



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E NATURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL

ADRIANO GOLDNER COSTA

EFEITOS DE DIFERENTES CONDIÇÕES FÍSICAS E EFLUENTES
AGRÍCOLAS SOBRE O CULTIVO DE MICROALGAS DA FAMÍLIA
SCENEDESMACEAE COMO SUBSÍDIO À APLICAÇÃO
BIOTECNOLÓGICA

VITÓRIA - ES

2018

ADRIANO GOLDNER COSTA

**EFEITOS DE DIFERENTES CONDIÇÕES FÍSICAS E EFLUENTES
AGRÍCOLAS SOBRE O CULTIVO DE MICROALGAS DA FAMÍLIA
SCENEDESMACEAE COMO SUBSÍDIO À APLICAÇÃO
BIOTECNOLÓGICA**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do Centro de Ciências Humanas e Naturais da Universidade Federal do Espírito Santo como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutor em Biologia Vegetal.

Área de concentração: Fisiologia Vegetal.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Valéria de Oliveira Fernandes

VITÓRIA - ES

2018

[PÁGINA DA FICHA CATALOGRÁFICA]

**EFEITOS DE DIFERENTES CONDIÇÕES FÍSICAS E EFLUENTES
AGRÍCOLAS SOBRE O CULTIVO DE MICROALGAS DA FAMÍLIA
SCENEDESMACEAE COMO SUBSÍDIO À APLICAÇÃO
BIOTECNOLÓGICA**

ADRIANO GOLDNER COSTA

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do Centro de Ciências Humanas e Naturais da Universidade Federal do Espírito Santo como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutor em Biologia Vegetal na área de concentração Fisiologia Vegetal.

Aprovada em 29 de março de 2018.

Comissão Examinadora:

Dr^a. Valéria de Oliveira Fernandes - UFES
Orientadora e Presidente da Comissão

Dr^a. Maria do Carmo Pimentel Batitucci - UFES
Examinador Interno

Dr. Camilo Dias Junior - UFES
Examinador Interno

Dr^a. Paola Alfonsa Vieira Lo Monaco - IFES
Examinador Externo

Dr. Stéfano Zorzal de Almeida – UCV / ES
Examinador Externo

*A minha tia, Laudiceia Maria Costa (in memoriam),
exemplo de fé, força e sabedoria, que me mostrou
com muita serenidade a importância da vida, o
valor das pessoas, o poder do perdão e a força da
persistência na busca de nossos ideais,
Dedico.*

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal (PPGBV) da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) e toda sua equipe de profissionais pela oportunidade de desenvolver esta pesquisa;

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Valéria de Oliveira Fernandes, pela grande amizade, pelos ensinamentos pessoais e profissionais, por acreditar no meu potencial e me abrir as portas do mundo científico e, sobretudo, pela confiança que sempre depositou em mim, desde a graduação, para a realização dos trabalhos de pesquisa, culminando com a presente tese;

A todos os amigos do Laboratório de Taxonomia e Ecologia de Algas Continentais (LATEAC), antigos e atuais, que de várias formas me ajudaram ao longo deste percurso. Em especial, agradeço à Natália Bernardino e ao Fernando, por toda amizade e companheirismo durante a minha jornada de doutoramento no laboratório, pela prontidão em me ajudar na elaboração dos experimentos, bem como nas coletas e análises, além do constante apoio emocional e incentivo que me deram;

A todos os amigos da turma de doutorado e aos amigos e funcionários do Setor Botânico pelo auxílio em várias etapas do curso, pelos momentos de descontração, pelas valiosas sugestões e por todo aprendizado adquirido juntos;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) que subsidiou a bolsa de pesquisa e projeto de pesquisa de Pós-graduação, em especial, ao Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE) pela concessão da bolsa para realizar o estágio no Laboratório Nacional de Energia e Geologia (LNEG), em Lisboa, Portugal;

À minha orientadora no exterior, Dra. Luísa Maria Gouveia da Silva, investigadora auxiliar do LNEG e renomada pesquisadora na área de Biotecnologia de Microalgas, pela maravilhosa acolhida e por todos os ensinamentos profissionais e pessoais, bem como à equipe de profissionais do LNEG e aos colegas estagiários, Alice e Daniel, pela amizade e pelos conhecimentos partilhados;

Ao Laboratório de Ambientes Recifais e Biotecnologia com Microalgas (LARBIM) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), João Pessoa, representado pelo Prof. Dr. Roberto Sassi e toda sua equipe, e à Dra. Hélène Hégaret, do Laboratório de Ciências do Meio Marinho (LEMAR), Instituto Europeu do Mar (IUEM), França, por me receberem de braços abertos para realizar o treinamento com as análises de citometria de fluxo empregadas ao cultivo de microalgas;

Ao Instituto Federal do Espírito Santo (IFES) por ter me concedido o afastamento para prosseguir com o doutorado e para a realização do estágio de doutorado sanduíche no exterior;

À minha amiga, Danielle Piontkovsky, pela sua parceria, doçura e por sempre me incentivar com palavras de força, contribuindo para que eu não perdesse o estímulo diante dos percalços; e ao meu amigo, Ismail Haddade, por toda a força, apoio estatístico, e, especialmente, pelo companheirismo durante minha estada em Portugal;

À minha mãe, Cleonice das Graças Goldner, pessoa que mais admiro no mundo, pelo exemplo de luta, sabedoria e determinação, por todos os ensinamentos e por ter me dado a oportunidade de estudar e me profissionalizar;

Ao meu pai, Ilson Costa, por estar sempre ao meu lado, me apoiando e vibrando comigo em cada etapa vencida;

A todos os meus familiares, em especial às minhas tias Laudiceia Maria Costa (*in memoriam*) e Dulci Marchesi, que também foram mães para mim e acompanharam de perto cada conquista ao longo de minha jornada acadêmica. Agradeço por todo amor, carinho, preocupação, confiança e consideração;

A Deus, que me presenteou com uma vida maravilhosa e me deu forças para superar as dificuldades e obstáculos que surgiram ao longo desta caminhada, me permitindo lutar pelos meus ideais e chegar até aqui;

Finalmente, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a realização dessa conquista e sempre torceram por mim.

Muito obrigado!

*“Mesmo quando tudo parece desabar,
cabe a mim decidir entre rir ou chorar,
ir ou ficar,
desistir ou lutar;
porque descobri,
no caminho incerto da vida,
que o mais importante é o decidir.”
(Cora Coralina)*

RESUMO

O cultivo de microalgas apresenta diversas aplicações de interesse econômico e ambiental, como a obtenção de compostos para suplementação alimentar humana e animal, o tratamento de águas residuárias e, mais recentemente, a produção de biocombustíveis. Estudos com a manipulação de luz e temperatura, bem como o uso de efluentes agropecuários como meios alternativos de cultivo, podem viabilizar o aumento da biomassa microalgal, reduzindo os custos de produção. Neste estudo, foram avaliados os efeitos de diferentes condições de temperatura (25°C, 30°C e 35°C) e luminosidade (sem sombreamento, sombreamento 50% e sombreamento 70%) sobre o crescimento e biomassa da espécie *Desmodesmus communis*; também foram testadas diferentes concentrações de efluentes agrícolas (efluente hidropônico da cultura de alface e efluente de suinocultura biodigerido) como meios alternativos no cultivo de *Scenedesmus acuminatus*, visando avaliar seu potencial biotecnológico, minimizar custos produtivos e mitigar impactos ambientais. Estabeleceram-se três tratamentos com diferentes concentrações de cada efluente (20%, 30% e 40% do resíduo hidropônico; e 10%, 15% e 20% do efluente de suinocultura) e um controle com meio sintético ASM1. Foram realizadas análises de crescimento, biomassa seca, clorofilas *a* e *b*, carotenoides totais, teor de proteínas hidrossolúveis, carboidratos e lipídeos totais, perfil de ésteres metílicos de ácidos graxos, além do percentual de remoção de nutrientes e redução da condutividade elétrica dos meios. Nos experimentos com diferentes temperaturas e sombreamentos, *D. communis* mostrou tolerância às variações testadas (25-35°C e até sombreamento 50%), não apresentando diferenças significativas entre os parâmetros de crescimento, biomassa seca e clorofila *a*. Entretanto, sob sombreamento 70% a microalga apresentou significativa limitação no rendimento celular máximo, massa seca e clorofila. Nos ensaios com a utilização de efluente hidropônico e efluente de suinocultura biodigerido, *S. acuminatus* atuou como eficiente biorremediadora, reduzindo expressivamente as concentrações de nitrogênio e fósforo destes resíduos (68,5-99,8%). O cultivo com 40% de efluente hidropônico destacou-se por produzir biomassa microalgal rica em proteínas (44,2%), clorofilas *a* e *b* (9799 µg.L⁻¹ e 2730 µg.L⁻¹, respectivamente), carotenoides totais (4826 µg.L⁻¹), além de ácidos graxos de grande valor nutricional, como o ácido linolênico (19,5%), sugerindo seu uso como suplemento alimentar humano e

animal. Já o cultivo da microalga em efluente de suinocultura após biodigestão apresentou baixa eficiência em termos de produtividade e biomassa útil, sendo pouco viável ao crescimento das algas em concentrações superiores à 10% do resíduo. Para os dois efluentes avaliados, o teor total de ésteres metílicos de ácidos graxos apresentou baixo rendimento (20,1-64,3 mg.g⁻¹), o que compromete sua aplicação na indústria para a produção de biodiesel. Por outro lado, os elevados teores de carboidratos nos cultivos com 20 e 30% de efluente hidropônico (44,1 e 34,4%, respectivamente), sugerem sua utilização na produção de bioetanol. Com base nos resultados, conclui-se que *D. communis* mostrou-se como espécie tolerante às variações de luz e temperatura, exibindo potencial para ser cultivada em maior escala, e *S. acuminatus* apresentou elevada eficiência na biorremediação dos efluentes agrícolas testados. Além disso, nos cultivos com efluente hidropônico foi possível produzir biomassa microalgal com grande potencial para aplicações biotecnológicas.

Palavras-chave: Biocombustíveis • biorremediação • efluentes • luz • microalgas • temperatura •

ABSTRACT

Microalgae cultivation presents several applications of economic and environmental interest, such as obtaining compounds for human and animal food supplementation, waste water treatment and, more recently, the biofuels production. Studies with the light and temperature manipulation, as well as the use of agricultural effluents as alternative cultivation mediums, can make possible the increase of the microalgal biomass, reducing the production costs. In this study, the effects of different temperature conditions (25°C, 30°C and 35°C) and luminosity (without shading, 50% shading and 70% shading) on the *Desmodesmus communis* growth and biomass were evaluated. Different agricultural effluents concentrations (hydroponic effluent of lettuce culture and biodigested swine effluent) were also tested as alternative mediums for the *Scenedesmus acuminatus* cultivation, in order to evaluate its biotechnological potential, to minimize productive costs and to mitigate environmental impacts. Three treatments with different concentrations of each effluent (20%, 30% and 40% of the hydroponic residue, and 10%, 15% and 20% of the swine effluent) and a control with ASM1 synthetic medium were established. Growth analyzes, dry biomass, *a* and *b* chlorophyll, total carotenoids, water soluble protein content, total carbohydrates and lipids, fatty acid methyl esters profile, and nutrient removal percentage and electrical conductivity reduction of the mediums were performed. In the experiments with different temperatures and shading, *D. communis* showed tolerance to the variations tested (25-35°C and up to 50% shading), showing no significant differences between growth parameters, dry biomass and *a* chlorophyll. However, under shading 70% the microalga presented significant limitation on maximum cell yield, dry mass and chlorophyll. In the tests with the use of hydroponic effluent and biodigested swine effluent, *S. acuminatus* acted as an efficient bioremediation agent, significantly reducing the nitrogen and phosphorus concentrations of these residues (68,5-99,8%). The 40% hydroponic effluent culture was characterized by the production of microalgal biomass rich in proteins (44,2%), *a* and *b* chlorophyll (9799 µg.L⁻¹ and 2730 µg.L⁻¹, respectively), total carotenoids (4826 µg.L⁻¹), besides fatty acids of great nutritional value, such as linolenic acid (19,5%), suggesting its use as a human and animal food supplement. The microalgae cultivation in swine effluent after biodigestion showed low efficiency in terms of productivity and useful biomass, being little viable to algal growth in

concentrations higher than 10% residue. For the two evaluated effluents, the fatty acid methyl esters total content presented low yield (20,1-64,3 mg.g⁻¹), which compromises their application in the industry for the biodiesel production. On the other hand, the high carbohydrate content in the cultures with 20% and 30% hydroponic effluent (44,1 and 34,4%, respectively), suggest its use in the bioethanol production. Based on the results, it was concluded that *D. communis* showed to be tolerant to variations in light and temperature, showing potential to be cultivated on a larger scale, and *S. acuminatus* showed high efficiency in the bioremediation of the tested agricultural effluents. In addition, in the cultures with hydroponic effluent, it was possible to produce microalgal biomass with great potential for biotechnological applications.

Keywords: Biofuels • bioremediation • effluents • light • microalgae • temperature •

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO GERAL

Figura 1: Exemplos de produção de microalgas em larga escala em sistemas de cultivo do tipo aberto, pista de corrida - *raceway* (A), e fechado, fotobiorreator tubular (B). Fonte: adaptado de Barata (2016).....28

CAPITULO 1 – EFEITOS DE DIFERENTES CONDIÇÕES DE TEMPERATURA E LUMINOSIDADE SOBRE O CRESCIMENTO E BIOMASSA DA MICROALGA *DESMODESMUS COMMUNIS* (HEGEWALD) HEGEWALD

Figura 1: Representação da microalga *D. communis* formando cenóbios com quatro células. Escala = 10 µm. Fonte: adaptado de Godinho et al. (2010).....47

Figura 2: Desenho experimental para avaliação do cultivo de *D. communis* em diferentes condições de temperatura. Fonte: o autor (2018).....48

Figura 3: Desenho experimental para avaliação do cultivo de *D. communis* em diferentes condições de luminosidade. Fonte: o autor (2018).....49

Figura 4: Curvas de crescimento das culturas de *D. communis* submetidas a diferentes condições de temperatura. Valores expressos em média ± erro padrão (barras verticais). * = Valores que apresentam diferenças significativas entre tratamentos pelo teste t com correção de Bonferroni ($p < 0,05$).53

Figura 5: Curvas de crescimento das culturas de *D. communis* submetidas a diferentes condições de luminosidade. Valores expressos em média ± erro padrão (barras verticais). * = Valores que apresentam diferenças significativas entre tratamentos pelo teste t com correção de Bonferroni ($p < 0,05$).56

Figura 6: Massa seca acumulada das culturas de *D. communis* submetidas a diferentes condições de temperatura. Valores expressos em média ± erro padrão (barras verticais). Colunas com a mesma letra não diferem significativamente pelo teste t com correção de Bonferroni ($p < 0,05$).58

Figura 7: Concentração de clorofila *a* das culturas de *D. communis* submetidas a diferentes condições de temperatura. Valores expressos em média ± erro padrão

(barras verticais). Colunas com a mesma letra não diferem significativamente pelo teste t com correção de Bonferroni ($p < 0,05$).58

Figura 8: Massa seca acumulada das culturas de *D. communis* submetidas a diferentes condições de luminosidade. Valores expressos em média \pm erro padrão (barras verticais). Colunas com a mesma letra não diferem significativamente pelo teste t com correção de Bonferroni ($p < 0,05$).60

Figura 9: Concentração de clorofila *a* das culturas de *D. communis* submetidas a diferentes condições de luminosidade. Valores expressos em média \pm erro padrão (barras verticais). Colunas com a mesma letra não diferem significativamente pelo teste t com correção de Bonferroni ($p < 0,05$).60

CAPITULO 2 – EFLUENTE HIDROPÔNICO DA PRODUÇÃO DE ALFACE UTILIZADO NO CULTIVO DE *SCENEDESMUS ACUMINATUS* (LAGERHEIN) CHODAT COMO SUBSÍDIO À APLICAÇÃO BIOTECNOLÓGICA

Figura 1: Representação da microalga *S. acuminatus* em um cenóbio com quatro células, à esquerda, e com oito células, à direita. Escala = 10 μ m. Fonte: adaptado de Godinho et al. (2010).76

Figura 2: Propriedade rural onde foi coletado o efluente hidropônico de cultivo de alface (Santa Leopoldina-ES). A. Estufa com bancadas de cultivo hidropônico de alface. B. Reservatório da solução nutritiva. C. Efluente hidropônico em erlenmeyer de 5 L. Fonte: o autor (2017).78

Figura 3: Fluxograma das principais etapas do teste piloto realizado com diferentes concentrações do efluente hidropônico de alface (10%-90%), bem como um controle contendo meio de cultivo sintético ASM1, evidenciando as três concentrações que apresentaram melhores resultados de crescimento e biomassa (20%, 30% e 40%). Fonte: o autor (2018).80

Figura 4: Curvas de crescimento de *S. acuminatus* cultivada no meio sintético ASM1 (Controle) e nos meios com diferentes concentrações de efluente de cultivo hidropônico de alface (10%–90%) obtidas a partir do teste piloto.81

Figura 5: Biomassa seca de <i>S. acuminatus</i> no meio sintético ASM1 (Controle) e nos meios com diferentes concentrações de efluente de cultivo hidropônico de alface (10%–90%) obtida a partir do teste piloto.	81
Figura 6: Concentrações de clorofila <i>a</i> , clorofila <i>b</i> e carotenoides totais de <i>S. acuminatus</i> no meio sintético ASM1 (Controle) e nos meios com diferentes concentrações de efluente de cultivo hidropônico de alface (10%–90%) obtidas a partir do teste piloto.....	82
Figura 7: Desenho experimental para avaliação do cultivo de <i>S. acuminatus</i> em meio sintético ASM1 (Controle) e nos meios com diferentes concentrações de efluente de cultivo hidropônico de alface (Tratamentos com 20%, 30% e 40% de efluente, respectivamente). Fonte: o autor (2018).....	82
Figura 8: Cromatograma referente à análise da fração lipídica da biomassa obtida de <i>S. acuminatus</i> cultivado em meio sintético ASM1. No gráfico é possível visualizar a identificação de cada ácido graxo e o tempo em que são identificados (valores entre parênteses). Fonte: o autor (2018).....	90
Figura 9: Curvas de crescimento de <i>S. acuminatus</i> no meio sintético ASM1 (Controle) e nos meios com diferentes concentrações de efluente hidropônico (Tratamentos com 20%, 30% e 40% de efluente, respectivamente). Valores expressos em média \pm erro padrão (barras verticais).	96
Figura 10: Curvas de biomassa seca do cultivo de <i>S. acuminatus</i> no meio sintético ASM1 (Controle) e nos meios com diferentes concentrações de efluente hidropônico (Tratamentos com 20%, 30% e 40% de efluente, respectivamente). Valores expressos em média \pm erro padrão (barras verticais).	100
Figura 11: Produtividade média do cultivo de <i>S. acuminatus</i> no meio sintético ASM1 (Controle) e nos meios com diferentes concentrações de efluente hidropônico (Tratamentos com 20%, 30% e 40% de efluente, respectivamente). Valores expressos em média \pm erro padrão (barras verticais). Colunas com a mesma letra não diferem significativamente pelo teste t com correção de Bonferroni ($p < 0,05$).	102
Figura 12: Concentrações de pigmentos fotossintéticos do cultivo de <i>S. acuminatus</i> no meio sintético ASM1 (Controle) e nos meios com diferentes concentrações de efluente hidropônico (20%, 30% e 40% de efluente, respectivamente) ao longo dos	

cultivos. A. Clorofila *a*. B. Clorofila *b*. C. Carotenoides totais. Valores expressos em média ± erro padrão (barras verticais).104

Figura 13: Teores de Proteínas, Carboidratos e Lipídeos na biomassa de *S. acuminatus* cultivado em meio sintético ASM1 (Controle) e nos meios com diferentes concentrações de efluente hidropônico (Tratamentos com 20%, 30% e 40% de efluente, respectivamente). Valores expressos em média ± erro padrão (barras verticais). Colunas da mesma cor ou textura seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste t com correção de Bonferroni ($p < 0,05$)...107

Figura 14: Perfil de Ésteres Metílicos de Ácidos Graxos (% do total de FAME) na biomassa de *S. acuminatus* cultivado em meio sintético ASM1 (Controle) e nos meios com diferentes concentrações de efluente hidropônico (Tratamentos com 20%, 30% e 40% de efluente, respectivamente).....113

CAPITULO 3 – CULTIVO DE *SCENEDESMUS ACUMINATUS* (LAGERHEIN) CHODAT EM EFLUENTE DE SUINOCULTURA BIODIGERIDO: CARACTERIZAÇÃO DO CRESCIMENTO, COMPOSIÇÃO DA BIOMASSA E REMOÇÃO DE NUTRIENTES

Figura 1: Representação da microalga *S. acuminatus* em um cenóbio com quatro células (à esquerda) e com oito células (à direita). Escala = 10 µm. Fonte: adaptado de Godinho et al. (2010).....142

Figura 2: Propriedade rural onde foi coletado o efluente de suinocultura (Santa Teresa-ES). A. Biodigestor anaeróbico do tipo Lagoa Coberta. B. Lagoa de estabilização para onde é lançado o efluente após o processo de biodigestão. C. Efluente de suinocultura biodigerido em erlenmeyer de 5L. Fonte: o autor (2017).....144

Figura 3: Fluxograma das principais etapas do teste piloto realizado com diferentes concentrações do efluente de suinocultura biodigerido (5%-30%), bem como um controle contendo meio de cultivo sintético ASM1, evidenciando as três concentrações que apresentaram melhores resultados de crescimento e biomassa (10%, 15% e 20%). Fonte: o autor (2018).....146

Figura 4: Curvas de crescimento de <i>S. acuminatus</i> cultivada no meio sintético ASM1 (Controle) e nos meios com diferentes concentrações de efluente de suinocultura biodigerido (5%-30%) obtidas a partir do teste piloto.....	147
Figura 5: Biomassa seca de <i>S. acuminatus</i> no meio sintético ASM1 (Controle) e nos meios com diferentes concentrações de efluente de suinocultura biodigerido (5%-25%) obtida a partir do teste piloto.....	147
Figura 6: Desenho experimental para avaliação do cultivo de <i>S. acuminatus</i> em meio sintético ASM1 (Controle) e nos meios com diferentes concentrações de efluente de suinocultura biodigerido (Tratamentos com 10%, 15% e 20% de efluente, respectivamente). Fonte: o autor (2018).....	148
Figura 7: Cromatograma referente à análise da fração lipídica da biomassa obtida de uma cultura de <i>S. acuminatus</i> cultivado em meio sintético ASM1. No gráfico é possível visualizar a identificação de cada ácido graxo e o tempo em que são identificados (valores entre parênteses). Fonte: o autor (2018).	156
Figura 8: Curvas de crescimento de <i>S. acuminatus</i> no meio sintético ASM1 (Controle) e nos meios com diferentes concentrações de efluente de suinocultura biodigerido (Tratamentos com 10%, 15% e 20% de efluente, respectivamente). A. Curvas do Controle e dos Tratamentos com 10%, 15% e 20% de efluente. B. Curvas dos Tratamentos com 10%, 15% e 20% de efluente, em maior escala. Valores expressos em média \pm erro padrão (barras verticais).	163
Figura 9: Curvas de biomassa seca no meio sintético ASM1 (Controle) e nos meios com diferentes concentrações de efluente de suinocultura biodigerido (Tratamentos com 10%, 15% e 20% de efluente, respectivamente). Valores expressos em média \pm erro padrão (barras verticais).	167
Figura 10: Produtividade média do cultivo de <i>S. acuminatus</i> no meio sintético ASM1 (Controle) e nos meios com diferentes concentrações de efluente de suinocultura biodigerido (Tratamentos com 10%, 15% e 20% de efluente, respectivamente). Valores expressos em média \pm erro padrão (barras verticais). Colunas com a mesma letra não diferem significativamente pelo teste t com correção de Bonferroni ($p < 0,05$).....	167
Figura 11: Concentrações de pigmentos fotossintéticos do cultivo de <i>S. acuminatus</i> no meio sintético ASM1 (Controle) e nos meios com diferentes concentrações de	

efluente de suinocultura biodigerido (10%, 15% e 20% de efluente, respectivamente). A. Clorofila *a*. B. Clorofila *b*. C. Carotenoides totais. Valores expressos em média \pm erro padrão (barras verticais).170

Figura 12: Teores de Proteínas, Carboidratos e Lipídeos na biomassa de *S. acuminatus* cultivado em meio sintético ASM1 (Controle) e nos meios com diferentes concentrações de efluente de suinocultura biodigerido (Tratamentos com 10%, 15% e 20% de efluente, respectivamente). Valores expressos em média \pm erro padrão (barras verticais). Colunas da mesma cor ou textura seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste t com correção de Bonferroni ($p < 0,05$).172

Figura 13: Perfil de Ésteres Metílicos de Ácidos Graxos (% do total de FAME) na biomassa de *S. acuminatus* cultivado em meio sintético (Controle) e nos meios com diferentes concentrações de efluente de suinocultura biodigerido (Tratamentos com 10%, 15% e 20% de efluente, respectivamente).176

LISTA DE TABELAS

CAPITULO 1 – EFEITOS DE DIFERENTES CONDIÇÕES DE TEMPERATURA E LUMINOSIDADE SOBRE O CRESCIMENTO E BIOMASSA DA MICROALGA *DESMODESMUS COMMUNIS* (HEGEWALD) HEGEWALD

Tabela 1: Composição das soluções estoque do meio ASM1. As massas correspondem às quantidades utilizadas para o preparo de 200 mL da solução A e 100 mL das soluções B, C e D, as quais são utilizadas na proporção 20:2:0,1:0,4, respectivamente, no preparo do meio ASM1.48

Tabela 2: Taxa de crescimento - μ , tempo de duplicação - G e rendimento máximo - $R_{m\acute{a}x}$ dos tratamentos nos diferentes experimentos. Valores expressos como média \pm erro padrão. Letras maiúsculas diferentes representam diferenças estatísticas entre os tratamentos para cada condição testada (diferentes temperaturas e luminosidades).54

CAPITULO 2 – EFLUENTE HIDROPÔNICO DA PRODUÇÃO DE ALFACE UTILIZADO NO CULTIVO DE *SCENEDESMUS ACUMINATUS* (LAGERHEIN) CHODAT COMO SUBSÍDIO À APLICAÇÃO BIOTECNOLÓGICA

Tabela 1: Composição das soluções estoque do meio ASM1. As massas correspondem às quantidades utilizadas para o preparo de 200 mL da solução A e 100 mL das soluções B, C e D, as quais são utilizadas na proporção 20:2:0,1:0,4, respectivamente, no preparo do meio ASM1.77

Tabela 2: Caracterização físico-química do efluente do cultivo hidropônico de alface utilizado na elaboração do experimento.93

Tabela 3: Valores de turbidez, condutividade elétrica, ortofosfato e nitrato do meio sintético ASM1 (Controle) e dos meios com diferentes concentrações de efluente hidropônico (Tratamentos com 20%, 30% e 40% de efluente, respectivamente) utilizados para o cultivo de *S. acuminatus*.95

Tabela 4: Parâmetros cinéticos de crescimento de *S. acuminatus* (taxa de crescimento - μ , tempo de duplicação - G e rendimento máximo - $R_{m\acute{a}x}$) e dias de duração da fase de crescimento exponencial (Log) no meio sintético ASM1

(Controle) e nos meios com diferentes concentrações de efluente hidropônico (Tratamentos com 20%, 30% e 40% de efluente, respectivamente).97

Tabela 5: Perfil de Ésteres Metílicos de Ácidos Graxos (% do total de FAME) na biomassa de *S. acuminatus* cultivado em meio sintético ASM1 (Controle) e nos meios com diferentes concentrações de efluente hidropônico (Tratamentos com 20%, 30% e 40% de efluente, respectivamente). 112

Tabela 6: Percentual de remoção de nutrientes (ortofosfato - PO_4^{3-} - e nitrato - NO_3) e de redução da Condutividade Elétrica (CE) ao final dos cultivos no meio sintético ASM1 (Controle) e nos meios com diferentes concentrações de efluente hidropônico (Tratamentos com 20%, 30% e 40% de efluente, respectivamente). 117

CAPITULO 3 – CULTIVO DE *SCENEDESMUS ACUMINATUS* (LAGERHEIN) CHODAT EM EFLUENTE DE SUINOCULTURA BIODIGERIDO: CARACTERIZAÇÃO DO CRESCIMENTO, COMPOSIÇÃO DA BIOMASSA E REMOÇÃO DE NUTRIENTES

Tabela 1: Composição das soluções estoque do meio ASM1. As massas correspondem às quantidades utilizadas para o preparo de 200 mL da solução A e 100 mL das soluções B, C e D, as quais são utilizadas na proporção 20:2:0,1:0,4, respectivamente, no preparo do meio ASM1. 143

Tabela 2: Caracterização físico-química do efluente de suinocultura após processo de biodigestão. 159

Tabela 3: Valores de turbidez, condutividade elétrica, ortofosfato e nitrato iniciais do meio sintético ASM1 (Controle) e dos meios com diferentes concentrações de efluente de suinocultura biodigerido (Tratamentos com 10%, 15% e 20% de efluente, respectivamente) utilizados para o cultivo de *S. acuminatus*. 161

Tabela 4: Parâmetros cinéticos de crescimento (taxa de crescimento - μ , tempo de duplicação - G e rendimento máximo - $R_{m\acute{a}x}$) e dias de duração da fase de crescimento exponencial (Log) do meio sintético ASM-1 (Controle) e dos meios com diferentes concentrações de efluente de suinocultura biodigerido (Tratamentos com 10%, 15% e 20% de efluente, respectivamente). 164

Tabela 5: Composição de Ésteres Metílicos de Ácidos Graxos - FAME (% do total de ésteres), teores de instauração e total de ésteres na biomassa de *S. acuminatus* cultivado em meio sintético ASM1 (Controle) e nos meios com diferentes concentrações de efluente de suinocultura biodigerido (Tratamentos com 10%, 15% e 20% de efluente, respectivamente).....175

Tabela 6: Percentual de remoção de nutrientes (ortofosfato - PO_4^{3-} - e nitrato - NO_3^-) e de redução da Condutividade Elétrica (CE) ao final dos cultivos no meio sintético (Controle) e nos meios com diferentes concentrações de efluente de suinocultura biodigerido (Tratamentos com 10%, 15% e 20% de efluente, respectivamente).....180

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	25
2. OBJETIVO GERAL	33
3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
4. REFERÊNCIAS	34
CAPITULO 1 – EFEITOS DE DIFERENTES CONDIÇÕES DE TEMPERATURA E LUMINOSIDADE SOBRE O CRESCIMENTO E BIOMASSA DA MICROALGA <i>DESMODESMUS COMMUNIS</i> (HEGEWALD) HEGEWALD.....	
RESUMO	40
ABSTRACT	42
1. INTRODUÇÃO	44
2. MATERIAL E MÉTODOS	47
2.1. <i>Isolamento da cepa de microalga e preparo do inóculo</i>	47
2.2. <i>Delineamento experimental</i>	48
2.3. <i>Avaliação do crescimento</i>	50
2.4. <i>Determinação da biomassa seca</i>	51
2.5. <i>Quantificação de clorofila a</i>	51
2.6. <i>Tratamento estatístico</i>	52
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
4. CONCLUSÕES	63
5. REFERÊNCIAS.....	64
CAPITULO 2 – EFLUENTE HIDROPÔNICO DA PRODUÇÃO DE ALFACE UTILIZADO NO CULTIVO DE <i>SCENEDESMUS ACUMINATUS</i> (LAGERHEIN) CHODAT COMO SUBSÍDIO À APLICAÇÃO BIOTECNOLÓGICA.....	
RESUMO	69
ABSTRACT	71
1. INTRODUÇÃO	73
2. MATERIAL E MÉTODOS	76
2.1 <i>Seleção da microalga e manutenção em meio de cultura sintético</i>	76
2.2 <i>Coleta e análise do efluente de cultivo hidropônico de alface</i>	77
2.3 <i>Processamento do efluente hidropônico e teste piloto</i>	79
2.4 <i>Delineamento experimental</i>	82
2.5 <i>Avaliação do crescimento</i>	84
2.6 <i>Determinação da biomassa seca</i>	85

2.7	<i>Quantificação de pigmentos</i>	85
2.8	<i>Determinação de proteínas hidrossolúveis</i>	86
2.9	<i>Determinação de carboidratos totais</i>	87
2.10	<i>Determinação de lipídeos totais</i>	88
2.11	<i>Perfil de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME)</i>	89
2.12	<i>Remoção de nutrientes</i>	91
2.13	<i>Tratamento estatístico</i>	92
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	93
3.1	<i>Caracterização do efluente hidropônico e dos meios de cultivo</i>	93
3.2	<i>Crescimento e biomassa</i>	96
3.3	<i>Concentração de pigmentos fotossintéticos</i>	103
3.4	<i>Proteínas hidrossolúveis, carboidratos e lipídeos totais</i>	106
3.5	<i>Perfil de ésteres metílicos de ácidos graxos</i>	111
3.6	<i>Remoção de nutrientes e redução da condutividade elétrica</i>	117
4.	CONCLUSÕES	120
5.	REFERÊNCIAS.....	122
CAPITULO 3 – CULTIVO DE <i>SCENEDESMUS ACUMINATUS</i> (LAGERHEIN) CHODAT EM EFLUENTE DE SUINOCULTURA BIODIGERIDO: CARACTERIZAÇÃO DO CRESCIMENTO, COMPOSIÇÃO DA BIOMASSA E REMOÇÃO DE NUTRIENTES.....		
	RESUMO	135
	ABSTRACT	137
1.	INTRODUÇÃO	139
2.	MATERIAL E MÉTODOS	142
2.1	<i>Seleção da microalga e manutenção em meio de cultura sintético</i>	142
2.2	<i>Coleta e análise do efluente de suinocultura biodigerido</i>	143
2.3	<i>Processamento do efluente de suinocultura biodigerido e teste piloto</i> ...	145
2.4	<i>Delineamento experimental</i>	147
2.5	<i>Avaliação do crescimento</i>	149
2.6	<i>Determinação da biomassa seca</i>	150
2.7	<i>Quantificação de pigmentos</i>	151
2.8	<i>Determinação de proteínas hidrossolúveis</i>	152
2.9	<i>Determinação de carboidratos totais</i>	153
2.10	<i>Determinação de lipídeos totais</i>	154
2.11	<i>Perfil de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME)</i>	154

2.12	<i>Remoção de nutrientes</i>	157
2.13	<i>Tratamento estatístico</i>	158
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	159
3.1	<i>Caracterização do efluente de suinocultura biodigerido e dos meios de cultivo</i>	159
3.2	<i>Crescimento e biomassa</i>	162
3.3	<i>Concentração de pigmentos fotossintéticos</i>	168
3.4	<i>Proteínas hidrossolúveis, carboidratos e lipídeos totais</i>	171
3.5	<i>Perfil de ésteres metílicos de ácidos graxos</i>	174
3.6	<i>Remoção de nutrientes</i>	179
4.	CONCLUSÕES	182
5.	REFERÊNCIAS.....	184
5.	CONCLUSÃO GERAL	194

1. INTRODUÇÃO GERAL

O cultivo de microalgas permite manipular esses organismos isoladamente e submetê-los a condições ótimas para seu crescimento em altas densidades, sendo de grande importância para elucidar diversos aspectos da biologia das espécies, principalmente quanto à variabilidade morfológica, à plasticidade fenotípica, características bioquímicas e ciclo de vida. Além disso, o avanço do cultivo tem proporcionado o uso crescente de microalgas em testes de toxicidade, melhorando a avaliação dos impactos ambientais causados por substâncias derramadas em ambientes aquáticos (LOURENÇO, 2006).

O crescente interesse pelo cultivo de microalgas se deve não somente à sua importância ambiental e biológica, mas também por constituir importante ferramenta para a produção de biomassa com diversas aplicações de interesse econômico, como a obtenção de biocompostos para suplemento alimentar humano, produção de ração concedida a animais, concentração de proteínas, ácidos graxos e carboidratos. Além disso, existem outras aplicações e usos potenciais envolvendo, por exemplo, o tratamento de águas residuárias (LOURENÇO, 2006; BERTOLDI et al., 2007; FERREIRA et al., 2017), e, mais recentemente, as microalgas têm ganhado grande destaque em virtude do seu potencial para a produção de biocombustíveis (GOUVEIA, 2011; MENEZES et al., 2013; REIS; GOUVEIA, 2016).

Na década de 90, com o aumento da atenção dos governantes e da sociedade para as questões ambientais relacionadas às emissões de gases estufa, ampliou-se o interesse pelos biocombustíveis como fonte energética alternativa (POUSA et al., 2007; AZEREDO, 2012). Tendo em vista essa demanda, diversos estudos e pesquisas voltados para a produção de biocombustíveis vêm sendo desenvolvidos e, neste contexto, as microalgas têm ganhado destaque como matéria-prima em virtude, principalmente, de sua grande capacidade de produzir biomassa por unidade de área e tempo, além de algumas espécies armazenarem grandes quantidades de óleo com potencial para a produção de biodiesel (AZEREDO, 2012).

Sendo um produto derivado de biomassa renovável, o biodiesel pode substituir total ou parcialmente os combustíveis derivados de petróleo e gás natural. A maior vantagem em longo prazo pode ser referida ao preço em relação ao

combustível fóssil, visto que a cada ano os valores do petróleo são acrescidos devido ao alto consumo e diminuição das reservas, além das crises políticas que elevam ainda mais o seu valor (BIODIESELBR, 2012).

No Brasil, o óleo diesel comercializado apresentava 8% de biodiesel desde março de 2017, estabelecido pela Resolução Nº 11/2017 do Conselho Nacional de Política Energética (CNPE) e, segundo decisão tomada em novembro de 2017 pelo mesmo Conselho, as distribuidoras deveriam aumentar para 10% o percentual de biodiesel obrigatoriamente adicionado ao óleo diesel vendido em todo o país a partir de março de 2018. Este aumento demonstra que o Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel (PNPB) teve sucesso na produção e uso de biocombustíveis em larga escala. O país está entre os maiores produtores e consumidores de biodiesel do mundo, com a presença de várias espécies vegetais como soja, dendê, babaçu, girassol, pinhão-mansão, mamona e amendoim, distribuídas em diversas regiões (ANP, 2012).

A extração de óleos de microalgas entre outras fontes compõe a terceira geração de biocombustíveis que, em relação às anteriores, é a melhor opção para lidar com a segurança alimentar e energética e as preocupações ambientais. Algumas vantagens em relação às plantas oleaginosas convencionais são: apresentam ciclo de vida rápido e produção contínua durante todo o ano (CHIST, 2007); exibem um crescimento exponencial quando em cultivo; o cultivo pode ser feito em regiões ensolaradas onde os solos são pouco agricultáveis e, portanto, inviáveis para a produção de biodiesel a partir de plantas terrestres; os cultivos praticamente não geram danos ambientais e implicam em menores gastos de água, quando comparado ao cultivo de plantas, sendo ainda viável a utilização de águas residuárias para seu cultivo (PEQUENO, 2010); e a biomassa resultante após a extração pode ser utilizada na alimentação animal, como adubo orgânico, como fonte de corantes e antioxidantes naturais (MAITY et al., 2014; VANTHOOR-KOOPMANS et al., 2013). Além da alta eficiência na produção de óleos (biodiesel), microalgas também são adequadas como matéria-prima de outros biocombustíveis como biohidrogênio (prótons e elétrons), biometano (biomassa), bioetanol (açúcares e amido) e bio-óleo (SCHENK et al., 2008; ZHU, 2015).

Outra aplicação das microalgas reside em programas de biorremediação (ZENG et al., 2015; KUMAR et al., 2015, SIVA KIRAN et al., 2012), ou na produção de medicamentos e fármacos, alimento e intermediários químicos para o setor

petroquímico, bioplásticos, bioquerosene e compostos bioativos diversos (AHMED et al., 2014; FRANCO et al., 2013; CHU et al., 2010; CABRITA et al., 2010; LA BARRE et al., 2010), cujas pesquisas sobre esses assuntos poderiam resultar em agregação de valor na cadeia produtiva do biodiesel derivado das microalgas, e consequente viabilização econômica desta produção.

Todavia, biocombustíveis a partir das microalgas ainda encontram entraves tecnológicos dos quais depende a sua expansão à escala comercial como: dificuldades na logística de produção em larga escala; dificuldades no uso de organismos geneticamente modificados em sistemas abertos; alto custo na formulação dos meios de cultura; complexidade no escalonamento industrial de fotobiorreatores; alto custo de produção em sistemas heterotróficos; alta demanda energética para secagem e extração; e alta acidez do material lipídico isolado (GREENWELL et al., 2010; LEITE et al., 2013). Assim, para que o potencial do biodiesel de microalgas se concretize é necessário que sejam desenvolvidas pesquisas biotecnológicas aplicáveis a todas as etapas do processo produtivo, desde a seleção, cultivo e manejo das microalgas até o processo de transesterificação do óleo extraído das mesmas, no sentido de otimizá-las e/ou baixar os seus custos.

No Brasil, o cultivo em massa de microalgas é um campo de investigação promissor e necessita de atenção urgente. Considerando-se a existência de regiões com condições climáticas potencialmente adequadas, com temperaturas amenas e sol em abundância, sua prática parece ser uma possibilidade sócio-econômica muito promissora para praticamente todas as regiões (SYDNEY et al., 2011).

Os primeiros estudos brasileiros sobre cultivo de microalgas foram realizados na década de 70 por Teixeira e Vieira (1976) com o cultivo da diatomácea *Phaeodactylus tricornutum*, na Universidade de São Paulo (LOURENÇO, 2006). A partir de 1980, o cultivo de microalgas começou a se difundir pelo país, geralmente ligado a projetos de aumento de biomassa para alimentação de animais na aquicultura. Atualmente, o cultivo tem sido utilizado em aplicações comerciais e sustentáveis diversas, como na captura de gás carbônico (CO₂) emitido por usinas termoelétricas ou por outras fontes desse gás, produção em larga escala de substâncias para uso cosmético, alimentício e até mesmo na produção de biocombustíveis. Desde 2008, por exemplo, empresas como a

PETROBRAS e outras agências nacionais de fomento à pesquisa tem incentivado a produção de biomassa microalgal para a produção de biodiesel (PEDRINI, 2010).

Hoje já são encontradas algumas empresas que cultivam biomassa de microalgas em grande escala, contudo, esse processo carece ainda de vários estudos visando à minimização de custos para serem expandidos (CALIXTO, 2016). Os sistemas de cultivo de microalgas comumente empregados em escala comercial são os abertos (Fig. 1 A), cujos cultivos são realizados sob condições naturais de iluminação e temperatura, e os fechados, desenvolvidos com iluminação natural ou artificial, denominados de fotobiorreatores (Fig. 1 B). Os sistemas abertos são relativamente mais baratos e de fácil manutenção, mas o seu uso é limitado a algumas espécies de microalgas, além de necessitarem de grandes áreas de implementação. Já os fotobiorreatores fechados são de construção mais dispendiosa, devido às condições controladas que possui, sendo, normalmente, mais difícil sua implementação em larga escala (BRENNAN; OWENDE, 2010).

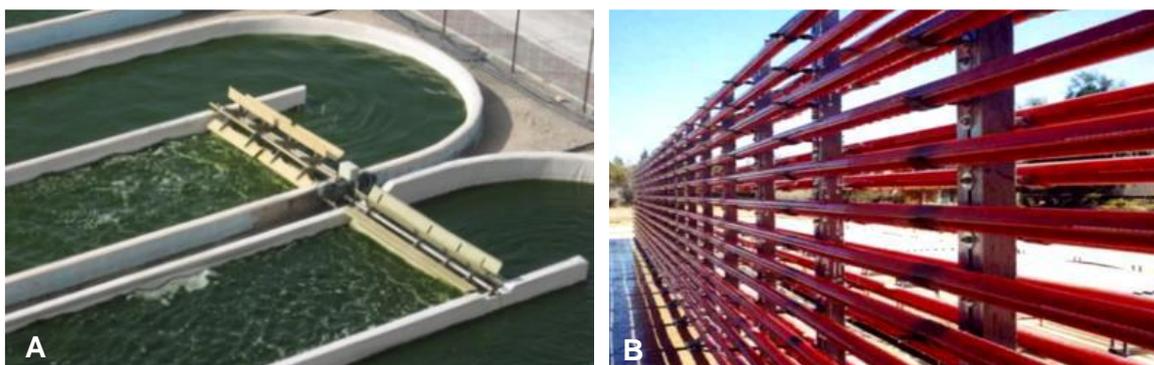


Figura 1: Exemplos de produção de microalgas em larga escala em sistemas de cultivo do tipo aberto, pista de corrida - *raceway* (A), e fechado, fotobiorreator tubular (B). Fonte: adaptado de Barata (2016).

