H_{34}$ identificado no óleo da *B. terribilis* por CG-MS.



Fonte: Autora, 2021.

Figura 42: Cromatograma do $C_{13}H_{28}$ identificado no óleo da *B. terribilis* por CG-MS.



Fonte: Autora, 2021.