O êxito no cultivo de microalgas depende de uma série de fatores, sendo os principais: temperatura, intensidade luminosa, salinidade e concentração de nutrientes (CHISTI, 2007). Dessa forma, essas variáveis devem ser observadas em cultivo a fim de otimizar o crescimento desses organismos, viabilizando e tornando mais eficiente o processo e a produção dos diversos compostos de interesse comercial.

Um dos fatores que mais afeta a taxa metabólica dos organismos é a temperatura. Há perigo em se fazer generalizações da temperatura, pois esta varia

de espécie para espécie, ainda que pertencentes à mesma região. Temperaturas constantes são desejáveis, pois proporcionam mais estabilidade nos experimentos e nas operações de rotinas, permitindo maior reprodutibilidade e previsibilidade das respostas das espécies (OLIVEIRA, 2013). Para salas de cultivos, temperaturas constantes são alcançadas por meio de sistemas de refrigeração, porém, para grandes sistemas a dificuldade de se manter a temperatura constante é maior (LOURENÇO, 2006).

A iluminação é outro fator que requer atenção especial para o êxito dos cultivos. A condição ótima para o crescimento das microalgas dependerá da intensidade da luz, do comprimento de onda e duração aos quais as células estão expostas. Em cultivos de pequena escala, recomenda-se o uso de luz artificial, uma vez que pode ser controlada de acordo com as necessidades das culturas. As lâmpadas mais comumente utilizadas são fluorescentes do tipo luz do dia, por simular comprimentos de ondas de 350 a 700 nm, necessários para a fotossíntese (OLIVEIRA, 2013).

A condição nutricional para o cultivo de microalgas é oferecida através dos meios de cultura pré-estabelecidos em solução aquosa, sendo estes responsáveis por estimular o crescimento pela oferta de macro e micronutrientes presentes; seu controle é feito na preparação e podem ou não ser incorporados após a inoculação das células (LOURENÇO, 2006; TREDICI, 2004).

Apesar do grande potencial, o cultivo de microalgas ainda apresenta altos custos, sendo um dos principais o custo dos reagentes químicos utilizados na preparação dos meios de cultura comerciais (FERRELL; SARISKY-REED, 2010; KRUSE; HANKAMER, 2010; NEVES et al., 2013). Segundo Grima et al. (2003), do valor total do custo da produção de biomassa, aproximadamente 35% está relacionado com o gasto para a produção do meio de cultivo.

Assim, vários estudos vêm sendo realizados com o intuito de avaliar o crescimento das microalgas cultivadas em meios de cultura alternativos, os quais podem ser mais baratos, facilmente obtidos e ricos em nutrientes necessários ao metabolismo desses organismos. Dentre os meios de culturas alternativos utilizados para a produção de biomassa de microalgas destacam-se: vinhaça, efluentes da bovinocultura e suinocultura e solução hidropônica residual (BERTOLDI et al., 2008).

Existe um esforço da comunidade científica em valorizar esses efluentes como fonte de nutrientes para cultivos de algas, pois esses resíduos são produzidos em largas quantidades e constituem um grave problema ambiental. As composições dos efluentes variam de acordo com sua origem, podendo conter grande quantidade de matéria orgânica, ou ainda apresentar altas concentrações de metais tóxicos (DAL MAGRO et al., 2011, apud OLIVEIRA, 2013).

No Brasil, a disposição final, ambientalmente correta, de efluentes agroindustriais é um dos principais desafios para criadores, produtores e pesquisadores, pois envolvem aspectos técnicos, econômicos e ambientais. No setor de produção animal, por exemplo, devido à grande concentração de animais por área em sistemas de confinamento, um volume considerável de dejetos é gerado diariamente, chegando a cerca de 6.106 toneladas.dia⁻¹ e 74.103 toneladas.dia⁻¹ de dejetos produzidos por bovinos e suínos, respectivamente (OLIVEIRA, 2013).

O uso de efluentes agroindustriais, como vinhaça, solução hidropônica residual, efluentes de bovinocultura e suinocultura, no cultivo de microalgas representa uma alternativa ambiental e econômica para o tratamento de efluente, pois além de permitir a redução do potencial poluidor e dos riscos sanitários dos dejetos, reduz o custo da produção de biomassa como matéria-prima para síntese de biodiesel, minimizando o gasto com nutrientes e água na produção de microalgas (OLIVEIRA, 2013).

Tendo em vista que os meios de cultura representam um dos itens de maior custo para o cultivo de microalgas em larga escala, o uso de meios alternativos de fácil aquisição e que sejam ricos em compostos nutricionais, como efluentes de atividades agroindustriais, pode ajudar a viabilizar o processo. Além disso, estudos com a manipulação das condições de cultivo, como luz e temperatura, são importantes para avaliar o desenvolvimento das microalgas e propor melhores condições para aumentar sua biomassa, reduzindo assim os custos em sua produção para diversos usos na indústria, em especial como matéria prima para a produção de biodiesel.

Além das condições físico-químicas do cultivo, também é importante conhecer bem as características específicas da alga de interesse, a qual pode ser obtida diretamente de um banco de cultivo pré-estabelecido ou indiretamente, através do isolamento da espécie a partir da coleta de uma amostra ambiental.

Neste caso, deve-se levar em consideração a biodiversidade do ecossistema a ser estudado.

Muitas algas da classe Chlorophyceae são atualmente cultivadas e têm a vantagem de serem facilmente encontradas em ambientes aquáticos continentais. Os componentes dessa classe são também conhecidos como algas verdes e correspondem a um amplo grupo de organismos cosmopolitas, que apresenta grande variedade morfológica, incluindo formas unicelulares e coloniais, flageladas ou imóveis. Os indivíduos possuem em sua composição principalmente clorofila *a* e *b*, e vários carotenoides (RICHMOND, 2004).

Nesta classe, destacam-se os gêneros *Scenedesmus* e *Desmodesmus*, da ordem Sphaeropleales, família Scenedesmaceae, caracterizadas como algas de água doce, de ambientes tipicamente eutróficos, encontradas facilmente nos ecossistemas aquáticos brasileiros. *Scenedesmus* compreende colônias planas do tipo cenóbio, com 2, 4, 8, 16 ou, mais raramente, 32 células elipsoides, ovoides, fusiformes ou lunadas dispostas lado a lado (BICUDO; MENEZES, 2006). Atualmente, é um gênero muito visado para o cultivo devido ao seu crescimento rápido, fácil adaptação às variações ambientais (TRAINOR, 1998) e grande valor nutritivo com alta produção de proteínas e ácidos graxos (BECKER, 1994; GOUVEIA; OLIVEIRA, 2009). Seu cultivo é voltado principalmente para a aquicultura (DERNER et al., 2006), para a alimentação humana como suplemento alimentar e como potencial matéria prima para produção de biodiesel (PRABAKARAN; RAVINDRAN, 2012). O gênero *Desmodesmus* caracteriza-se por apresentar colônias cenobiais planas e formadas por 2, 4, 8 ou 16 células elipsoides ou ovoides dispostas lado a lado, com espinhos nas células extremas e/ou intermediárias do cenóbio (BICUDO; MENEZES, 2006). São indivíduos reconhecidamente resistentes a variações ambientais e competição com outras espécies de algas, sendo, dessa forma, potencialmente interessantes para o cultivo em larga escala, onde esses fatores tem maior interferência (PAN et al., 2011). Sua resistência torna possível boa produtividade de biomassa em meio de cultura produzido com efluentes, apesar do baixo conteúdo lipídico (SAMORI et al., 2013).

Diante do exposto, o presente estudo visou avaliar o crescimento de microalgas (Scenedesmaceae) em diferentes condições de temperatura e luminosidade, bem como testar diferentes efluentes oriundos de atividades agrícolas como substitutos para os meios de cultivos sintéticos, e assim, reduzir o

custo da produção de biomassa algal, subsidiando o cultivo em maior escala para diferentes fins comerciais, com destaque para a produção de biodiesel.

As hipóteses que nortearam esta pesquisa foram: As espécies de microalgas da família Scenedesmaceae utilizadas neste estudo (oriundas do estado do Espírito Santo, região Sudeste do Brasil) apresentam potencial para aplicações biotecnológicas e produzem biomassa e lipídeos em quantidades adequadas à produção de biodiesel; *Desmodesmus communis* apresenta diferenças no crescimento e produção de biomassa quando submetida a diferentes condições de temperatura e luminosidade durante o cultivo; A espécie de microalga *Scenedesmus acuminatus* apresenta crescimento e produção de biomassa acentuados em meios de cultivo alternativos preparados a partir de efluentes agrícolas (efluente hidropônico de cultivo de alface e efluente de suinocultura biodigerido); As diferentes concentrações dos efluentes utilizados na formulação dos meios de cultivo alternativos alteram a composição química da microalga, incluindo o teor lipídico e os ácidos graxos constituintes, o que provoca variações nas propriedades combustíveis do biodiesel produzido e em suas aplicações biotecnológicas; A microalga *Scenedesmus acuminatus* apresenta grande capacidade de remoção de nutrientes quando cultivada em meios de cultivo preparados a partir de efluentes, podendo ser utilizada na biorremediação dos mesmos.

2. OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos de diferentes condições físicas de crescimento e testar diferentes efluentes agrícolas como meios de cultivo alternativos em espécies de microalgas da família Scenedesmaceae com potencial para aplicação biotecnológica, visando minimizar custos produtivos e mitigar impactos ambientais.

3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Testar o cultivo da microalga *Desmodesmus communis* em meio sintético sob diferentes condições de temperatura e luminosidade;
- Testar o cultivo da microalga *Scenedesmus acuminatus* em meio sintético e em meios alternativos formulados a partir de efluente hidropônico de cultivo de alface e de efluente de suinocultura biodigerido, visando avaliar a influência destes meios na composição química e produtividade da biomassa obtida;
- Caracterizar os efluentes brutos e os meios de cultivo alternativos formulados a partir deles, quanto às variáveis físico-químicas;
- Avaliar o crescimento e o incremento de biomassa das microalgas submetidas a diferentes condições de temperatura, luminosidade e meios de cultivo alternativos;
- Analisar as diferenças na composição química (carboidratos totais, proteínas hidrossolúveis, lipídios totais e ésteres metílicos de ácidos graxos) da alga cultivada nas diferentes concentrações dos efluentes testados como meios de cultivo alternativos, bem como seu potencial em termos de remoção de nutrientes;
- Determinar as condições mais eficientes de temperatura, luminosidade e as concentrações mais viáveis dos meios alternativos para o cultivo das microalgas, visando a aplicação biotecnológica, com ênfase na produção de biodiesel.

4. REFERÊNCIAS

- AHMED, F.; FANNING, K.; NETZEL, M.; TURNER, W.; LI, Y.; SCHENK, P. M. Profiling of carotenoids and antioxidant capacity of microalgae from subtropical coastal and brackish water. **Food Chemistry**, v. 165, p. 300-306, 2014.
- ANP - **AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS**, 2012. Comercialização de biocombustíveis. Disponível em: <http://www.anp.gov.br/?pg=60468&m=&t1=&t2=&t3=&t4=&ar=&ps=&cachebus t=1359568985545>. Acesso em 02 jun. 2014.
- AZEREDO, V. B. S. Produção de Biodiesel a partir do cultivo de microalgas: estimativa de custos e perspectivas para o Brasil. **Dissertação de Mestrado em Planejamento Energético** – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012. 188p.
- BECKER, E. W. **Microalgae: biotechnology and microbiology**, Ed. Baddiley, J. et al., Cambridge Univ. Press, Cambridge, New York. 1994.
- BERTOLDI, F.C.; SANT'ANNA, E.; OLIVEIRA, J.L.B. Chlorophyll content and minerals profile in the microalgae *Chlorella vulgaris* cultivated in hydroponic wastewater. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.1, p.54-58, 2008.
- BERTOLDI, F.C.; SANT'ANNA, E.; OLIVEIRA, J.L.B.; REBELO, A.M. Biorremocão de nitrogênio e fósforo da solução hidropônica residual por meio da microalga *Chlorella vulgaris*. **Evidência**, Joaçaba, v. 7, n. 2, p. 85-92, 2007.
- BICUDO, C. E. M.; MENEZES, M. **Gêneros de algas de águas continentais do Brasil: chave para identificação e descrições**. São Carlos: Rima. 502p. 2006.
- BIODIESELBR, **O que é biodiesel?** Curitiba, 2012. Disponível em: <http://www.biodieselbr.com/biodiesel.htm>. Acesso em: 2 nov. 2014.
- BRENNAN, L.; OWENDE, P. Biofuels from microalgae — A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renew. Sustain. Energy Rev.**, v. 14, n. 2, p. 557–577, 2010.
- CABRITA, M.T.; VALE, C.; RAUTER, A.P. Halogenated compounds from marine algae. **Marine drugs**, v. 8, n. 8, p. 2301-2317, 2010.
- CALIXTO, C.D. Potencial de microalgas regionais cultivadas em meios alternativos para produção de biodiesel. **Tese de Doutorado em Química**, Universidade Federal da Paraíba, UFPB, 2016. 155p.

- CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, v. 25, p. 294-306, 2007.
- CHU, W.-L.; LIM, Y.-W.; RADHAKRISHNAN, A. K.; LIM, P.-E. Protective effect of aqueous extract from *Spirulina platensis* against cell death induced by free radicals. **BCM Complementary and Alternative Medicine**, v. 10, n. 53, p. 3-8, 2010.
- DERNER, R.B.; OHSE, S.; VILLELA, M.; CARVALHO, S.M.; FETT, R. Microalgas, produtos e aplicações. **Ciencia Rural**, v. 36, n. 6, p. 1959-1967, 2006.
- FERREIRA, A.; RIBEIRO, B.; MARQUES, A.P.S.S.; FERREIRA, A.F.; DIAS, A.P.; PINHEIRO, H.M.; REIS, A.; GOUVEIA, L. *Scenedesmus obliquus* mediated brewery wastewater remediation and CO₂ biofixation for green energy purposes. **Journal of Cleaner Production**. v.165, p.1316-1327, 2017.
- FERRELL, J.; SARISKY-REED, V. **National algal biofuels technology roadmap**. A technology roadmap resulting from the national algal biofuels workshop Washington U.S. Department of Energy, Office of Energy Efficiency and Renewable Energy, Biomass Program. 2010.
- FRANCO, A. L. C.; LÔBO, I. P.; CRUZ, R. S.; TEIXEIRA, C. M. L. L.; ALMEIDA FUKUDA, N.; HABE, H.; ITO, M.; Biodegradation of biodiesel wash water from a biodiesel fuel production plant. **Journal of Oleo Science**, v. 62, n. 7, p. 525-532, 2013.
- GOUVEIA, L. **Microalgae as a feedstock for biofuels**. SpringerBriefs. Springer Berlin Heidelberg, 2011.
- GOUVEIA, L.; OLIVEIRA, A. C. Microalgae as a raw material for biofuels production. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 36, n. 2, p. 269-274, 2009.
- GREENWELL, H.C.; LAURENS, L.M.L.; SHIELDS, R.J.; LOVITT, R.W.; FLYNN, K.J. Placing microalgae on the biofuels priority list: a review of the technological challenges. **J. R. Soc. Interface**, v.7, p.703–726, 2010.
- KRUSE, O.; HANKAMER, B. Microalgal hydrogen production. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 21, n. 3, p. 238-243, 2010.
- KUMAR, K.S.; DAHMS, H.U.; WON, E.J.; LEE, J.S.; SHIN, K.H. Microalgae – A promising tool for heavy metal remediation. **Ecotox. Environ. Safe**, v.113, p.329–352, 2015.
- LA BARRE, S.; POTIN, P.; LEBLANC, C.; DELAGE, L. The halogenated metabolism of brown algae (Phaeophyta), its biological importance and its environmental significance. **Marine drugs**, v.8, n.4, p.988-1010, 2010.

LEITE, G.B.; ABDELAZIZ, A.E.; HALLENBECK, P.C. Algal biofuels: challenges and opportunities. **Bioresource Technology**, v.145, p.134-141, 2013.

LOURENÇO, S. O. **Cultivo de Microalgas Marinhas**: Princípios e aplicações. ed. 1, São Carlos: RiMa, 2006.

MAITY, J. P.; BUNDSCHUH, V.; CHEN, C.; BHATTACHARYA, P. Microalgae for third generation biofuel production, mitigation of greenhouse gas emissions and wastewater treatment: Present and future perspectives: A mini review. **Energy**, p.1-10, 2014.

MENEZES, R.S.; LELES, M.I.G.; SOARES, A.T.; FRANCO, P.I.B.M.F.; FILHO, N.R.A.; SANT'ANNA, C.L.; VIEIRA, A.A.H. Avaliação da potencialidade de microalgas dulcícolas como fonte de matéria-prima graxa para a produção de biodiesel. **Química Nova**, v. 36, n. 1, p. 10-15, 2013.

NEVES, F.F.; DERNER, R.B.; LISBOA, H.M.; RORIG, L.R.; LOPES, R.G.; VIEIRA, A.S.; JEREMIAS, M.L. Efeito do uso de efluente doméstico tratado, como meio de cultura, sobre o crescimento e produtividade no cultivo de *Chlamydomonas sp.* isolada de lixiviado de aterro sanitário. **Tecno-Lógica**, v. 17, n. 1, p. 30-37, 2013.

OLIVEIRA, A.C. Produção de biomassa de microalgas *Scenedesmus sp.* em efluente de bovinocultura biodigerido. **Dissertação de Mestrado em Engenharia e Ciência dos Materiais** - Universidade Federal do Paraná, 2013. 82p.

PAN, Y-Y.; WANG, S-T.; CHUANG, L-T.; CHANG, Y-W.; CHEN, C-N.N. Isolation of thermo-tolerant and high lipid content green microalgae: Oil accumulation is predominantly controlled by photosystem efficiency during stress treatments in *Desmodesmus*. **Bioresource technology**, v.102, p.10510-10517, 2011.

PEDRINI, A.G. **Microalgas**: uma introdução à taxonomia. Technical Books, Rio de Janeiro. 125p. 2010.

PEQUENO, M.A.G. Avaliação do Potencial Produtivo de Óleos Obtidos a Partir de Microalgas por Cromatografia Gasosa. 2010. 66 p. **Dissertação de Mestrado** - Departamento de Química, Universidade Federal da Paraíba, 2010.

POUSA, P. A. G.; SANTOS, A. L. F.; SUAREZ, P. A. Z. History and policy of biodiesel in Brazil. **Energy Policy**, v. 35, n. 11, p. 5393-5398, 2007.

PRABAKARAN, P.; RAVINDRAN, D. *Scenedesmus* as a potential source of biodiesel among selected microalgae, **Current Science**, v. 102, n. 4, p. 606-620, 2012.

- REIS, A.; GOUVEIA, L. Low cost microalgal production for biofuels: a review. Special issue Current Advances in Algae Biotechnology. **Current Biotechnology**, v. 5, p. 266-276, 2016.
- RICHMOND, A.; **Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology**. Oxford: Blackwell Science, 2004.
- SAMORI, G.; SAMORI, C.; GUERRINI, F.; PISTOCCHI, R. Growth and nitrogen removal capacity of *Desmodesmus communis* and of a natural microalgae consortium in a bath culture system in view of urban wastewater treatment: Part I. **Water res.** v. 47, n. 2, p. 791-801, 2013.
- SCHENK P., Second Generation Biofuels: High-Efficiency Microalgae for Biodiesel Production. **Bioenergy Research**, v.1, p. 20–43, mar. 2008.
- SIVA KIRAN, R.R.; MADHU, G.M.; SATYANARAYANA, S.V.; BINDIYA, P. Bioaccumulation of Cadmium in Blue Green Algae *Spirulina (Arthrospira)*. **Journal of Bioremediation and Biodegradation**, v. 3, n. 3, p. 1-4, 2012.
- SYDNEY, E. B.; DA SILVA, T.E.; TOKARSKI, A.; NOVAK, A.C.; DE CARVALHO, J.C. WOICIECHOWSKI, A.L.; SOCCOL, C.R. Screening of microalgae with potential for biodiesel production and nutrient removal from treated domestic sewage. **Applied Energy**, v. 88, n.10, p.3291-3294, 2011.
- TEIXEIRA, C.; VIEIRA, A. A. H. Nutrient experiment using *Phaeodactylum tricornutum* as an assay organism. **Boletim do Instituto Oceanográfico**, v. 25, n. 1, p. 29-42, 1976.
- TRAINOR, F. R. **Biological aspects of *Scenedesmus (Chlorophyceae)*-phenotypic plasticity**. Nova Hedwigia, Beiheft, 1998.
- TREDICI, M. R. Mass Production of Microalgae: Photobioreactors. In: RICHMOND, A. **Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology**. Ames: Blackwell, 2004. p. 178-214.
- VANTHOOR-KOOPMANS, M.; WIJFEELS, R. H.; BARBOSA, M, J. Biorefinery of microalgae for food and fuel. **Bioresource Technology**, v.135, p.142-149, 2013.
- ZENG, X.; GUO, X.; SU, G.; DANQUAH, M.K.; ZHANG, S.; LU, Y.; LIN, L. Bioprocess considerations for microalgal-based wastewater treatment and biomass production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 42, p. 1385-1392, 2015.

ZHU, L. Biorefinery as a promising approach to promote microalgae industry: An innovative framework. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 41, p. 1376-1384, 2015.

CAPITULO 1

**EFEITOS DE DIFERENTES CONDIÇÕES DE TEMPERATURA E
LUMINOSIDADE SOBRE O CRESCIMENTO E BIOMASSA DA MICROALGA**

***Desmodesmus communis* (HEGEWALD) HEGEWALD**

RESUMO

O crescente interesse pelo cultivo de microalgas se deve não somente à sua importância ambiental e biológica, mas por constituir ferramenta importante para a produção de biomassa com diversas aplicações de interesse econômico, sobretudo nas indústrias farmacêutica, nutracêutica e, mais recentemente, de biocombustíveis. Estudos sobre os efeitos de fatores ambientais, como luz e temperatura, sobre os cultivos de microalgas, são de interesse para avaliar o seu desenvolvimento e propor melhores condições para o incremento de biomassa, subsidiando a redução dos custos de sua produção em larga escala. Neste estudo, foram avaliados o crescimento e a biomassa da espécie *Desmodesmus communis* sob diferentes condições de temperatura (25°C, 30°C e 35°C) e luminosidade (sem sombreamento, sombreamento 50% e sombreamento 70%). Os experimentos foram conduzidos em estufa incubadora, utilizando-se erlenmeyers de 500 mL, contendo 300 mL de meio de cultura ASM1, com pH neutro, em temperatura constante de 25°C ± 2, com luminosidade fornecida por lâmpadas fluorescentes de 40 W do tipo *daylight*, com intensidade de aproximadamente 100 μmol de fótons m⁻².s⁻¹ e fotoperíodo de 12/12h de luz/escuro. Foram analisadas as densidades celulares ao longo de 17 dias de cultivo, bem como os parâmetros cinéticos de crescimento (taxa de crescimento - μ, tempo de duplicação - G, e rendimento celular máximo - R_{máx}), e, ao final do experimento, determinaram-se as concentrações de massa seca e de clorofila *a*. No experimento com diferentes temperaturas, *D. communis* mostrou grande tolerância às variações testadas (25-35°C), não apresentando diferenças significativas entre os parâmetros de crescimento, biomassa seca e clorofila *a*. Somente no 8º e 11º dias de cultivo, à 35°C, a densidade celular foi significativamente superior às dos demais tratamentos. No experimento com diferentes condições de luminosidade, a microalga não apresentou diferença significativa entre o controle (sem sombreamento) e o cultivo com sombreamento 50% para os parâmetros cinéticos de crescimento, massa seca e clorofila. Entretanto, sob sombreamento 70%, a microalga apresentou expressiva limitação no crescimento, refletindo em valores significativamente menores de rendimento celular máximo, biomassa e clorofila *a*. Os resultados indicaram que *D. communis* é uma espécie interessante para ser explorada em cultivos em maior escala, uma vez que apresentou elevada tolerância às variações de luz e

temperatura impostas nos experimentos, sugerindo potencial fonte de matéria-prima para obtenção de compostos de interesse biotecnológico, incluindo biocombustíveis. Ressalta-se, entretanto, que mais estudos, visando a investigação de outros fatores ambientais que interferem no desenvolvimento e síntese de óleos por essas algas, são necessários para o aperfeiçoamento da produção dessa matéria-prima a partir de sistemas de cultivo.

Palavras-chave: Biomassa • crescimento • cultivo • luz • microalgas • temperatura•

ABSTRACT

The growing interest in microalgae cultivation is due not only to its environmental and biological importance, but also because it is an interesting tool for biomass production with several economic interest applications, mainly in the pharmaceutical, nutraceutical and, more recently, biofuel industries. Studies about the environmental factors effects, such as light and temperature, on microalgae crops, are of interest to evaluate their development and propose better conditions for the biomass increase, subsidizing the costs reduction of their production on a large scale. In this study, the growth and biomass of *Desmodesmus communis* under different temperature conditions (25°C, 30°C and 35°C) and luminosity (without shading, 50% shading and 70% shading) were evaluated. The experiments were carried out in an incubator using 500 mL erlenmeyers containing 300 mL of ASM1 culture medium, at neutral pH, at a constant temperature of 25°C ± 2, with luminosity provided by 40 W *daylight* fluorescent lamps, with an intensity of approximately 100 μmol of photons m⁻².s⁻¹ and 12/12h of light/dark photoperiod. The cell densities were analyzed over 17 days of cultivation, as well as growth parameters (growth rate - μ, doubling time - G, and maximum cellular yield - Rmax), and at the experiment end, dry mass and a chlorophyll concentrations were determined. In the experiment with different temperatures, *D. communis* showed great tolerance to the variations tested (25-35°C), showing no significant differences between growth parameters, dry biomass and a chlorophyll. Only at the 8th and 11th days of cultivation, at 35°C, the cell density was significantly higher than the other treatments. In the experiment with different light conditions, the microalga presented no significant difference between the control (without shading) and 50% shading, for the kinetic parameters of growth, dry mass and chlorophyll. However, under 70% shading, the microalga presented significant growth limitation, reflecting significantly lower values of maximum cell yield, biomass and a chlorophyll. The results indicated that *D. communis* is an interesting species to be explored in crops on a larger scale, since it presented high tolerance to the light and temperature variations imposed in the experiments, suggesting potential source of raw material to obtain compounds of biotechnological interest including biofuels. It should be noted, however, that more studies, aiming at the investigation of other environmental factors that interfere in the development and oils synthesis by these

algae, are necessary for the production improvement of this raw material from farming systems.

Keywords: Biomass • growth • cultivation • light • microalgae • temperature •

1. INTRODUÇÃO

O cultivo de microalgas permite manipular esses organismos isoladamente e submetê-los às condições ambientais que otimizem seu crescimento em altas densidades, sendo de grande importância para elucidar diversos aspectos da biologia das espécies, principalmente quanto à variabilidade morfológica, à plasticidade fenotípica, características bioquímicas e ciclo de vida.

O crescente interesse pelo cultivo de microalgas se deve não somente à sua importância ambiental e biológica, mas também por constituir importante ferramenta para a produção de biomassa com diversas aplicações de interesse econômico, como a obtenção de biocompostos para suplemento alimentar humano, produção de ração para animais, concentração de proteínas, ácidos graxos e carboidratos, e fonte de biocombustíveis (LOURENÇO, 2006; DERNER et al. 2006). Além disso, existem usos potenciais envolvendo, por exemplo, o tratamento de águas residuárias (FERREIRA et al., 2017).

Com o aumento da atenção dos governantes e sociedade para as questões ambientais, ampliou-se o interesse pelo uso de fontes energéticas alternativas. Mais recentemente, as microalgas têm ganhado destaque em virtude do seu potencial para a produção de biodiesel, principalmente devido a algumas vantagens em relação às plantas oleaginosas, como por exemplo: alta taxa fotossintética; maior rendimento de biomassa devido ao rápido crescimento (POUSA et al., 2007); natureza unicelular, o que propicia uma mesma composição química em toda biomassa; menor necessidade de espaço físico para o cultivo e possibilidade de cultivo em qualquer região (COHEN, 1986; RICHMOND, 2004). Além disso, algumas espécies armazenam grande quantidade de triacilglicerídeos, que podem ser convertidos em ésteres metílicos de ácidos graxos para a produção de biodiesel (MENEZES et al., 2013).

O êxito no cultivo de microalgas depende de uma série de fatores, sendo os principais: temperatura, intensidade luminosa e concentração de nutrientes (CHISTI, 2007; KUMAR et al., 2010). Dessa forma, estudos com a manipulação das condições de cultivo, como luz e temperatura, são importantes para avaliar o desenvolvimento das microalgas e propor melhores condições para aumentar sua biomassa, reduzindo assim os custos em sua produção para diversos usos na indústria, em especial como matéria prima para a produção de biocombustíveis.

Além do incremento de biomassa, as alterações nas condições de cultivo podem otimizar ou induzir a produção de maiores concentrações de biocompostos de interesse, uma vez que a composição química das microalgas é variável (MIAO; WU, 2004). Uma variedade de pesquisas tem investigado a manipulação de fatores como a limitação de nutrientes e utilização de meios alternativos de cultura (BAUMGARTNER et al., 2013), diferentes intensidades luminosas (CHEN et al., 2015), diferentes gradientes de salinidade (RUANGSOMBOON, 2012) e temperatura (XIN et al., 2011; CONVERTI et al., 2009) como forma de estresse para otimizar a produção nos cultivos.

Um dos fatores que mais afeta a taxa metabólica e o crescimento dos organismos é a temperatura, tendo influência direta na produção de lipídeos, proteínas e compostos fenólicos (XIN et al., 2011).

Há perigo em se fazer generalizações da temperatura, pois esta varia de espécie para espécie, ainda que pertencentes à mesma região. Lourenço (2006) sugere que, para microalgas de ambientes tropicais, a faixa de temperatura ótima para cultivo está entre 20 e 25°C; já Lopes (2007) estipula a faixa entre 25 e 35°C, para algas nos mesmos ambientes.

Temperaturas constantes são desejáveis, pois proporcionam mais estabilidade nos experimentos e nas operações de rotinas, permitindo maior reprodutibilidade e previsibilidade das respostas das espécies (OLIVEIRA, 2013). Para salas de cultivos, temperaturas constantes são alcançadas por meio de sistemas de refrigeração, porém, para grandes sistemas a dificuldade de se manter a temperatura constante é maior (LOURENÇO, 2006).

A iluminação é outro fator que requer atenção especial para o êxito dos cultivos de microalgas, uma vez que influencia diretamente no processo fotossintético e no desenvolvimento desses organismos (GUILLARD; MORTON, 2003), auxiliando na formação de compostos orgânicos, bem como na composição bioquímica e celular (ERIKSEN et al., 1996; JORGE et al., 1999). A condição ótima para o crescimento das microalgas dependerá da intensidade da luz, do comprimento de onda e duração aos quais as células estão expostas.

Algas da classe Chlorophyceae têm sido preferencialmente cultivadas por serem facilmente encontradas em ambientes aquáticos continentais. São as algas verdes e correspondem a um amplo grupo de organismos cosmopolitas, que apresenta grande variedade morfológica, incluindo formas unicelulares e coloniais,

flageladas ou imóveis. Os indivíduos possuem em sua composição, principalmente, clorofila *a* e *b*, e vários carotenoides (RICHMOND, 2004).

Nesta classe, destaca-se o gênero *Desmodesmus*, da ordem Sphaeropleales, família Scenedesmaceae, constituído por algas de água doce, de ambientes tipicamente eutróficos, encontradas facilmente nos ecossistemas aquáticos brasileiros. Tal gênero caracteriza-se por apresentar colônias cenobiais planas e formadas por 2, 4, 8 ou 16 células elipsoides ou ovóides dispostas lado a lado, com espinhos nas células extremas e/ou intermediárias do cenóbio (BICUDO; MENEZES, 2006). São indivíduos reconhecidamente resistentes a variações ambientais e competição com outras espécies de algas, sendo, dessa forma, potencialmente interessantes para o cultivo em larga escala, em que esses fatores tem maior interferência (PAN et al, 2011). Sua resistência ainda torna possível boa produtividade em termos de biomassa em meio de cultura produzido com efluentes (SAMORI et al, 2013).

Diante do exposto, o objetivo do presente estudo foi avaliar o crescimento da microalga *Desmodesmus communis* (Hegewald) Hegewald cultivada em diferentes temperaturas e intensidades luminosas, visando determinar as melhores condições de cultivo para o incremento de biomassa da espécie, o que pode subsidiar a obtenção de compostos para diferentes fins comerciais, com destaque para produção de biodiesel.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Isolamento da cepa de microalga e preparo do inóculo

A cepa de *Desmodesmus communis* (Fig. 1), selecionada para os experimentos de temperatura e luminosidade foi isolada a partir de coleta de fitoplâncton realizada no reservatório localizado no Sítio Dois Irmãos, município de Santa Teresa, na região centro-serrana do estado do Espírito Santo.

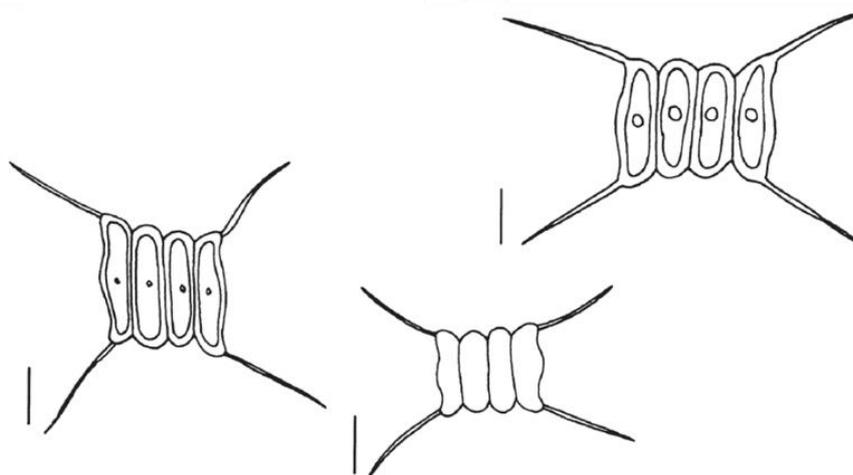


Figura 1: Representação da microalga *D. communis* formando cenóbios com quatro células. Escala = 10 μm . Fonte: adaptado de Godinho et al. (2010).

O isolamento da alga foi realizado seguindo a metodologia de Andersen e Kawashi (2005), por pipetagem e diluições sucessivas. Cada indivíduo foi inoculado em eppendorfs contendo 1mL de meio de cultura ASM1 (GORHAM et al., 1964), previamente esterilizado em autoclave à 121°C por 30 minutos.

O meio de cultura ASM1 foi preparado a partir de quatro soluções estoque, chamadas de A, B, C e D, adicionadas à água deionizada nas proporções de 20 mL, 2mL, 0,1 mL e 0,4 mL para A, B, C e D, respectivamente, conforme mostrado na Tabela 1.

A cepa utilizada como inóculo para o experimento foi transferida para erlenmeyers de 500 mL, contendo 300 mL do meio de cultura, fechados por tampões de gaze com algodão hidrófobo, e foi mantida em estufa incubadora, a temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, com luminosidade fornecida por lâmpadas fluorescentes de 40 W do tipo *daylight*, com intensidade de aproximadamente 100 μmol de fótons

$m^{-2}.s^{-1}$, fotoperíodo de 12/12 h de luz/escuro e pH ajustado inicialmente para $7,0 \pm 0,05$.

Tabela 1: Composição das soluções estoque do meio ASM1. As massas correspondem às quantidades utilizadas para o preparo de 200 mL da solução A e 100 mL das soluções B, C e D, as quais são utilizadas na proporção 20:2:0,1:0,4, respectivamente, no preparo do meio ASM1.

Solução A	Massa (g)	Solução B	Massa (g)	Solução C	Massa (g)	Solução D	Massa (g)
NaNO ₃ /NH ₄ Cl ₂	1,70	K ₂ HPO ₄	0,87	H ₃ BO ₃	2,4800	EDTA. Na ₂	1,86
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,41	Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	1,78	MnCl ₂ .4H ₂ O	1,3900		
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,49			FeCl ₃ .6H ₂ O	1,0800		
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,29			ZnCl ₂	0,3350		
				CoCl ₂ .6H ₂ O	0,0190		
				CuCl ₂ .2H ₂ O	0,0014		

Fonte: Adaptado de Gorham et al. (1964).

2.2. Delineamento experimental

Para os experimentos com diferentes temperaturas e intensidades luminosas, o delineamento adotado foi inteiramente casualizado e consistiu em um controle e dois tratamentos, realizados em triplicata, totalizando nove unidades experimentais para cada parâmetro testado (Fig. 2 e Fig. 3).

No experimento com diferentes condições de temperatura foi estabelecido o controle a 25°C, um tratamento a 30°C e outro a 35°C. Para a obtenção das diferentes temperaturas foram utilizadas três incubadoras programadas conforme o tratamento que cada uma recebeu.

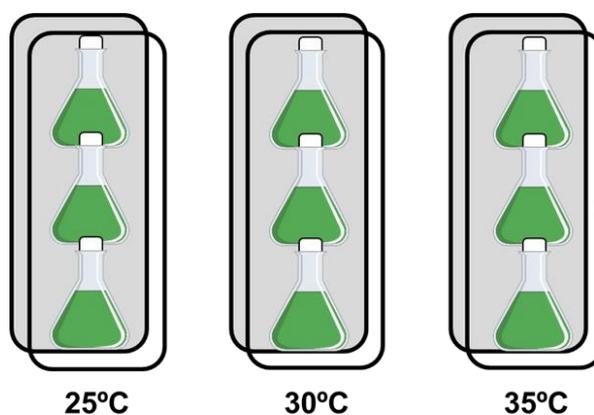


Figura 2: Desenho experimental para avaliação do cultivo de *D. communis* em diferentes condições de temperatura. Fonte: o autor (2018).

Para o experimento com diferentes níveis de luminosidade foi estabelecido o controle sem sombreamento ($\sim 100 \mu\text{mol}$ de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), um tratamento com 50% de sombreamento ($\sim 50 \mu\text{mol}$ de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) e outro com 70% de sombreamento ($\sim 30 \mu\text{mol}$ de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), mantidos em temperatura constante de $25^{\circ}\text{C} \pm 2$. Para atingir os níveis de sombreamento dos tratamentos, os erlenmeyers foram envolvidos por telas de sombreamento (sombrites) com 50% e 30% de passagem de luz, respectivamente.

Todos os experimentos foram conduzidos em estufas incubadoras Eletrolab, modelo EL202/3, utilizando-se erlenmeyers de 500 mL, contendo 300 mL de meio de cultura ASM1, com pH inicial neutro, e as cepas foram mantidas em fotoperíodo de 12/12h de luz/escuro.

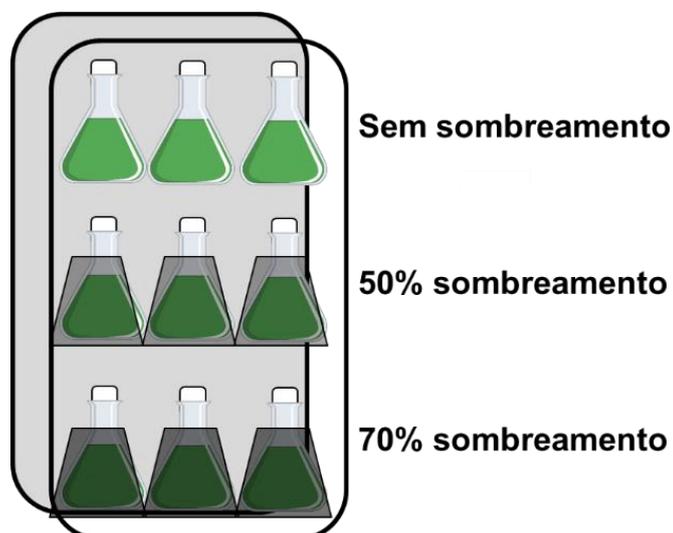


Figura 3: Desenho experimental para avaliação do cultivo de *D. communis* em diferentes condições de luminosidade. Fonte: o autor (2018).

Foi determinada uma sequência de rodízio dos erlenmeyers nas estufas incubadoras a fim de garantir a uniformidade das condições de cultivo. O experimento com diferentes temperaturas apresentou duração de 30 dias e o experimento com diferentes intensidades luminosas apresentou duração de 32 dias. A curva de crescimento foi determinada até o 17^o dia de cultivo para ambas as condições testadas e ao final dos experimentos foi determinada a concentração de clorofila *a* e a biomassa seca das amostras.

2.3. Avaliação do crescimento

Para o acompanhamento do crescimento e determinação da densidade celular das unidades experimentais foram retiradas alíquotas de 1 mL, a cada dois ou três dias, a partir do quinto dia de cultivo, utilizando-se micropipeta de volume ajustável e ponteiras esterilizadas. As coletas foram realizadas em câmara de fluxo laminar devidamente esterilizada e em cada alíquota foi acrescentada uma gota de solução de lugol acético diluído a 5% para fixação das amostras, de acordo com Utermöhl (1958).

A quantificação dos indivíduos (células.mL⁻¹) foi realizada por meio de contagens diretas em câmara de Neubauer em microscópio óptico Olympus CX41, no aumento de 200X.

A partir dos resultados de densidade celular foram elaboradas as curvas de crescimento para cada tratamento e calculados as taxas de crescimento, o tempo de duplicação e o rendimento máximo das cepas. Para os cálculos das taxas de crescimento foi considerado todo o período de acompanhamento das culturas, do 5º ao 17º dia, abrangendo a fase exponencial de crescimento dos tratamentos.

A taxa de crescimento (μ) e o tempo médio de duplicação (G) foram calculados segundo as Equações 1 e 2, descritas primariamente por Fogg e Thake (1987).

$$\mu = (\ln N_2 - \ln N_1) / (t_2 - t_1) \quad \text{Eq. (1)}$$

Sendo,

μ = velocidade específica do crescimento;

N_1 e N_2 = número de células nos tempos t_1 e t_2 .

A partir da velocidade específica do crescimento (μ) foi possível calcular o tempo médio de duplicação:

$$G = \ln(2) / \mu \quad \text{Eq. (2)}$$

O rendimento máximo (R) de cada tratamento foi determinado através da Equação 3:

$$R = R_1 - R_0 \quad \text{Eq. (3)}$$

Sendo,

R_1 = número máximo de células/mL;

R_0 = número inicial de células/mL.

2.4. Determinação da biomassa seca

Para a quantificação da biomassa celular dos tratamentos foram coletadas alíquotas das culturas para a determinação da massa seca ao final dos experimentos. Foram filtrados 50mL, com auxílio de bomba a vácuo, kitassato e funil de Buchner, em filtros de fibra de vidro GF-1 com diâmetro de 47 mm e poros de 0,7 µm, previamente secos em estufa a 60°C e pesados. Depois de filtradas as amostras, os filtros foram levados de volta para estufa e mantidos a mesma temperatura de 60°C até atingirem peso constante. A determinação da biomassa seca se deu através da subtração da massa final pela massa inicial do filtro, dividido pelo volume filtrado, conforme a Equação 4 (LOURENÇO, 2006).

$$MS = (Mf - Mi) / V \quad \text{Eq. (4)}$$

Sendo,

MS: Massa seca (g.L⁻¹);

Mf: Massa final (g);

Mi: Massa inicial (g) e;

V: Volume filtrado (L).

2.5. Quantificação de clorofila a

A concentração de clorofila a foi determinada por meio da espectrofotometria, segundo Lorenzen (1967), ao final do experimento, para cada unidade experimental. Uma alíquota de 20 mL foi retirada das culturas de cada tratamento e filtrada em filtro de fibra de vidro GF-1. A extração se deu por meio da maceração dos filtros de fibra de vidro, com o material retido, usando acetona 90% como solvente a frio. Em seguida, a solução foi acondicionada em tubos de centrifuga envoltos por papel alumínio e armazenados no refrigerador a 4°C por 24 horas. Passado o tempo, a solução foi centrifugada e o sobrenadante lido em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 665 nm e 750 nm. Todo o processo foi realizado ao abrigo de luz.

Para a determinação da concentração de clorofila a foi utilizada a Equação 5, proposta por Lorenzen (1967).

$$\text{Clorofila } a = F \times [(A_{665} - A_{750}) - (A_{665a} - A_{750a})] \times v / (V \times c)$$

Sendo,

Clorofila *a*, em $\mu\text{g.L}^{-1}$;

F = fator de correção (26,73).

v = volume da acetona usado para a extração (mL);

V = volume filtrado da cultura (L);

c = caminho óptico da cubeta espectrofotométrica (cm);

A_{665} = absorvância em 665 nm;

A_{750} = absorvância em 750 nm;

A_{665a} = absorvância em 665 nm após adicionar ácido clorídrico;

A_{750a} = absorvância em 750 nm após adicionar ácido clorídrico;

2.6. Tratamento estatístico

Os experimentos foram conduzidos seguindo delineamento inteiramente casualizado, com três repetições, e as análises estatísticas foram realizadas por meio do programa R (R CORE TEAM, 2017). Para verificar se as variáveis avaliadas atendiam aos pressupostos para a análise de variância, foi realizada uma avaliação gráfica dos resíduos do modelo utilizado (QQ-Plot) e, em seguida, aplicados os testes de Shapiro-Wilk (normalidade), D'Agostino (simetria), Anscombe (mesocurticidade), estes dois últimos para o caso do não atendimento do pressuposto de normalidade. A homogeneidade de variâncias foi avaliada por meio do teste de Levene. No caso do atendimento dos pressupostos, as variáveis estudadas foram submetidas à análise de variância, e, na situação de efeito significativo ($p < 0,05$), as médias foram comparadas por meio do teste t com correção de Bonferroni. Para medidas com avaliação do efeito no tempo foi realizado o teste de esfericidade de Mauchly, sendo realizadas as correções dos graus de liberdade e dos quadrados médios dos resíduos gerados na análise de variância para condições de esfericidade não atendidas. Em todas as análises estatísticas, considerou-se um valor de 5% para o erro α .

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas Figuras 4 e 5 estão representadas as curvas de crescimento das culturas de *Desmodesmus communis* submetidas a diferentes condições de temperatura e em diferentes níveis de sombreamento, respectivamente.

A partir das curvas de crescimento do experimento com diferentes condições de temperatura (Fig. 4) foi possível observar que as culturas de todos os tratamentos, desde o quinto dia do experimento (quando a primeira coleta foi realizada), estiveram na fase exponencial de crescimento, não apresentando as demais fases.

A maior densidade celular média foi registrada na temperatura de 35°C ($450,86 \pm 20,92 \times 10^4$ cél.mL⁻¹), no 17º dia de crescimento, entretanto, em termos estatísticos, não diferiu das densidades celulares registradas nas temperaturas de 30°C ($405,09 \pm 29,97 \times 10^4$ cél.mL⁻¹) e 25°C ($366,95 \pm 22,27 \times 10^4$ cél.mL⁻¹), para o mesmo dia ($p > 0,05$), conforme mostrado na Figura 4. Entretanto, no 8º e no 11º dia de cultivo, o tratamento com temperatura de 35°C apresentou valores de densidade celular significativamente maiores em relação às densidades registradas para os demais tratamentos ($p < 0,05$).

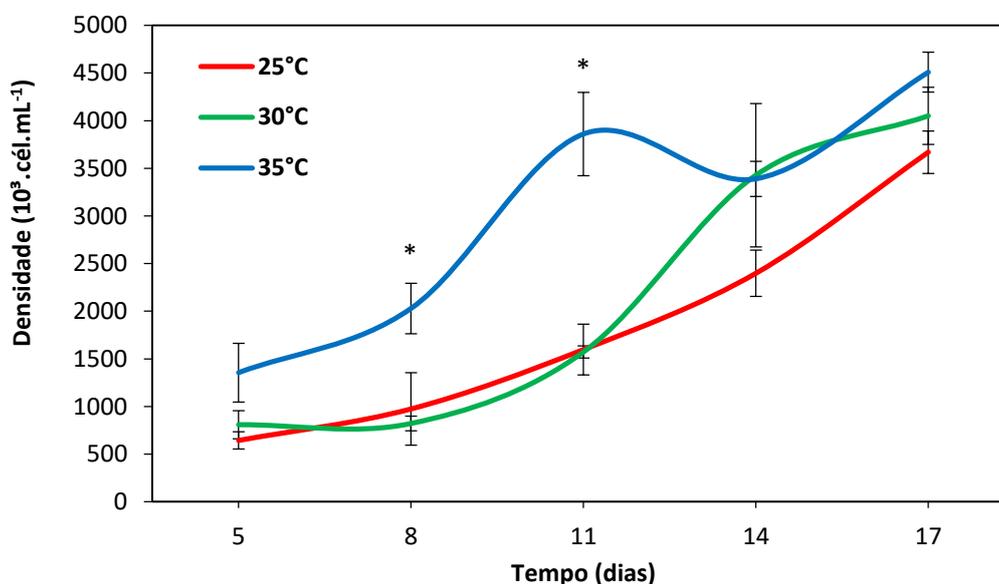


Figura 4: Curvas de crescimento das culturas de *D. communis* submetidas a diferentes condições de temperatura. Valores expressos em média \pm erro padrão (barras verticais). * = Valores que apresentam diferenças significativas entre tratamentos pelo teste t com correção de Bonferroni ($p < 0,05$).

De acordo com Chisti (2007), em geral, a temperatura de cultivo de microalgas deve manter-se entre 20 e 30°C, sendo que temperaturas fora desse intervalo podem matar ou danificar as células. Apesar desta prerrogativa, na presente pesquisa observou-se que as taxas de crescimento (μ), os tempos de duplicação (G) e os rendimentos máximos registrados nas três temperaturas testadas não apresentaram diferenças significativas entre si ($p > 0,05$), conforme mostrado na Tabela 2. Tais resultados indicam que *D. communis* apresenta grande amplitude de tolerância com relação a esta variável, uma vez que, mesmo na maior temperatura testada, não houve redução do crescimento celular.

Segundo Juneja et al. (2013), é esperado que, abaixo da temperatura ótima, a taxa de crescimento aumente com a elevação da temperatura. Entretanto, no estudo de Militão (2016), em que foi avaliado o efeito da temperatura no cultivo unialgal e misto das microalgas *Scenedesmus obliquus* e *Pseudopediastrum boryanum*, o efeito da temperatura nos cultivos não foi uniforme, indicando haver temperaturas ótimas de crescimento diferentes para as duas espécies. Além disso, no mesmo trabalho, as melhores taxas de crescimento e tempo de duplicação nos cultivos mistos foram obtidas em 20°C. Esses resultados reforçam que as divergências nos padrões de variação das microalgas à temperatura podem ser altamente específicas e que a combinação desta variável a outros fatores ambientais influencia nas respostas de crescimento das microalgas.

Tabela 2: Taxa de crescimento - μ , tempo de duplicação - G e rendimento máximo - R_{máx} dos tratamentos nos diferentes experimentos. Valores expressos como média \pm erro padrão. Letras maiúsculas diferentes representam diferenças estatísticas entre os tratamentos para cada condição testada (diferentes temperaturas e luminosidades).

Tratamento	μ (d⁻¹)	G (dias)	R_{máx} (10³.cél.mL⁻¹)
25°C	0,15 \pm 0,02 ^A	4,88 \pm 0,61 ^A	3.025,77 \pm 313,22 ^A
30°C	0,14 \pm 0,01 ^A	5,14 \pm 0,38 ^A	3.241,90 \pm 188,14 ^A
35°C	0,11 \pm 0,03 ^A	7,26 \pm 1,41 ^A	3.152,90 \pm 487,60 ^A
Sem sombreamento	0,20 \pm 0,02 ^A	3,54 \pm 0,32 ^A	2.749,49 \pm 485,28 ^A
Sombreamento 50%	0,21 \pm 0,01 ^A	3,25 \pm 0,09 ^A	3.457,15 \pm 281,40 ^A
Sombreamento 70%	0,16 \pm 0,03 ^A	4,55 \pm 0,84 ^A	751,54 \pm 272,92 ^B

Valores expressos em média \pm erro padrão. Valores seguidos pela mesma letra, na mesma coluna, para cada experimento, não diferem significativamente pelo teste t com correção de Bonferroni ($p < 0.05$).

No trabalho de Costa et al. (2006), em que foi avaliado o perfil de ácidos graxos das microalgas *Chlorella vulgaris* e *Chlorella minutissima* cultivadas em diferentes condições físico-químicas, dentre elas diferentes temperaturas, os autores afirmaram que a condição ótima para o cultivo desses organismos está entre 35 e 37°C, sendo observado que houve aumento significativo na produtividade de *Chlorella vulgaris* na temperatura de 35°C. Sorokin e Krauss (1958), ao realizarem estudo testando os efeitos da intensidade da luz sobre as taxas de crescimento de diferentes espécies de algas verdes, observaram que ao aumentar a temperatura de cultivo da microalga *Chlorella pyrenoidosa* de 25°C para 39°C, a espécie apresentou melhor desenvolvimento. Os resultados destes trabalhos, realizados com diferentes espécies de *Chlorella*, são diferentes do observado na presente pesquisa, uma vez que não houve diferença significativa no rendimento máximo das culturas nas três condições de temperatura avaliadas no experimento (Tab. 2). Entretanto, foi notório o efeito da temperatura nas etapas mais iniciais da fase exponencial de crescimento, quando o cultivo à 35°C apresentou maiores densidades. É possível que em culturas mais jovens pequenas variações de temperatura atuem mais fortemente estimulando o crescimento celular devido ao aumento das taxas metabólicas.

No experimento com diferentes intensidades luminosas (Fig. 5), as curvas mostraram o predomínio da fase exponencial de crescimento, do 5º ao 12º dia de cultivo, após a qual as culturas de todos os tratamentos se mantiveram na fase estacionária de crescimento.

O controle e o tratamento com 50% de sombreamento apresentaram valores de densidade celular aproximados ao longo de todo período de crescimento estudado, sendo significativamente maiores ($p < 0,05$) que os valores registrados para o tratamento com 70% de sombreamento (Fig. 5). Somente no 7º dia de cultivo todos os meios apresentaram diferenças significativas entre si ($p < 0,05$), com maior valor de densidade registrado para o cultivo com 50% de sombreamento ($95,60 \pm 5,34 \times 10^4$ cél.mL⁻¹), em relação aos demais.

Ao final do experimento, a maior densidade celular média foi registrada para o tratamento com 50% de sombreamento ($374,31 \pm 28,31 \times 10^4$ cél.mL⁻¹), no 17º dia de cultivo, entretanto, a mesma não apresentou diferença significativa com a densidade registrada na condição sem sombreamento ($302,28 \pm 48,99 \times 10^4$ cél.mL⁻¹), para o mesmo dia ($p < 0,05$).

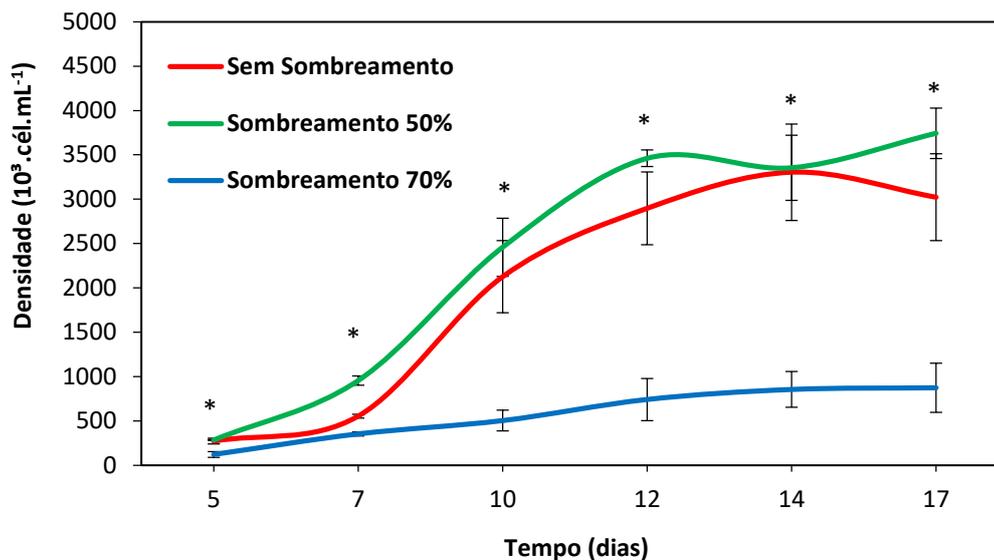


Figura 5: Curvas de crescimento das culturas de *D. communis* submetidas a diferentes condições de luminosidade. Valores expressos em média \pm erro padrão (barras verticais). * = Valores que apresentam diferenças significativas entre tratamentos pelo teste t com correção de Bonferroni ($p < 0,05$).

A partir dos parâmetros cinéticos de crescimento mostrados na Tabela 2, foi possível observar que não houve diferença estatística entre nenhum dos três tratamentos com diferentes níveis de sombreamento ($p > 0,05$) em relação à taxa de crescimento (μ) e tempo de duplicação (G). Por outro lado, o rendimento máximo ($R_{\text{máx}}$) do tratamento com maior nível de sombreamento (70%) apresentou valor significativamente inferior aos demais cultivos avaliados ($p < 0,05$), indicando que a redução da luminosidade limitou o crescimento celular. Estes resultados podem ser compreendidos pelo fato da taxa de crescimento ter sido calculada numa fase exponencial mais tardia dos cultivos, levando-se em consideração a densidade celular e o tempo decorrido entre o final e o início desse intervalo (LOURENÇO, 2006). Dessa forma, o tempo de duração da fase exponencial tem influência direta na taxa de crescimento e, conseqüentemente, no tempo de duplicação das culturas. Cabe ressaltar que a densidade celular no 5º dia de cultivo foi significativamente menor ($p < 0,05$) no meio com 70% de sombreamento, o que influenciou para que esta condição apresentasse valores semelhantes de taxa de crescimento e tempo de duplicação, em relação aos demais tratamentos para o mesmo período de crescimento considerado. Nesse sentido, para efeito de comparação das condições testadas, o rendimento celular máximo e as densidades celulares foram as

variáveis que melhor representaram às respostas dos cultivos expostos às diferentes intensidades luminosas.

Alguns estudos demonstraram que o aumento da luminosidade pode acelerar o crescimento das microalgas, como, por exemplo, o de Jorge et al. (1999), os quais verificaram que o crescimento da cianobactéria *Nostoc* sp. foi maior na condição de intensidade luminosa mais elevada ao avaliar esta espécie em três diferentes luminosidades (500 lux, 1000 lux e 2000 lux). Na presente pesquisa, as culturas de *D. communis* sob ausência de sombreamento (condição de maior disponibilidade de luz) apresentaram desenvolvimento semelhante à condição de luminosidade intermediária (tratamento com 50% de sombreamento). Entretanto, sob condições mais sombreadas (70%), o crescimento das cepas foi muito limitado, possivelmente, devido à redução do processo fotossintético e, conseqüentemente, das taxas reprodutivas ao longo do cultivo.

Quanto à avaliação da biomassa microalgal, o acúmulo de massa seca ao final do experimento com diferentes condições de temperatura não apresentou diferenças significativas entre os três tratamentos testados ($p > 0,05$), conforme mostrado na Figura 6. Este resultado corrobora com os dados de crescimento e dos parâmetros cinéticos estudados, reforçando que *D. communis* é uma espécie bastante tolerante às variações de temperatura no ambiente. Em regiões de clima tropical, por exemplo, em que as variações diárias de temperatura podem ser muito discrepantes, o cultivo de espécies de microalgas que apresentem maior plasticidade térmica se torna interessante para a produção de biomassa, especialmente em sistemas de cultivo abertos, nos quais as transferências térmicas com o meio podem ser mais acentuadas.

A concentração de clorofila *a* ao final do experimento com diferentes condições de temperatura apresentou as mesmas respostas observadas para a densidade celular e a massa seca, não exibindo diferenças significativas entre os três tratamentos testados (Fig. 7). Tais resultados reforçam que, dentro da faixa de temperatura avaliada (25^o-35^oC), *D. communis* não apresentou alterações metabólicas que levassem a perdas na produção de matéria orgânica e concentração de clorofila, o que contribui para a sua utilização em cultivos de maior escala para fins de produção de biomassa com aplicação biotecnológica.

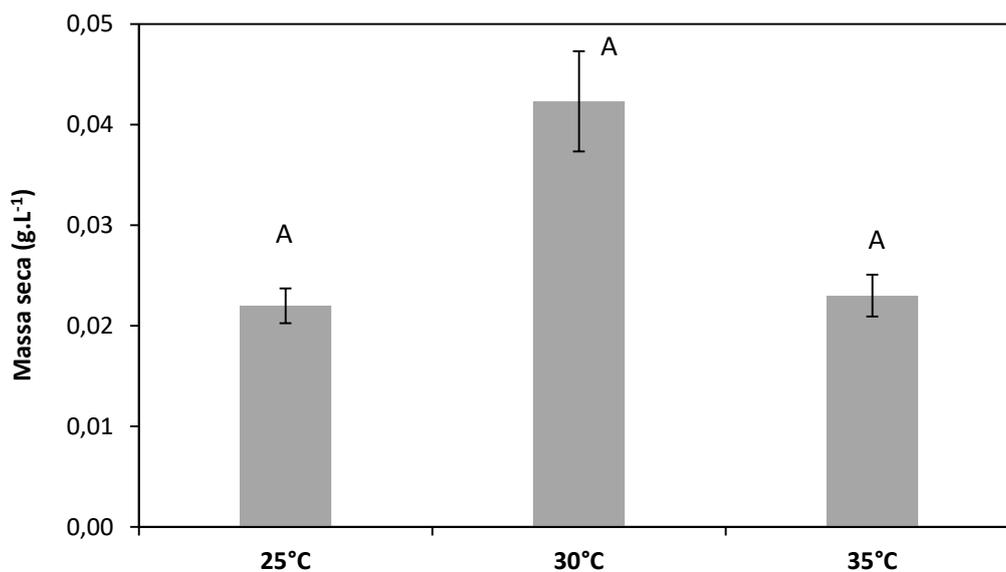


Figura 6: Massa seca acumulada das culturas de *D. communis* submetidas a diferentes condições de temperatura. Valores expressos em média \pm erro padrão (barras verticais). Colunas com a mesma letra não diferem significativamente pelo teste t com correção de Bonferroni ($p < 0,05$).

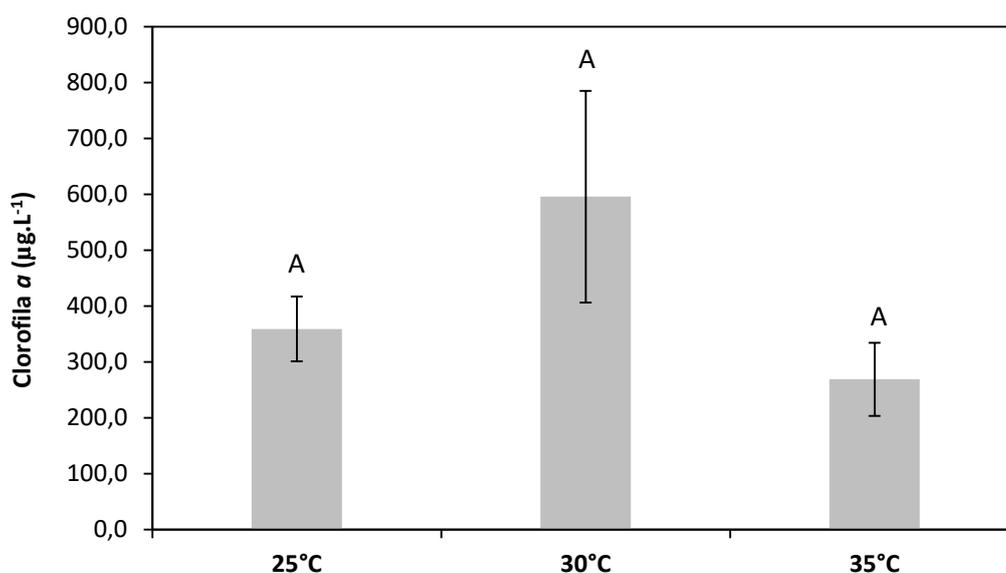


Figura 7: Concentração de clorofila *a* das culturas de *D. communis* submetidas a diferentes condições de temperatura. Valores expressos em média \pm erro padrão (barras verticais). Colunas com a mesma letra não diferem significativamente pelo teste t com correção de Bonferroni ($p < 0,05$).

Resultados diferentes são encontrados na literatura para outras espécies de microalgas da família Scenedesmaceae, como por exemplo no trabalho de Chokshi et al. (2015), que ao avaliarem a concentração dos pigmentos fotossintéticos em

Acutodesmus dimorphus, em cultivo realizado em meio BG11 durante 15 dias, obtiveram menores valores de clorofila *a* na maior temperatura testada (38°C). A partir do resultado do referido autor, comparado ao presente estudo, é perceptível que existem diferenças na tolerância ecológica a nível específico, para variáveis como a temperatura, entre microalgas pertencentes a um mesmo grupo taxonômico.

A temperatura pode influenciar de forma significativa o cultivo, sendo que cada espécie exibe um perfil de crescimento dentro de determinada faixa de temperatura. Converti et al. (2009) realizaram o cultivo das espécies *Nannochloropsis oculata* e *Chlorella vulgaris* sob diferentes temperaturas para observar a influência desta variável sobre a geração de biomassa e o conteúdo de lipídeos totais destas microalgas. Como resultado, os autores verificaram que *Chlorella vulgaris* demonstrou melhor produtividade, tanto de biomassa quanto lipídica, quando cultivada nas temperaturas entre 25 e 30°C. Na condição em que o cultivo foi realizado em temperaturas mais elevadas (acima de 35°C) houve a diminuição do crescimento, ou até mesmo, a morte celular. Para *Nannochloropsis oculata*, os autores obtiveram bom resultado de produtividade lipídica à temperatura de 20 °C, entretanto, em temperaturas menores (15°C) foram obtidos valores reduzidos de produtividade e em maiores (25°C) a produtividade permaneceu constante.

No experimento com diferentes intensidades luminosas, com relação à massa seca, foram registrados maiores valores no controle (maior disponibilidade de luz) e no tratamento com 50% de sombreamento, os quais não apresentaram diferença significativa entre si, conforme indicado na Figura 8. Já o tratamento com 70% de sombreamento apresentou massa seca bastante inferior às das demais condições testadas, evidenciando forte limitação na produção de biomassa algal.

Na Figura 9 é possível observar que a maior média da concentração de clorofila *a* foi registrada no tratamento com 50% de sombreamento ($735,0 \pm 86,7 \mu\text{g.L}^{-1}$), a qual não diferiu significativamente ($p > 0,05$) da média do cultivo controle (condição mais iluminada), entretanto, ambas foram estatisticamente maiores ($p < 0,05$) que o resultado de clorofila reportado para o tratamento com a maior condição de sombreamento (70%), que apresentou média de $142,5 \pm 30,9 \mu\text{g.L}^{-1}$. Estes resultados estão de acordo com a redução de crescimento e biomassa que as

culturas de *D. communis* apresentaram sob maior sombreamento, indicando que a redução na produção de clorofila está diretamente ligada à limitação de luz.

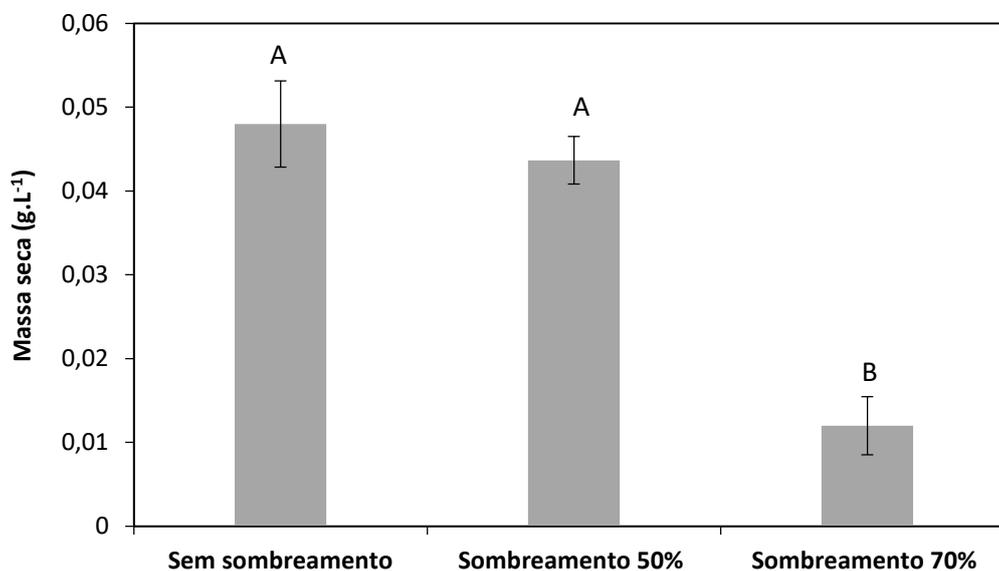


Figura 8: Massa seca acumulada das culturas de *D. communis* submetidas a diferentes condições de luminosidade. Valores expressos em média \pm erro padrão (barras verticais). Colunas com a mesma letra não diferem significativamente pelo teste t com correção de Bonferroni ($p < 0,05$).

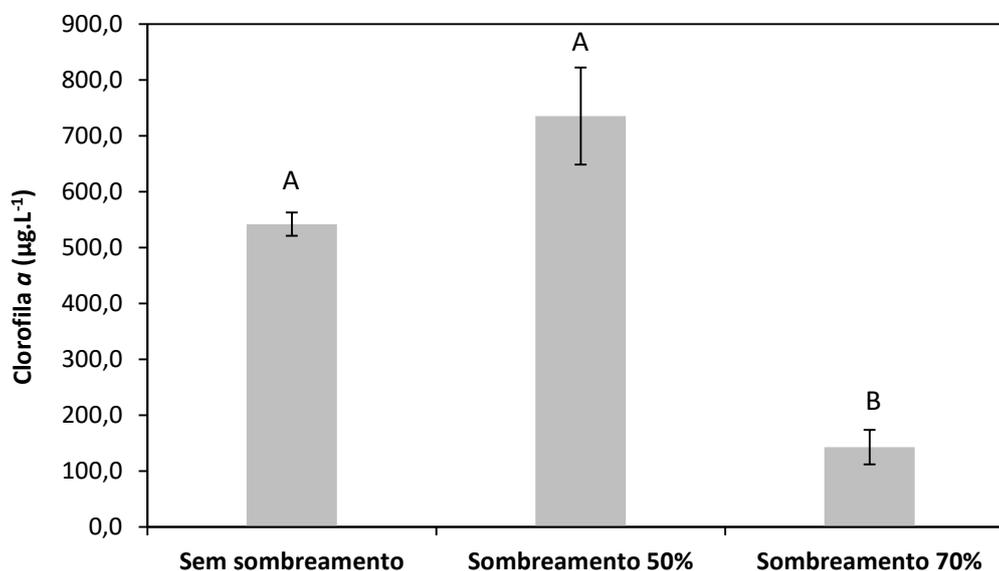


Figura 9: Concentração de clorofila *a* das culturas de *D. communis* submetidas a diferentes condições de luminosidade. Valores expressos em média \pm erro padrão (barras verticais). Colunas com a mesma letra não diferem significativamente pelo teste t com correção de Bonferroni ($p < 0,05$).

No estudo de Sorokin e Krauss (1958), os mesmos demonstraram ocorrer fotoinibição na espécie *Scenedesmus obliquus*, que apresentou forte redução na taxa de crescimento quando a intensidade luminosa passou de 500 footcandles (ponto de saturação da luz para essa alga) para 4500 footcandles. De forma semelhante, Bouterfas et al. (2006), ao trabalharem com as microalgas verdes *Selenastrum minutum*, *Coelastrum microporum* e a desmídia *Cosmarium subprotumidum*, em intensidades luminosas entre 30 e 456 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, e em duas temperaturas diferentes, 25°C e 35°C, observaram fotoinibição do crescimento dessas algas após expô-las a intensidades luminosas acima de seus valores ótimos. O resultado disso foi o decréscimo dos valores da taxa de crescimento, mais ou menos rapidamente, dependendo da temperatura.

Segundo Richmond (2004), a intensidade luminosa é um dos principais fatores limitantes no crescimento das microalgas, sendo que existe uma faixa ótima de iluminação para maior geração de biomassa. Em seu estudo, o autor registrou que o aumento da intensidade luminosa em *Chlorella vulgaris* (de 25 μmol fótons $\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ para 60 μmol fótons $\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), estimulou maior geração de biomassa. No entanto, a duplicação dessa última intensidade luminosa (120 μmol fótons $\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) causou diminuição da produção de biomassa (LV et al., 2010). De acordo com o autor, este fato pode ter sido atribuído a fotoinibição e ao processo de auto sombreamento gerado no meio por causa da elevada densidade celular.

No presente estudo, as algas cultivadas sob sombreamento de 70% apresentaram significativa redução no crescimento, produção de biomassa seca e clorofila *a*, quando comparadas às demais condições, indicando que a limitação por luz comprometeu expressivamente o metabolismo celular de *D. communis*, especialmente para a realização do processo fotossintético. Por outro lado, numa amplitude de até 50% abaixo da quantidade de luz que foi utilizada como controle (100 μmol fótons $\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), a microalga continuou apresentando crescimento e produção de biomassa satisfatórios, indicando tolerância dentro desta faixa de sombreamento.

De maneira geral, os cultivos de *D. communis* sob diferentes condições de temperatura e luminosidade mostraram que esta espécie apresentou grande resistência às variações físicas nas condições controladas de crescimento avaliadas nesta pesquisa. Godinho et al. (2010), descreveram *D. communis* como espécie cosmopolita, ao realizarem um levantamento florístico dos representantes

da família Scenedesmaceae (Chlorophyceae) do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, Brasil, evidenciando que esta espécie apresenta-se muito bem adaptada a condições diversas na natureza. No presente estudo, foi constatado que em uma amplitude de variação de 10°C, a microalga não apresentou diferenças significativas no rendimento celular máximo, biomassa e concentração de clorofila, sendo, dessa forma, potencialmente interessante para o cultivo em larga escala, com vistas à produção de biomassa para fins biotecnológicos. De forma semelhante, *D. communis* não apresentou comprometimento em seu crescimento e síntese de biomassa com a redução de até 50% da intensidade luminosa sobre as culturas. Entretanto, sob sombreamento de 70%, o cultivo apresentou forte limitação em seu crescimento e conseqüente redução na produção de matéria orgânica.

Apesar do potencial que *D. communis* apresentou, em termos de crescimento e acúmulo de biomassa, nos ensaios conduzidos em laboratório, é importante salientar a necessidade de se realizarem estudos para caracterizar a composição bioquímica da biomassa produzida por esta microalga a fim de avaliar suas possíveis aplicações biotecnológicas. Uma vez que na literatura ainda existem pouquíssimas informações acerca da composição química desta espécie, é fundamental que se determinem, nos próximos estudos, os teores e produtividade de proteínas, lipídeos, carboidratos, ácidos graxos, vitaminas e minerais. A partir destas informações, poderão ser realizadas investigações no sentido de viabilizar a expansão do cultivo de *D. communis* para escalas maiores de produção, visando sua utilização na alimentação humana, ração animal, bem como potencial matéria prima para produção de biocombustíveis, como o biodiesel.

4. CONCLUSÕES

A partir dos níveis de temperatura e luminosidade avaliados neste estudo, pode-se concluir que o cultivo de *D. communis* apresentou excelentes resultados, em termos de crescimento e biomassa, uma vez que as respostas da microalga indicaram grande tolerância às variações físicas testadas. Dentre as condições avaliadas, somente sob elevada restrição luminosa a microalga teve comprometimento em seu desenvolvimento, reduzindo a quantidade de matéria orgânica produzida. Considerando que em cultivos de larga escala, o controle das variáveis físicas e químicas, que interferem no crescimento das microalgas, é um dos fatores que mais aumentam os custos de produção, a utilização de espécies como a *D. communis* pode tornar o processo mais viável economicamente, uma vez que a mesma exibiu ampla resistência térmica e luminosa.

Apesar do potencial que a microalga apresentou nos ensaios conduzidos em laboratório, é importante ressaltar a necessidade de se realizar estudos para caracterizar a composição bioquímica da biomassa produzida por esta microalga, a fim de se avaliar suas possíveis aplicações biotecnológicas. Além disso, trabalhos que visem a investigação de outros fatores ambientais que interferem no desenvolvimento e na síntese de óleos e outros biocompostos por essas algas, são necessários para o aperfeiçoamento da produção dessa matéria-prima a partir de sistemas de cultivo. Martins e Fernandes (2016), em seu estudo sobre os efeitos da depleção de nitrogênio na biomassa e produção lipídica de três espécies de microalgas verdes, evidenciaram a importância do conhecimento das características fisiológicas da espécie a ser cultivada e de estudos preliminares das condições ótimas para a cepa isolada, visando a produção de biodiesel em escala comercial.

De maneira geral, os experimentos realizados contribuíram para o conhecimento de alguns aspectos ecofisiológicos da microalga *D. communis*, acrescentando informações importantes sobre a influência de diferentes condições de luz e temperatura no crescimento e produção de biomassa por este microrganismo, o que pode subsidiar a utilização dessa espécie como fonte de compostos de interesse econômico, incluindo a produção de biocombustíveis.

5. REFERÊNCIAS

- ANDERSEN, R. A.; KAWASHI, M., Traditional microalgae isolation techniques. In: **Algal Culturing Techniques** (Andersen, R. A. ad.). Elsevier/Academic Press, San Diego, p. 83-100, 2005.
- BAUMGARTNER, T. R. S.; BURAK, J.A.M.; KOGIKOSKI, M.E.; SEBASTIEN, N.Y.; ARROYO, P.A. Avaliação da produtividade da microalga *Scenedesmus acuminatus* (Lagerheim) Chodat em diferentes meios de cultivo. **Brazilian Journal of Biosciences**, v. 11, n. 2, p. 250–255, 2013.
- BICUDO, C. E. M.; MENEZES, M. **Gêneros de algas de águas continentais do Brasil**: chave para identificação e descrições. São Carlos: Rima. 502p. 2006.
- BOUTERFAS, R.; BELKOURA, M.; DAUTA, A. The effects of irradiance and photoperiod on the growth rate of three freshwater green algae isolated from a eutrophic lake. **Limnetica**, Espanha, v. 25, n. 3, p. 647-656, 2006.
- CHEN, T.; LIU, J.; GUO, B.; MA, X.; SUN, P.; LIU, B.; CHEN, F. Light attenuates lipid accumulation while enhancing cell proliferation and starch synthesis in the glucose-fed oleaginous microalga *Chlorella zofingiensis*. **Scientific Reports**, v. 5, n. 14936, p. 1-10, 2015.
- CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, v. 25, p. 294-306, 2007.
- CHOKSHI, K.; PANCHA, I.; TRIVEDI, K.; GEORGE, B.; MAURYA, R.; GHOSH, A.; MISHA, S. Biofuel potential of the newly isolated microalgae *Acutodesmus dimorphus* under temperature induced oxidative stress conditions. **Bioresource Technology**. v. 180, p.162-171, 2015.
- COHEN, Z. Products from microalgae. In: **Handbook of microalgal mass culture**, RICHMOND, A. (Ed). CRC. Boca Raton: CRC, p.421-454, 1986.
- CONVERTI, A.; CASAZZA, A. A.; ORTIZ, E. Y.; PEREGO, P. e BORGHI, M. D. Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for Biodiesel production. **Chemical Engineering and Processing**, v. 48, p.1146–1151, 2009.
- COSTA, J. A. V.; RADMANN, E. M.; CERQUEIRA, V. S.; SANTOS, G. C.; CALHEIRO, M. N. Perfil de ácidos graxos das microalgas *Chlorella vulgaris* e *Chlorella minutissima* cultivadas em diferentes condições. **Alim. Nutr.**, Araraquara, v.17, n.4, p.429-436, 2006.

- DERNER, R.B.; OHSE, S.; VILLELA, M.; CARVALHO, S.M.; FETT, R. Microalgas, produtos e aplicações. **Ciencia Rural**, v. 36, n. 6, p. 1959-1967, 2006.
- ERIKSEN, N.T.; GEEST, T.; IVERSEN, J. J. L., Phototrophic growth in the Lumostat: a photo-bioreactor with on-line optimization of light intensity. **ApplPhycol**, v. 8, p. 345-352, 1996.
- FERREIRA, A.; RIBEIRO, B.; MARQUES, A.P.S.S.; FERREIRA, A.F.; DIAS, A.P.; PINHEIRO, H.M.; REIS, A.; GOUVEIA, L. *Scenedesmus obliquus* mediated brewery wastewater remediation and CO₂ biofixation for green energy purposes. **Journal of Cleaner Production**. v.165, p.1316-1327, 2017.
- FOGG, G. E.; THAKE, B., **Algae Cultures and Phytoplankton Ecology**, ed. 3. University of Wisconsin Press. London, p. 269, 1987.
- GODINHO, L.R., GONZÁLEZ, A.A.C.; BICUDO, C.E.M. Criptógamos do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, SP. Algas, 30: Chlorophyceae (família Scenedesmaceae). **Hoehnea**, v. 37, n. 3, p. 513-553, 2010.
- GORHAM, P.R.; MCLACHLAN, J.; HAMMER, U.T.; KIM, W.K. Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena flos-aquae* (Lyngb.) de Breb. **Verh. Internat. Verein. Limnol.** , v. 15, p. 796–804, 1964.
- GUILLARD, R.R.L.; MORTON, S.L. **Culture Methods**. In: Manual on Harmful Marine Microalgae. UNESCO, Paris, p. 77-97, 2003.
- JORGE, R.R; MORIOKA, L.R.; RIBEIRO, M. L. L.; PINOTTI, M. H. P. Cultivo de *Nostoc* sp em diferentes luminosidades para produção de biomassa e ficobiliproteínas. **Semina: Ci Biol. Saúde**, Londrina, v. 20/21, n. 2, p. 67-71, 1999.
- JUNEJA, A.; CEBALLOS, R.; MURTHY, G. Effects of Environmental Factors and Nutrient Availability on the Biochemical Composition of Algae for Biofuels Production: A Review. **Energies**, v. 6, n. 9, p.4607-4638, 2013.
- KUMAR, M. S.; MIAO, Z. H.; WYATT, S. K. Influence of nutrient loads, feeding frequency and inoculum source on growth of *Chlorella vulgaris* in digested piggery effluent culture medium. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 15, p. 6012-6018, 2010.
- LOPES, E. J. Sequestro de dióxido de carbono em fotobiorreatores. **Tese de Doutorado em Engenharia Química** – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007. 136p.

- LORENZEN, C. J. Determination of chlorophyll and pheopigments: spectrophotometric equations. **Limnology and Oceanography**, v. 12, p. 343-346, 1967.
- LOURENÇO, S. O. **Cultivo de Microalgas Marinhas**: Princípios e aplicações. ed. 1, São Carlos: RiMa, 2006.
- LV, J.M, CHENG, L.H., XU, X.H., ZHANG, L., CHEN, H.L. Enhanced lipid production of *Chlorella vulgaris* by adjustment of cultivation conditions. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 6797–6804, 2010.
- MARTINS, G. B.; FERNANDES, V. O. Efeitos da depleção de nitrogênio sobre a biomassa e produção lipídica de três espécies de microalgas. **Iheringia, Série Botânica**, Porto Alegre, v. 71, n. 2, p. 117-123, 2016.
- MENEZES, R.S.; LELES, M.I.G.; SOARES, A.T.; FRANCO, P.I.B.M.F.; FILHO, N.R.A.; SANT'ANNA, C.L.; VIEIRA, A.A.H. Avaliação da potencialidade de microalgas dulcícolas como fonte de matéria-prima graxa para a produção de biodiesel. **Química Nova**, v. 36, n. 1, p. 10-15, 2013.
- MIAO, X.; WU, Q. High yield bio-oil production from fast pyrolysis by metabolic controlling of *Chlorella protothecoides*. **Journal of Biotechnology**, v. 110, p.85-93, 2004.
- MILITÃO, F. P. Efeito da temperatura no cultivo unialgal e misto de microalgas (crescimento e composição bioquímica) como subsídio para a aplicação biotecnológica. **Dissertação de Mestrado em Biologia Vegetal** - Universidade Federal do Espírito Santo, 2016. 71p.
- OLIVEIRA, A.C. Produção de biomassa de microalgas *Scenedesmus* sp. em efluente de bovinocultura biodigerido. **Dissertação de Mestrado em Engenharia e Ciência dos Materiais** - Universidade Federal do Paraná, 2013. 82p.
- PAN, Y-Y.; WANG, S-T.; CHUANG, L-T.; CHANG, Y-W.; CHEN, C-N.N. Isolation of thermo-tolerant and high lipid content green microalgae: Oil accumulation is predominantly controlled by photosystem efficiency during stress treatments in *Desmodesmus*. **Bioresource technology**, v. 102, p. 10510-10517. 2011.
- POUSA, P. A. G.; SANTOS, A. L. F.; SUAREZ, P. A. Z. History and policy of biodiesel in Brazil. **Energy Policy**, v. 35, n. 11, p. 5393-5398, 2007.
- R CORE TEAM. R. **A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical computing, Viena, Áustria. URL: [https:// www.R-project.org/](https://www.R-project.org/). 2017.

RICHMOND, A.; **Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology**. Oxford: Blackwell Science, 2004.

RUANGSOMBOON, S. 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**, v. 109, p. 261-265, 2012.

SAMORI, G.; SAMORI, C.; GUERRINI, F.; PISTOCCHI, R. Growth and nitrogen removal capacity of *Desmodesmus communis* and of a natural microalgae consortium in a bath culture system in view of urban wastewater treatment: Part I. **Water res.** v. 47, n. 2, p. 791-801, 2013.

SOROKIN, C.; KRAUSS, R. W. The effects of light intensity on the growth rates of green algae. **Plantphysiology**, v. 33, p.109-113, 1958.

UTERMÖHL, H. Zur vervollkommung der quantitativen phytoplankton: methodik. **Mitt. Int. Verein. Theor. Angew. Limnol.**, v. 9, p. 1-38, 1958.

XIN, Li; HONG-YING, Hu; YU-PING, Zhang. Growth and lipid accumulation properties of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. under different cultivation temperature. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 102, n. 3, p. 3098-3102, fev. 2011.

CAPITULO 2

**EFLUENTE HIDROPÔNICO DA PRODUÇÃO DE ALFACE UTILIZADO NO
CULTIVO DE *Scenedesmus acuminatus* (LAGERHEIN) CHODAT COMO
SUBSÍDIO À APLICAÇÃO BIOTECNOLÓGICA**

RESUMO

A hidroponia consiste em uma técnica alternativa de cultivo protegido, utilizada em todo o mundo, na qual o solo é substituído por uma solução aquosa rica em nutrientes essenciais ao desenvolvimento vegetal. No Brasil, o cultivo hidropônico de hortaliças tem se expandido nas últimas décadas, ampliando também as preocupações com o destino dos efluentes gerados por esta atividade. Diante disso, a presente pesquisa teve como objetivo avaliar o cultivo da microalga *Scenedesmus acuminatus* em diferentes concentrações de efluente hidropônico da cultura de alface, visando subsidiar sua aplicação biotecnológica, minimizar custos produtivos e mitigar impactos ambientais. Para tanto, estabeleceram-se três tratamentos com diferentes concentrações de efluente hidropônico (20%, 30% e 40% de efluente, respectivamente) e um controle com meio sintético ASM1, com três repetições. O experimento foi conduzido em sala de cultivo, utilizando-se erlenmeyers de 3 L, contendo o volume de 2,5 L de seu respectivo meio, com pH inicial neutro, à temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, iluminação proveniente de lâmpadas fluorescentes de 40W do tipo *daylight*, fotoperíodo de 12/12h de luz/escuro e aeração contínua à vazão de $3,5 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$, durante 28 dias de cultivo. Foram realizadas análises de crescimento, biomassa seca, clorofilas *a* e *b*, carotenoides totais, teor de proteínas hidrossolúveis, carboidratos e lipídeos totais, perfil de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME), além do percentual de remoção de nutrientes e redução da condutividade elétrica dos meios de cultivo, após separação da biomassa. Dentre os tratamentos, o cultivo com 40% de efluente hidropônico destacou-se por apresentar maior densidade celular ($947,5 \times 10^4 \cdot \text{cél}\cdot\text{mL}^{-1}$) e produzir biomassa microalgal rica em proteínas (44,2%), clorofilas *a* e *b* ($9799 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ e $2730 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente), carotenoides totais ($4826 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), além de ácidos graxos de grande valor nutricional (ômegas), sugerindo seu uso como suplemento alimentar humano e animal. Por outro lado, o cultivo controle em meio sintético apresentou os maiores valores de massa seca ($1,2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) e produtividade ($0,05 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{dia}^{-1}$), em relação aos demais tratamentos. O teor total de ésteres metílicos de ácidos graxos apresentou baixo rendimento em todos os cultivos ($47,8\text{-}64,3 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$) e o perfil de FAME não se adequou às normas vigentes para a produção de biocombustíveis. Entretanto, os elevados teores de carboidratos nos cultivos com 20 e 30% de efluente hidropônico (44,1 e 34,4%,

respectivamente) indicaram potencial para utilização na produção de bioetanol. Os cultivos de *S. acuminatus* foram efetivos na remoção de fosfato (99,6-99,9%) e nitrato (92,9-98,7%), bem como na redução da condutividade elétrica (28,8-54,4%), sugerindo uma excelente alternativa para a biorremediação deste tipo de efluente. Com base nos resultados, pode-se concluir que o efluente hidropônico da cultura de alface representa uma alternativa eficaz para o cultivo da microalga *S. acuminatus*, produzindo biomassa com propriedades químicas interessantes para a aplicação biotecnológica (alto teor de proteínas, carboidratos e carotenoides), além de contribuir com a redução dos custos de produção e ser ambientalmente sustentável.

Palavras-chave: Biorremediação • biotecnologia • efluente • hidroponia • microalgas •

ABSTRACT

Hydroponics is an protected cultivation alternative technique, used throughout the world, in which the soil is replaced by an aqueous solution rich in nutrients essential to plant development. In Brazil, the hydroponic lettuce cultivation has expanded in the last decades, also increasing the concerns with the effluents fate generated by this activity. The objective of this research was to evaluate the *Scenedesmus acuminatus* microalgae cultivation in different concentrations of lettuce crop residual hydroponic solution, aiming to subsidize its biotechnological application, minimize productive costs and mitigate environmental impacts. For that, three treatments with different residual hydroponic solution concentrations (20%, 30% and 40% of effluent, respectively) and a control with ASM1 synthetic medium were established, with three replicates. The experiment was conducted in a culture room using 3 L Erlenmeyer flasks, containing the volume of 2,5 L of its respective medium, at initial neutral pH, at $25 \pm 2^\circ\text{C}$, illumination from fluorescent lamps of 40 W *daylight* type, 12/12h light/dark photoperiod and continuous aeration at $3,5 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ flow for 28 days of cultivation. Growth analyzes, dry biomass, *a* and *b* chlorophyll, total carotenoids, water soluble protein content, total carbohydrates and lipids, fatty acid methyl esters profile (FAME), as well as nutrient removal percentage and electrical conductivity reduction of the medium after biomass separation. Among the treatments, the 40% hydroponic effluent culture was characterized by a higher cell density ($947,5 \times 10^4 \cdot \text{cells}\cdot\text{mL}^{-1}$) and a microalgal biomass rich in proteins (44,2%), *a* and *b* chlorophyll (19,5%), carotenoids ($4826 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), as well as fatty acids of great nutritional value (omegas), such as linolenic acid (19,5%), suggesting its use as a human and animal food supplement. On the other hand, the control cultivation in synthetic medium had the highest values of dry mass ($1,2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) and yield ($0,05 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$), in relation to the other treatments. The total content of fatty acids methyl esters presented low yield in all crops ($47,8\text{-}64,3 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$) and the FAME profile did not conform to the current norms for the production of biofuels. However, the high carbohydrate content in the 20% and 30% hydroponic effluent cultures (44,1 and 34,4%, respectively) indicated potential for use in the production of bioethanol. The *S. acuminatus* cultures were effective in the phosphate (99,6-99,9%) and nitrate (92,9-98,7%) removal, as well as in the electrical conductivity reduction (28,8-54,4%), suggesting an excellent alternative for the bioremediation of this effluent type.

Based on the results, it can be concluded that the lettuce crop residual hydroponic solution represents an effective alternative for the *S. acuminatus* microalgae cultivation, producing a biomass with interesting chemical properties for the biotechnological application (high protein, carbohydrate and carotenoids), besides contributing to the production costs reduction and being environmentally sustainable.

Key words: Bioremediation • biotechnology • effluent • hydroponics • microalgae •

1. INTRODUÇÃO

A hidroponia consiste em uma técnica alternativa de cultivo protegido utilizada em praticamente todo o mundo, na qual o solo é substituído por uma solução aquosa que contém os elementos minerais essenciais aos vegetais. No Brasil, a produção hidropônica está concentrada, aproximadamente, 80% na cultura da alface (*Lactuca sativa* L.) e os 20% restantes nas demais culturas comerciais, com destaque em rúcula, agrião, tomate, melão, hortelã e manjeriço (FURLANI; CASTELLANE, 1999; PAULUS et al., 2012). Este tipo de cultivo proporciona desenvolvimento uniforme e adequado estado fitossanitário das plantas, exige menos trabalho e reduz o desperdício de água e nutrientes (POMPÊO, 1996; MARTINEZ, 1997; RODRIGUES, 2002). Além disso, a produção por hidroponia diminui a incidência de doenças nas plantas e, por conseguinte, a necessidade de uso de agrotóxicos. Em ambientes em que o solo disponível não é agriculturável, a atividade hidropônica torna-se alternativa viável para o cultivo destas hortaliças.

Segundo Brzezinski et al. (2017), atualmente, a alface é a hortaliça folhosa de maior importância econômica no Brasil, sendo cultivada geralmente em condições de agricultura familiar, de maneira intensiva, em pequenas propriedades situadas em áreas periurbanas ou nos cinturões verdes dos grandes centros urbanos (SALA; COSTA, 2012). Entretanto, a crescente difusão da hidroponia pelo país vem ampliando também as preocupações com o destino dos seus efluentes.

Para a produção hidropônica de alface o sistema mais utilizado é o NFT - *Nutrient Film Technique* (Técnica de fluxo laminar de nutrientes), que consiste em fazer circular nas calhas de cultivo os nutrientes contidos na solução nutritiva (LUZ et al., 2017). Por ser um sistema fechado, ou seja, com recirculação, pode causar contaminação por fitopatógenos e desbalanceamento na solução nutritiva, sendo necessária sua troca periódica (FURLANI et al., 1999). Esse processo gera um efluente composto por nutrientes ricos em nitrogênio e fósforo que, quando descartados diretamente no ecossistema, podem causar problemas ambientais, como a eutrofização (BERTOLDI et al., 2007). Considerando que grande parte dos agricultores, que utilizam hidroponia, descarta os efluentes produzidos diretamente no ambiente, torna-se importante encontrar métodos eficazes no tratamento/aproveitamento prévio destes resíduos.

A biotecnologia de microalgas demonstra ser bastante versátil, podendo ser aplicada em diferentes processos, dentre eles, o tratamento de efluentes. Muitos estudos apontam o crescimento de microalgas em resíduos agrícola, industrial e esgoto municipal (GAN et al., 2014; GRIFFITHS; HARRISON, 2009), além de meios constituídos de efluentes de biodigestores, vinhaça e manipueira (RAMIREZ et al., 2014; BORGHETI, 2009; BERTOLDI et al., 2008), resíduos provenientes das atividades agropecuárias (MARKOU et al., 2016; GAN et al., 2014; RODRIGUES; FILHO, 2004), de indústria de laticínios (LU et al., 2015; WOERTZ et al., 2009), de destilaria (TRAVIESO et al., 2008), entre outros.

Efluentes hidropônicos possuem em sua composição N, P, K, Ca, S, Mg, Fe, Cu, Zn, Mn, B, Mo e Cl, constituindo-se em fontes nutritivas de interesse para microalgas biorremediadoras. No processo de biorremediação, as microalgas assimilam os nutrientes (principalmente o nitrogênio e o fósforo), incorporando-os à sua biomassa, obtendo-se um produto enriquecido nutricionalmente, o qual pode ser utilizado para diversas aplicações, tais como na alimentação humana e animal, na forma de suplementos e rações, respectivamente, na indústria de cosméticos, e também como fonte para a produção de biocombustíveis (RODOLFI et al., 2009; KIRROLIA et al., 2013; GOUVEIA et al., 2016). De acordo com Baumgärtner et al. (2013), nos últimos anos houve aumento das atividades, processos e aplicações que envolvem estes microrganismos devido, principalmente, às diversas substâncias que eles sintetizam com alto valor no mercado mundial, como ácidos graxos poli-insaturados, carotenoides, ficobilinas, polissacarídeos, proteínas, vitaminas, sais minerais, esteróis e diversos compostos biologicamente ativos (DERNER et al., 2006; GOUVEIA et al., 2006).

Muitos meios de cultura sintéticos têm sido desenvolvidos para diferentes cultivos de microalgas, entretanto, o alto custo dos nutrientes pode representar fator limitante para a sua produção em larga escala (MULITERNO et al., 2005, BAUMGÄRTNER, 2011). Os gastos com os meios de cultivo destes microrganismos, para a produção de proteína e outros bioprodutos, costumam representar de 40 a 60% do custo total (BERTOLDI et al., 2008, SCHMITZ et al., 2012). Frente a essas colocações, o aproveitamento de efluentes gerados na cultura hidropônica de alface no cultivo de microalgas constitui uma alternativa interessante para a produção de biomassa com aplicação biotecnológica, uma vez que este efluente representa elevada disponibilidade, baixo custo e é rico em

nutrientes necessários ao metabolismo desses organismos. Dessa forma, o cultivo de microalgas em solução de efluente hidropônico também reduz o teor de nutrientes deste efluente, diminuindo danos ao ambiente causados pelo seu descarte inadequado.

Dentre as microalgas que podem ser empregadas na biorremediação, destacam-se as Chlorophyceae do gênero *Scenedesmus*, as quais são facilmente encontradas nos ecossistemas aquáticos continentais, apresentam grande resistência às variações ambientais, sendo também boas competidoras em relação às outras espécies de algas (PAN et al., 2011). As microalgas deste gênero pertencem à família Scenedesmaceae, e vêm sendo muito visadas para o cultivo devido ao seu crescimento rápido, fácil adaptação às variações ambientais e grande valor nutritivo, com alta produção de proteínas e ácidos graxos (BECKER, 1994; GOUVEIA; OLIVEIRA, 2009; SASSI, 2016; CALIXTO, 2016). Atualmente, seu cultivo é voltado principalmente para a aquicultura (DERNER et al., 2006), para a alimentação humana, como suplemento alimentar, e como potencial matéria prima para produção de biodiesel (PRABAKARAN; RAVINDRAN, 2012; FERREIRA et al., 2017). Nesse contexto, *Scenedesmus* exibe grande interesse para o cultivo em larga escala, podendo apresentar boa produtividade, em termos de biomassa, em meios de cultivo produzidos a partir de efluentes (SAMORI et al., 2013), como os gerados em cultivos hidropônicos (BERTOLDI et al., 2007).

Nessa perspectiva, o presente estudo objetivou avaliar o cultivo da microalga *Scenedesmus acuminatus* (Lagerhein) Chodat em diferentes concentrações de efluente gerado em cultivo hidropônico de alface, visando minimizar custos produtivos, subsidiar sua aplicação biotecnológica e mitigar impactos ambientais.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Seleção da microalga e manutenção em meio de cultura sintético

A microalga *Scenedesmus acuminatus* (Lagerhein) Chodat (L027A), selecionada para o presente estudo (Fig. 1), foi obtida a partir do banco de cultivo de microalgas do Laboratório de Taxonomia e Ecologia de Algas Continentais (LATEAC), pertencente ao Departamento de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES).

A espécie em questão está inclusa na divisão Chlorophyta, ordem Sphaeropleales, família Scenedesmaceae, sendo característica de água doce, encontrada em ambientes tipicamente eutróficos. Compreende colônias planas do tipo cenóbio, com 2, 4, 8, 16 ou, mais raramente, 32 células elipsoides, ovoides, fusiformes ou lunadas, dispostas lado a lado (BICUDO; MENEZES, 2006).

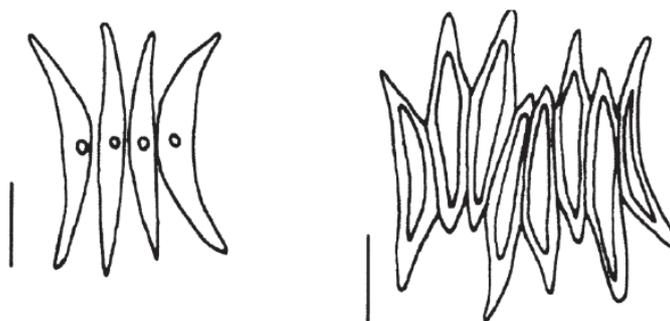


Figura 1: Representação da microalga *S. acuminatus* em um cenóbio com quatro células, à esquerda, e com oito células, à direita. Escala = 10 μm . Fonte: adaptado de Godinho et al. (2010).

Para a realização deste trabalho, a cepa foi previamente mantida em estufas incubadoras Eletrolab, modelo EL202/3, em erlenmeyers de 1 L, contendo 500 mL de meio de cultura sintético ASM1 (adaptado de GORHAM et al., 1964), previamente esterilizado em autoclave à 121 °C por 30 minutos e com pH ajustado para $7,0 \pm 0,05$, com iluminação fornecida por lâmpadas fluorescentes de 40W do tipo *daylight*, temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 12/12h de luz/escuro e aeração contínua utilizando compressor Gong Yang Bang HP-400 com injeção de ar à vazão de $3,5 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$.

O meio de cultura ASM1 foi preparado a partir de quatro soluções estoque, chamadas de A, B, C e D, adicionadas à água deionizada nas proporções de 20

mL, 2 mL, 0,1 mL e 0,4 mL para A, B, C e D, respectivamente, conforme mostrado na Tabela 1.

Tabela 1: Composição das soluções estoque do meio ASM1. As massas correspondem às quantidades utilizadas para o preparo de 200 mL da solução A e 100 mL das soluções B, C e D, as quais são utilizadas na proporção 20:2:0,1:0,4, respectivamente, no preparo do meio ASM1.

Solução A	Massa (g)	Solução B	Massa (g)	Solução C	Massa (g)	Solução D	Massa (g)
NaNO ₃ /NH ₄ Cl ₂	1,70	K ₂ HPO ₄	0,87	H ₃ BO ₃	2,4800	EDTA. Na ₂	1,86
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,41	Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	1,78	MnCl ₂ .4H ₂ O	1,3900		
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,49			FeCl ₃ .6H ₂ O	1,0800		
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,29			ZnCl ₂	0,3350		
				CoCl ₂ .6H ₂ O	0,0190		
				CuCl ₂ .2H ₂ O	0,0014		

Fonte: Adaptado de Gorham et al. (1964).

2.2 Coleta e análise do efluente de cultivo hidropônico de alface

O efluente de cultivo hidropônico de alface (*Lactuca sativa*) foi coletado em uma propriedade privada situada na região rural do município de Santa Leopoldina-ES (Fig. 2), em que o tipo de sistema hidropônico utilizado é o *Nutrient Film Technique* (NFT) ou Técnica do Fluxo Laminar, constituído basicamente por um tanque de solução nutritiva, canais de cultivo (por onde a solução entra em contato com as raízes de alface), uma bomba que promove a circulação da solução e um sistema de retorno ao tanque. Na propriedade em questão são cultivadas quatro variedades comuns de alfaces, sendo elas: *L. sativa* var. *capitata* (alfaces-repolhudas); *L. sativa* var. *longifolia* (alfaces-romanas); *L. sativa* var. *crispa* (alfaces-crespas); e *L. sativa* var. *latina* (alfaces-galegas); as quais são comercializadas, principalmente, na região centro-serrana do estado.

As amostragens foram realizadas nos momentos de troca da solução nutritiva do sistema, que ocorrem a cada 20 dias, aproximadamente. O material foi acondicionado em garrafas de polietileno de 5 L e, posteriormente, em laboratório, foi mantido em erlenmeyers de 5 L sob refrigeração (a 4°C) até o momento em que foi processado.



Figura 2: Propriedade rural onde foi coletado o efluente de cultivo hidropônico de alface (Santa Leopoldina-ES). A. Estufa com bancadas de cultivo hidropônico de alface. B. Reservatório da solução nutritiva. C. Efluente hidropônico em erlenmeyer de 5 L. Fonte: o autor (2017).

Parte da amostra do efluente hidropônico foi enviada a Agrolab - Análises e Controle de Qualidade LTDA - para a determinação das seguintes variáveis: fósforo total (método SM 3120 B), nitrogênio total (método SM 4500 N), nitrogênio amoniacal (método SM 4500 NH_3 B), nitrito (método SM 4500 NO_2^- B), nitrato (método SM 4500 NO_3^- E), ferro total (método SM 3500 Fe B) e condutividade elétrica (método SM 2520 B), conforme recomendações do *Standard Methods*, APHA (2012). Também foram determinados o pH, com pHmetro VWR SympHony, a turbidez, com turbidímetro Alfakit Plus V1.25, a salinidade e o oxigênio dissolvido, com o medidor multiparâmetros YSI 85. Para a determinação dos sólidos totais em suspensão (STS), utilizou-se o método gravimétrico de acordo com metodologia descrita pelo *Standard Methods* (APHA, 2012).

Ao todo, foram realizadas duas coletas de efluente hidropônico em momentos distintos ao longo do estudo (para o teste piloto e para o experimento propriamente dito), sendo amostrados aproximadamente 10 L em cada uma delas.

Cabe ressaltar que somente na amostragem para a execução do experimento foram realizadas as análises físico-químicas do efluente.

2.3 Processamento do efluente hidropônico e teste piloto

Na primeira amostragem, o material coletado foi utilizado para realizar um teste piloto (Fig. 3) contendo vários níveis de diluições do efluente em água deionizada (10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70, 80% e 90% de efluente) e um controle com meio de cultivo sintético ASM1, a partir do qual foram selecionadas as três concentrações que apresentaram melhores resultados de crescimento e biomassa (20%, 30% e 40%) para constituírem os tratamentos do experimento propriamente dito.

Para o preparo das diluições, o efluente foi previamente filtrado através de filtros de fibra de vidro GF1 de 47 mm de diâmetro e 0,7 μm de porosidade, utilizando-se kit kitassato e bomba a vácuo, visando a remoção de material particulado da amostra. Após este procedimento, o efluente foi esterilizado em autoclave por 30 minutos, à temperatura de 121°C, com a finalidade de eliminar possíveis microrganismos contaminantes. Por fim, o efluente hidropônico foi resfriado à temperatura ambiente e, posteriormente, armazenado a 4°C até ser utilizado para o preparo dos tratamentos com as diferentes concentrações.

O teste piloto foi conduzido em sala de cultivo (escala laboratorial), utilizando-se erlenmeyers de 1 L, contendo 500 mL de meio de cultura ASM1, para o controle, e 500 mL dos meios preparados a partir das diluições, para os demais tratamentos (10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% e 90% de efluente); todos com pH inicial ajustado para $7 \pm 0,05$, iluminação fornecida por lâmpadas fluorescentes de 40W do tipo *daylight*, temperatura de 25 ± 2 °C, fotoperíodo de 12/12h de luz/escuro e aeração contínua com injeção de ar à vazão de 3,5 L.min.⁻¹, fornecida por compressores Gong Yang Bang HP-400.

Em cada erlenmeyer foi adicionado 9,6 mL de inóculo (*S. acuminatus*) com concentração de $5,2 \times 10^6$ cél.mL⁻¹, chegando-se a densidade celular inicial (dia zero) de aproximadamente $1,0 \times 10^5$ cél.mL⁻¹ para todos os tratamentos. O cultivo foi do tipo estanque ou batelada, sem aspersão de CO₂ e sem adição de mais nutrientes após inoculação.

As posições dos erlenmeyers na bancada da sala de cultivo foram alteradas, por meio de sorteios, duas vezes ao dia, a fim de garantir maior uniformidade das

condições de cultivo, conforme sugerido por Lourenço (2006) para experimentos com ciclo de 12 horas de luz. O teste piloto apresentou duração de 24 dias, sendo realizadas amostragens a cada dois dias para análise da densidade celular e ao final do ensaio foram determinadas as concentrações das clorofilas *a* e *b* e carotenoides totais, bem como foi quantificada a biomassa seca. Todo o material utilizado foi previamente autoclavado e seu manuseio se deu em câmara de fluxo laminar Pachane PCR T3.

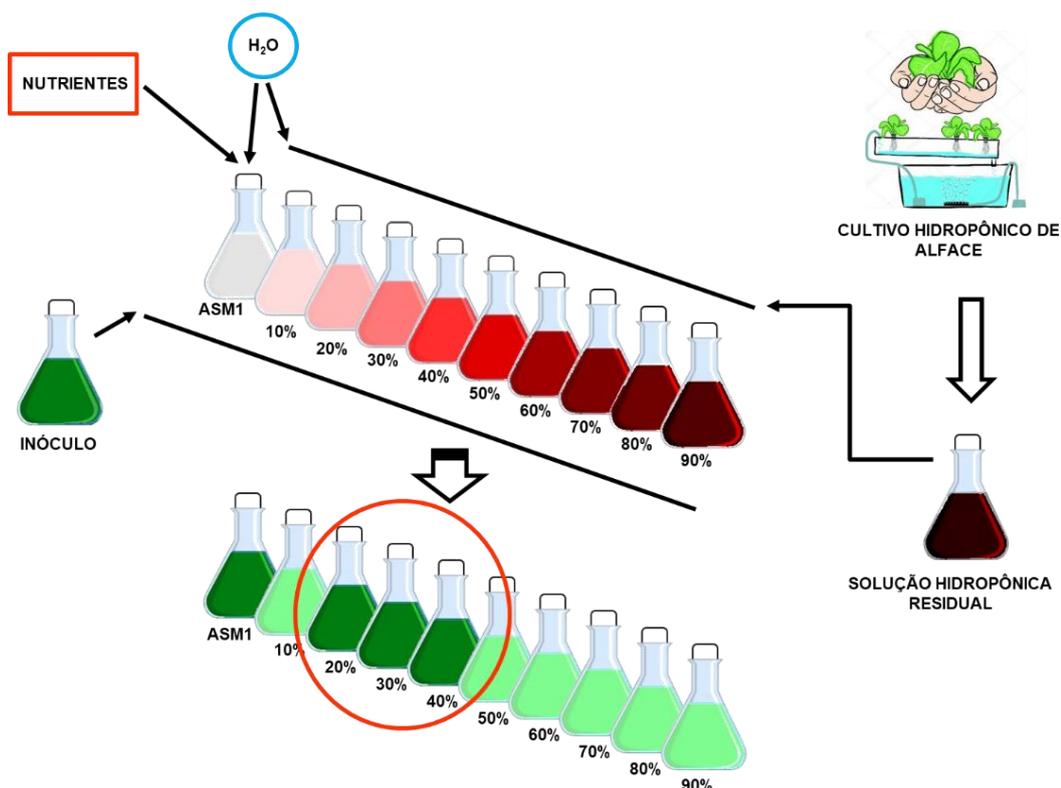


Figura 3: Fluxograma das principais etapas do teste piloto realizado com diferentes concentrações do efluente hidropônico de alface (10%-90%), bem como um controle contendo meio de cultivo sintético ASM1, evidenciando as três concentrações que apresentaram melhores resultados de crescimento e biomassa (20%, 30% e 40%). Fonte: o autor (2018).

A partir das curvas de crescimento e dos valores das concentrações dos pigmentos e de massa seca obtidos com o teste piloto (Fig. 4, Fig. 5 e Fig. 6), foram selecionadas as concentrações de 20%, 30% e 40% de efluente hidropônico para a realização do experimento, uma vez que foram as diluições que apresentaram os melhores resultados, em termos de crescimento e biomassa, para aprofundar o estudo acerca da produtividade, composição bioquímica e potencial biorremediativo da microalga cultivada nestas condições.

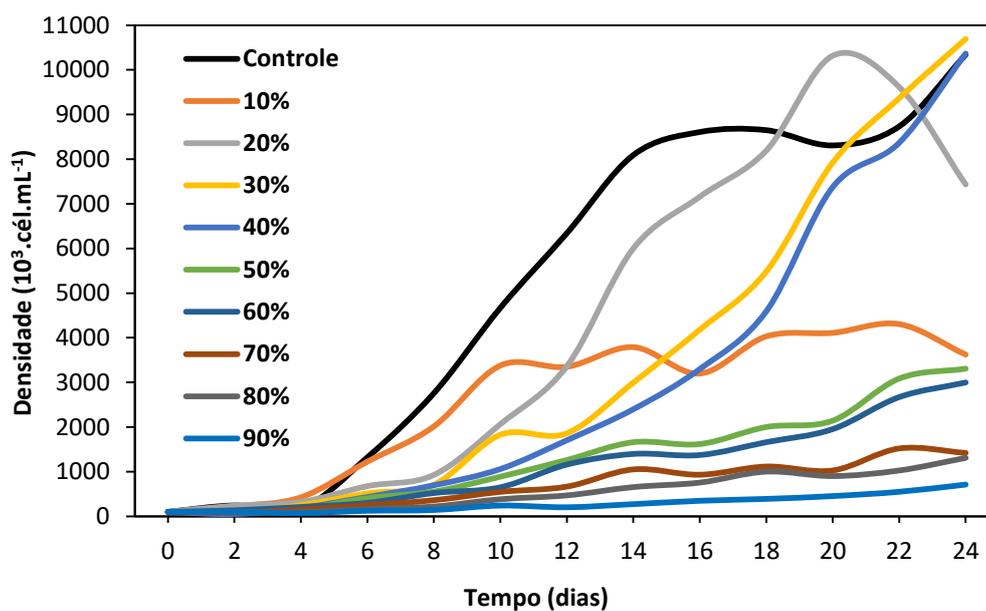


Figura 4: Curvas de crescimento de *S. acuminatus* cultivada no meio sintético ASM1 (Controle) e nos meios com diferentes concentrações de efluente de cultivo hidropônico de alface (10%–90%) obtidas a partir do teste piloto.

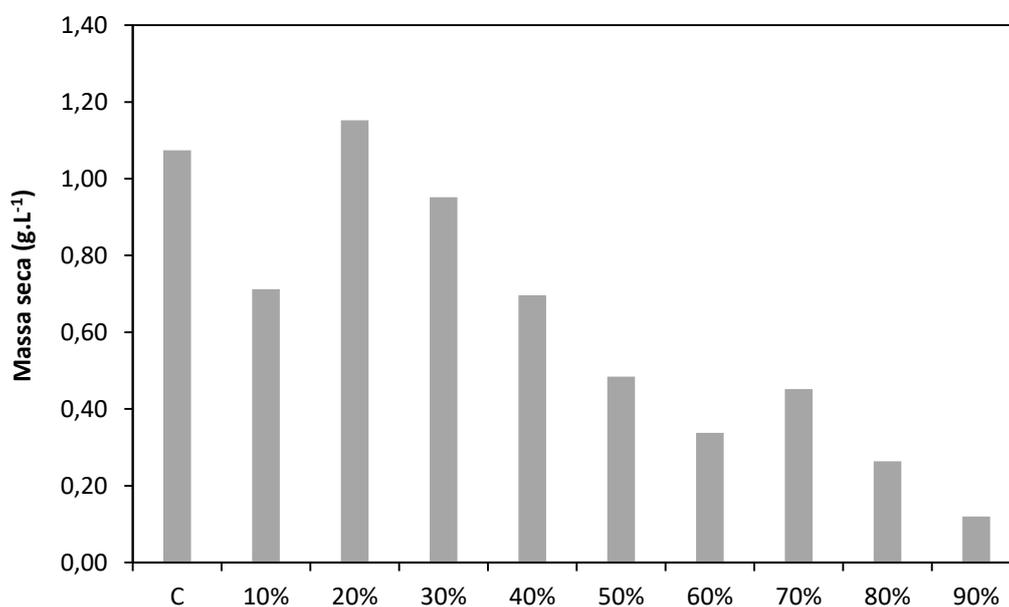


Figura 5: Biomassa seca de *S. acuminatus* no meio sintético ASM1 (Controle) e nos meios com diferentes concentrações de efluente de cultivo hidropônico de alface (10%–90%) obtida a partir do teste piloto.

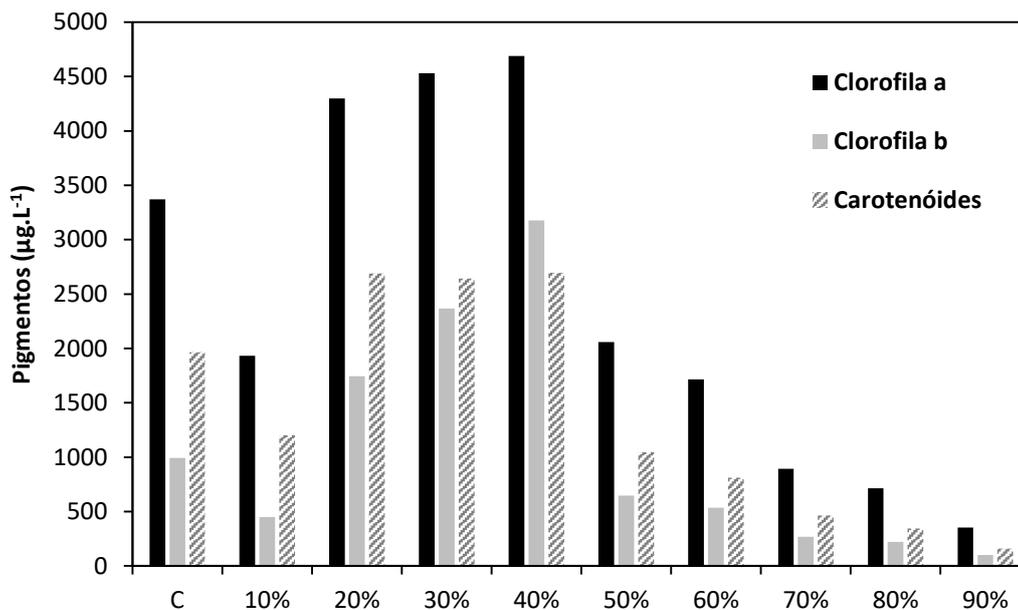


Figura 6: Concentrações de clorofila *a*, clorofila *b* e carotenóides totais de *S. acuminatus* no meio sintético ASM1 (Controle) e nos meios com diferentes concentrações de efluente de cultivo hidropônico de alface (10%–90%) obtidas a partir do teste piloto.

2.4 Delineamento experimental

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado e consistiu de um controle com meio de cultivo sintético ASM1 e três tratamentos com as concentrações de 20%, 30% e 40% de efluente hidropônico, respectivamente, com três repetições, conforme esquematizado na Figura 7.

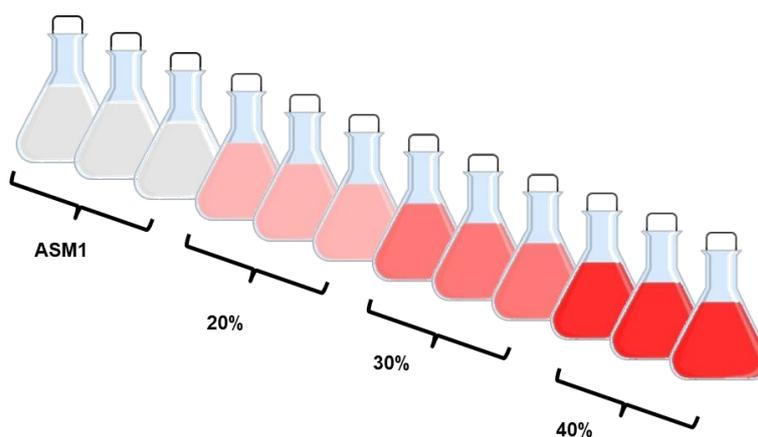


Figura 7: Desenho experimental para avaliação do cultivo de *S. acuminatus* em meio sintético ASM1 (Controle) e nos meios com diferentes concentrações de efluente de cultivo hidropônico de alface (Tratamentos com 20%, 30% e 40% de efluente, respectivamente). Fonte: o autor (2018).

O experimento foi conduzido em sala de cultivo, utilizando-se erlenmeyers de 3 L, contendo o volume de 2,5 L de seu respectivo meio, com pH inicial neutro, mantidos sob temperatura controlada a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, com iluminação proveniente de lâmpadas fluorescentes de 40W do tipo *daylight*, fotoperíodo de 12/12h de luz/escuro e aeração contínua com injeção de ar à vazão de $3,5 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$.

Amostras dos meios preparados a partir das diluições do efluente hidropônico, bem como amostras do meio controle, foram enviadas a Agrolab - Análises e Controle de Qualidade LTDA - para a determinação das concentrações iniciais de ortofosfato (método SM 4500 P), nitrato (método SM 4500 NO_3^- E) e condutividade elétrica (método SM 2520 B), conforme metodologia do *Standard Methods*, APHA (2012). A turbidez também foi determinada antes da adição do inóculo nos meios de cultivo por meio do turbidímetro Alfakit Plus V1.25.

Em cada erlenmeyer foi adicionado 200 mL de inóculo (*S. acuminatus*) com concentração de $2,8 \times 10^6 \text{ cél}\cdot\text{mL}^{-1}$, chegando-se a densidade celular inicial (dia zero) de aproximadamente $2,0 \times 10^5 \text{ cél}\cdot\text{mL}^{-1}$, tanto para o controle quanto para os demais tratamentos. O cultivo realizado foi do tipo estanque ou batelada, sem aspersão de CO_2 e adição de mais nutrientes após a inoculação. Todo o material utilizado foi previamente autoclavado e seu manuseio se deu em câmara de fluxo laminar Pachane PCR T3.

Da mesma forma que adotado para o teste piloto, as posições dos erlenmeyers na bancada da sala de cultivo foram alteradas, por meio de sorteios, duas vezes ao dia, para garantir maior uniformidade das condições de cultivo (LOURENÇO, 2006).

O experimento apresentou duração de 28 dias, sendo realizadas amostragens com intervalos regulares de dois dias para as análises de densidade celular e de quatro dias para as análises de quantificação de massa seca e pigmentos.

Ao final do ensaio, a biomassa restante foi centrifugada (centrífuga refrigerada Novatecnica), congelada à -80°C (ultrafreezer) e liofilizada (liofilizador SL - 404) para a realização das análises de proteínas hidrossolúveis, carboidratos e lipídeos totais, bem como para a caracterização do perfil de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME). Tais análises foram realizadas na Unidade de Bioenergia do Laboratório Nacional de Energia e Geologia (LNEG), em Lisboa, Portugal, por

meio do Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE) da CAPES. As metodologias específicas para cada análise estão descritas nas seções seguintes.

2.5 Avaliação do crescimento

Para o acompanhamento do crescimento das culturas e determinação da densidade celular das unidades experimentais foram retiradas alíquotas de 2 mL, a cada dois dias, utilizando-se micropipeta de volume ajustável e ponteiros esterilizados. As coletas foram realizadas em câmara de fluxo laminar devidamente esterilizada e cada alíquota foi transferida para eppendorfs, onde acrescentou-se uma gota de solução de lugol acético diluído a 5% para fixação das amostras, de acordo com Utermöhl (1958).

A quantificação dos indivíduos (células.mL⁻¹) foi realizada por meio de contagens diretas em hemocítômetro de Fuchs-Rosenthal, utilizando-se microscópico óptico Olympus CX41, no aumento de 200X.

A partir dos resultados de densidade celular foram elaboradas as curvas de crescimento para cada tratamento e calculados a taxa de crescimento, o tempo de duplicação e o rendimento máximo das cepas. Para os cálculos das taxas de crescimento foram considerados os valores compreendidos na fase exponencial do crescimento das culturas.

A taxa de crescimento (μ), o tempo médio de duplicação (G) e o rendimento máximo (R) foram calculados segundo as Equações 1 e 2, descritas primariamente por Fogg e Thake (1987).

$$\mu = (\ln N_2 - \ln N_1) / (t_2 - t_1) \quad \text{Eq. (1)}$$

Sendo,

μ = velocidade específica de crescimento;

N_1 e N_2 = número de células nos tempos t_1 e t_2 , respectivamente.

A partir do μ foi possível calcular o tempo médio de duplicação (G):

$$G = \ln(2) / \mu \quad \text{Eq. (2)}$$

O rendimento máximo (R) de cada tratamento foi determinado através da Equação 3:

$$R = R_1 - R_0 \quad \text{Eq. (3)}$$

Sendo,

R_1 = densidade celular máxima (células.mL⁻¹);

R_0 = densidade celular inicial (células.mL⁻¹).

2.6 Determinação da biomassa seca

A quantificação da biomassa seca dos cultivos foi realizada por metodologia gravimétrica a cada intervalo de quatro dias até o final do experimento. Foram filtradas amostras de 45 mL, com auxílio de bomba a vácuo, kitassato e funil de Buchner, através de microfiltros de fibra de vidro GF1 com diâmetro de 47 mm e poros de 0,7 µm, previamente secos em estufa a 60°C até atingirem massa constante e então serem pesados. Depois de filtradas as amostras, os filtros foram levados de volta para estufa e mantidos a mesma temperatura de 60°C até atingirem peso constante. A determinação da biomassa seca se deu através da subtração da massa final pela massa inicial do filtro, dividido pelo volume filtrado (Equação 4), segundo Lourenço (2006).

$$MS = (M_f - M_i) / V \quad \text{Eq. (4)}$$

Sendo,

MS = Massa seca (g.L⁻¹);

M_f = Massa final (g);

M_i = Massa inicial (g);

V = Volume filtrado (L).

A partir dos valores de massa seca foi possível calcular a produtividade média de biomassa (g.L⁻¹.d⁻¹) para cada tratamento, que se refere à concentração de biomassa microalgal acumulada nos cultivos ao longo do tempo.

2.7 Quantificação de pigmentos

As concentrações dos pigmentos clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides totais foram determinadas por meio da espectrofotometria a cada quatro dias de intervalo até o final do experimento. Alíquotas foram retiradas das culturas de cada tratamento e filtradas em filtro de fibra de vidro GF1. A extração se deu por meio da maceração dos filtros de fibra de vidro, com o material retido, usando acetona 90%

como solvente a frio. Em seguida, a solução foi acondicionada em tubos de centrifuga envoltos por papel alumínio e armazenados no refrigerador a 4°C por 24 horas. Passado o tempo, a solução foi centrifugada (centrífuga refrigerada Novatecnica) e o sobrenadante lido em espectrofotômetro Aquamate Plus nos comprimentos de onda de 480, 510, 630, 647, 664 e 750 nm. Todo o processo foi realizado ao abrigo de luz.

Para a determinação das concentrações das clorofilas *a* e *b* (em $\mu\text{g.L}^{-1}$) foram utilizadas as Esquações 5 e 6, propostas por Jeffrey e Humphrey (1975).

$$[\text{Clorofila } a \text{ (}\mu\text{g.L}^{-1}\text{)}] = [11,85 \times A_{664 \text{ nm}} - 1,54 \times A_{647 \text{ nm}} - 0,08 \times A_{630 \text{ nm}}] \times v / (V \times c)$$

Eq. (5)

$$[\text{Clorofila } b \text{ (}\mu\text{g.L}^{-1}\text{)}] = [21,03 \times A_{647 \text{ nm}} - 5,43 \times A_{664 \text{ nm}} - 2,66 \times A_{630 \text{ nm}}] \times v / (V \times c)$$

Eq. (6)

Em que,

A = absorvância;

v = volume de acetona utilizada para extração do pigmento (L);

V = volume do filtrado da cultura (L);

c = caminho ótico da cubeta (cm).

Para estimar os carotenoides totais foi utilizada a Equação 7, desenvolvida por Strickland e Parsons (1968).

$$[\text{Carotenoides totais (}\mu\text{g.L}^{-1}\text{)}] = [7,60 \times A_{480 \text{ nm}} - 3,00 \times A_{750 \text{ nm}} - 1,49 \times A_{510 \text{ nm}} - 2,00 \times A_{750 \text{ nm}}] \times v / (V \times c)$$

Eq. (7)

2.8 Determinação de proteínas hidrossolúveis

O teor de proteínas hidrossolúveis foi quantificado na biomassa liofilizada obtida em cada cultivo empregando-se o método adaptado de Lowry et al., (1951), o qual utiliza albumina bovina como padrão.

Inicialmente, foi adicionado 4,0 mL de NaOH 1,0 N a 5,0 mg da biomassa microalgal liofilizada acondicionada em tubo de ensaio, o qual foi aquecido em banho-maria, a 100°C por uma hora, para a extração das proteínas solúveis. Após

resfriar, o tubo com a amostra foi centrifugado, por 10 minutos a 3000 rpm, e então retirou-se 0,5 mL do extrato alcalino (sobrenadante), o qual foi transferido para outro tubo, onde adicionaram-se 5,0 mL de solução composta por carbonato de sódio (Na_2CO_3) 2,0% em hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 N, sulfato de cobre II pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 0,5% e tartarato de sódio e potássio ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) 1,0%, na proporção 100:1:1, respectivamente. A mistura foi agitada em vortex e deixada em repouso por 10 minutos. Em seguida, foram acrescentados 0,5 mL de solução de Folin-Ciocalteu em H_2O deionizada, na proporção 1:1, e novamente o conteúdo do tubo foi homogeneizado em vortex, sendo então deixado em repouso por 30 minutos.

A leitura da absorbância das amostras foi realizada no comprimento de onda de 750 nm. Para os pontos da curva padrão foram realizadas cinco diluições compreendidas na faixa de 0 a $0,4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ de albumina e o teor de proteínas (%) foi calculado de acordo com a Equação 8:

$$\text{Teor proteico (\%)} = (C \times V / m) \times 100 \quad \text{Eq. (8)}$$

Em que,

C = Concentração dada pelo método de Lowry a partir da equação da curva padrão ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$);

V = Volume de solução de NaOH usado no pré-tratamento da amostra (mL);

m = Quantidade de biomassa liofilizada utilizada na análise (mg).

2.9 Determinação de carboidratos totais

Os carboidratos totais foram analisados pelo método adaptado de Kochert (1978), empregando-se glicose como padrão.

Primeiramente, foi adicionado 4,0 mL de NaOH 1,0 N a 5,0 mg da biomassa liofilizada acondicionada em tubo de ensaio, o qual foi aquecido em banho-maria, a 100°C por uma hora, para a extração dos hidratos de carbono. Após esfriar à temperatura ambiente, o tubo com a amostra foi centrifugado, a 3000 rpm por 10 minutos, e então retiraram-se 0,5 mL do extrato alcalino (sobrenadante), o qual foi transferido para outro tubo, onde adicionaram-se 1,0 mL de NaOH 1,0 N e 0,5 mL de fenol 4,0 %, seguindo de agitação em vortex. Após 30 minutos em repouso,

foram acrescentados 2,5 mL de H₂SO₄ concentrado ao tubo, seguido de agitação em vortex. A mistura foi então deixada em repouso para esfriar à temperatura ambiente.

Por fim, foi realizada a leitura das amostras em espectrofotômetro no comprimento de onda de 485 nm. Para os pontos da curva padrão foram realizadas cinco diluições de glicose anidra com gradiente de concentração na faixa de 0 a 0,4 mg.mL⁻¹ de glicose e o teor de carboidratos (%) foi calculado de acordo com a Equação 9:

$$\text{Teor de carboidratos (\%)} = (C \times V / m) \times 100 \quad \text{Eq. (9)}$$

Em que,

C = Concentração dada pelo método de Kochert a partir da equação da curva padrão (mg.mL⁻¹);

V = Volume de solução de NaOH usado no pré-tratamento da amostra (mL);

m = Quantidade de biomassa liofilizada utilizada na análise (mg).

2.10 *Determinação de lipídeos totais*

A determinação do conteúdo de lipídeos totais foi realizada por gravimetria, de acordo com metodologia adaptada de Bligh e Dyer (1959), levando-se em conta as proporções recomendadas entre os solventes clorofórmio, metanol e água.

Inicialmente foram pesados 0,5 g de biomassa liofilizada em um tubo de vidro, onde foram adicionados 2 mL de água deionizada. À biomassa úmida foram adicionados 7,5 mL de solução clorofórmio: metanol, na proporção 1:2, seguido de agitação em vortex por dois minutos. Foi então adicionado ao tubo 2,5 mL de clorofórmio, sendo novamente agitado em vortex por 30 segundos. Em seguida, foram adicionados à mistura 2,5 mL de água deionizada, seguido de nova agitação em vortex por 30 segundos. A biomassa foi então separada por centrifugação a 3000 rpm durante 10 min e, posteriormente, a fase orgânica (clorofórmica) foi transferida para um becker de vidro, fazendo-a passar por uma pipeta de *Pasteur* contendo algodão e sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄), para retirar quaisquer resíduos de água da amostra. Na sequência, o becker foi colocado sobre placa aquecedora a 50°C até evaporação do remanescente líquido. Por fim, foi levado a estufa a 30°C para secagem até atingir massa constante, restando somente os

lipídeos totais na forma sólida. A partir das diferenças de massa de cada becker foi determinado o teor lipídico das amostras, conforme Equação 10.

$$\text{Teor de lipídeos (\%)} = (M_f - M_i) \times 100 / M_b \quad \text{Eq. (10)}$$

M_f = massa final do becker, incluindo o conteúdo lipídico (g);

M_i = Massa inicial do becker (g);

M_b = Massa da amostra liofilizada usada para a extração de lipídeos (g).

2.11 *Perfil de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME)*

O método para avaliar a composição da biomassa em termos de ácidos graxos foi baseado na norma NP EN ISO 5508:1996 e apresentou como principal objetivo determinar, a partir da análise por cromatografia em fase gasosa, a percentagem de cada ácido graxo presente na amostra.

Antes de se proceder à análise cromatográfica, as amostras tiveram que ser preparadas de acordo com a norma EN ISO 5509:2000, que tem como princípio a adição de solução metanólica de hidróxido de sódio (NaOH), para que ocorra saponificação dos glicerídeos, seguida da adição de solução de trifluoreto de boro (BF_3), para que ocorra a conversão dos sabões em ésteres metílicos.

Inicialmente, ligou-se o banho-maria para que aquecesse até 85°C e preparam-se as soluções necessárias para o procedimento, sendo elas: solução metanólica de hidróxido de sódio, dissolvendo-se 2 g de NaOH em 100 mL de metanol (CH_3OH); e solução saturada de cloreto de sódio (NaCl), dissolvendo-se NaCl em água deionizada, até que a solução ficasse saturada. Foram então pesados para um balão de destilação de 50 mL, 150 mg de biomassa microalgal liofilizada (pesados em balança *Mettler Toledo*). Adicionou-se 4 mL da solução metanólica de hidróxido de sódio (NaOH) e reguladores de ebulição, após o que se colocou o balão em refluxo e imerso no banho-maria, durante cerca de 20 minutos. O balão foi agitado a cada minuto, para evitar formação de um anel de NaOH à volta do mesmo. Adicionou-se, através do tubo refrigerante, 5 mL de BF_3 e deixou-se em ebulição durante três minutos, após o que se adicionou, pelo mesmo tubo refrigerante, 3 mL de isooctano (C_8H_{18}). O balão foi depois retirado do calor e, ainda quente, adicionou-se 20 mL da solução saturada de NaCl através do tubo refrigerante. Retirou-se então o balão do suporte e foi adicionada mais solução

saturada de NaCl até ao “pescoço” do mesmo, sendo tampado e agitado fortemente durante aproximados 15 segundos. Após separação das fases, a fase superior (com isooctano) contendo a fração lipídica extraída da biomassa microalgal foi transferida, com o auxílio de uma micropipeta, para um tubo de vidro, fazendo-a passar por uma pipeta de *Pasteur* contendo algodão e sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4), para retirar quaisquer resíduos de água da amostra.

Para análise do teor de ésteres metílicos na fração lipídica, adicionou-se cerca de 10 mg de padrão interno (éster metílico do ácido heptadecanóico, C17:0) a 1,0 mL da amostra filtrada acima referida (fase do isooctano), procedendo-se depois a análise cromatográfica. Na Figura 8 é possível observar o resultado de uma das análises cromatográficas realizada a partir da fração lipídica da biomassa de *S. acuminatus* cultivado em meio ASM1.

As amostras foram analisadas num cromatógrafo (*Varian 3800*), equipado com detector de ionização à chama (FID) e coluna capilar (*Supelcowax 10*, comprimento de 30 m, diâmetro interno de 0,32 mm e espessura de filme de 0,25 μm) nas seguintes condições: temperatura inicial da coluna de 60°C (2 min); taxa de aquecimento de 10°C/min até 200°C, seguida de taxa de aquecimento de 5°C/min até 240°C (7 min); temperatura do injetor de 250°C; temperatura do detector de 250°C; pressão do gás de arrasto (hélio - N50) de 6,0 psi; volume de injeção de 1 μL .

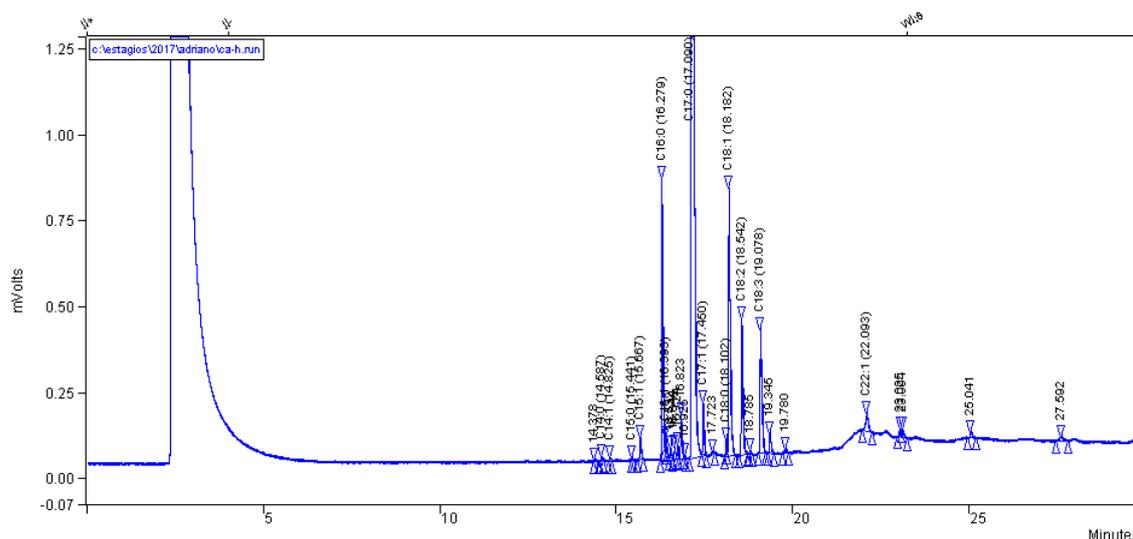


Figura 8: Cromatograma referente à análise da fração lipídica da biomassa obtida de *S. acuminatus* cultivado em meio sintético ASM1. No gráfico é possível visualizar a identificação de cada ácido graxo e o tempo em que são identificados (valores entre parênteses). Fonte: o autor (2018).

A percentagem relativa de cada um dos ésteres metílicos de ácidos graxos foi calculada através da Equação 11:

$$\% \text{ FAME} = [A_i / (\sum A - A_{PI})] \times 100 \quad \text{Eq. (11)}$$

Onde,

A_i = área do pico do qual se pretende calcular a percentagem;

$\sum A$ = área total dos picos dos vários ésteres metílicos;

A_{PI} = área do pico que corresponde ao padrão interno utilizado.

A identificação dos ésteres metílicos dos ácidos graxos foi feita por comparação com o obtido para a solução padrão, analisada nas mesmas condições cromatográficas. Os ácidos graxos que não constavam no padrão interno foram identificados por meio do padrão Supelco - 37.

O teor de ésteres metílicos de ácidos graxos da fração lipídica contida na biomassa seca foi calculado através da Equação 12.

$$\text{Teor de ésteres totais (\%)} = [(\sum A - A_{PI}) / A_{PI}] \times M_{PI} \times (V_{iso.i} / V_{iso.f}) / M_{biomassa} \times 100 \quad \text{Eq. (12)}$$

Onde,

M_{PI} = massa do padrão interno (C17:0) adicionada à amostra (mg);

$V_{iso.i}$ = volume total de isooctano usado no preparo da amostra pelo método BF_3 (3 mL);

$V_{iso.f}$ = volume de isooctano contendo os ésteres metílicos usado para a análise cromatográfica (mL);

$M_{biomassa}$ = biomassa pesada para o processo de transesterificação (método BF_3) (mg).

2.12 Remoção de nutrientes

Para avaliar a eficiência do tratamento do efluente gerado no cultivo hidropônico de alface pela espécie de microalga cultivada, análises de nitrato (método SM 4500 NO_3^- E), ortofosfato (método SM 4500 P) e condutividade elétrica (método SM 2520 B), segundo as recomendações do *Standard Methods* (APHA,

2012), foram realizadas nos diferentes tratamentos ao final do experimento, após filtração da biomassa.

A taxa global de remoção para cada nutriente analisado e a taxa de redução da condutividade elétrica (CE) foram determinadas de acordo com a Equação 13, adaptada de Ferreira et al. (2017).

$$\text{Remoção / Redução (\%)} = (C_i - C_f) / C_i \times 100 \quad \text{Eq. (13)}$$

Em que,

C_i = Concentração inicial do nutriente ou valor inicial da CE no meio de cultivo, antes da inoculação;

C_f = Concentração final do nutriente ou valor final da CE no meio, após remoção da biomassa.

2.13 *Tratamento estatístico*

O experimento foi conduzido seguindo delineamento inteiramente casualizado, com três repetições, e as análises estatísticas foram realizadas por meio do programa R (R CORE TEAM, 2017). Para verificar se as variáveis avaliadas atendiam aos pressupostos para a análise de variância, foi realizada uma avaliação gráfica dos resíduos do modelo utilizado (QQ-Plot) e, em seguida, aplicados os testes de Shapiro-Wilk (normalidade), D'Agostino (simetria), Anscombe (mesocurticidade), estes dois últimos para o caso do não atendimento do pressuposto de normalidade. A homogeneidade de variâncias foi avaliada por meio do teste de Levene. No caso do atendimento dos pressupostos, as variáveis estudadas foram submetidas à análise de variância (ANOVA), e, na situação de efeito significativo ($p < 0,05$), as médias foram comparadas por meio do teste t com correção de Bonferroni. Para medidas com avaliação do efeito no tempo foi realizado o teste de esfericidade de Mauchly, sendo realizadas as correções dos graus de liberdade e dos quadrados médios dos resíduos gerados na análise de variância para condições de esfericidade não atendidas. Em todas as análises estatísticas, considerou-se um valor de 5% para o erro α .

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização do efluente hidropônico e dos meios de cultivo

Na Tabela 2 é possível visualizar os parâmetros físico-químicos que foram avaliados para caracterizar o efluente do cultivo hidropônico de alface que foi utilizado na elaboração dos meios de cultivo alternativos para a realização do experimento.

Tabela 2: Caracterização físico-química do efluente do cultivo hidropônico de alface utilizado na elaboração do experimento.

Parâmetros	Valores
pH	5,95
Turbidez (NTU)	7,20
Condutividade Elétrica ($\mu\text{S.cm}^{-1}$)	1054,00
Sólidos Totais em Suspensão (mg.L^{-1})	0,91
Oxigênio Dissolvido (mg.L^{-1})	6,71
Ferro Total (mg.L^{-1})	6,15
Fósforo Total (mg.L^{-1})	34,00
Nitrogênio Total (mg.L^{-1})	10,20
Nitrato (mg.L^{-1})	7,84
Nitrito (mg.L^{-1})	0,18
Nitrogênio Amoniacal (mg.L^{-1})	0,61

De modo geral, o efluente hidropônico bruto apresentou pH ácido, baixos valores de turbidez e sólidos totais em suspensão, elevada condutividade elétrica e concentração de oxigênio dissolvido, além de elevados valores de ferro, fósforo e nitrogênio total. Dentre as formas de nitrogênio dissolvido, o nitrato apresentou maior concentração em relação às demais. Os valores de pH, condutividade elétrica, nitrito e fósforo total foram compatíveis com os valores registrados na solução hidropônica residual utilizada no estudo de Bertoldi et al. (2007), em que avaliaram a capacidade de remoção de nitrogênio e fósforo pela microalga *Chlorella vulgaris*. Entretanto, o efluente hidropônico do referido trabalho apresentou valores de nitrato e nitrogênio amoniacal (226,5 e 26,5 mg.L^{-1} , respectivamente) muito superiores aos determinados nesta pesquisa, o que aumenta consideravelmente a razão N/P da solução residual daquele trabalho.

O nitrogênio apresenta grande importância para o desenvolvimento das microalgas por ser constituinte de diversas substâncias do metabolismo primário. Dessa forma, as concentrações de proteínas, carotenoides e clorofilas nas células tendem a aumentar quando há disponibilidade de nitrogênio no cultivo; por outro lado, conforme se limita o nitrogênio do meio, reduzem-se as quantidades dessas substâncias (LOURENÇO, 2006; ORDOG et al., 2011). Segundo Santos et al. (2003), a escassez de nitrogênio no meio de cultivo pode aumentar o conteúdo lipídico de uma microalga, uma vez que direciona o metabolismo, antes voltado à multiplicação celular, para a produção de componentes de reserva, como os ácidos graxos saturados, preparando a célula para um período de privação nutricional (ALONSO et al., 2000; XU et al., 2012). Além de permitir o aumento do teor lipídico das células, a depleção de nitrogênio altera gradualmente a composição dos lipídeos, de ácidos graxos para triglicerídeos (WIDJAJA et al., 2009).

No presente estudo, o fósforo foi o nutriente registrado em maior concentração no efluente de hidroponia. Este elemento apresenta importantes funções na célula, participando de todos os processos de trocas energéticas e na constituição de moléculas estruturais (ATP, açúcares fosfatados, ácidos nucleicos e fosfoenzimas). Semelhante ao nitrogênio, o fósforo é considerado um dos principais elementos limitantes do crescimento celular, porém, em momentos em que está disponível, as microalgas são capazes de absorverem grandes quantidades de fósforo, o que permite o crescimento em períodos de privações (LOURENÇO, 2006).

Normalmente as soluções hidropônicas apresentam coloração avermelhada devido à presença de considerável concentração de ferro em sua composição, conforme também verificado para este estudo (Tab. 2). Tal elemento, na sua forma reduzida, é extremamente importante para as algas, por participar de inúmeras funções como: vias biossintéticas da clorofila e dos citocromos, transporte respiratório e fotossintético de elétrons, redução de nitrato e de nitrito, redução de sulfato, fixação de nitrogênio molecular (N_2), detoxificação de espécies reativas de oxigênio, além de ser cofator de diversas enzimas (LOURENÇO, 2006). A concentração de ferro do ambiente apresenta relação direta com o conteúdo lipídico de microalga, sendo que a sua suplementação no início do cultivo aumenta o crescimento celular e estimula a produção de lipídios neutros, até 56,6% quando comparado com um cultivo sem suplementação de ferro (LIU et al., 2008).

Além dos nutrientes até aqui discutidos, as necessidades nutricionais das microalgas incluem diversos micronutrientes em quantidades consideráveis, com limites e relações específicas para cada espécie (KLIGERMAN; BOUWER, 2015). No efluente analisado, os elevados valores de condutividade elétrica indicam a presença de diversos íons que podem se configurar como macro ou micronutrientes importantes para o cultivo de microalgas.

Na Tabela 3 estão relacionados os valores iniciais de turbidez, condutividade elétrica, ortofosfato e nitrato determinados no meio de cultivo sintético e nos meios preparados a partir do efluente hidropônico de cultivo de alface, antes da inoculação de *S. acuminatus*, para a realização do experimento. Foi possível observar o gradiente físico-químico que se estabeleceu entre os tratamentos com diferentes concentrações de efluente, especialmente para a turbidez e condutividade elétrica, os quais apresentaram médias com diferenças significativas entre todos os meios testados ($p < 0,05$). Além disso, a concentração de ortofosfato foi estatisticamente maior no tratamento com 40% de efluente, quando comparado aos demais, enquanto os valores de nitrato não diferiram entre os meios com efluente hidropônico; entretanto, apresentou média significativamente maior no tratamento com 40% de efluente em relação ao controle.

A partir destas condições de cultivo foi possível avaliar os efeitos que as mesmas apresentaram sobre o crescimento, biomassa e composição bioquímica de *S. acuminatus*, bem como verificar o seu potencial biorremediativo para a solução de efluente hidropônico de cultivo de alface.

Tabela 3: Valores de turbidez, condutividade elétrica, ortofosfato e nitrato do meio sintético ASM1 (Controle) e dos meios com diferentes concentrações de efluente hidropônico (Tratamentos com 20%, 30% e 40% de efluente, respectivamente) utilizados para o cultivo de *S. acuminatus*.

	Turbidez (NTU)	Cond. Elétrica ($\mu\text{S.cm}^{-1}$)	Ortofosfato (mg.L^{-1})	Nitrato (mg.L^{-1})
Controle	0,00 \pm 0,00 ^D	414,33 \pm 2,85 ^B	15,43 \pm 1,05 ^C	15,97 \pm 2,40 ^B
20%	4,17 \pm 0,08 ^C	297,13 \pm 3,38 ^D	19,47 \pm 0,69 ^{BC}	17,70 \pm 2,62 ^{AB}
30%	6,98 \pm 0,14 ^B	401,00 \pm 3,21 ^C	21,93 \pm 1,86 ^B	19,23 \pm 1,56 ^{AB}
40%	9,55 \pm 0,21 ^A	505,67 \pm 2,03 ^A	29,47 \pm 1,84 ^A	26,57 \pm 2,12 ^A

Valores expressos em média \pm erro padrão. Valores seguidos pela mesma letra, na mesma coluna, não diferem significativamente pelo teste t com correção de Bonferroni ($p < 0,05$).

3.2 Crescimento e biomassa

O crescimento de *S. acuminatus* foi avaliado pela determinação da densidade celular em função do tempo, conforme pode ser observado nas diferentes curvas de crescimento nos meios de cultura provenientes do efluente hidropônico de cultivo de alface (20%, 30% e 40% de efluente) comparados ao meio sintético ASM1, escolhido como controle (Fig. 9).

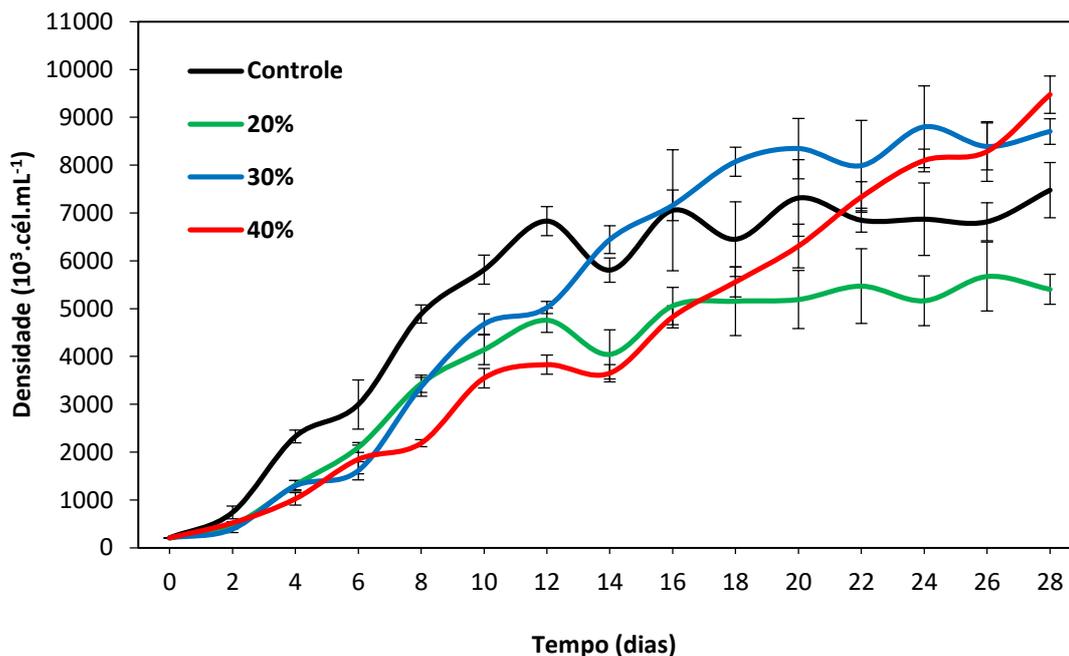


Figura 9: Curvas de crescimento de *S. acuminatus* no meio sintético ASM1 (Controle) e nos meios com diferentes concentrações de efluente hidropônico (Tratamentos com 20%, 30% e 40% de efluente, respectivamente). Valores expressos em média \pm erro padrão (barras verticais).

De modo geral, todas as culturas apresentaram rápida adaptação aos meios testados, sendo que em todos eles a fase de indução ao crescimento (lag) durou somente até o 2º dia de cultivo, a partir do qual iniciou-se a fase de crescimento exponencial ou logarítmico (log). Isso indica que as diferenças iniciais na turbidez e na concentração nutricional entre os tratamentos não foram suficientes para limitar o desenvolvimento das microalgas na fase lag. Entretanto, com exceção do cultivo controle e do meio com 20% de efluente hidropônico, que exibiram perfis semelhantes de curvas de crescimento (mas com valores diferentes) e mesma duração da fase log, os outros tratamentos apresentaram diferenças marcantes no padrão e duração das demais fases de crescimento.

Para o cálculo da taxa de crescimento e tempo de duplicação foram utilizados os valores de densidade celular correspondentes ao início e ao final da fase exponencial dos cultivos (Fase Log), conforme mostrado na Tabela 4.

Tabela 4: Parâmetros cinéticos de crescimento de *S. acuminatus* (taxa de crescimento - μ , tempo de duplicação - G e rendimento máximo - $R_{m\acute{a}x}$) e dias de duração da fase de crescimento exponencial (Log) no meio sintético ASM1 (Controle) e nos meios com diferentes concentrações de efluente hidropônico (Tratamentos com 20%, 30% e 40% de efluente, respectivamente).

	μ (d ⁻¹)	G (dias)	$R_{m\acute{a}x}$ (10 ³ .cél.mL ⁻¹)	Duração da Fase Log (dias)
Controle	0,23 ± 0,02 ^A	3,12 ± 0,27 ^B	7.269,63 ± 579,22 ^{AB}	2-12
20%	0,23 ± 0,01 ^A	2,97 ± 0,14 ^B	5.463,91 ± 721,18 ^B	2-12
30%	0,19 ± 0,01 ^A	3,65 ± 0,27 ^B	8.593,26 ± 853,81 ^{AB}	2-18
40%	0,11 ± 0,00 ^B	6,22 ± 0,20 ^A	9.267,59 ± 389,65 ^A	2-28

Valores de μ , G e $R_{m\acute{a}x}$ expressos em média ± erro padrão. Valores seguidos pela mesma letra, na mesma coluna, não diferem significativamente pelo teste t com correção de Bonferroni ($p < 0,05$).

Os cultivos controle e com 20% de efluente apresentaram fase exponencial de crescimento com 10 dias de duração, finalizando no 12^o dia de cultivo, a partir do qual se mantiveram na fase estacionária de crescimento até o final do experimento. Já o cultivo com 30% de efluente apresentou fase exponencial com duração de 16 dias, encerrando a mesma no 18^o dia de cultivo. Neste tratamento foi possível perceber o estabelecimento de uma pequena fase de redução do crescimento, entre o 18^o e o 20^o dia, a partir da qual o cultivo também permaneceu na fase estacionária. O cultivo com 40% de efluente foi o que apresentou maior duração da fase log (26 dias), permanecendo na mesma até o último dia do experimento e com tendência ao aumento de densidade (Fig. 9).

Segundo Lourenço (2006), quando algum componente torna-se limitante, a fase exponencial termina e verifica-se crescimento em taxas mais reduzidas, muitas vezes viabilizado pelo consumo de reservas celulares endógenas. No presente estudo, as diferenças observadas na duração da fase log das curvas de crescimento entre os tratamentos testados estiveram relacionadas, principalmente, à disponibilidade de nutrientes, a qual não foi limitante para o meio preparado com maior concentração de efluente hidropônico (40%), uma vez que apresentou crescimento exponencial até o final do cultivo.

Todos os parâmetros cinéticos de crescimento avaliados neste estudo apresentaram efeito de variância significativo entre as diferentes condições testadas (Tab. 4), sendo que o tratamento com 40% de resíduo hidropônico apresentou a menor taxa de crescimento (μ) e o maior tempo de duplicação (G), segundo o teste t com correção de Bonferroni ($p < 0,05$). Além disso, este mesmo cultivo se destacou em relação ao rendimento máximo celular ($R_{\text{máx}}$), que foi significativamente maior que a média do tratamento 20% e equivalente às médias do controle e do meio com 30% de efluente. Os cultivos controle e os meios com 20% e 30% de efluente não apresentaram diferenças estatísticas entre si para os três parâmetros cinéticos analisados ($p > 0,05$). Estes resultados podem ser compreendidos pelo fato da taxa de crescimento ter sido calculada no período correspondente à fase exponencial dos cultivos, levando-se em consideração a densidade celular e o tempo decorrido entre o final e o início desse intervalo (LOURENÇO, 2006). Dessa forma, o tempo de duração da fase exponencial de crescimento tem influência direta na taxa de crescimento e, conseqüentemente, no tempo de duplicação das culturas.

Ao final dos cultivos de *S. acuminatus* nas diferentes concentrações de efluente hidropônico e em meio sintético, observou-se que o tratamento com 40% de efluente apresentou valor de densidade celular ($947,49 \pm 38,96 \times 10^4 \text{ cél.mL}^{-1}$) significativamente maior ($p < 0,05$) que o meio controle ($747,70 \pm 57,92 \times 10^4 \text{ cél.mL}^{-1}$), entretanto não diferiu do cultivo com 30% de efluente ($870,41 \pm 26,68 \times 10^4 \text{ cél.mL}^{-1}$), em termos estatísticos. Por outro lado, a densidade final do cultivo com 20% de resíduo hidropônico ($540,29 \times 31,32 \times 10^4 \text{ cél.mL}^{-1}$) foi significativamente inferior às demais ($p < 0,05$), conforme mostrado na Figura 9.

Os resultados de crescimento da microalga testada nos meios com diferentes concentrações de efluente hidropônico de alface se mostraram muito interessantes, especialmente quanto ao rendimento máximo que eles podem atingir. Dentre os poucos trabalhos realizados com este tipo de efluente, destaca-se o de Bertoldi et al. (2008), que cultivaram a microalga *Chlorella vulgaris* em três diferentes concentrações de solução hidropônica residual de alface e em meio sintético BBM, durante 7 dias. Nele, os autores registraram maior densidade celular ($1010 \times 10^4 \text{ cél.mL}^{-1}$) no cultivo com 25% de solução residual, quando comparado aos cultivos com 50% de efluente e com efluente puro. Valores inferiores foram encontrados por Vendrúscolo (2009), que cultivou a microalga *Scenedesmus*

quadricauda em efluentes de biodigestão de aves e suínos em comparação ao meio padrão CHU ao longo de 14 dias. Neste estudo, o autor registrou pico máximo de crescimento celular de 103×10^4 cél.mL⁻¹ em meio CHU; 106×10^4 cél.mL⁻¹ em meio suíno bruto; e 133×10^4 cél.mL⁻¹ em meio avícola bruto. Por outro lado, Kim et al. (2007) cultivaram a microalga *Scenedesmus* sp. por 60 dias em resíduo suíno digerido com adição de nutrientes e obtiveram, no 15º dia de cultivo, concentração celular de aproximadamente 500×10^4 cél.mL⁻¹ e ao final do experimento a densidade celular alcançada foi de aproximadamente 2000×10^4 cél.mL⁻¹.

Baumgartner et al. (2013) realizaram o cultivo da mesma espécie utilizada neste estudo (*S. acuminatus*) e testaram quatro diferentes meios de cultivo propostos na literatura para este tipo de alga. Dentre eles, o meio MC (Medium for *Chlorella ellipsoidea*) mostrou melhor relação entre a biomassa produzida e o tempo de cultivo, apresentando taxas de crescimento e produtividade semelhantes aos maiores valores registrados neste trabalho. Valores similares também foram encontrados por Morais e Costa (2007), quando cultivaram *Scenedesmus obliquus* em três fotobiorreatores conectados em série, utilizando o meio MC no cultivo. No entanto, a taxa de crescimento máxima obtida pelos autores para *S. obliquus* (0,15 dia⁻¹) foi inferior à taxa de crescimento para a *S. acuminatus* registrada neste estudo no meio controle ASM1 (0,23 dia⁻¹) e nos meios com efluente hidropônico nas concentrações de 20% (0,23 dia⁻¹) e 30% (0,19 dia⁻¹). Ainda há na literatura outros registros com diferentes efluentes e grupos de microalgas testados, como o de Budiyo et al. (2014), que utilizaram vinhaça 0,8% e obtiveram taxa de crescimento de 0,15 dia⁻¹ para *Spirulina platensis*, valor semelhante ao encontrado por Morais e Costa (2007), supracitados.

Na Figura 10 é mostrada a variação da concentração de massa seca ao longo dos cultivos com os diferentes meios testados. Observa-se que houve incremento significativo em biomassa ($p < 0,05$), do primeiro ao último dia de cultivo, em todos os tratamentos. Apesar disso, o cultivo controle chegou ao final do experimento (28º dia) com valor médio de massa seca significativamente superior às médias atingidas pelos meios com diferentes concentrações de resíduo hidropônico ($p < 0,05$), os quais não apresentaram diferenças entre si ($p > 0,05$). As concentrações máximas de biomassa seca atingidas foram: $1,21 \pm 0,03$ g.L⁻¹ no controle; e $1,00 \pm 0,07$ g.L⁻¹; $0,91 \pm 0,04$ g.L⁻¹; e $0,85 \pm 0,04$ g.L⁻¹; nos tratamentos com 20%, 30% e 40% de efluente hidropônico, respectivamente.

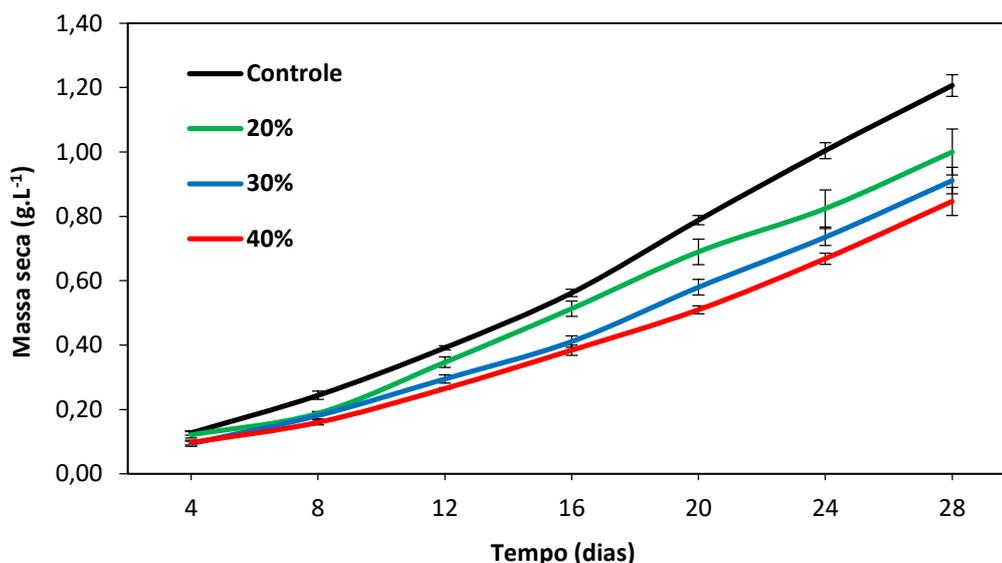


Figura 10: Curvas de biomassa seca do cultivo de *S. acuminatus* no meio sintético ASM1 (Controle) e nos meios com diferentes concentrações de efluente hidropônico (Tratamentos com 20%, 30% e 40% de efluente, respectivamente). Valores expressos em média \pm erro padrão (barras verticais).

A diferença observada entre os cultivos em meio com efluente hidropônico e em meio sintético, em termos de biomassa, pode estar associada às alterações no tamanho/volume das células produzidas nestes meios devido às diferentes concentrações nutricionais. Isso justificaria, por exemplo, o fato do meio com 40% de efluente de hidroponia ter apresentado menor biomassa seca em relação ao cultivo controle, mesmo tendo densidade celular significativamente maior (Fig. 9). Em meios de cultura com grande disponibilidade de nitrogênio as células tendem a se multiplicar, por outro lado, em meio com deficiência de nitrogênio as algas tendem a armazenar lipídeos e outros metabólitos, aumentando assim o tamanho da célula (LOURENÇO, 2006; HO et al., 2010). Isso explica o fato da biomassa seca do cultivo controle ter aumentado à medida que os nutrientes do meio de cultivo foram sendo consumidos. Esses dados corroboram com os encontrados por Illman et al. (2000), em que espécies de *Chlorella* spp. cultivadas com baixo teor de nitrogênio alcançaram maior produção de biomassa do que quando cultivadas em meio Watanabe.

Trabalhos utilizando águas residuárias com resultado semelhante foram relatados na literatura como os cultivos de *Botryococcus braunii*, *Dunaliella tertiolecta* e *Pleurochrysis carterae*, em água de efluente pré-tratado de indústria de carpetes, demonstrando ser esta água mais eficaz na produção de biomassa algal do que quando em meio sintético BG 11 (CHINNASAMY et al., 2010). No cultivo de *Isochrysis aff. galbana* foi mostrado que a produção de biomassa, a partir de meio a base de fertilizante agrícola, foi equivalente a produção em meio de cultivo sintético F2 (VALENZUELA-ESPINOZA et al., 2002).

Em estudos realizados com outros tipos de resíduos, valores menores de biomassa foram observados em relação aos registrados no presente trabalho. Woertz et al. (2009), por exemplo, utilizaram efluente da indústria de laticínios diluído a 10% como meio de cultivo para um mix de espécies de algas e nessa condição obtiveram 0,5 g.L⁻¹ de biomassa seca como melhor resultado no 6º dia de experimento. Entretanto, em diluição de 25%, eles obtiveram ganho de biomassa maior, chegando a 0,9 g.L⁻¹, no 13º dia de cultivo. Abou-Shanab et al. (2013) utilizaram resíduo suíno como meio de cultivo alternativo para o crescimento de diferentes microalgas, dentre elas *Scenedesmus obliquus*, e, após 20 dias de experimentação, a biomassa alcançou aproximadamente 0,53 g.L⁻¹.

Os valores de produtividade média de biomassa de *S. acuminatus* também foram calculados para os cultivos testados. Conforme os resultados mostrados na Figura 11, as produtividades médias dos meios com 20% e 30% de efluente hidropônico não apresentaram diferença significativa em relação ao controle e ao meio com 40% de efluente, entretanto, estes últimos foram significativamente diferentes entre si ($p < 0,05$).

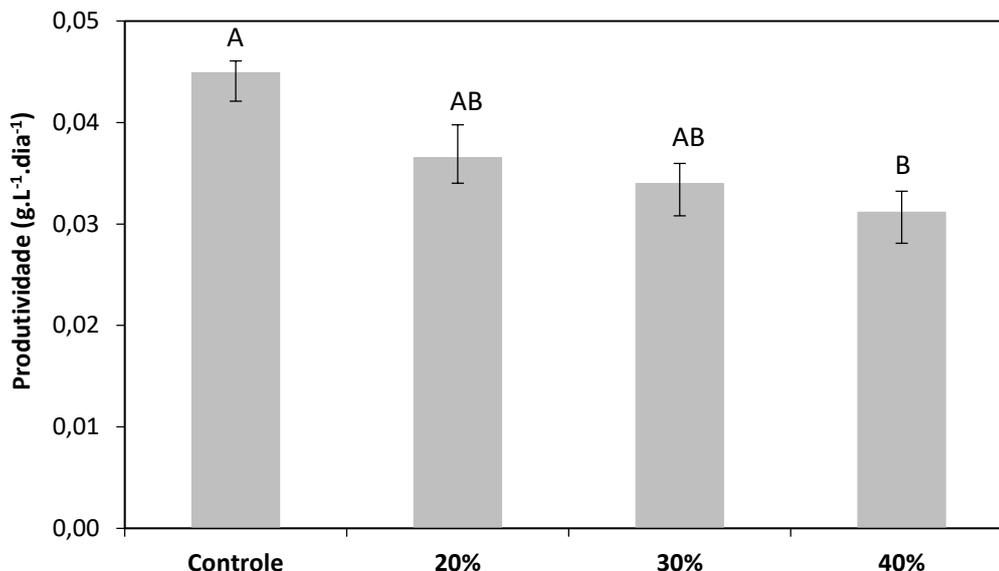


Figura 11: Produtividade média do cultivo de *S. acuminatus* no meio sintético ASM1 (Controle) e nos meios com diferentes concentrações de efluente hidropônico (Tratamentos com 20%, 30% e 40% de efluente, respectivamente). Valores expressos em média \pm erro padrão (barras verticais). Colunas com a mesma letra não diferem significativamente pelo teste t com correção de Bonferroni ($p < 0,05$).

A partir do estudo realizado por Baumgartner et al. (2013), foi possível verificar que os valores médios de produtividade registrados neste trabalho estão dentro da faixa de valores que os autores registraram para *S. acuminatus* em meio MC (0,02-0,06 g.L⁻¹.d⁻¹). Apesar disso, na literatura é possível encontrar valores de produtividade máxima muito superiores para microalgas do mesmo gênero, como os registrados por McGinn et al. (2012), que cultivaram *Scenedesmus* sp. em efluente secundário de esgoto (0,27 g.L⁻¹.d⁻¹), e por Bjornsson et al. (2013), cultivando *Scenedesmus* sp. em resíduos diluídos da digestão anaeróbica de esterco bovino e suíno (0,15 e 0,18 g.L⁻¹.d⁻¹, respectivamente).

Ressalta-se que neste estudo a cepa testada não passou pelo processo de aclimação aos novos meios com efluente hidropônico. Tal processo poderia melhorar ainda mais os resultados de crescimento e biomassa na segunda repicagem em relação à primeira. Segundo Wood et al. (2005) as culturas aclimatadas crescem mais rapidamente do que as não aclimatadas devido à seleção e adaptação das microalgas ao novo meio.

3.3 Concentração de pigmentos fotossintéticos

As concentrações dos pigmentos fotossintéticos avaliados nos diferentes meios de cultivo durante o experimento estão representadas na Figura 12 A, B e C.

Pode-se notar que a variação das diferentes curvas de pigmentos ao longo dos cultivos se assemelhou a das curvas de densidade celular (Fig. 9), podendo estar relacionadas às diferentes fases de crescimento. Tamburic et al. (2011) afirmaram que, no caso das algas verdes, a viabilidade celular pode ser diretamente relacionada com a síntese de pigmentos, tais como as clorofilas. No presente estudo, observou-se que houve incremento inicial mais rapidamente dos pigmentos no cultivo controle e nos meios com 20% e 30% de efluente hidropônico, quando comparados ao tratamento com 40% de efluente. Isso pode estar relacionado às diferentes taxas de crescimento que foram determinadas para estas culturas, sendo que o tratamento com maior concentração de efluente hidropônico apresentou menor taxa de crescimento e maior tempo de duplicação celular (Tab. 4), conforme discutido anteriormente.

Após o aumento inicial na concentração dos pigmentos, os mesmos sofreram variações até o final do experimento, entretanto, não foram verificadas diferenças significativas entre os cultivos para um mesmo dia ($p > 0,05$). O teste t com correção de Bonferroni mostrou diferença estatística somente no 4º dia de cultivo, quando o meio controle apresentou valores de clorofila *a*, *b* e carotenoides totais significativamente superiores ($p < 0,05$) aos dos meios com diferentes concentrações de efluente hidropônico, os quais não diferiram entre si. Esse resultado pode ter sido um reflexo da fase adaptativa dos cultivos, em que o controle exibiu maior incremento de biomassa, provavelmente, por apresentar o mesmo meio de cultivo (ASM1) utilizado no preparo dos inóculos.

O cultivo padrão apresentou maiores valores médios de concentração de clorofila *a* e carotenoides totais ao final do experimento (28º dia), ao passo que a maior média para a clorofila *b* se deu no 12º dia. Já o meio com 20% de efluente hidropônico apresentou os maiores picos dos três pigmentos analisados no 12º dia de cultivo. Nos meios com 30% e 40% de efluente, os maiores valores médios de clorofila *a*, *b* e carotenoides totais ocorreram no último dia de experimento.

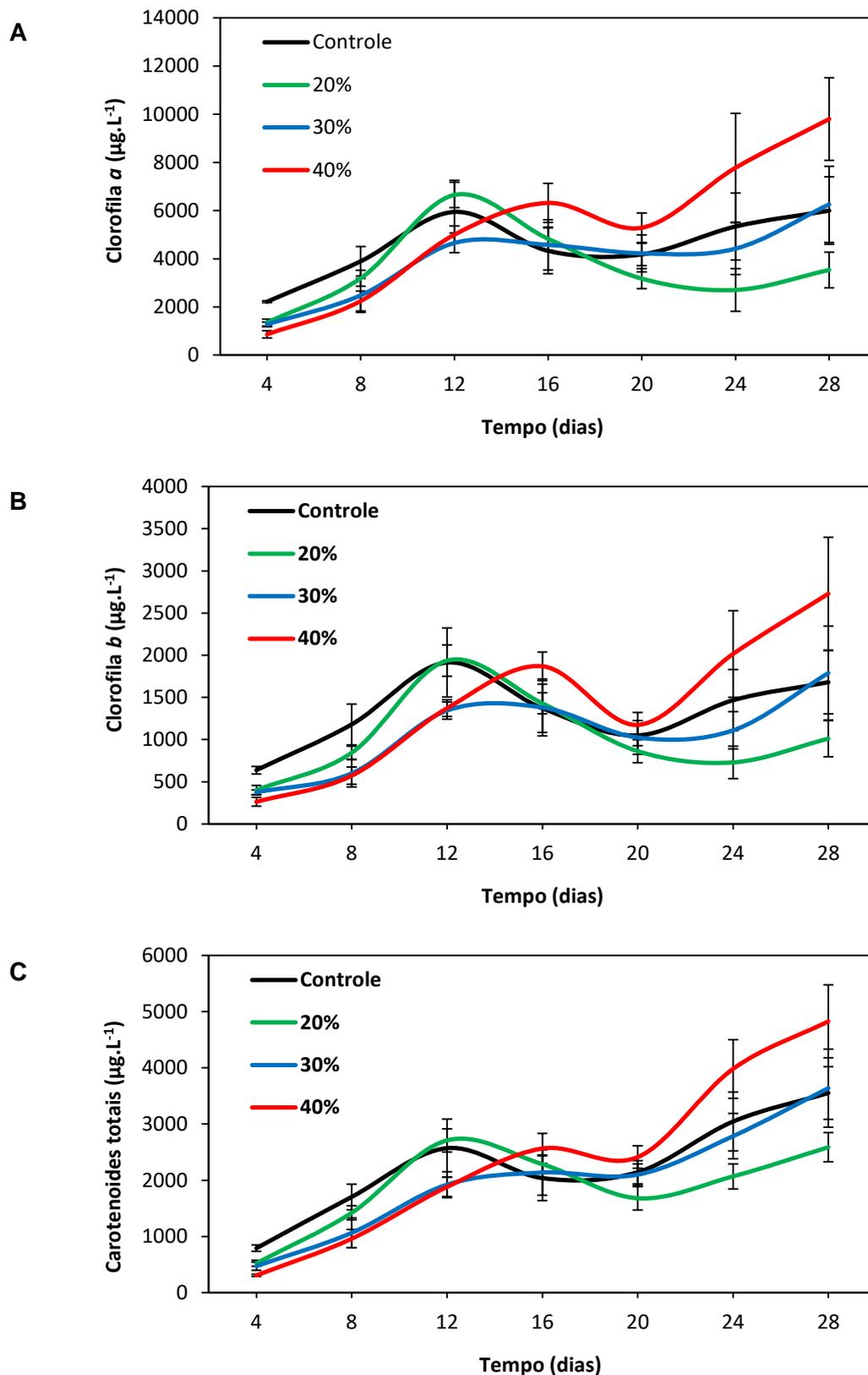


Figura 12: Concentrações de pigmentos fotossintéticos do cultivo de *S. acuminatus* no meio sintético ASM1 (Controle) e nos meios com diferentes concentrações de efluente hidropônico (20%, 30% e 40% de efluente, respectivamente) ao longo dos cultivos. A. Clorofila a. B. Clorofila b. C. Carotenoides totais. Valores expressos em média \pm erro padrão (barras verticais).

Apesar das pequenas variações observadas nos padrões das curvas, as concentrações das clorofilas *a* e *b*, bem como dos carotenoides totais, não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos testados do 8º ao 28º dia de cultivo. Resultado semelhante foi obtido para as concentrações de clorofilas *a* e *b* por Bertoldi et al. (2008), cultivando *Chlorella vulgaris* em meios com diferentes concentrações de solução hidropônica residual de alface. Segundo os referidos autores, a não existência de diferença significativa entre os cultivos se deve ao fato da taxa fotossintética não ter reduzido de forma significativa, apesar da redução de nitrogênio nos meios, como consequência das diluições. Syrett (1992) também observou padrão semelhante e concluiu que as células algais podem se recuperar das baixas concentrações de nitrogênio no meio, e que o conteúdo de clorofila aumenta após adaptação. Tal fato pode ter ocorrido nos meios com menores concentrações de nitrato, neste estudo, o que contribuiu para que chegassem ao final dos cultivos com as mesmas concentrações de pigmentos dos demais tratamentos.

As similaridades nas concentrações dos pigmentos entre os cultivos testados também confirmam o alto rendimento de biomassa nos resíduos. As concentrações médias de clorofila registradas neste estudo são maiores do que os resultados encontrados por Borges et al. (2007), por exemplo, que avaliaram o potencial de captura de carbono por dez espécies microalgais e encontraram concentrações de clorofila *a* variando de 34,5 a 965,4 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ no início dos cultivos. De acordo com os autores, a quantidade de clorofila *a* se correlaciona à saúde fisiológica das células e à capacidade fotossintética e de fixação de carbono por esses organismos. Diante dessas considerações, pode-se admitir que a biomassa de *S. acuminatus* cultivada em efluente hidropônico de alface apresentou-se fisiologicamente saudável, independente da diluição.

As diferentes composições dos meios de cultivo afetam diretamente a produção e o conteúdo celular de espécies de microalgas. Segundo Valenzuela-Espinoza et al. (2002), a clorofila *a* é um dos componentes celulares mais utilizados para estimar a biomassa em cultivos de microalgas, servindo como medida de crescimento, e, normalmente, apresenta alterações de seu conteúdo em função das diferentes concentrações de nutrientes no meio. Apesar dessa prerrogativa, os resultados de pigmentos fotossintéticos obtidos neste estudo indicaram que a cepa de *S. acuminatus*, testada em diferentes concentrações de efluente hidropônico,

não apresentou diferenças em termos de clorofila. Esse resultado corrobora o quanto *S. acuminatus* é resistente às variações ambientais, sendo, dessa forma, potencialmente interessante para o cultivo em larga escala para diferentes aplicações biotecnológicas, utilizando meios de cultura produzidos a partir de efluentes.

Segundo Valduga et al. (2009), os pigmentos produzidos por microrganismos, como as microalgas, têm ganhado cada vez mais espaço no mercado industrial de corantes, na aquicultura e na suplementação animal e humana. Apesar das clorofilas serem os pigmentos encontrados em maior quantidade nas microalgas, o maior interesse comercial ainda está nos carotenoides como o β -caroteno e a astaxantina (LOURENÇO, 2006). Do ponto de vista da saúde humana os carotenoides agem como antioxidantes, constituindo assim uma base protetora contra o estresse oxidativo (GUEDES et al., 2011). Por outro lado, as clorofilas também apresentam efeitos benéficos à saúde por suas propriedades anticancerígenas, efeitos anti-inflamatórios e antioxidativos, prevenindo o processo da aterosclerose, bem como doenças cardiovasculares aterotrombóticas (HSU et al., 2005; SIMONICH et al., 2008).

Diante das consideráveis quantidades de pigmentos produzidos por *S. acuminatus* em efluente hidropônico, pode-se dizer que existe um grande potencial de cultivo desta microalga em maior escala, visando suas aplicações biotecnológicas. Apesar dos valores não serem tão expressivos, quando comparados aos obtidos por microalgas já utilizadas para essa finalidade no mercado (como por exemplo *Dunaliella salina* e *Haematococcus pluvialis*), a redução nos custos com os meios de cultura pode tornar a produção economicamente viável, além de ser ambientalmente sustentável.

3.4 Proteínas hidrossolúveis, carboidratos e lipídeos totais

Os resultados obtidos para as análises de proteínas hidrossolúveis, carboidratos e lipídeos totais dos cultivos da microalga *S. acuminatus* em meios com diferentes concentrações de efluente hidropônico de alface e em meio sintético ASM1 estão representados na Figura 13.

O teste de variância seguido do teste t com correção de Bonferroni demonstrou haver diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos para todas as variáveis analisadas, indicando que as diferentes concentrações dos

meios com efluente hidropônico influenciaram a composição bioquímica da biomassa microalgal gerada.

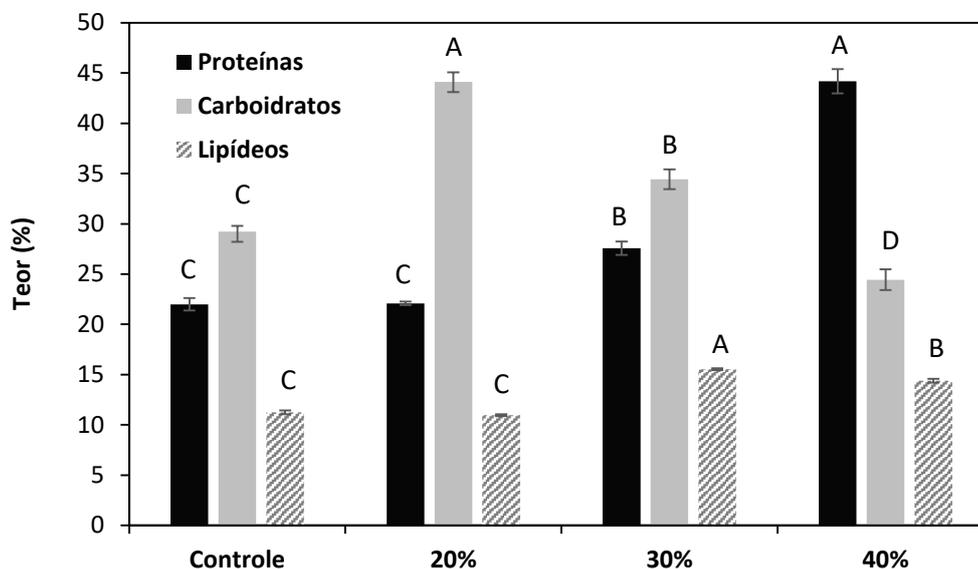


Figura 13: Teores de Proteínas, Carboidratos e Lipídeos na biomassa de *S. acuminatus* cultivado em meio sintético ASM1 (Controle) e nos meios com diferentes concentrações de efluente hidropônico (Tratamentos com 20%, 30% e 40% de efluente, respectivamente). Valores expressos em média \pm erro padrão (barras verticais). Colunas da mesma cor ou textura seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste t com correção de Bonferroni ($p < 0,05$).

Com relação aos teores de proteínas solúveis totais, o tratamento com 40% de efluente hidropônico apresentou teor significativamente maior na biomassa produzida (44,2%), quando comparado aos demais cultivos ($p < 0,05$). Na sequência, o meio com 30% de efluente apresentou percentual proteico médio de 27,6%, sendo este valor estatisticamente superior às médias encontradas no meio com 20% de efluente (22,1%) e no meio controle (22,0%), sendo que estes não diferiram significativamente entre si.

Sassi (2016), ao avaliar a qualidade nutricional de 12 cepas regionais de microalgas do Nordeste do Brasil, encontrou maior concentração de proteínas (37,7%) em *Scenedesmus acuminatus* cultivada em meio WC (GUILLARD; LORENZEN, 1972). Comparado aos resultados desta autora, pode-se inferir que o teor proteico registrado na presente pesquisa, para a mesma microalga em meio com 40% de efluente hidropônico, foi bastante expressivo. Da mesma forma, Bertoldi et al. (2008) encontraram elevado valor no teor de proteína bruta (50,5%)

em *Chlorella vulgaris*, também cultivada em solução hidropônica residual. Ge e Champagne (2016) verificaram que os maiores teores de proteínas foram registrados em meios com alto teor de nitrogênio em cultivos de *Chlorella vulgaris* em diferentes concentrações de esgoto doméstico. Estes autores constataram que meios com teores mais elevados de nitrogênio e fósforo propiciavam diminuição nas concentrações de carboidratos e aumento em proteínas, como também foi observado no presente estudo. No mesmo sentido, Li et al. (2011) demonstraram que as células de microalgas possuem um nível basal de amido em cultivos com baixas quantidades de compostos nitrogenados, mas em ambiente rico em nitrogênio as microalgas tendem a utilizar este nutriente para sintetizar mais proteínas, ácidos nucleicos e fosfolipídeos e promover altas taxas de fixação de dióxido de carbono.

Da mesma forma que os resultados encontrados no presente estudo, na literatura existem muitos outros trabalhos que relacionam o incremento do teor proteico das microalgas com a maior disponibilidade de nitrogênio nos cultivos (BERTOLDI et al., 2008; CAKMAK et al., 2012; CONVERTI et al., 2009; COURCHESNE et al., 2009; FUENTES-GRÜNEWALD et al., 2013; GE; CHAMPAGNE, 2016; HO et al., 2014; LI et al., 2008; LIANG et al., 2012; MSANNE et al., 2012; WANG et al., 2014). Dos principais macronutrientes necessários para o crescimento algal, o nitrogênio é importante por ser constituinte de diversas substâncias do metabolismo primário, sendo que a abundância deste elemento no meio tende a aumentar as quantidades de proteínas e clorofilas nas células e sua carência, tende a diminuir as taxas de crescimento celular (BERTOLDI et al., 2008; LOURENÇO, 2006).

O elevado percentual de proteínas em relação aos demais compostos orgânicos obtidos na biomassa final do cultivo com maior concentração de efluente hidropônico (40%) confirma sua potencialidade biotecnológica, como o uso em rações animais, por exemplo. Esses alimentos devem conter quantidades adequadas de proteínas, sendo a complementação com microalgas considerada promissora, pois, além das proteínas, elas carregam consigo carotenoides e ácidos graxos (BOROWITZKA, 2014; LUM et al., 2013).

Efeito inverso ao do teor de proteínas foi observado para a concentração de carboidratos totais, sendo esta significativamente maior no meio com 20% de efluente hidropônico (44,1%) quando comparado aos demais tratamentos ($p <$

0,05). Em contrapartida, o cultivo com 40% de efluente apresentou o menor teor médio de carboidratos (24,4%), mesmo quando comparado ao meio controle (29,2%). Esta tendência corrobora com o estudo de Illman et al. (2000), em que a maior produção de carboidratos foi obtida quando *Chlorella vulgaris* foi cultivada em concentrações menores de nitrogênio. Além destes, Msanne et al. (2012) e Cakmak et al. (2012), em ensaios realizados com cepas de *Chlamydomonas reinhardtii*, observaram aumento significativo no teor de carboidratos totais na biomassa cultivada com supressão total de nitrogênio. Segundo Ho et al. (2014), a depleção de nitrogênio força o metabolismo das microalgas a diminuir os teores de proteínas ou peptídeos, aumentando assim o percentual de compostos ricos em energia tais como carboidratos e lipídios, ou polissacarídeos e ácidos graxos, corroborando com os resultados apontados neste estudo.

Os carboidratos presentes nas microalgas apresentam interesse não apenas para fabricação de suplementos e rações animais, mas também para a produção de biocombustível, por ser importante fonte de carbono para a fermentação (CHEN et al., 2013). Os valores de carboidratos totais obtidos com a utilização do efluente de hidroponia foram bastante satisfatórios considerando os teores registrados em outros estudos, como o de Sassi (2016), que encontrou concentração de 14,5% para a mesma microalga em meio sintético WC, sendo este valor inferior ao menor valor obtido no presente estudo.

Em termos de teores lipídicos, o maior valor foi registrado para o cultivo com 30% de resíduo hidropônico (média de 15,5%), sendo este significativamente diferente das médias dos demais cultivos ($p < 0,05$). O meio controle e o cultivo com 20% de efluente apresentaram valores médios de 11,2% e 10,9%, respectivamente, não havendo diferença significativa entre eles ($p > 0,05$). Entretanto, os mesmos foram estatisticamente inferiores à média registrada para o tratamento com 40% de resíduo hidropônico (14,4%).

Os menores teores lipídicos apresentados pela microalga no meio controle e no meio com 20% de efluente podem ser explicados pelo fato da recuperação de biomassa ter sido realizada no momento em que estes cultivos encontravam-se na fase estacionária tardia de crescimento, em relação aos demais tratamentos para o mesmo dia (Fig. 9). Alguns trabalhos relatam a importância das diferentes fases do crescimento e o comportamento dos componentes celulares durante essas

fases (HU et al., 2008; LV et al., 2010). Geralmente, são apresentados maiores teores lipídicos no início da fase estacionária (LV et al., 2010). Com o passar do tempo, as células que haviam acumulado lipídeo, como material de reserva, começam a utilizar esse componente celular, devido a diminuição de nutrientes no meio. Isso explica os maiores teores lipídicos encontrados nos tratamentos com maiores concentrações de resíduo hidropônico (30% e 40%), em relação ao controle e ao meio com 20% de efluente. Além disso, é possível perceber o significativo aumento da fração lipídica no cultivo com 30% de efluente, quando comparado ao meio com 40% do resíduo, evidenciando a relação que esta variação apresenta com a redução na concentração de nutrientes. De acordo com Fuentes-Grünewald et al. (2012), a síntese de lipídios, principalmente na forma de triacilglicerídios, ajuda a dissipar o excesso de energia fotossintética e, por ser uma molécula de armazenamento, utiliza essa energia para manter os requisitos metabólicos específicos para o crescimento celular.

No estudo de Sassi (2016), para a mesma espécie (*S. acuminatus*) em meio WC, o autor registrou menor concentração de lipídeos totais (6,9%) em relação aos valores obtidos na presente pesquisa. Entretanto, no mesmo estudo, a autora encontrou valores superiores a 25% de teor lipídico em cepas de *Chlorococcum* sp. e *Amphidinium carterae*. Na literatura há trabalhos com diferentes espécies cultivadas em outros tipos de resíduos em que os teores de lipídeos totais se encontram dentro ou próximos da faixa de valores registrados neste estudo (10,9-15,5%). Wu et al. (2014), por exemplo, utilizando esgoto doméstico no cultivo de microalgas, verificaram produtividade lipídica inferior a 10%. Por outro lado, Li et al. (2011), utilizando efluente urbano como meio de cultivo, e Wang et al. (2010), com resíduo de laticínio digerido, registraram valores de 11% e 10,1% de lipídeos, respectivamente, em *Chorella* sp.. Em águas residuárias industriais, Wu et al. (2012) registraram 18,4% de lipídeos em *Chlamydomonas* sp..

O experimento realizado mostrou haver um acréscimo significativo no conteúdo de proteínas devido ao aumento da concentração de resíduo hidropônico nos meios de cultivo, ao passo que houve decréscimo no teor de açúcares nos mesmos. Além disso, o ensaio evidenciou máxima concentração lipídica e maior equilíbrio entre os compostos orgânicos na concentração intermediária de efluente testada. Tais resultados são extremamente interessantes, pois indicam que, dependendo da concentração de efluente hidropônico utilizada nos meios de

cultivo, é possível direcionar o metabolismo dos nutrientes para a produção do composto orgânico desejado. Segundo Fuentes-Grünewald et al. (2013), a estratégia de esgotamento de nutrientes é amplamente usada, a fim de se obter concentrações mais elevadas de lipídeos e/ou carboidratos em diversas espécies de microalgas visando incrementar a produtividade do cultivo e reduzir os custos de produção (CONVERTI et al., 2009; LI et al., 2008). Na indústria de biocombustíveis, por exemplo, os lipídeos de microalgas podem ser utilizados para a produção de biodiesel, enquanto os carboidratos são excelentes substratos para produção de bioetanol (CHOI et al., 2010).

3.5 Perfil de ésteres metílicos de ácidos graxos

A composição dos ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME - *Fatty Acids Methyl Esters*) extraídos da biomassa de *S. acuminatus* obtida ao final do experimento, bem como os teores de insaturações e o total de ésteres presentes em cada cultivo estão relacionados na Tabela 5. A partir da análise do perfil de FAME foram identificados ácidos graxos com cadeias carbônicas variando de C14 a C22, saturados e insaturados, com 1 a 3 insaturações.

Segundo Hu et al. (2008), o conteúdo e a composição de ácidos graxos em microalgas são específicos para cada espécie, predominando, em geral, uma mistura de ácidos graxos insaturados: palmitoleico (C16:1), oleico (C18:1), linoleico (C18:2) e linolênico (C18:3); e ácidos graxos saturados: palmítico (C16: 0) e esteárico (C18:0) (ABOUSHANAB et al., 2013). Esta mesma composição foi encontrada nos cultivos avaliados no presente estudo, com variações nos teores específicos de cada éster, em função das diferentes concentrações de efluente hidropônico utilizadas para compor os tratamentos (Fig. 14).

Os ácidos graxos com maior representatividade, considerando todos os tratamentos, foram o ácido graxo oleico (13,23-27,44%), palmítico (19,43-24,51%), linolênico (15,03-19,52%) e linoleico (11,85-13,72%), conforme evidenciado na Figura 14. Tal composição para *S. acuminatus* corrobora com a literatura, uma vez que esta aponta que as clorofíceas apresentam predominância destes mesmos ácidos graxos. Mishra et al. (2015), por exemplo, verificaram que a clorofíceia do gênero *Chlamydomonas* é caracterizada por sintetizar ácidos graxos de cadeia curta a média, sendo que dentre esses últimos se destacam principalmente os

ácidos palmítico, oleico e linolênico. Essa composição também foi constatada para a clorofícea *Scenedesmus obliquus* no estudo de Salama et al. (2013).

Tabela 5: Perfil de Ésteres Metílicos de Ácidos Graxos (% do total de FAME) na biomassa de *S. acuminatus* cultivado em meio sintético ASM1 (Controle) e nos meios com diferentes concentrações de efluente hidropônico (Tratamentos com 20%, 30% e 40% de efluente, respectivamente).

FAME	Controle	20%	30%	40%
Mirístico (C14:0)	0,49 ^A	0,45 ^{AB}	0,31 ^B	ND
Miristoleico (C14:1)	0,23 ^A	0,15 ^A	0,23 ^A	0,16 ^A
Pentadecanoico (C15:0)	0,21 ^A	0,22 ^A	0,20 ^A	0,17 ^A
Pentadecenoico (C15:1)	1,91 ^C	1,75 ^C	3,54 ^B	5,06 ^A
Palmítico (C16:0)	23,39 ^{AB}	24,51 ^A	21,59 ^{BC}	19,43 ^C
Palmitoleico (C16:1)	0,84 ^{AB}	0,62 ^B	0,74 ^{AB}	1,10 ^A
Hexadecadienoico (C16:2)	1,26 ^C	0,95 ^D	1,61 ^B	2,06 ^A
Hexadecatrienoico (C16:3) ω-3	3,23 ^C	2,46 ^D	4,57 ^B	5,84 ^A
Heptadecenoico (C17:1)	4,59 ^C	5,06 ^C	6,32 ^B	7,46 ^A
Estearico (C18:0)	1,47 ^A	1,63 ^A	1,20 ^B	1,00 ^B
Oleico (C18:1) ω-9	26,24 ^A	27,44 ^A	18,94 ^B	13,23 ^C
Linoleico (C18:2) ω-6	13,15 ^A	11,85 ^B	13,72 ^A	13,71 ^A
Linolênico (C18:3) ω-3 + ω-6	15,03 ^C	16,10 ^{BC}	17,56 ^{AB}	19,52 ^A
Erúcido (C22:1)	1,91 ^A	1,20 ^A	1,92 ^A	1,58 ^A
OUTROS	6,03 ^C	5,61 ^C	7,55 ^B	9,69 ^A
SFA	25,57 ^A	26,80 ^A	23,30 ^B	20,60 ^C
MUFA	35,73 ^A	36,23 ^A	31,69 ^B	28,58 ^B
DUFA	14,41 ^B	12,80 ^C	15,33 ^A	15,78 ^A
TUFA	18,26 ^C	18,56 ^C	22,13 ^B	25,36 ^A
Ésteres totais (mg.g⁻¹ms)	60,6 ^A	64,3 ^A	57,0 ^{AB}	47,8 ^B

Médias seguidas pela mesma letra, na mesma linha, não diferem significativamente pelo teste t com correção de Bonferroni ($p < 0,05$). SFA - ácidos graxos saturados. MUFA - ácidos graxos monoinsaturados. DUFA - ácidos graxos di-insaturados. TUFA - ácidos graxos tri-insaturados. ND - Não Detectado na amostra. ms - massa seca. ω -3 - ômega 3. ω -6 - ômega 6. ω -9 - ômega 9.

A composição dos FAME na biomassa microalgal variou de forma significativa ($p < 0,05$) no que diz respeito ao número de insaturações (Tab. 5).

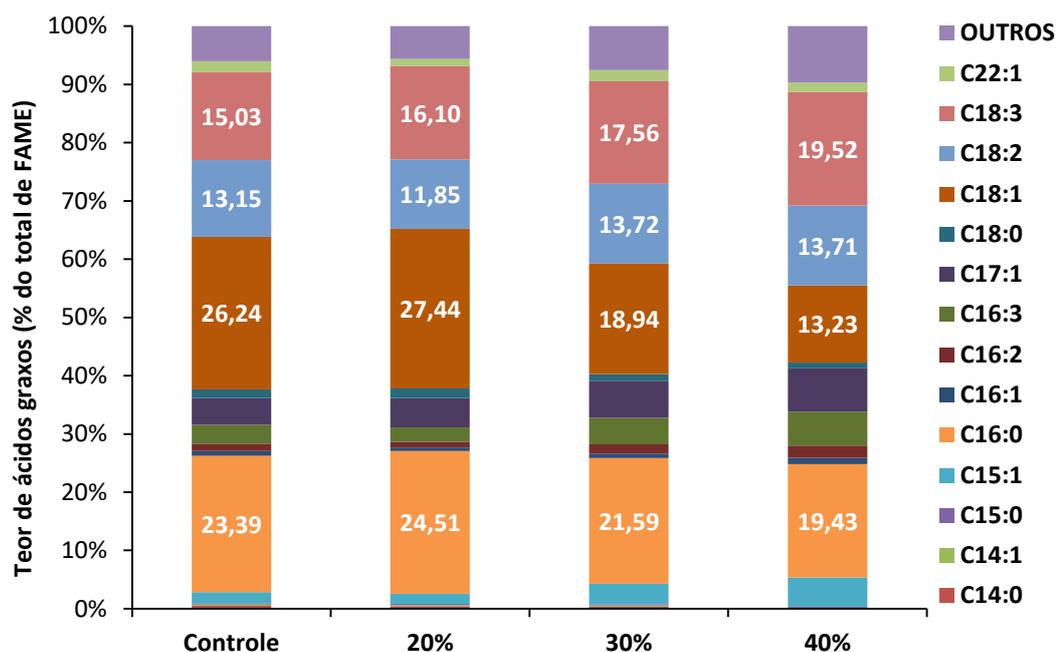


Figura 14: Perfil de Ésteres Metílicos de Ácidos Graxos (% do total de FAME) na biomassa de *S. acuminatus* cultivado em meio sintético ASM1 (Controle) e nos meios com diferentes concentrações de efluente hidropônico (Tratamentos com 20%, 30% e 40% de efluente, respectivamente).

Entre os tratamentos, as concentrações dos ácidos graxos saturados (SFA), monoinsaturados (MUFA), di-insaturados (DUFA) e tri-insaturados (TUFA) variaram entre 20,60-26,80%, 28,58-36,23%, 12,80-15,78% e 18,26-25,36%, respectivamente. Tanto no cultivo controle quanto nos tratamentos com as diluições do efluente hidropônico, os MUFA foram a fração que apresentou maior contribuição na composição do perfil de FAME. O cultivo controle e o tratamento com 20% de efluente apresentaram maiores valores médios de MUFA (35,73% e 36,23%, respectivamente) e foram significativamente diferentes ($p < 0,05$) dos teores encontrados nos cultivos com 30% e 40% de efluente hidropônico (31,69% e 28,58%, respectivamente).

Dentre os ésteres monoinsaturados, o ácido oleico (C18:1) se destacou no meio controle e no tratamento com 20% de efluente, contribuindo com percentuais de 26,24% e 27,44% do total de FAME, respectivamente. Esses valores foram significativamente superiores aos valores registrados para os cultivos com 30% e 40% de resíduo hidropônico (18,94% e 13,23%, respectivamente). Considerando os ácidos graxos saturados, o ácido palmítico (C16:0) foi o éster de maior teor na composição dos perfis de FAME. Segundo D`oca et al. (2011), este ácido graxo

apresenta predominância na constituição do óleo da maioria das microalgas. O cultivo com 20% de efluente hidropônico apresentou o maior percentual de ácido palmítico (24,51%), sendo estatisticamente igual ao do cultivo controle (23,39%) e superior aos percentuais dos tratamentos com 30% (21,59%) e 40% de efluente (19,43%). O ácido palmítico é reconhecido por sua vasta aplicação na produção de cosméticos (MOHAN et al., 2011) e nos últimos anos vem sendo apontado como um novo e específico inibidor do HIV-1 (LIN et al., 2011). Esse ácido também pode ser utilizado como surfactante em produtos de limpeza, sendo sua principal fonte a palma (dendê) que produz cerca de 40% (ZAMBIAZI et al., 2007).

Na pesquisa de Sassi (2016), envolvendo 12 cepas de microalgas regionais do Nordeste brasileiro, a autora descreveu o perfil de FAME de *S. acuminatus*, destacando-a como uma das microalgas com maior teor de ácido oleico (31,90%) e palmítico (31,50%). No presente estudo os percentuais destes ésteres, em todos os tratamentos, estiveram abaixo dos valores obtidos pela referida autora, apesar de terem sido os mais representativos na biomassa microalgal, conforme mostrado na Tabela 5 e Figura 14. Dentre os ácidos insaturados, também se destacaram nos cultivos realizados neste estudo os ácidos graxos linoleico (C18:1) e linolênico (C18:3). Variações nos teores de ácido palmítico (C16:0), oleico (C18:1) e linolênico (C18:3) foram observadas por Wu et al. (2012) ao longo do cultivo de *Chlamydomonas* sp. em águas residuais industriais.

A presença dos ácidos graxos linoleico e linolênico na biomassa de *S. acuminatus* também possibilita uma série de aplicações biotecnológicas. Segundo Derner et al. (2006), esses ácidos podem ser destinados a indústrias alimentícias para serem utilizados como aditivos alimentares, auxiliando na prevenção e tratamento de uma série de doenças cardiovasculares, da aterosclerose e da arritmia, da redução da pressão arterial, da redução dos níveis de colesterol e triglicerídeos no plasma, da artrite reumatoide, do câncer, além de serem aparentemente essenciais na nutrição infantil e no desenvolvimento cerebral. Se por um lado esses ácidos graxos são interessantes do ponto de vista nutracêutico e farmacêutico, por outro, a elevada concentração dos mesmos na biomassa microalgal pode comprometer sua utilização para a produção de biodiesel.

Segundo Chisti (2007), o biodiesel produzido a partir de óleos de microalgas é, provavelmente, a única fonte renovável capaz de substituir o diesel derivado do petróleo e suprir sua demanda no ramo dos transportes. Entretanto, para a

utilização desse óleo se tornar viável, sua composição de ésteres metílicos precisa cumprir algumas exigências que garantam a qualidade final do biodiesel produzido (RAWAT et al., 2013). As normativas europeias EN 14214 para biodiesel destinado ao uso nos transportes e EN 14213 do biodiesel como óleo de aquecimento, estipulam que o teor máximo de TUFA aceitável, principalmente o ácido graxo linolênico, é de 12%; e de 1% para PUFA (ácidos graxos poli-insaturados com 4 ou mais insaturações) (KNOTHE et al., 2006). Neste estudo, nenhum dos perfis de FAME dos cultivos testados atenderia a normativa, quanto ao teor de TUFA, por outro lado não foram identificadas espécies de PUFA em nenhum dos tratamentos.

As principais propriedades do biodiesel influenciadas diretamente pela composição de ácidos graxos no óleo são: o número de cetano, viscosidade, ponto de entupimento a frio, estabilidade oxidativa e índice de iodo (BOAMAR, 2010; FRANCO et al., 2013). De acordo com os parâmetros de qualidade do biodiesel, é interessante cultivar microalgas com elevado teor de ácidos graxos, preferencialmente saturados e monoinsaturados, além de baixa quantidade de poli-insaturados. Em relação às insaturações, quanto maior o número, menos estável o biodiesel à oxidação. Dessa forma, para que se tenha um biodiesel de alta qualidade são necessários altos teores de ácidos graxos saturados e monoinsaturados, visto que essa composição melhora a estabilidade do biodiesel frente à oxidação, o que resulta em aumento da vida útil do biocombustível (BAUMGÄRTNER et al., 2013; GARCIA et al., 2015; KNOTHE et al., 2009; KNOTHE, 2005). Ácidos graxos com menor número de insaturações apresentam também maior número de cetano, proporcionando melhor qualidade à combustão.

Neste trabalho os perfis de FAME que mais se aproximaram das condições ideais para compor o biodiesel foram o do cultivo com meio sintético e com 20% de efluente hidropônico, os quais apresentaram teores significativamente maiores de MUFA e menores concentrações de TUFA e DUFA (Tab. 5). Por outro lado, os tratamentos com 30% e 40% de efluente hidropônico apresentaram alto grau de insaturação, devido a redução dos SFA e MUFA, com concomitante aumento dos teores de DUFA e TUFA. Estes perfis contribuem para a formação de um biodiesel com baixa estabilidade oxidativa, levando à formação de depósitos e incrustações que podem ocasionar o entupimento do sistema de injeção. Entretanto, favorece a fluidez do combustível e melhora a propriedade de viscosidade e entupimento de filtro a frio, devido ao ponto de fusão dos ácidos graxos insaturados serem menores

que dos ácidos saturados, não precipitando com facilidade em regiões de clima frio (GARCIA et al., 2015; BAUMGÄRTNER et al., 2013; NASCIMENTO et al., 2013; BOAMAR, 2010).

Além da potencial aplicação na área de biocombustíveis, as microalgas também são fontes primárias de ácidos graxos que constituem os ômega de alto valor nutricional utilizados para aplicações diversas na indústria nutracêutica, tais como aditivos para leite de formulação infantil e no enriquecimento de ovos, através da adição da biomassa rica em ômega na ração de frangos (PULZ; GROSS, 2004). Além disso, alguns ômega, como o ω -3, são fundamentais para prevenção de doenças cardiovasculares e aterosclerose (GÓMEZ-CORTÉS et al., 2016). Com relação ao teor de ômega (somatório de ω -3, ω -6 e ω -9), todos os cultivos realizados neste estudo apresentaram percentual acima de 50% em sua composição de FAME. Isso indica um potencial elevado para ser utilizado na indústria de alimentos, que agregado ao biodiesel, reforça a possibilidade de produção segundo o conceito de biorrefinaria (CALIXTO, 2016).

Apesar de *S. acuminatus* ter apresentado perfis de FAME interessantes do ponto de vista biotecnológico, a quantidade de ésteres totais na biomassa produzida foi baixa, comprometendo a sua aplicação para a produção de biodiesel nas condições testadas. As maiores concentrações médias de ésteres totais foram registradas no cultivo controle ($60,6 \text{ mg.g}^{-1}$) e no meio com 20% de efluente hidropônico ($64,3 \text{ mg.g}^{-1}$), conforme mostrado na Tabela 5. Estes resultados não diferiram entre si, entretanto, foram estatisticamente superiores a do tratamento com 40% de efluente (47,8%) e equivalentes a do cultivo com 30% de efluente (57,0%). Dados da literatura evidenciam teores de ésteres muito variados em diferentes espécies, entretanto, na maioria delas os valores reportados ultrapassam os encontrados neste estudo. Soares et al. (2014), por exemplo, registraram valores de ésteres de $50,2 \text{ mg.g}^{-1}$ em *Chlorella* sp. e $636,4 \text{ mg.g}^{-1}$ em *Chaetoceros muelleri*. Menezes et al. (2013) reportaram teores de ésteres entre 198 a 422 mg.g^{-1} , superior aos $196,9 \text{ mg.g}^{-1}$ encontrado na soja, para *Choricystis* sp., *Monoraphidium komarkovae*, *Kirchneriella lunaris*, e *Tetranephris brasiliensis*, concluindo que estas espécies apresentam potencial para produção de biodiesel. Em nenhum dos cultivos realizados no presente estudo, incluindo o cultivo com meio sintético, produziu-se biomassa com teor de ésteres que superasse ou se aproximasse ao valor obtido para a soja, indicando produtividade reduzida de biodiesel a partir de

S. acuminatus. Entretanto, cabe ressaltar que esta espécie apresentou excelente potencial como fonte de proteínas, carboidratos, lipídeos, clorofilas e carotenoides, além de conter ácidos graxos de enorme valor nutricional (ômega), indicando um mercado muito promissor na indústria de alimentos funcionais.

3.6 Remoção de nutrientes e redução da condutividade elétrica

Após a separação da biomassa microalgal, no 28º dia, a composição do meio de cultivo foi avaliada em relação aos teores de ortofosfato, nitrato e condutividade elétrica para avaliação do efeito biorremediativo da microalga nos meios com diferentes concentrações do efluente hidropônico, bem como no controle com meio sintético ASM1. Na Tabela 6 são apresentados os percentuais de remoção de ortofosfato e nitrato e a redução da condutividade elétrica nos diferentes tratamentos.

Tabela 6: Percentual de remoção de nutrientes (ortofosfato - PO_4^{3-} - e nitrato - NO_3^-) e de redução da Condutividade Elétrica (CE) ao final dos cultivos no meio sintético ASM1 (Controle) e nos meios com diferentes concentrações de efluente hidropônico (Tratamentos com 20%, 30% e 40% de efluente, respectivamente).

	% Remoção PO_4^{3-}	% Remoção NO_3^-	% Redução CE
Controle	99,68 ± 0,02 ^B	92,92 ± 3,67 ^{BC}	32,93 ± 2,26 ^B
20%	99,86 ± 0,01 ^A	95,38 ± 0,47 ^C	28,75 ± 13,72 ^{AB}
30%	99,84 ± 0,02 ^A	98,11 ± 0,25 ^{AB}	47,57 ± 0,87 ^A
40%	99,80 ± 0,00 ^A	98,67 ± 0,17 ^A	54,42 ± 2,99 ^A

Valores expressos em média ± erro padrão. Valores seguidos pela mesma letra, na mesma coluna, não diferem significativamente pelo teste t com correção de Bonferroni ($p < 0.05$).

Os cultivos de *S. acuminatus* se mostraram muito eficientes na absorção dos nutrientes, uma vez que chegaram ao final do experimento apresentando elevado percentual de remoção dos mesmos (> 90%). Os percentuais de remoção de ortofosfato foram significativamente maiores ($p < 0,05$) nos tratamentos com 20%, 30% e 40% de resíduo hidropônico (99,86%, 99,84% e 99,80%, respectivamente), quando comparados ao meio controle (99,69%), e não diferiram entre si. Para o percentual de remoção de nitrato, o tratamento com 40% de efluente apresentou a maior média (98,67%), entretanto, não diferiu significativamente da média do cultivo

com 30% de efluente (98,11%). Já o cultivo controle apresentou menor média de percentual de remoção de nitrato (92,92%), sendo estatisticamente igual à média do tratamento com 20% de resíduo hidropônico (95,38%).

Segundo Esteves (2011), a condutividade elétrica é a capacidade de uma solução em conduzir corrente elétrica em função dos íons presentes nela, se constituindo em um parâmetro interessante de ser avaliado, em termos de tratamento de águas residuárias, visto que varia de acordo com as concentrações de macro e micronutrientes dissolvidos no meio. No presente estudo, o percentual de redução desta variável permitiu estimar, indiretamente, o quanto *S. acuminatus* puderam assimilar os sais minerais dissolvidos em cada meio de cultivo avaliado. O tratamento com 40% de efluente hidropônico apresentou redução média de condutividade de 54,42%, não exibindo diferença significativa em relação aos cultivos com 30% e 20% de efluente, os quais tiveram médias de 47,57% e 28,75%, respectivamente. Já o cultivo controle apresentou média de redução de condutividade de 32,93%, sendo estatisticamente equivalente à média do meio com 20% de efluente ($p > 0,05$). Os maiores valores de remoção de nutrientes e redução da condutividade elétrica nos tratamentos com maiores concentrações de efluente hidropônico podem estar relacionados às diferentes fases de crescimento entre os cultivos ao final do experimento, uma vez que o controle e o tratamento 20% se encontravam numa fase estacionária mais tardia, em relação aos demais cultivos.

Dentre os poucos trabalhos com o mesmo tipo de efluente, destaca-se o de Bertoldi et al. (2007), que avaliaram a biorremoção de nitrogênio e fósforo pela microalga *Chlorella vulgaris* cultivada em três diferentes concentrações de solução hidropônica residual de alface. Nele, os autores obtiveram percentuais de remoção de nitrato, que variaram de 80,5% a 87,0%, e de fósforo total, que variaram de 43,1% a 51,9%. A eficiência de remoção destes e de outros nutrientes também foi avaliada no trabalho realizado por Wang et al. (2010). Nele, os autores realizaram experimentos com a microalga *Chlorella* sp. em meios de cultivo alternativos preparados com efluente suíno biodigerido em diferentes diluições, sendo uma delas 10%. As remoções de nitrogênio total e fosfato relatadas foram da ordem de 82,5% e 70,1%, respectivamente. No presente estudo, pode-se perceber que os percentuais de remoção de nitrato e fosfato em todos os meios testados foram superiores aos registrados por Bertoldi et al. (2007) e Wang et al. (2010). No trabalho desenvolvido por Woertz et al. (2009), com resíduo proveniente da

indústria de laticínios diluídos a 10% e 25% com mix de microalgas (dentre elas a *Scenedesmus* sp.), os autores obtiveram remoção de 96% de nitrogênio amoniacal e mais de 99% de fosfato. Elevados percentuais de remoção de nitrogênio e fósforo também foram encontrados por Chinnasamy et al. (2010), em *Chlamydomonas*, *Chlorella* e *Scenedesmus* sp., e por Lim et al. (2010), em *Chlorella vulgaris* em cultivos realizados com efluentes têxteis diluídos. Na literatura há ainda outros estudos em que o crescimento de microalgas em diferentes tipos de efluentes e a efetividade de remoção de nutrientes foram demonstrados (HERNANDÉZ et al., 2016; MATAMOROS et al., 2015; WANG et al., 2016). Alguns trabalhos têm sido sugeridos no sentido de aprimorar o processo de biorremediação realizando o tratamento biológico conjugado, que utiliza o consórcio de microrganismos (bactérias e microalgas) (MUÑOZ; GUIEYSSE, 2006; PANIAGUA-MICHEL; GARCIA, 2003; TOI et al., 2014; VAN DEN HENDE et al., 2014).

Considerando que um dos principais gargalos no uso de microalgas para a produção de biodiesel é o elevado custo de produção (GRIMA et al., 2003), a busca por meios de cultivo alternativos que diminuam os gastos de geração de biomassa por espécies com elevada produtividade de óleos possibilita tornar o processo economicamente mais viável (CHISTI, 2007). Desse modo, a incorporação de efluentes como meios alternativos aos cultivos de microalgas pode favorecer duplamente a cadeia produtiva do biodiesel, aumentando a eficácia da biorremediação (minimizando impactos ambientais) e incrementando a produção de biomassa, que poderia ser destinada à produção de mais biodiesel.

Os dados obtidos para os cultivos em meios com efluente hidropônico mostraram eficiência na remoção de nitrogênio e fósforo por *S. acuminatus*, indicando que não haveria a necessidade de realizar grande diluição do efluente hidropônico para a realização da biorremoção. Além disso, o crescimento efetivo da microalga testada demonstra seu potencial para reduzir cargas de nutrientes de outros tipos de águas residuárias, possibilitando assim gerar biomassa de menor custo destinada a diversas aplicações, como a produção de biodiesel e coprodutos (JI et al., 2013).

4. CONCLUSÕES

O efluente hidropônico proveniente da cultura de alface mostrou-se como um meio de cultivo muito interessante e eficaz para o crescimento da microalga *Scenedesmus acuminatus*. Neste trabalho, ficou demonstrado que a biomassa gerada a partir de cultivos com diferentes concentrações desse efluente apresenta potencialidade para diversas aplicações biotecnológicas.

No que diz respeito ao crescimento e produção de biomassa, verificou-se que o cultivo com maior concentração de efluente hidropônico apresentou a maior densidade celular final e um rendimento celular máximo que não diferiu do cultivo em meio sintético, apesar de sua massa seca e produtividade média terem sido ligeiramente menores.

A utilização de diferentes concentrações de efluente nos cultivos da microalga permitiu obter biomassa rica em proteínas, carboidratos, lipídeos, clorofilas e carotenoides, além de conter ácidos graxos de grande valor nutricional (ômega), sugerindo potencial uso como suplemento na alimentação humana e de animais. Além disso, dependendo da concentração de efluente hidropônico que foi utilizada nos meios de cultivo, foi possível direcionar o metabolismo dos nutrientes para a maior ou menor produção do composto orgânico de interesse.

O perfil de ésteres metílicos de ácidos graxos de *S. acuminatus* apresentou composição interessante do ponto de vista biotecnológico. Entretanto, para a indústria de biocombustíveis, a quantidade de ésteres totais na biomassa produzida foi baixa, comprometendo o seu uso como fonte de matéria prima para a produção de biodiesel.

No cultivo preparado com a maior concentração de efluente hidropônico, *S. acuminatus* apresentou elevada capacidade de remoção de ortofosfato e nitrato, em percentuais próximos a 100%, além de reduzir a condutividade elétrica, em percentual acima de 50%, indicando a possibilidade de utilizar esta microalga em processos de biorremediação de águas residuárias, em que o nitrogênio e o fósforo estejam presentes em grandes quantidades.

A partir desta pesquisa, pode-se concluir que a microalga estudada, de fato, pode atuar como eficiente biorremediadora do efluente testado, e, ao mesmo tempo, pode produzir biomassa com compostos de interesse comercial em quantidades expressivas. Apesar do rendimento em biomassa ter sido ligeiramente

inferior ao do cultivo em meio sintético, a redução nos custos com os meios de cultura pode tornar a produção economicamente viável, além de ser ambientalmente sustentável. Ressalta-se que neste estudo a cepa utilizada não passou pelo processo de aclimação aos novos meios com efluente hidropônico, sendo que tal processo poderia melhorar ainda mais os resultados de crescimento e biomassa.

Diante disso, a pesquisa abre novas perspectivas de investigação, uma vez que um duplo interesse pode ser identificado com os resultados obtidos: a redução das concentrações de nutrientes presentes no efluente hidropônico para níveis mais adequados ao seu descarte, minimizando assim impactos ambientais; e a produção de biomassa microalgal que pode ser usada para obtenção de compostos de interesse à biotecnologia, reduzindo assim os custos de produção em cultivos de larga escala.

Dessa forma, trabalhos futuros que visem a utilização deste mesmo efluente fora do ambiente controlado de laboratório são importantes para tentar simular, de uma forma mais próxima da realidade, as possíveis repostas geradas pelas microalgas em maior escala. Também há necessidade de novos estudos que envolvam: a investigação de formas de incrementar a síntese de produtos de interesse nos cultivos, como os lipídeos; o uso de fontes de CO₂ emitido por indústrias, com objetivo de aumentar a produção de biomassa e melhorar a qualidade das emissões; a biorremediação provocada pelo cultivo de microalgas no resíduo hidropônico para outros parâmetros físico-químicos que não foram avaliados neste trabalho; bem como a utilização de outros tipos de efluentes como fonte de nutrientes para cultivo de microalgas avaliando a eficiência de biorremediação e produção de biomassa.

5. REFERÊNCIAS

- ABOU-SHANAB, R.A.I.; JI, M.K.; KIM, H.C.; PAENG, K.J.; JEON, B.H. Microalgal species growing on piggery wastewater as a valuable candidate for nutrient removal and biodiesel production. **J. Environ. Manage**, v.115, p.257–264, 2013.
- ALONSO, D.L.; BELARBI, E.H.; FERNÁNDEZ-SEVILHA, J.M.; RODRÍGUEZ-RUIZ, J.; GRIMA, E.M. Acyl lipid composition variation related to culture age and nitrogen concentration in continuous culture of the microalga *Phaeodactylum tricornutum*. **Phytochemistry**, v.54, p. 461-471, 2000.
- APHA. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**, American Public Health Association, 21^o ed., Washington, D.C., 2012.
- BAUMGARTNER, T. R. S. Cultivo e extração de óleo das microalgas *Scenedesmus* sp. e *Spirulina* sp. para a síntese de ésteres visando à produção de biodiesel. **Tese de Doutorado em Engenharia Química - Universidade Estadual de Maringá-PEQ/UEM**, Paraná, 2011. 124p.
- BAUMGARTNER, T. R. S.; BURAK, J.A.M.; KOGIKOSKI, M.E.; SEBASTIEN, N.Y.; ARROYO, P.A. Avaliação da produtividade da microalga *Scenedesmus acuminatus* (Lagerheim) Chodat em diferentes meios de cultivo. **Brazilian Journal of Biosciences**, v. 11, n. 2, p. 250–255, 2013.
- BECKER, E. W. **Microalgae: biotechnology and microbiology**, Ed. Baddiley, J. et al., Cambridge Univ. Press, Cambridge, New York. 1994.
- BERTOLDI, F.C.; SANT´ANNA, E.; OLIVEIRA, J.L.B. Chlorophyll content and minerals profile in the microalgae *Chlorella vulgaris* cultivated in hydroponic wastewater. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.1, p.54-58, 2008.
- BERTOLDI, F.C.; SANT´ANNA, E.; OLIVEIRA, J.L.B.; REBELO, A.M. Biorremocão de nitrogênio e fósforo da solução hidropônica residual por meio da microalga *Chlorella vulgaris*. **Evidência**, Joaçaba, v. 7, n. 2, p. 85-92, 2007.
- BICUDO, C. E. M.; MENEZES, M. **Gêneros de algas de águas continentais do Brasil: chave para identificação e descrições**. São Carlos: Rima. 502p. 2006.
- BJORNSSON, W.J.; NICOL, R.W.; DICKINSON, K.E.; MCGINN, P.J. Anaerobic digestates are useful nutrient sources for microalgae cultivation: functional coupling of energy and biomass production. **J. Appl. Phycol**, v.25, p.1523–1528, 2013.
- BLIGH, E.G.; DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, p. 911-917, 1959.

- BOAMAR, P.F.A. **Combustíveis Automotivos – Especificações Técnicas, Tributos e Legislação**. 1.ed. Florianópolis: ed. Insular, 832 p., 2010.
- BORGES, L.V. FARIA, B.M.; ODEBRECHT, C.; ABREU, P.C.O.V. Potencial de absorção de carbono por espécies de microalgas usadas na aquicultura: primeiros passos para o desenvolvimento de um “mecanismo de Desenvolvimento limpo”. **Revista Atlântica**, Rio Grande, v. 29, n. 1, p. 35-46, 2007.
- BORGHETTI, I.A. Avaliação do crescimento da microalga *Chlorella minutíssima* em meio de cultura com diferentes concentrações de manipueira. **Dissertação de Mestrado em Engenharia de Bioprocessos**. Universidade Federal do Paraná - UFPR, 2009. 103p.
- BOROWITZKA, M.A. Tyge Christensen Prize 2012. **Phycologia**, 53 (6), 657 – 58, 2014.
- BRZEZINSKI, C.R.; ABATI J.; GELLER, A.; WERNER, F.; ZUCARELI, C. Produção de cultivares de alface americana sob dois sistemas de cultivo. **Rev. Ceres**, Viçosa, v. 64, n.1, p. 083-089, 2017.
- BUDIYONO, I. S.; SUMARDIONO, S.; SASONGKO, S. B. Production of *Spirulina platensis* Biomass Using Digested Vinasse as Cultivation Medium. **Trends in Applied Sciences Research**, v. 9, n. 2, p. 93–102, 2014.
- CAKMAK, T.; ANGUN, P.; DEMIRAY, Y.E.; OZKAN, A.D.; ELIBOL, Z.; TEKINAY, T. Differential effects of nitrogen and sulfur deprivation on growth and biodiesel feedstock production of *Chlamydomonas reinhardtii*. **Biotechnol Bioeng**, v.109, p.1947–1957, 2012.
- CALIXTO, C.D. Potencial de microalgas regionais cultivadas em meios alternativos para produção de biodiesel. **Tese de Doutorado em Química**, Universidade Federal da Paraíba, UFPB, 2016. 155p.
- CHEN, C-Y.; ZHAO, X-Q.; YEN, H-W.; HO, S-H.; CHENG, C-L.; LEE, D-J.; BAI, F-W.; CHANG, J-S. Microalgae-based carbohydrates for biofuel production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 78, p. 1-10, 2013.
- CHINNASAMY, S.; BHATNAGAR, A.; HUNT, R.W.; DAS, K.C. Microalgae cultivation in a wastewater dominated by carpet mill effluents for biofuel applications. **Bioresource Technology**, v.101, n.9, p.3097–3105, 2010.
- CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, v. 25, p. 294-306, 2007.

- CHOI, S.P.; NGUYEN, M.T.; SIM, S.J. Enzymatic pretreatment of *Chlamydomonas reinhardtii* biomass for ethanol production. **Bioresource Technology**, v.101, p.5330–5336, 2010.
- CONVERTI, A.; CASAZZA, A. A.; ORTIZ, E. Y.; PEREGO, P. e BORGHI, M. D. Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for Biodiesel production. **Chemical Engineering and Processing**, 48:1146–1151, 2009.
- COURCHESNE, N.M.D.; PARISIEN, A.; WANG, B.; LAN.; C.Q. Enhancement of lipid production using biochemical, genetic and transcription factor engineering approaches. **Journal of Biotechnology**, v. 141, p. 31–41, 2009.
- D'OCA, M. G. M. et al. Production of FAMES from several microalgal lipidic extracts and direct transesterification of the *Chlorella pyrenoidosa*. **Biomass and bioenergy**, v. 35, p. 1533-1538, 2011.
- DERNER, R.B.; OHSE, S.; VILLELA, M.; CARVALHO, S.M.; FETT, R. Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural**, v. 36, n. 6, p. 1959-1967, 2006.
- EN ISO 5509, “**Animal and vegetable fats and oils - preparation of methyl esters of fatty acids.**” 2000.
- ESTEVEES, F. A. **Fundamentos de limnologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Interciência, 2011.
- FERREIRA, A.; RIBEIRO, B.; MARQUES, A.P.S.S.; FERREIRA, A.F.; DIAS, A.P.; PINHEIRO, H.M.; REIS, A.; GOUVEIA, L. *Scenedesmus obliquus* mediated brewery wastewater remediation and CO₂ biofixation for green energy purposes. **Journal of Cleaner Production**. V.165, p.1316-1327, 2017.
- FOGG, G. E.; THAKE, B., **Algae Cultures and Phytoplankton Ecology**, ed. 3. University of Wisconsin Press. London, p. 269, 1987.
- FRANCO, C.L.A.; LOBO, I.P.; CRUZ, R.S.; TEIXEIRA, C.M.L.P.; NETO, J.A.A.; MENEZES, R.S. Biodiesel de microalgas: avanços e desafios. **Química Nova**, v. 36, n. 3, p. 437-448, 2013.
- FUENTES-GRUNEWALD, C., GARCES, E., ALACID, E., SAMPEDRO, N., ROSSI, S., CAMP, J. Improvement of lipid production in the marine strains *Alexandrium minutum* and *Heterosigma akashiwo* by utilizing abiotic parameters. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** 39, 207-216, 2012.

- FUENTES-GRUNEWALD, C.; GARCES, E.; ALACID, E.; ROSSI, S.; CAMP, J. Biomass and lipid production of dinoflagellates and raphidophytes in indoor and outdoor photobioreactors. **Mar. Biotechnol**, v.15, p.37–47, 2013.
- FURLANI, P.R.; CASTELLANE, P.D. Estruturas para cultivo hidropônico. **Informe Agropecuário**. Belo Horizonte, v. 20, n. 2000/2001, p. 72-80, 1999.
- GAN, K.; MOU, X.; XU, Y.; WANG, H. Application of ozonated piggery wastewater for cultivation of oil-rich *Chlorella pyrenoidosa*. **Bioresource Technology**, v.171, p. 285-290, 2014.
- GARCIA C.C.; BRAGA, J.G.F.; BRANCO, K.B.Z.F.; DERNER, R.B.; ARROYO, P.A. Estudo de dois diferentes métodos de extração do óleo da microalga *Scenedesmus accuminatus* para produção de biodiesel. **Anais do I Congresso de Engenharia de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis**. Campina Grande-PB, 2015.
- GE, S.; CHAMPAGNE, P. Nutrient removal, microalgal biomass growth, harvesting and lipid yield in response to centrate wastewater loadings. **Water Res**, v.88, p.604-612, 2016.
- GODINHO, L.R., GONZÁLEZ, A.A.C.; BICUDO, C.E.M. Criptógamos do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, SP. Algas, 30: Chlorophyceae (família Scenedesmaceae). **Hoehnea**, v. 37, n. 3, p. 513-553, 2010.
- GÓMEZ-CORTÉS, P.; BRENNAN, J.T.; LAWRENCE, P.; FUENTE, M.A. Novel characterisation of minor α -linolenic acid isomers in linseed oil by gas chromatography and covalent adduct chemical ionisation tandem mass spectrometry. **Food Chem**, v.200, p.141–145, 2016.
- GORHAM, P.R.; MCLACHLAN, J.; HAMMER, U.T.; KIM, W.K. Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena flos-aquae* (Lyngb.) de Breb. **Verh. Internat. Verein. Limnol.** , v. 15, p. 796–804, 1964.
- GOUVEIA, L.; JANELAS, J.; TORPECELO, A.; OLIVEIRA, A.C. Microalga *Nannochloropsis* sp. biomass for biodiesel production: conventional (cell disruption) and in situ transesterification. **Journal of Marine Biology & Oceanography**. v. 5, p. 1-7, 2016.
- GOUVEIA, L.; OLIVEIRA, A. C. Microalgae as a raw material for biofuels production. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 36, n. 2, p. 269-274, 2009.
- GOUVEIA, L.; RAYMUNDO, A.; BATISTA, A.P.; SOUSA, I.; EMPIS, J. *Chlorella vulgaris* and *Haematococcus pluvialis* biomass as colouring and antioxidant in food emulsions. **European Food and Research Technology**, v.222, p.362–367, 2006.

- GRIFFITHS, M.J.; HARRISON, S.T.L. Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. **J. Appl. Phycol**, v.21, p.493-507, 2009.
- GRIMA, E., M. BELARBI, E.-H., FERNANDEZ, F.G.A., MEDINA, A.R., CHISTI, Y. Recovery of microalgal biomass and metabolites: Process options and economics, **Biotechnology Advances**, v. 20, n. 7-8, p. 491-515, 2003.
- GUEDES, A. C.; AMARO, H. M.; MALCATA, F. X. Microalgae as Sources of Carotenoids. **Marine Drugs**, v. 9, n. 12, p.625-644, 2011.
- GUILLARD, R.R. L.; LORENZEN, C.J. Yellow-green algae with chlorophyllide c. **Journal of Phycology**, v. 8, p. 10-14, 1972.
- HERNÁNDEZ, D.; RIAÑO, B.; COCA, M.; SOLANA, M.; BERTUCCO, A.; GARCÍA-GONZÁLEZ, M.C. Microalgae cultivation in high rate algal ponds using slaughterhouse wastewater for biofuel applications. **Chemical Engineering Journal**, v. 285, p. 449-458, 2016.
- HO, S.A.; CHEN, W.; CHANG, J. *Scenedesmus obliquus* CNW-N as a potential candidate for CO₂ mitigation and biodiesel production. **Bioresource Technology**, v.101. p.8725–8730, 2010.
- HO, S-H.; NAKANISHI, A.; YE, X.; CHANG, J-S.; HARA, K.; HASUNUMA, T.; KONDO, A. Optimizing biodiesel production in marine *Chlamydomonas* sp. JSC4 through metabolic profiling and an innovative salinity-gradient strategy. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, p. 97-113, 2014.
- HSU, C. Y.; YANG, C.M.; CHEN, C.M.; CHAO, P.Y.; HU, S.P. Effects of chlorophyll-related compounds on hydrogen peroxide induced DNA damage within human lymphocytes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 7, p. 2746-2750, 2005.
- ILLMAN, A. M., SCRAGG, A. H., SHALES, S. W. Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium. **Enzyme and Microbial Technology**, 27:631–635, 2000.
- JEFFREY, S.W.; HUMPHREY, G. F. New Spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae, and natural phytoplankton. **Biochem. Physiol. Pflanz**. 167: 191-194, 1975.
- JI, M.-K.; JEON, B.-H.; KIM, H.-C.; SAPIREDDY, V. R.; YUN, H.-S.; ABOU-SHANAB, R.A.I.; CHOI, J.; LEE, W.; TIMMES, T.C.; INAMUDDIN. Simultaneous nutrient removal and lipid production from pretreated piggyery wastewater by

Chlorella vulgaris ysw-04. **Applied microbiology and biotechnology**, v.97, n.6, p.2701–2710, 2013.

KIM, M. K.; PARK, J. W.; PARK, C. S.; KIM, S. J.; JEUNE, K. H.; CHANG, M. U.; ACREMAN, J. Enhanced production of *Scenedesmus spp.* (green microalgae) using a new medium containing fermented swine wastewater. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 2220-2228, 2007.

KIRROLIA, A.; BISHNOI, N.R.; SINGH, R. Microalgae as a boon for sustainable energy production and its future research & development aspects. **Renewable Sustainable Energy Rev.**, v. 20, p. 642-656, 2013.

KLIGERMAN, D.C.; BOUWER, E.J. Prospects for biodiesel production from algae-based wastewater treatment in Brazil: A review. **Renew. Sust. Energ. Ver**, v.52, p.1834-1846, 2015.

KNOTHE, G. Dependence of biodiesel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters. **Fuel Processing Technology**, v.86, p.1059–1070, 2005.

KNOTHE, G.; DUNN, R.O.; VAUGHN, S.F.; ISBELL, T.A. A comprehensive evaluation of the melting points of fatty acids and esters determined by differential scanning calorimetry. **J Am Oil Chem Soc**, v.86, p.843–856, 2009.

KNOTHE, G.; GERPEN J. V.; KRAHL J.; RAMOS, L. P. **Manual de Biodiesel**. 1ª edição, Editora Edgard Blücher, 2006.

KOCHERT, G. Carbohydrate determination by phenol–sulfuric acid method, In: Hellebust, J.A., Craigie, J.S. (Eds.), **Handbook of Physiological and Biochemical Methods**. Cambridge Univ. Press, Cambridge, p. 96–97, 1978.

LI, Y.; CHEN, Y.F.; CHEN, P.; MIN, M.; ZHOU, W.; MARTINEZ, B.; ZHU, J.; RUAN, R. Characterization of a microalga *Chlorella sp.* well adapted to highly concentrated municipal wastewater for nutrient removal and biodiesel production. **Bioresource Technology**, v.102, p.5138–5144, 2011.

LI, Y.; HORSMAN, M.; WANG, B.; WU, N.; LAN, C. Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochloris oleoabundans*. **Appl. Microbiol. Biotechnol**, v.81, p.629–636, 2008.

LIANG, K.; ZHANG, Q.; GU, M.; CONG, W. Effect of phosphorus on lipid accumulation in freshwater microalga *Chlorella sp.* **Journal Applied of Phycology**, v. 5, p. 311-318, 2012.

LIM, S-L.; CHU, W-L.; PHANG, S-M. Use *Chlorella vulgaris* for bioremediation of textile wastewater. **Bioresource Techonology**, v. 101, p. 7314-7322, 2010.

- LIN, X.; PASKALEVA, E.E.; CHANG, W.; SHEKHTMAN, A.; CANKI, M. Inhibition of HIV-1 infection in ex vivo cervical tissue model of human vagina by palmitic acid; implications for a microbicide development, **PLoS One**, **6**, e24803, 2011.
- LIU, Z.; WANG, G.; ZHOU, B. Effect of iron on growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris*. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 4717 – 4722, 2008.
- LOURENÇO, S. O. **Cultivo de Microalgas Marinhas: Princípios e aplicações**. ed. 1, São Carlos: RiMa, 2006.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem**, v.193, p.265–275, 1951.
- LU, W.; WANG, Z.; WANG, X.; YUAN, Z. Cultivation of *Chlorella* sp. using raw dairy wastewater for nutrient removal and biodiesel production: Characteristics comparison of indoor bench-scale and outdoor pilot-scale cultures. **Bioresource Technology**, v.192, p. 382-388, 2015.
- LUM, K. K.; KIM, J.; LEI, X. G. Dual potential of microalgae as a sustainable biofuel feedstock and animal feed. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 4, n. 1, p. 53 – 59, 2013.
- LUZ, G.L.; MEDEIROS, S.L.P.; BORCIONI, E.; LAJÚS, C.R.; FERRAZZA, A.C.; VERONA, R.B. Ação dos intervalos entre irrigações no sistema radicular da alface em hidroponia. **Interciência**, v. 42, n. 6, p. 370-373, 2017.
- LV, J.M, CHENG, L.H., XU, X.H., ZHANG, L., CHEN, H.L. Enhanced lipid production of *Chlorella vulgaris* by adjustment of cultivation conditions. **Bioresource Technology**, 101:6797–6804, 2010.
- MARKOU, G., ICONOMOU, D., MUYLEAERT, K. Applying raw poultry litter leachate for the cultivation of *Arthrospira platensis* and *Chlorella vulgaris*. **Algal Research**, v.13, p. 79-84, 2016.
- MARTINEZ, H.E.P. **Formulação de soluções nutritivas para cultivos hidropônicos comerciais**. Jaboticabal: FUNEP, 1997. 31p.
- MATAMOROS, V.; GUTIÉRREZ, R.; FERRER, I.; GARCÍA, J.; BAYONA, J. M. Capability of microalgae-based wastewater treatment systems to remove emerging organic contaminants: A pilot-scale study. **Journal of Hazardous Materials**, v.288, p. 34-42, 2015.
- MCGINN, P.J.; DICKINSON, K.E.; PARK, K.C.; WHITNEY, C.G.; MACQUARRIE, S.P.; BLACK, F.J.; O'LEARY, S. J. Assessment of the bioenergy and bioremediation

potentials of the microalga *Scenedesmus* sp. AMDD cultivated in municipal wastewater effluent in batch and continuous mode. **Algal Research**, v. 1, n. 2, p. 155-165, 2012.

MENEZES, R.S.; LELES, M.I.G.; SOARES, A.T.; FRANCO, P.I.B.M.F.; FILHO, N.R.A.; SANT'ANNA, C.L.; VIEIRA, A.A.H. Avaliação da potencialidade de microalgas dulcícolas como fonte de matéria-prima graxa para a produção de biodiesel. **Química Nova**, v. 36, n. 1, p. 10-15, 2013.

MISHRA, S.; SINGH, N.; SARMA, A.K. Assessment of a Novel Algal Strain *Chlamydomonas debaryana* NIREMACC03 for Mass Cultivation, Biofuels Production and Kinetic Studies. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 176, n. 8, p. 2253-2266, 2015.

MOHAN, S.V.; DEVI, M.P.; MOHANAKRISHNA, G.; AMARNATH, N.; BABU, M.L.; SARMA, P.N. Potential of mixed microalgae to harness biodiesel from ecological waterbodies with simultaneous treatment, **Bioresource technology**, v.102, p.1109–1117, 2011.

MORAIS, M.G.; COSTA, J.A.V. Biofixation of carbon dioxide by *Spirulina* sp. and *scenedesmus obliquus* cultivated in a three-stage serial tubular photobioreactor. **J. Biotechnol.**, 129: 439–445, 2007.

MSANNE, J.; XU, D.; KONDA, A.R.; CASAS-MOLLANO, J.A.; AWADA, T.; CAHOON, E.B.; CERUTTI, H. Metabolic and gene expression changes triggered by nitrogen deprivation in the photoautotrophically grown microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* and *Coccomyxa* sp. C-169. **Phytochemistry**, v. 75, p. 50–59, 2012.

MULITERNO, A.; MOSELE, P.C.; COSTA, J.A.V.; HEMKEMEIER, M.; BERTOLIN, T.E.; COLLA, L.M. Cultivo mixotrófico da microalga *Spirulina platensis* em batelada alimentada. **Ciênc. Agrotec.**, v. 29, n. 6, p. 1132-1138, 2005.

MUÑOZ, R.; GUIEYSSE, B. Algal-bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: a review. **Water Research**, v. 40, p. 2799–2815, 2006.

NASCIMENTO, I.A.; MARQUES, S.S.I.; CABANELAS, I.T.D.; PEREIRA, S.A.; DRUZIAN, J.I.; SOUZA, C.O.; VICH, D.V.; CARVALHO, G.C.; NASCIMENTO, M.A. Screening microalgae strains for biodiesel production: lipid productivity and estimation of fuel quality based on fatty acids profiles as selective criteria. **BioEnergy Research**, v. 6, n. 1, p. 1-13, 2013.

- ORDOG, V.; STIRK, W.A.; BÁLINT, P.; VAN STADEN, J.; LOVÁSZ, C. Changes in lipid, protein and pigment concentrations in nitrogen-stressed *Chlorella minutissima* cultures. **J. Appl Phycol**, 2011.
- PAN, Y-Y.; WANG, S-T.; CHUANG, L-T.; CHANG, Y-W.; CHEN, C-N.N. Isolation of termo-tolerant and hight lipid contente green microalgae: Oil accumulation is predominantly controlled by phtosystem efficiency during stress treatments in *Desmodesmus*. **Bioresource technology**, 102:10510-10517. 2011.
- PANIAGUA-MICHEL, J.; GARCIA, O. Ex-situ bioremediation of shrimp culture effluente using constructed microbial mats. **Acquaculture Engineering**, v. 28, n. 3-4, p. 131-139, 2003.
- PAULUS, D.; PAULUS, E.; NAVA, G.A.; MOURA, C.A. Crescimento, consumo hídrico e composição mineral de alface cultivada em hidroponia com águas salinas. **Rev. Ceres**, v. 59, n. 1, p. 110-117, 2012.
- POMPÊO, M.L.M. Culturas hidropônicas, uma alternativa não uma solução. v. 8, p. 73-80. São Carlos, SP. **Anais Sem. Reg. Ecol.**, 1996.
- PRABAKARAN, P.; RAVINDRAN, D. *Scenedesmus* as a potential source of biodiesel among selected microalgae, **Current Science**, v. 102, n. 4, p. 606-620, 2012.
- PULZ, O.; GROSS, W. Valuable products from biotechnology of microalgae. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.65, p.635–648, 2004.
- R CORE TEAM. R. **A language and enviroment for statistical computing**. R **Foundation for Statistical computing**, Viena, Áustria. URL: [https:// www.R-project.org/](https://www.R-project.org/). 2017.
- RAMIREZ, N.N.V.; FARENZENA, M.; TRIERWEILER, J. O. Growth of Microalgae *Scenedesmus* sp. in Ethanol Vinasse. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 57, n. 5, p. 630-635, 2014.
- RAWAT, I.; RANJITH, K.R.; MUTANDA, F.B.T. Biodiesel from microalgae: a critical evaluation from laboratory to large scale production. **Appl Energy**, v.103, p.444-467, 2013.
- RODOLFI, L.; ZITTELLI, G.C.; BASSI, N.; PADOVANI, G.; BIONDI, N.; BONINI, G. Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. **Biotechnology and Bioengineering**, v.102, n.1, p.100–12, 2009.

RODRIGUES, J.B.R., FILHO, P.B. Eficiência da microalga *Chlorella minutissima* no tratamento de resíduos de suinicultura enriquecido com uréia. **Biotemas**, v.17, n.2, p.7-26, 2004.

RODRIGUES, L.R.F. **Técnicas de cultivo hidropônico e de controle ambiental no manejo de pragas, doenças e nutrição vegetal em protegido**. Jaboticabal – SP: FUNEP. Ed. Afiliada, 2002. 761 p.

SALA, F. C.; COSTA, C. P. Retrospectiva e tendência da alfacicultura brasileira. **Horticultura Brasileira**, v. 30, n. 2, p. 187-194, 2012.

SALAMA, E-S.; KIM, H.C.; ABOU-SHANAB, R.A.; JI, M.K.; OH, Y. K.; KIM, S. H.; JEON, B.H. Biomass, lipid content, and fatty acid composition of freshwater *Chlamydomonas mexicana* and *Scenedesmus obliquus* grown under salt stress. **Bioprocess and biosystems engineering**, v. 36, n. 6, p. 827-833, 2013.

SAMORI, G.; SAMORI, C.; GUERRINI, F.; PISTOCCHI, R. Growth and nitrogen removal capacity of *Desmodesmus communis* and of a natural microalgae consortium in a bath culture system in view of urban wastewater treatment: Part I. **Water Res.** v. 47, n. 2, p. 791-801, 2013.

SANTOS, G. M.; MACEDO, R. V. T.; ALEGRE, R. M.. Influencia do teor de nitrogênio no cultivo de *Spirulina maxima* em duas temperaturas – Parte I: Alteração da Composição da Biomassa. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 23(Supl), p. 17 – 21, dez. 2003.

SASSI, K.K.B. Bioprospecção de metabólitos de interesse à indústria de alimentos produzidos por cepas regionais de microalgas em cultivos monoespecíficos. **Tese de Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Universidade Federal da Paraíba, UFPB, 2016. 108p.

SCHMITZ, R., MAGRO, C. D.; COLLA, L. M. Aplicações ambientais de microalgas. **Revista CIATEC–UPF**, v. 4, n. 1, p. 48-60, 2012.

SIMONICH, M. T. *et al.* Low-dose dietary chlorophyll inhibits multi-organ carcinogenesis in the rainbow trout. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 3, p. 1014-1024, 2008.

SOARES, A.T.; COSTA, D.C.; SILVA, B.F.; LOPES, R.G.; DERNER, R.B.; ANTONIOSI FILHO, N.R. Comparative analysis of the fatty acid composition of microalgae obtained by different oil extraction methods and direct biomass transesterification. **Bioener. Res**, v.7, p.1035–1044, 2014.

STRICKLAND, J. D. H.; PARSONS, T. R. A practical handbook of seawater analysis. **Bull. Fish. Res. Bd**, Canada, 167:1-311, 1968.

SYRETT, P.J. Nitrogen assimilation. In:_____. **Physiology and biochemistry of algae**. New York: Academic, 1992. p.171-183.

TAMBURIC, B.; ZEMICHAEL, F.W.; MAITLAND, G.C.; HELLGARDT, K. Parameters affecting the growth and hydrogen production of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 36, p. 7872-7876, 2011.

TOI, H. T.; BOECHX, P.; SORGELOOS, P.; BOSSIER, P.; STAPPEN, G. V. Co-feeding of microalgae and bacteria may result in increased N assimilation in *Artemia* as compared to mono-diets, as demonstrated by a ¹⁵N isotope uptake laboratory study, **Aquaculture**, v. 422-423, p. 109-114, 2014.

TRAVIESO, L.; BENÍTEZ, F.; SÁNCHEZ, E.; BORJA, R.; LEÓN, M.; RAPOSO, F.; RINCÓN, B. Assessment of a microalgae pond for post treatment of the effluent from an anaerobic fixed bed reactor treating distillery wastewater. **Environmental Technology**, v.29, n.9, p.985- 992, 2008.

UTERMÖHL, H. Zur vervollkommung der quantitativen phytoplankton: methodik. **Mitt. Int. Verein. Theor. Angew. Limnol.**, v. 9, p. 1-38, 1958.

VALDUGA, E.; TATSCH, P.O.; TIGGEMANN, L.; TREICHEL, H.; TONIAZZO, G.; ZENI, J.; LUCCIO, M.D.; JUNIOR, A.F. Produção de carotenoides: microrganismos como fonte de pigmentos naturais. **Química Nova**, v. 32, n. 9, p.2429-2436, 2009.

VALENZUELA-ESPINOZA, E., MILLÁN-NÚÑEZ, R., NÚÑEZ-CEBRERO, F. Protein, carbohydrate, lipid and chlorophyll a content in *Isochrysis* aff. *galbana* (cloneT-Iso) cultured with a low cost alternative to the f/2 medium. **Aquacultural Engineering**, v. 25, n.4, p. 207–216, 2002.

VAN DEN HENDE, S.; BEELEN, V.; BOREEN, G.; BOON, N.; VERVAEREN, H. Up-scaling aquaculture wastewater treatment by microalgal bacterial flocs: From lab reactors to an outdoor raceway pond. **Bioresource Technology**, v. 159, p. 342-354, 2014.

VENDRUSCULO, J. B. G. Cultivo da microalga *Scenedesmus quadricauda* em efluentes de biodigestão de aves e suínos. **Dissertação de Mestrado em Aquicultura Continental**. Universidade Católica de Goiás, 2009. 45p.

- WANG, H.; JI, B.; WANG, J.F.; GUO, F.J.; ZHOU, W.J.; GAO, L.L.; LIU, T.Z. Growth and biochemical composition of filamentous microalgae *Tribonema* sp. as potential biofuel feedstock. **Bioprocess. Biosyst. Eng**, v.37, p.2607–2613, 2014.
- WANG, L.; LI, Y.; CHEN, P.; MIN, M.; CHEN, Y.; ZHU, J.; RUAN, R.R. Anaerobic digested dairy manure as a nutrient supplement for cultivation of oil-rich green microalgae *Chlorella* sp. **Bioresource Technology**, v.101, p.2623-2628, 2010.
- WANG, L.; LIU, J.; ZHAO, Q.; WEI, W.; SUN, Y. Comparative study of wastewater treatment and nutrient recycle via activated sludge, microalgae and combination systems **Bioresource Technology**, v.211, p.1-5, 2016.
- WIDJAJA, A.; CHIEN, C.C.; JU, Y.H.. Study of increasing lipid production from fresh water microalgae *Chlorella vulgaris*. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 40, p. 13-20, 2009.
- WOERTZ, I.; FEFFER, A.; LUNDQUIST, T.; NELSON, Y. Algae grown on dairy and municipal wastewater for simultaneous nutrient removal and lipid production for biofuel feedstock. **J. Environ. Eng**, v.135, p.1115–1122, 2009.
- WOOD, A. M.; EVERROAD, R. C.; WINGARD, L. M. Measuring growth rates in microalgal cultures. **Algal culturing techniques**, p. 269-285, 2005.
- WU, L.F.; CHEN, P.C.; HUANG, A.P.; LEE, C.M. The feasibility of biodiesel production by microalgae using industrial wastewater. **Bioresource Technology**, v.113, p.14-18, 2012.
- WU, Y.H.; HU, H.Y.; YU, Y.; ZHANG, T.Y.; ZHU, S.F.; ZHUANG, L.L.; ZHANG, X.; LU, Y. Microalgal species for sustainable biomass lipid production using wastewater as resource: a review. **Renew. Sustain. Energy Ver**, v.33, p.675–688, 2014.
- XU, L.; WANG, F.; GUO, C.; LIU, C-Z. Improved algal oil production from *Botryococcus braunii* by feeding nitrate and phosphate in an airlift bioreactor. **Engineering in Life Sciences**, v. 12, n. 2, p.171 – 177, 2012.
- ZAMBIAZI, R. U. I. C.; PRZYBYLSKI, R.; ZAMBIAZI, M. W.; MENDONÇA, C. B. Fatty Acid Composition Of Vegetable Oils And Fats. **Boletim CEPPA**, Curitiba, v. 25, n. 1, p. 111-120, 2007.

CAPITULO 3

**CULTIVO DE *Scenedesmus acuminatus* (LAGERHEIN) CHODAT EM
EFLUENTE DE SUINOCULTURA BIODIGERIDO: CARACTERIZAÇÃO DO
CRESCIMENTO, COMPOSIÇÃO DA BIOMASSA E REMOÇÃO DE
NUTRIENTES**

RESUMO

Com o aumento da atenção dos governantes e sociedade para as questões ambientais, ampliou-se o interesse pelo uso de fontes energéticas alternativas. Nesse contexto, as microalgas têm ganhado destaque como matéria-prima promissora para a geração de biocombustíveis. Além disso, as microalgas podem produzir biomassa com diversos metabólitos de interesse às indústrias nutracêutica e farmacêutica, sendo ainda viável a utilização de águas residuárias para o cultivo destes organismos. No Brasil, o consumo de carne suína cresceu mais de 30% na última década e, associado a isso, aumentou-se o volume de efluentes que são gerados nesta área. Nesse sentido, o presente estudo visou avaliar diferentes concentrações de efluente de suinocultura biodigerido como meio alternativo ao cultivo de *Scenedesmus acuminatus*, visando reduzir custos da produção de biomassa microalgal e mitigar impactos ambientais. Para isso, foram estabelecidos três tratamentos com diferentes concentrações do resíduo suíno biodigerido (10%, 15% e 20% do efluente, respectivamente) e um controle com meio sintético ASM1, com três repetições. O experimento foi conduzido em sala de cultivo, utilizando-se erlenmeyers de 3 L, contendo o volume de 2,5 L de seu respectivo meio, com pH inicial neutro, à temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, iluminação proveniente de lâmpadas fluorescentes de 40W do tipo *daylight*, fotoperíodo de 12/12h de luz/escuro e aeração contínua à vazão de $3,5 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$, durante 28 dias de cultivo. Foram realizadas análises de densidade celular, biomassa seca, clorofilas *a* e *b*, carotenoides totais, teor de proteínas hidrossolúveis, carboidratos e lipídeos totais, perfil de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME), além do percentual de remoção de nutrientes e redução da condutividade elétrica dos meios de cultivo, após remoção da biomassa. Os tratamentos com as diferentes concentrações do efluente apresentaram taxa de crescimento, rendimento celular máximo e produtividade de biomassa significativamente inferiores ao cultivo com meio sintético. Dentre as diluições testadas, o cultivo com 10% de efluente foi o que apresentou maior densidade celular final ($71,7 \times 10^4 \text{ cél}\cdot\text{mL}^{-1}$), taxa de crescimento ($0,07 \text{ d}^{-1}$), rendimento celular máximo ($51,7 \times 10^4 \text{ cél}\cdot\text{mL}^{-1}$), concentrações das clorofilas *a* e *b* e carotenoides totais ($1636 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, $754 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ e $1034 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente), além do maior teor lipídico (18,1%). Em todos os cultivos com efluente suíno, o teor de proteínas na biomassa esteve acima de 50%, superando

a concentração registrada no controle (20,4%). Por outro lado, o teor total de ésteres metílicos de ácidos graxos apresentou baixo rendimento (20,1-52,5 mg.g⁻¹) entre os tratamentos, o que compromete sua aplicação na indústria para a produção de biodiesel. Apesar do reduzido crescimento, os cultivos em meios com efluente suíno mostraram eficiência na remoção de ortofosfato (68,6-94,3%) e redução da condutividade elétrica (33,3-33,4%), indicando que *S. acuminatus* apresenta potencial para ser empregada na biorremediação deste tipo de resíduo. Conclui-se que, nas condições testadas, o efluente de suinocultura biodigerido não representou uma alternativa interessante para produção de biomassa microalgal com fins biotecnológicos, muito embora, tenha exibido um potencial para o tratamento do resíduo suíno.

Palavras-chave: Biorremediação • biotecnologia • efluente • suinocultura • microalgas •

ABSTRACT

With increasing attention of government and society to environmental issues, interest in the use of alternative energy sources has increased. In this context, microalgae have gained prominence as a promising raw material for the biofuels generation. In addition, microalgae can produce biomass with various metabolites of interest to the nutraceutical and pharmaceutical industries, and it is still viable the use of wastewater for the cultivation of these organisms. In Brazil, the pork consumption has grown more than 30% in the last decade and, associated with this, the effluents volume that are generated in this area has increased. In this sense, the present study aimed to evaluate different biodigested swine effluent concentrations as an alternative to the *Scenedesmus acuminatus* cultivation, aiming at reducing microalgal biomass production costs and mitigating environmental impacts. For this, three treatments with different biodigested swine residue concentrations (10%, 15% and 20% of the effluent, respectively) and a control with ASM1 synthetic medium were established, with three replicates. The experiment was conducted in a culture room using 3 L Erlenmeyer flasks, containing the volume of 2,5 L of its respective medium, at initial neutral pH, at $25 \pm 2^\circ\text{C}$, illumination from fluorescent lamps of 40 W *daylight* type, 12/12h light/dark photoperiod and continuous aeration at $3,5 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ flow for 28 days of cultivation. Growth analyzes, dry biomass, *a* and *b* chlorophyll, total carotenoids, water soluble protein content, total carbohydrates and lipids, fatty acid methyl esters profile (FAME), as well as nutrient removal percentage and electrical conductivity reduction of the medium after biomass removal. The treatments with the different effluent concentrations presented growth rate, maximum cellular yield and biomass productivity significantly lower than the culture with synthetic medium. Among the dilutions tested, the 10% effluent culture showed the highest final cell density ($71,7 \times 10^4 \text{ cells}\cdot\text{mL}^{-1}$), growth rate ($0,07 \text{ d}^{-1}$), maximum cell yield ($51,7 \times 10^4 \text{ cells}\cdot\text{mL}^{-1}$), *a* and *b* chlorophyll and carotenoids ($1636 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, $754 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ and $1034 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively), as well as the highest lipid content (18,1%). In all cultures with swine effluent, the protein content in the biomass was above 50%, exceeding the concentration recorded in the control (20,4%). On the other hand, the total content of fatty acids methyl esters presented low yield (20,1-52,5 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) among the treatments, which compromises their application in the industry for the biodiesel production. Despite the reduced growth, the cultures in

mediums with swine effluent showed efficiency in the removal of orthophosphate (68,6-94,3%) and reduction of electrical conductivity (33,3-33,4%), indicating that *S. acuminatus* presents potential to be employed in the bioremediation of this waste type. It was concluded that, under the conditions tested, the biodigested swine effluent did not represent an interesting alternative for the microalgal biomass production for biotechnological purposes, although it did exhibit a potential for the treatment of the swine residue.

Key words: Bioremediation • biotechnology • effluent • microalgae • pig farming •

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos têm havido preocupação crescente com a escassez dos combustíveis fósseis e com a utilização de energias renováveis para suprir as necessidades energéticas e ambientais da sociedade atual (DRIRA et al., 2016). De acordo com Cho et al. (2011), a bioenergia, que inclui o biometano, o bioetanol e o biodiesel, produzidos a partir de organismos fotossintéticos, constitui fonte com elevado potencial, por ser renovável, biodegradável e menos tóxica, quando comparada aos combustíveis derivados do petróleo. Nesse contexto, as microalgas representam uma alternativa promissora de matéria-prima para obtenção de biomassa e óleo para a produção de biodiesel a fim de atender a demanda de combustível e geração de energia destinada a outros fins específicos.

A extração de óleos de microalgas, entre outras fontes, compõe a terceira geração de biocombustíveis que, em relação às anteriores, é a melhor opção para lidar com a segurança alimentar e energética e as preocupações ambientais. Algumas vantagens em relação às plantas oleaginosas convencionais são: apresentam ciclo de vida rápido e produção contínua durante todo o ano (CHISTI, 2007); o cultivo pode ser feito em regiões ensolaradas onde os solos são pouco agricultáveis (ZENG et al., 2015; KUMAR et al., 2010); os cultivos praticamente não geram danos ambientais e implicam em menores gastos de água, sendo ainda viável a utilização de águas residuárias para seu cultivo (PEQUENO, 2010); e a biomassa resultante após a extração pode ser utilizada na alimentação animal, como adubo orgânico, como fonte de corantes e antioxidantes naturais (MAITY et al., 2014; VANTHOOR-KOOPMANS et al., 2013). Além da alta eficiência na produção de óleos para obtenção de biodiesel, microalgas também são adequadas como matéria-prima de outros biocombustíveis como biohidrogênio (prótons e elétrons), biometano (biomassa) e bioetanol (açúcares e amido) (SCHENK et al., 2008; ZHU, 2015).

Apesar de apresentar todas essas vantagens, o cultivo de microalgas para biocombustíveis ainda tenta superar a questão da viabilidade econômica, devido aos altos custos operacionais, principalmente associados aos meios de cultivo (JEBALI et al., 2015). Dessa forma, aprimorar os processos envolvidos na produção de biomassa de microalgas é importante para se atingir certa autonomia energética, não dependente do petróleo. A maioria das pesquisas com cultivo de microalgas

têm sido orientadas ao desenvolvimento de métodos de sistemas de cultivo; engenharia genética e metabólica, a fim de aumentar a produção lipídica; medidas mais eficientes de colheita de biomassa; e tecnologias de conversão de biodiesel (GHOSH et al., 2016; GONÇALVES et al., 2016; SAWAENGSAK et al., 2014; TERCERO et al., 2014; ZHU, 2015).

Além do potencial para a produção de biocombustíveis, as microalgas podem ser utilizadas na biorremediação e tratamento de águas residuárias, não somente pela capacidade que elas têm de absorverem os nutrientes do meio e produzirem biomassa, mas também por removerem diversas substâncias nocivas (CHEAH et al, 2014; CHIU et al, 2015; MEZZARI et al, 2013; KOTHARI et al., 2013). Tal habilidade faz com que as microalgas possam ser cultivadas em meios preparados com águas residuárias diversas, minimizando assim os custos de produção de biomassa e criando perspectivas reais de inúmeras aplicações biotecnológicas, inclusive na produção de energia. Uma variedade de efluentes têm sido testados como meios alternativos para a produção de biomassa de microalgas, tais como: os de suinocultura (ZHU et al., 2013), de laticínios (HENA et al., 2015), da agroindústria canavieira (RAMIREZ et al., 2014), esgoto doméstico (KLIGERMANN et al., 2015), manipueira (BORGHETI, 2009), da indústria de papel e celulose (GENTILI, 2014), de tanques de cultivo de peixes (MANDAL; MALLICK, 2011), da produção de cerveja (FERREIRA et al., 2017), de carpetes (CHINNASAMY et al., 2010), do processamento do óleo de palma (LAM; LEE, 2011) e de azeite (HODAIFA et al., 2010), dentre outros.

Segundo Mezzomo et al. (2010), as águas residuárias de suinocultura podem ser utilizadas como meio para crescimento de microalgas após estabilização por aeração ou digestão anaeróbica. Este tratamento gera o digestato (com elevadas concentrações de nitrogênio e fósforo) como efluente final e o biogás, o qual contém elevadas concentrações de CH₄ (55-70%) e de CO₂ (30-40%), além de contaminantes como o H₂S (até 1%) (APPELS et al., 2008).

No cenário de produção de microalgas, a utilização desse tipo de efluente biodigerido como meio de cultura tem demonstrado ser vantajosa. Entretanto, ainda há limitações substanciais no que diz respeito à diversificação das fontes residuais utilizadas, bem como nos seus processos de pré-tratamento (GENTILI, 2014). Além disso, nem todas as espécies crescem adequadamente em meios formulados a partir desses efluentes, de forma que a seleção de espécies tolerantes se torna um

critério essencial para se atingir uma boa produção de biomassa (JEBALI et al., 2015).

No Brasil, a suinocultura constitui importante atividade econômica, sendo que, em 2015, o país foi o quarto maior produtor e exportador mundial de carne suína, com produção de mais de 3,5 milhões de toneladas (USDA, 2016). Além disso, a média de consumo nacional tem crescido e representou um aumento de 30% nos últimos dez anos (ABPA, 2016). Atrelado a este crescimento, está o grande volume de efluentes que é gerado na produção de suínos, o qual é rico em fósforo e nitrogênio. Esses resíduos, quando descarregados no ambiente sem tratamento prévio, geralmente se acumulam na água causando problemas sanitários e ambientais, como a eutrofização (SILVA et al., 2012).

Nessa perspectiva, a realização de pesquisas com foco na utilização de efluentes de suinocultura para o cultivo de microalgas é de extremo interesse econômico e ambiental, uma vez que pode reduzir os custos operacionais e de infraestrutura para produção de biomassa, além de promover a remoção dos poluentes presentes nos resíduos (CANTRELL et al., 2008; CAI et al., 2013; HU et al., 2012; MEDEIROS et al., 2015; CHIU et al., 2015). A biomassa gerada pode ser utilizada como fonte para produção de biodiesel, como alimento para animais, produção de fertilizantes ou para produzir produtos químicos finos, tais como polissacarídeos, carotenoides, esteróis, vitaminas, ácidos graxos e lipídios poli-insaturados (DERNER et al., 2006).

Diante disso, o presente trabalho objetivou testar diferentes concentrações de efluente de suinocultura biodigerido na busca de uma alternativa ao uso de meio de cultivo sintético para o crescimento da microalga *Scenedesmus acuminatus*, visando reduzir o custo da produção de biomassa algal para diferentes aplicações biotecnológicas, destacando-se a produção de biodiesel, e mitigar impactos ambientais oriundos da atividade agroindustrial em questão.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Seleção da microalga e manutenção em meio de cultura sintético

A microalga *Scenedesmus acuminatus* (Lagerhein) Chodat (Fig. 1) está incluída na divisão Chlorophyta, ordem Sphaeropleales, família Scenedesmaceae, sendo característica de água doce, encontrada em ambientes tipicamente eutróficos. Compreende colônias planas do tipo cenóbio, com 2, 4, 8, 16 ou, mais raramente, 32 células elipsoides, ovoides, fusiformes ou lunadas dispostas lado a lado (BICUDO; MENEZES, 2006). Atualmente, é uma alga muito visada para o cultivo devido ao seu crescimento rápido, fácil adaptação às variações ambientais e grande valor nutritivo com alta produção de proteínas e ácidos graxos (BECKER, 1994; GOUVEIA; OLIVEIRA, 2009).

A cepa selecionada para o presente estudo (L027A) foi obtida a partir do banco de cultivo de microalgas do Laboratório de Taxonomia e Ecologia de Algas Continentais (LATEAC), pertencente ao Departamento de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES).

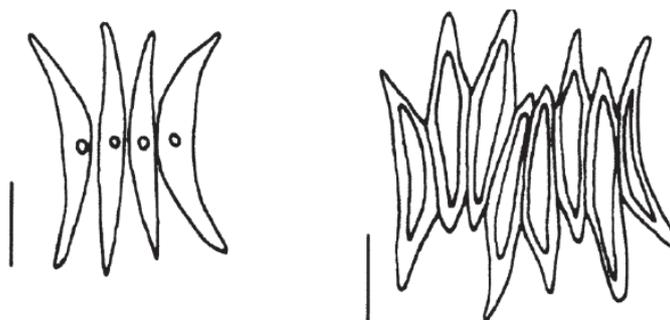


Figura 1: Representação da microalga *S. acuminatus* em um cenóbio com quatro células (à esquerda) e com oito células (à direita). Escala = 10 μm . Fonte: adaptado de Godinho et al. (2010).

Para a realização deste trabalho, a cepa foi previamente mantida em estufas incubadoras Eletrolab, modelo EL202/3, em erlenmeyers de 1 L, contendo 500 mL de meio de cultura sintético ASM1 (adaptado de GORHAM et al., 1964), previamente esterilizado em autoclave à 121 °C por 30 minutos e com pH ajustado para $7,0 \pm 0,05$, com iluminação fornecida por lâmpadas fluorescentes de 40W do tipo *daylight*, temperatura de 25 ± 2 °C, fotoperíodo de 12/12 h de luz/escuro e

aeração contínua utilizando compressor Gong Yang Bang HP-400 com injeção de ar à vazão de 3,5 L.min.⁻¹.

O meio de cultura ASM1 foi preparado a partir de quatro soluções estoque, chamadas de A, B, C e D, adicionadas à água deionizada nas proporções de 20 mL, 2 mL, 0,1 mL e 0,4 mL para A, B, C e D, respectivamente, conforme mostrado na Tabela 1.

Tabela 1: Composição das soluções estoque do meio ASM1. As massas correspondem às quantidades utilizadas para o preparo de 200 mL da solução A e 100 mL das soluções B, C e D, as quais são utilizadas na proporção 20:2:0,1:0,4, respectivamente, no preparo do meio ASM1.

Solução A	Massa (g)	Solução B	Massa (g)	Solução C	Massa (g)	Solução D	Massa (g)
NaNO ₃ /NH ₄ Cl ₂	1,70	K ₂ HPO ₄	0,87	H ₃ BO ₃	2,4800	EDTA. Na ₂	1,86
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,41	Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	1,78	MnCl ₂ .4H ₂ O	1,3900		
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,49			FeCl ₃ .6H ₂ O	1,0800		
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,29			ZnCl ₂	0,3350		
				CoCl ₂ .6H ₂ O	0,0190		
				CuCl ₂ .2H ₂ O	0,0014		

Fonte: Adaptado de Gorham et al. (1964).

2.2 Coleta e análise do efluente de suinocultura biodigerido

O efluente de suinocultura biodigerido foi coletado de uma granja localizada em uma propriedade privada situada no Sítio Taboquinhas, região rural de Santo Antônio do Canaã, no município de Santa Teresa-ES (Fig. 2). As amostragens foram realizadas imediatamente após o efluente passar pelo biodigestor e antes de ser lançado na lagoa de estabilização. Em campo, o material foi acondicionado em garrafas de polietileno de 5 L e, posteriormente, em laboratório, foi mantido em erlenmeyers de 5 L sob refrigeração (a 4°C) até o momento de sua utilização.

Parte da amostra de efluente bruto foi enviada a Agrolab - Análises e Controle de Qualidade LTDA - para a determinação das seguintes variáveis: fósforo total (método SM 3120 B), ortofosfato (método SM 4500 P), nitrogênio total (método SM 4500 N), nitrogênio amoniacal (método SM 4500 NH₃ B), nitrito (método SM 4500 NO₂⁻ B), nitrato (método SM 4500 NO₃⁻ E) e condutividade elétrica (método SM 2520 B), conforme recomendações do *Standard Methods*, APHA (2012). Também foram determinados o pH, com pHmetro VWR SympHony, a turbidez, com

turbidímetro Alfakit Plus V1.25, e o oxigênio dissolvido, com o medidor multiparâmetros YSI 85. Para a determinação dos sólidos totais em suspensão (STS), parte da amostra foi filtrada a vácuo em filtros de fibra de vidro GF1, previamente secos e pesados. Posteriormente, os filtros foram mantidos em estufa a 60 °C até peso constante, sendo o resultado obtido pela diferença entre a massa final e a inicial, dividido pelo volume da amostra filtrada (APHA, 2012).

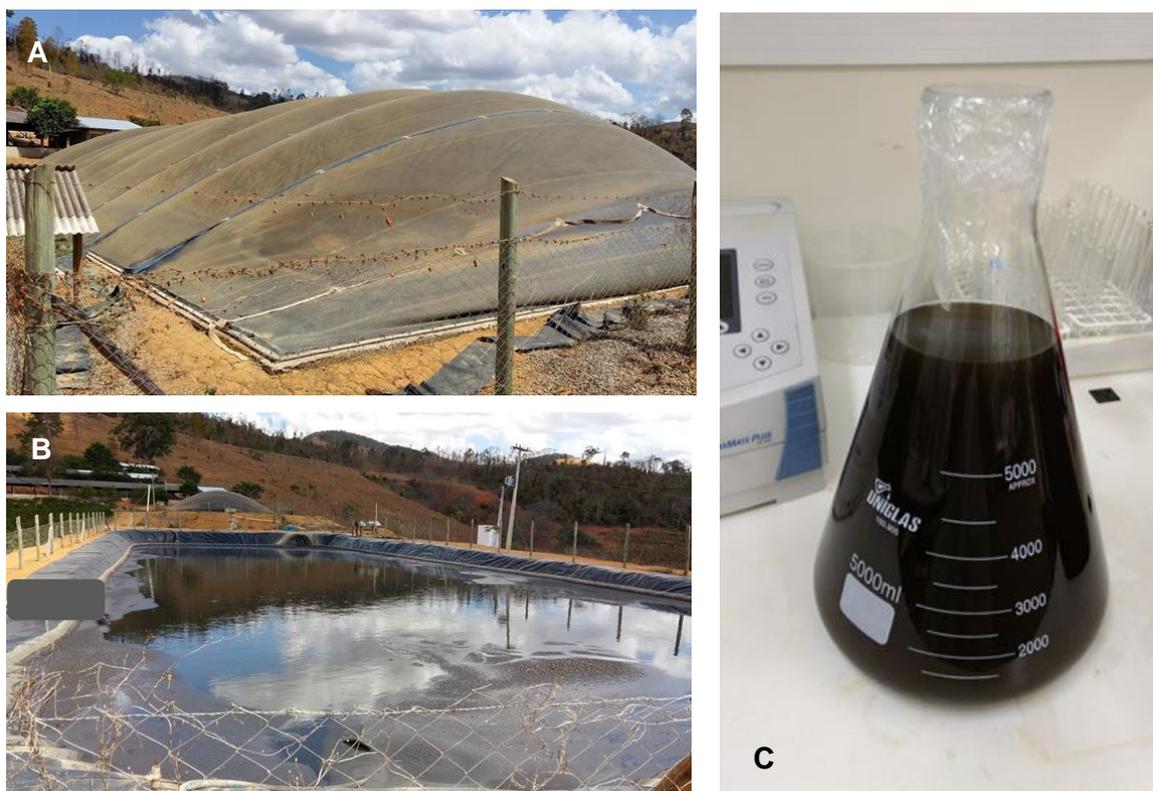


Figura 2: Propriedade rural onde foi coletado o efluente de suinocultura (Santa Teresa-ES). A. Biodigestor anaeróbico do tipo Lagoa Coberta. B. Lagoa de estabilização para onde é lançado o efluente após o processo de biodigestão. C. Efluente de suinocultura biodigerido em erlenmeyer de 5L. Fonte: o autor (2017).

Ao todo, foram realizadas duas amostragens de efluente em momentos distintos ao longo deste estudo (para o teste piloto e o experimento, respectivamente), sendo coletados aproximadamente 10 L de resíduo em cada uma delas. Cabe ressaltar que somente na segunda amostragem foram realizadas as análises físico-químicas do efluente de suinocultura para a realização do experimento.

2.3 Processamento do efluente de suinocultura biodigerido e teste piloto

Na primeira amostragem, o material coletado foi utilizado para realizar um teste piloto (Fig. 3) contendo vários níveis de diluições do efluente em água deionizada (5%, 10%, 15%, 20%, 25% e 30% de efluente) e um controle com meio de cultivo sintético ASM1, a partir do qual foram selecionadas as três concentrações que apresentaram melhores resultados de crescimento e biomassa (10%, 15% e 20%) para constituírem os tratamentos do experimento.

Para o preparo das diluições, o efluente foi previamente filtrado através de malha de 20 μ m de porosidade, sendo posteriormente centrifugado, utilizando-se centrífuga refrigerada Novatecnica, por 5 minutos a 4000 rpm, e filtrado novamente em filtro de fibra de vidro GF1 de 0,7 μ m de porosidade, utilizando-se kit kitassato e bomba a vácuo, visando a máxima remoção de material particulado. Após este procedimento, o efluente foi esterilizado em autoclave por 30 minutos, à temperatura de 121°C, com a finalidade de eliminar possíveis microrganismos contaminantes, e, após esfriar à temperatura ambiente, foi armazenado a 4°C até ser utilizado para o preparo dos tratamentos com as diferentes concentrações.

O teste piloto foi conduzido em sala de cultivo (escala laboratorial), utilizando-se erlenmeyers de 1 L, contendo 600 mL de meio de cultura ASM1 para o controle e 600 mL dos meios preparados a partir das diluições para os demais tratamentos (5%, 10%, 15%, 20%, 25% e 30% de efluente); todos com pH inicial neutro, iluminação fornecida por lâmpadas fluorescentes de 40W do tipo *daylight*, temperatura de 25 \pm 2 °C, fotoperíodo de 12/12 h de luz/escuro e aeração contínua com injeção de ar à vazão de 3,5 L.min.⁻¹, fornecida por compressores Gong Yang Bang HP-400.

Em cada erlenmeyer foi adicionado 60 mL de inóculo (*S. acuminatus*) com concentração de 2,5 x 10⁶ cél.mL⁻¹, chegando-se a densidade celular inicial (dia zero) de aproximadamente 2,3 x 10⁵ cél.mL⁻¹ para todos os tratamentos. O cultivo foi do tipo estanque ou batelada, sem aspensão de CO₂ e sem adição de mais nutrientes após inoculação.

As posições dos erlenmeyers na bancada da sala de cultivo foram alteradas, por meio de sorteios, duas vezes ao dia, a fim de garantir maior uniformidade das condições de cultivo, conforme sugerido por Lourenço (2006) para experimentos com ciclo de 12 horas de luz. O teste piloto apresentou duração de 25 dias, sendo realizadas amostragens a cada quatro dias para análise da densidade celular e ao

final do ensaio foi determinada a massa seca. Todo o material utilizado foi previamente autoclavado e seu manuseio se deu em câmara de fluxo laminar Pachane PCR T3.

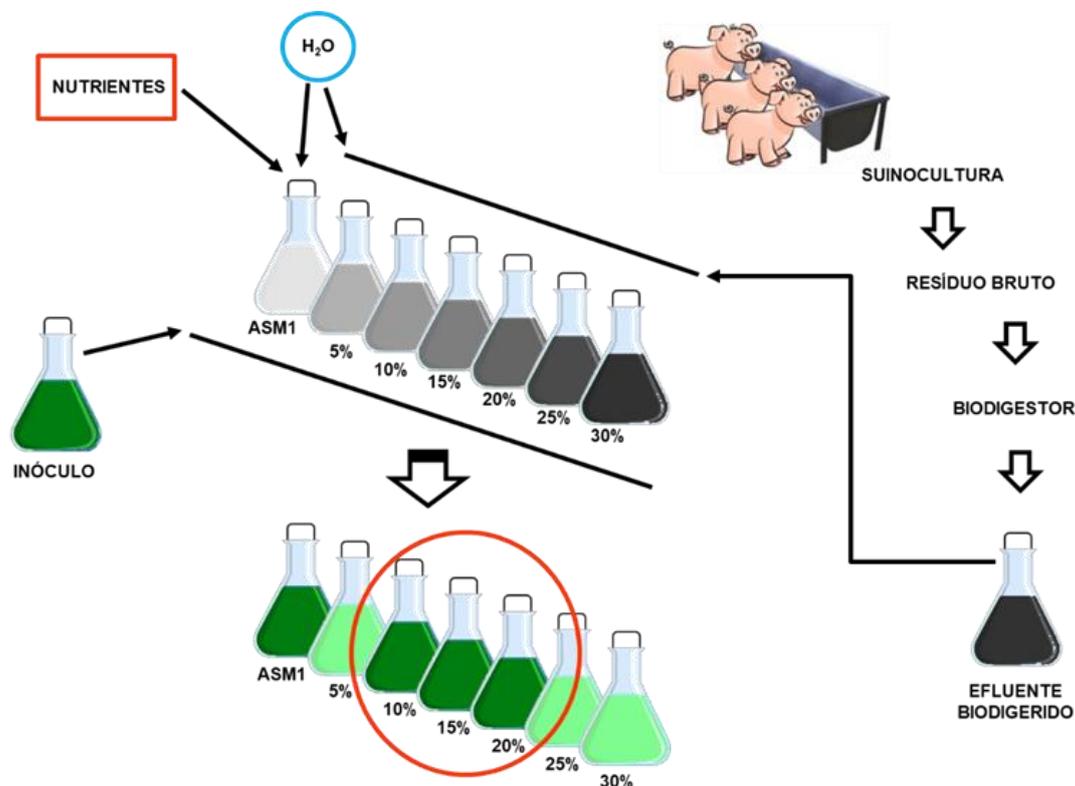


Figura 3: Fluxograma das principais etapas do teste piloto realizado com diferentes concentrações do efluente de suinocultura biodigerido (5%-30%), bem como um controle contendo meio de cultivo sintético ASM1, evidenciando as três concentrações que apresentaram melhores resultados de crescimento e biomassa (10%, 15% e 20%). Fonte: o autor (2018).

A partir das curvas de crescimento e dos resultados de massa seca obtidos com o teste piloto (Fig. 4 e Fig. 5), foram selecionadas as diluições de 10%, 15% e 20% para a realização do experimento, uma vez que foram as diluições de efluente que apresentaram melhores resultados, em termos de densidade e teor de matéria orgânica, para aprofundar o estudo acerca da produtividade, composição bioquímica e potencial biorremediativo da microalga cultivada nestas condições.

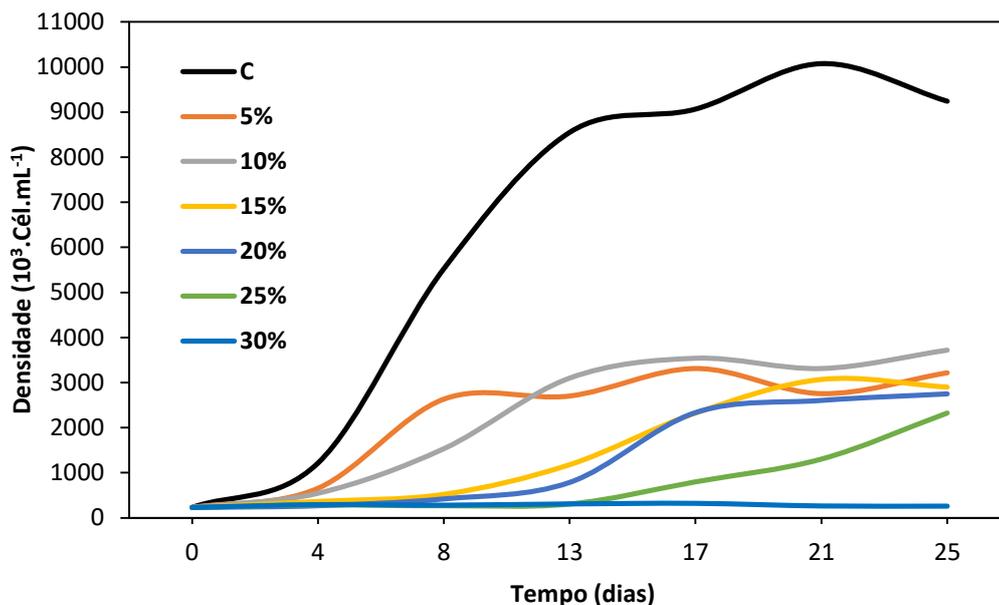


Figura 4: Curvas de crescimento de *S. acuminatus* cultivada no meio sintético ASM1 (Controle) e nos meios com diferentes concentrações de efluente de suinocultura biodigerido (5%-30%) obtidas a partir do teste piloto.

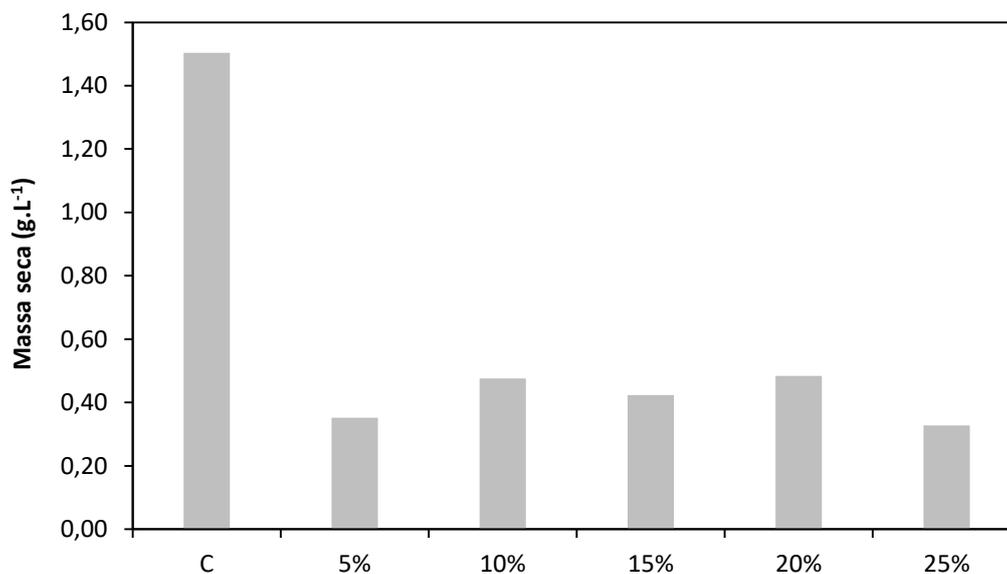


Figura 5: Biomassa seca de *S. acuminatus* no meio sintético ASM1 (Controle) e nos meios com diferentes concentrações de efluente de suinocultura biodigerido (5%-25%) obtida a partir do teste piloto.

2.4 Delineamento experimental

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado e consistiu de um controle com meio de cultivo sintético ASM1 e três tratamentos com as

concentrações de 10%, 15% e 20% de efluente de suinocultura biodigerido, respectivamente, com três repetições, conforme esquematizado na Figura 6.

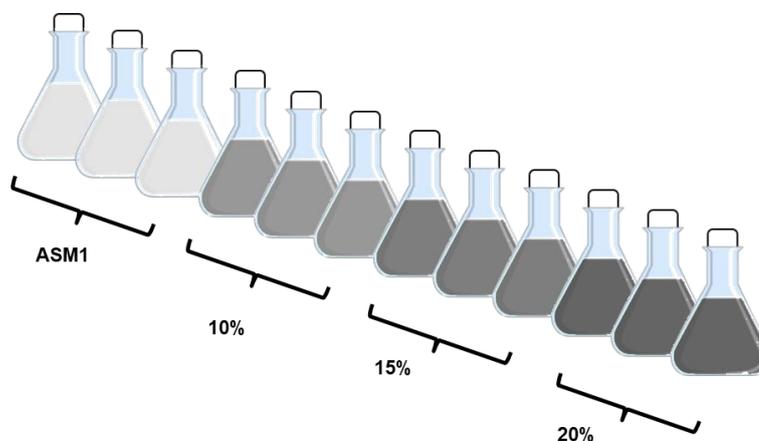


Figura 6: Desenho experimental para avaliação do cultivo de *S. acuminatus* em meio sintético ASM1 (Controle) e nos meios com diferentes concentrações de efluente de suinocultura biodigerido (Tratamentos com 10%, 15% e 20% de efluente, respectivamente). Fonte: o autor (2018).

O experimento foi conduzido em sala de cultivo, utilizando-se erlenmeyers de 3 L, contendo o volume de 2,5 L de seu respectivo meio, com pH inicial neutro, mantidos sob temperatura controlada a $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, com iluminação proveniente de lâmpadas fluorescentes de 40W do tipo *daylight*, fotoperíodo de 12/12h de luz/escuro e aeração contínua com injeção de ar à vazão de $3,5 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$.

Amostras dos meios preparados a partir das diluições do efluente de suinocultura biodigerido, bem como amostras do meio controle, foram enviadas a Agrolab - Análises e Controle de Qualidade LTDA - para a determinação das concentrações iniciais de ortofosfato (método SM 4500 P), nitrato (método SM 4500 $\text{NO}_3^- \text{ E}$) e condutividade elétrica (método SM 2520 B), conforme metodologia do *Standard Methods*, APHA (2012). A turbidez também foi determinada antes da adição do inóculo nos meios de cultivo por meio do turbidímetro Alfakit Plus V1.25.

Em cada erlenmeyer foi adicionado 125 mL de inóculo (*S. acuminatus*) com concentração de $4,2 \times 10^6 \text{ cél}\cdot\text{mL}^{-1}$, chegando-se a densidade celular inicial (dia zero) de aproximadamente $2,0 \times 10^5 \text{ cél}\cdot\text{mL}^{-1}$, tanto para o controle quanto para os demais tratamentos. O cultivo realizado foi do tipo estanque ou batelada, sem aspensão de CO_2 e sem adição de mais nutrientes após a inoculação. Todo o material utilizado foi previamente autoclavado e seu manuseio se deu em câmaras de fluxo laminar Pachane PCR T3.

Da mesma forma que adotado para o teste piloto, as posições dos erlenmeyrs na bancada da sala de cultivo foram alteradas, por meio de sorteios, duas vezes ao dia, a fim de garantir maior uniformidade das condições de cultivo (LOURENÇO, 2006).

O experimento apresentou duração de 28 dias, sendo realizadas amostragens com intervalos regulares de dois dias para as análises de densidade celular e de quatro dias para as análises de quantificação de massa seca e pigmentos.

Ao final do ensaio, a biomassa restante foi centrifugada (centrífuga refrigerada Novatecnica), congelada à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (ultrafreezer) e liofilizada (liofilizador SL - 404) para a realização das análises de proteínas hidrossolúveis, carboidratos e lipídeos totais, bem como para a caracterização do perfil de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME). Tais análises foram realizadas na Unidade de Bioenergia do Laboratório Nacional de Energia e Geologia (LNEG), em Lisboa, Portugal, por meio do Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE) da CAPES. As metodologias específicas para cada análise estão descritas nas secções seguintes.

2.5 Avaliação do crescimento

Para o acompanhamento do crescimento das culturas e determinação da densidade celular das unidades experimentais foram retiradas alíquotas de 2 mL, a cada dois dias, utilizando-se micropipeta de volume ajustável e ponteiras esterilizadas. As coletas foram realizadas em câmara de fluxo laminar devidamente esterilizada e cada alíquota foi transferida para eppendorfs, onde acrescentou-se uma gota de solução de lugol acético diluído a 5% para fixação das amostras, de acordo com Utermöhl (1958).

A quantificação dos indivíduos (células.mL^{-1}) foi realizada por meio de contagens diretas em hemocitômetro de Fuchs-Rosenthal, utilizando-se microscópico óptico Olympus CX41, no aumento de 200X.

A partir dos resultados de densidade celular foram elaboradas as curvas de crescimento para cada tratamento e calculados a taxa de crescimento, o tempo de duplicação e o rendimento máximo das cepas. Para os cálculos das taxas de crescimento foram considerados os valores compreendidos na fase exponencial do crescimento das culturas.

A taxa de crescimento (μ), o tempo médio de duplicação (G) e o rendimento máximo (R) foram calculados segundo as Equações 1 e 2, descritas primariamente por Fogg e Thake (1987).

$$\mu = (\ln N_2 - \ln N_1) / (t_2 - t_1) \quad (\text{Eq. 1})$$

Sendo,

μ = velocidade específica de crescimento;

N_1 e N_2 = número de células nos tempos t_1 e t_2 , respectivamente.

A partir do μ foi possível calcular o tempo médio de duplicação (G):

$$G = \ln(2) / \mu \quad (\text{Eq. 2})$$

O rendimento máximo (R) de cada tratamento foi determinado através da Equação 3:

$$R = R_1 - R_0 \quad (\text{Eq. 3})$$

Sendo,

R_1 = densidade celular máxima (células.mL⁻¹);

R_0 = densidade celular inicial (células.mL⁻¹).

2.6 Determinação da biomassa seca

A quantificação da biomassa seca dos cultivos foi realizada por metodologia gravimétrica a cada intervalo de quatro dias até o final do experimento. Foram filtradas amostras de 45 mL, com auxílio de bomba a vácuo, kitassato e funil de Buchner, através de microfiltros de fibra de vidro GF1 com diâmetro de 47 mm e poros de 0,7 μm , previamente secos em estufa a 60°C até atingirem massa constante e então serem pesados. Depois de filtradas as amostras, os filtros foram levados de volta para estufa e mantidos a mesma temperatura de 60°C até atingirem peso constante. A determinação da biomassa seca se deu através da subtração da massa final pela massa inicial do filtro, dividido pelo volume filtrado (Equação 4) (LOURENÇO, 2006).

$$MS = (M_f - M_i) / V \quad (\text{Eq. 4})$$

Sendo,

MS = Massa seca (g.L⁻¹);

M_f = Massa final (g);

M_i = Massa inicial (g);

V = Volume filtrado (L).

A partir dos valores de massa seca foi possível calcular a produtividade média de biomassa (g.L⁻¹.d⁻¹) para cada tratamento, que se refere à concentração de biomassa microalgal acumulada nos cultivos ao longo do tempo.

2.7 Quantificação de pigmentos

As concentrações dos pigmentos clorofilas *a*, clorofila *b* e carotenoides totais foram determinadas por meio da espectrofotometria a cada quatro dias de intervalo até o final do experimento. Alíquotas foram retiradas das culturas de cada tratamento e filtradas em filtro de fibra de vidro GF1. A extração se deu por meio da maceração dos filtros de fibra de vidro, com o material retido, usando acetona 90% como solvente a frio. Em seguida, a solução foi acondicionada em tubos de centrifuga envoltos por papel alumínio e armazenados no refrigerador a 4°C por 24 horas. Passado o tempo, a solução foi centrifugada (centrífuga refrigerada Novatecnica) e o sobrenadante lido em espectrofotômetro Aquamate Plus nos comprimentos de onda de 480, 510, 630, 647, 664 e 750 nm. Todo o processo foi realizado ao abrigo de luz.

Para a determinação das concentrações das clorofilas *a* e *b* (em µg.L⁻¹) foram utilizadas as Equações 5 e 6, propostas por Jeffrey e Humphrey (1975).

$$[\text{Clorofila } a \text{ (}\mu\text{g.L}^{-1}\text{)}] = [11,85 \times A_{664 \text{ nm}} - 1,54 \times A_{647 \text{ nm}} - 0,08 \times A_{630 \text{ nm}}] \times v / (V \times c) \quad (\text{Eq. 5})$$

$$[\text{Clorofila } b \text{ (}\mu\text{g.L}^{-1}\text{)}] = [21,03 \times A_{647 \text{ nm}} - 5,43 \times A_{664 \text{ nm}} - 2,66 \times A_{630 \text{ nm}}] \times v / (V \times c) \quad (\text{Eq. 6})$$

Em que,

A = absorvância;

v = volume de acetona utilizada para extração do pigmento (L);

V = volume do filtrado da cultura (L);

c = caminho ótico da cubeta (cm).

Para estimar os carotenoides totais foi utilizada a Equação 7 desenvolvida por Strickland e Parsons (1968).

$$[\text{Carotenoides totais } (\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})] = [7,60 \times A_{480 \text{ nm}} - 3,00 \times A_{750 \text{ nm}} - 1,49 \times A_{510 \text{ nm}} - 2,00 \times A_{750 \text{ nm}}] \times v / (V \times c) \quad (\text{Eq. 7})$$

2.8 Determinação de proteínas hidrossolúveis

O teor de proteínas hidrossolúveis foi quantificado na biomassa liofilizada obtida em cada cultivo empregando-se o método adaptado de Lowry et al., (1951), o qual utiliza albumina bovina como padrão.

Inicialmente, foi adicionado 4,0 mL de NaOH 1,0 N a 5,0 mg da biomassa microalgal liofilizada acondicionada em tubo de ensaio, o qual foi aquecido em banho-maria, a 100°C por uma hora, para a extração das proteínas solúveis. Após resfriar, o tubo com a amostra foi centrifugado a 3000 rpm por 10 minutos e então retirou-se 0,5 mL do extrato alcalino (sobrenadante), o qual foi transferido para outro tubo, onde adicionou-se 5,0 mL de solução composta por carbonato de sódio (Na_2CO_3) 2,0% em hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 N, sulfato de cobre II pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 0,5% e tartarato de sódio e potássio ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) 1,0%, na proporção 100:1:1, respectivamente. A mistura foi agitada em vortex e deixada em repouso por 10 minutos. Em seguida, foi acrescentado 0,5 mL de solução de Folin-Ciocalteu em H_2O destilada, na proporção 1:1, e novamente o tubo foi homogeneizado em vortex, sendo então deixado em repouso por 30 minutos.

A leitura da absorbância das amostras foi realizada no comprimento de onda de 750 nm. Para os pontos da curva padrão foram realizadas cinco diluições compreendidas na faixa de 0 a 0,4 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de albumina e o teor de proteínas (%) foi calculado de acordo com a Equação 8:

$$\text{Teor proteico (\%)} = (C \times V / m) \times 100 \quad (\text{Eq. 8})$$

Em que,

C = Concentração dada pelo método de Lowry a partir da equação da curva padrão ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$);

V = Volume de solução de NaOH usado no pré-tratamento da amostra (mL);

m = Quantidade de biomassa liofilizada utilizada na análise (mg).

2.9 Determinação de carboidratos totais

Os carboidratos totais foram analisados pelo método adaptado de Kochert (1978), empregando-se glicose como padrão.

Primeiramente, foi adicionado 4,0 mL de NaOH 1,0 N a 5,0 mg da biomassa liofilizada acondicionada em tubo de ensaio, o qual foi aquecido em banho-maria, a 100°C por uma hora, para a extração dos hidratos de carbono. Após esfriar à temperatura ambiente, o tubo com a amostra foi centrifugado a 3000 rpm por 10 minutos e então retirou-se 0,5 mL do extrato alcalino (sobrenadante), o qual foi transferido para outro tubo, onde adicionou-se 1,0 mL de NaOH 1,0 N e 0,5 mL de fenol 4,0 %, seguindo de agitação em vortex. Após 30 minutos em repouso, foi acrescentado 2,5 mL de H₂SO₄ concentrado ao tubo, o qual foi agitado em vortex. A mistura foi então deixada em repouso para esfriar à temperatura ambiente.

Por fim, foi realizada a leitura das amostras em espectrofotômetro no comprimento de onda de 485 nm. Para os pontos da curva padrão foram realizadas cinco diluições de glicose anidra com gradiente de concentração na faixa de 0 a 0,4 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de glicose e o teor de carboidratos (%) foi calculado de acordo com a Equação 9:

$$\text{Teor de carboidratos (\%)} = (C \times V / m) \times 100 \quad (\text{Eq. 9})$$

Em que,

C = Concentração dada pelo método de Kochert a partir da equação da curva padrão ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$);

V = Volume de solução de NaOH usado no pré-tratamento da amostra (mL);

m = Quantidade de biomassa liofilizada utilizada na análise (mg).

2.10 *Determinação de lipídeos totais*

A determinação do conteúdo de lipídeos totais foi realizada por gravimetria, de acordo com metodologia adaptada de Bligh e Dyer (1959), levando-se em conta as proporções recomendadas entre os solventes clorofórmio, metanol e água.

Inicialmente foram pesados 0,5 g de biomassa liofilizada em um tubo de vidro, onde foram adicionados 2 mL de água deionizada. À biomassa úmida foram adicionados 7,5 mL de solução clorofórmio: metanol, na proporção 1:2, seguido de agitação em vortex por dois minutos. Foi então adicionado ao tubo 2,5 mL de clorofórmio, sendo novamente agitado em vortex por 30 segundos. Em seguida, foi adicionado à mistura 2,5 mL de água deionizada, seguido de nova agitação em vortex por 30 segundos. A biomassa foi então separada por centrifugação a 3000 rpm durante 10 min e, posteriormente, a fase orgânica (clorofórmica) foi transferida para um becker de vidro, fazendo-a passar por uma pipeta de *Pasteur* contendo algodão e sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4), para retirar quaisquer resíduos de água da amostra. Na sequência, o becker foi colocado sobre placa aquecedora a 50°C até evaporação do remanescente líquido. Por fim, foi levado a estufa a 30°C para secagem até atingir massa constante, restando somente os lipídeos totais na forma sólida. A partir das diferenças de massa de cada becker foi determinado o teor lipídico das amostras, conforme Equação 10.

$$\text{Teor de lipídeos (\%)} = (\text{Mf} - \text{Mi}) \times 100 / \text{Mb} \quad (\text{Eq. 10})$$

Mf = massa final do becker, incluindo o conteúdo lipídico (g);

Mi = Massa inicial do becker (g);

Mb = Massa da amostra liofilizada usada para a extração de lipídeos (g).

2.11 *Perfil de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME)*

O método para avaliar a composição da biomassa em termos de ácidos graxos foi baseado na norma NP EN ISO 5508:1996 e apresentou como principal objetivo determinar, a partir da análise por cromatografia em fase gasosa, a percentagem de cada ácido graxo presente na amostra.

Antes de se proceder à análise cromatográfica, as amostras tiveram que ser preparadas de acordo com a norma EN ISO 5509:2000, que tem como princípio a adição de uma solução metanólica de hidróxido de sódio (NaOH), para que ocorra

saponificação dos glicerídeos, seguida da adição de uma solução de trifluoreto de boro (BF_3), para que ocorra a conversão dos sabões em ésteres metílicos.

Inicialmente, ligou-se o banho-maria para que aquecesse até 85°C e prepararam-se as soluções necessárias para o procedimento, sendo elas: solução metanólica de hidróxido de sódio, dissolvendo-se 2 g de NaOH em 100 mL de metanol (CH_3OH); e solução saturada de cloreto de sódio (NaCl), dissolvendo-se NaCl em água deionizada, até que a solução ficasse saturada. Foram então pesados para um balão de destilação de 50 mL, 150 mg de biomassa microalgal liofilizada (pesados em balança *Mettler Toledo*). Adicionou-se 4 mL da solução metanólica de hidróxido de sódio (NaOH) e reguladores de ebulição, após o que se colocou o balão em refluxo e imerso no banho-maria, durante cerca de 20 minutos. O balão foi agitado a cada minuto, para evitar formação de um anel de NaOH à volta do mesmo. Adicionou-se, através do tubo refrigerante, 5 mL de BF_3 e deixou-se em ebulição durante três minutos, após o que se adicionou, pelo mesmo tubo refrigerante, 3 mL de isooctano (C_8H_{18}). O balão foi depois retirado do calor e, ainda quente, adicionou-se 20 mL da solução saturada de NaCl através do tubo refrigerante. Retirou-se então o balão do suporte e foi adicionada mais solução saturada de NaCl até ao “pescoço” do mesmo, sendo tampado e agitado fortemente durante aproximados 15 segundos. Após separação das fases, a fase superior (com isooctano) contendo a fração lipídica extraída da biomassa microalgal foi transferida, com o auxílio de uma micropipeta, para um tubo de vidro, fazendo-a passar por uma pipeta de *Pasteur* contendo algodão e sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4), para retirar quaisquer resíduos de água da amostra.

Para análise do teor de ésteres metílicos na fração lipídica, adicionou-se cerca de 10 mg de padrão interno (éster metílico do ácido heptadecanóico, C17:0) a 1,0 mL da amostra filtrada acima referida (fase do isooctano), procedendo-se depois a análise cromatográfica. Na Figura 7 é possível observar o resultado de uma das análises cromatográficas realizada a partir da fração lipídica da biomassa de *S. acuminatus* cultivado em meio ASM1.

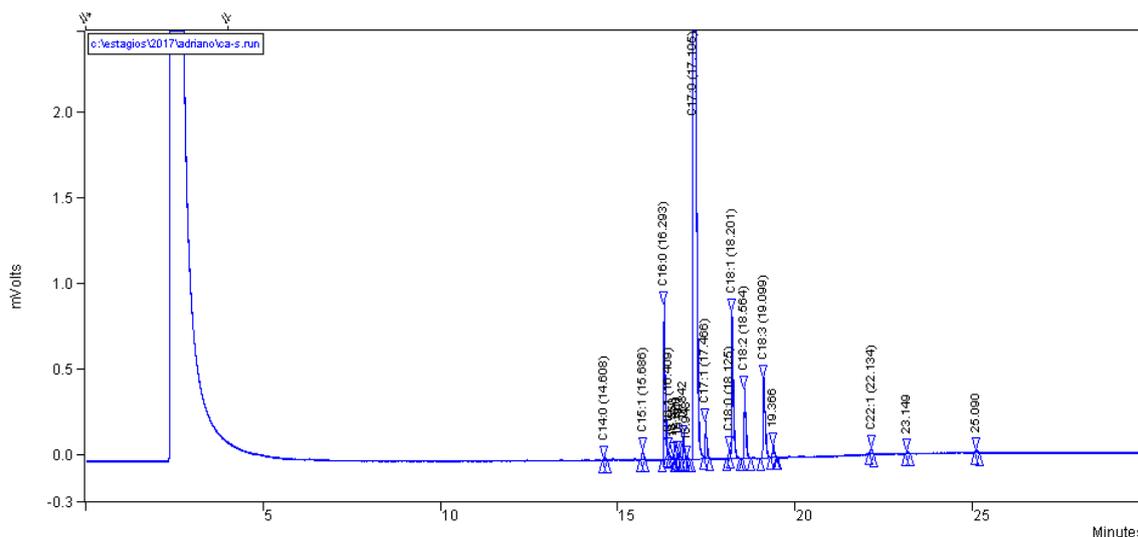


Figura 7: Cromatograma referente à análise da fração lipídica da biomassa obtida de uma cultura de *S. acuminatus* cultivado em meio sintético ASM1. No gráfico é possível visualizar a identificação de cada ácido graxo e o tempo em que são identificados (valores entre parênteses). Fonte: o autor (2018).

As amostras foram analisadas num cromatógrafo (*Varian 3800*), equipado com detector de ionização à chama (FID) e coluna capilar (*Supelcowax 10*, comprimento de 30 m, diâmetro interno de 0,32 mm e espessura de filme de 0,25 μm) nas seguintes condições: temperatura inicial da coluna de 60°C (2 min); taxa de aquecimento de 10°C/min até 200°C, seguida de taxa de aquecimento de 5°C/min até 240°C (7 min); temperatura do injetor de 250°C; temperatura do detector de 250°C; pressão do gás de arrasto (hélio - N50) de 6,0 psi; volume de injeção de 1 μL .

A percentagem relativa de cada um dos ésteres metílicos de ácidos graxos foi calculada através da Equação 11:

$$\% \text{ FAME} = [A_i / (\sum A - A_{PI})] \times 100 \quad (\text{Eq. 11})$$

Onde,

A_i = área do pico do qual se pretende calcular a percentagem;

$\sum A$ = área total dos picos dos vários ésteres metílicos;

A_{PI} = área do pico que corresponde ao padrão interno utilizado.

A identificação dos ésteres metílicos dos ácidos graxos foi feita por comparação com o obtido para a solução padrão, analisada nas mesmas condições cromatográficas. Os ácidos graxos que não constavam no padrão interno foram identificados por meio do padrão Supelco – 37.

O teor de ésteres metílicos de ácidos graxos da fração lipídica contida na biomassa seca foi calculado através da Equação 12.

$$\text{Teor de ésteres totais (\%)} = [(\sum A - A_{PI}) / A_{PI}] \times M_{PI} \times (V_{\text{iso.i}} / V_{\text{iso.f}}) / M_{\text{biomassa}} \times 100 \quad (\text{Eq. 12})$$

Onde,

M_{PI} = massa do padrão interno (C17:0) adicionada à amostra (mg);

$V_{\text{iso.i}}$ = volume total de isooctano usado no preparo da amostra pelo método BF_3 (3 mL);

$V_{\text{iso.f}}$ = volume de isooctano contendo os ésteres metílicos usado para a análise cromatográfica (mL);

M_{biomassa} = biomassa pesada para o processo de transesterificação (método BF_3) (mg).

2.12 Remoção de nutrientes

Para avaliar a eficiência do tratamento de águas residuais pela espécie de microalga cultivada, análises de nitrato (método SM 4500 NO_3^- E), ortofosfato (método SM 4500 P) e condutividade elétrica (método SM 2520 B), segundo as recomendações do *Standard Methods* (APHA, 2012), foram realizadas nos diferentes tratamentos ao final do experimento, após separação da biomassa.

A taxa global de remoção para cada nutriente analisado e a taxa de redução da condutividade elétrica (CE) foram determinadas de acordo com a Equação 13, adaptada de Ferreira et al. (2017).

$$\text{Remoção / Redução (\%)} = (C_i - C_f) / C_i \times 100 \quad (\text{Eq. 13})$$

Em que,

C_i = Concentração inicial do nutriente ou valor inicial da CE no meio de cultivo, antes da inoculação;

Cf = Concentração final do nutriente ou valor final da CE no meio, após remoção da biomassa.

2.13 *Tratamento estatístico*

O experimento foi conduzido seguindo delineamento inteiramente casualizado, com três repetições, e as análises estatísticas foram realizadas por meio do programa R (R CORE TEAM, 2017). Para verificar se as variáveis avaliadas atendiam aos pressupostos para a análise de variância, foi realizada uma avaliação gráfica dos resíduos do modelo utilizado (QQ-Plot) e, em seguida, aplicados os testes de Shapiro-Wilk (normalidade), D'Agostino (simetria), Anscombe (mesocurticidade), estes dois últimos para o caso do não atendimento do pressuposto de normalidade. A homogeneidade de variâncias foi avaliada por meio do teste de Levene. No caso do atendimento dos pressupostos, as variáveis estudadas foram submetidas à análise de variância, e, na situação de efeito significativo ($p < 0,05$), as médias foram comparadas por meio do teste t com correção de Bonferroni. Para medidas com avaliação do efeito no tempo foi realizado o teste de esfericidade de Mauchly, sendo realizadas as correções dos graus de liberdade e dos quadrados médios dos resíduos gerados na análise de variância para condições de esfericidade não atendidas. Em todas as análises estatísticas, considerou-se um valor de 5% para o erro α .

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização do efluente de suinocultura biodigerido e dos meios de cultivo

A caracterização prévia dos efluentes permite compreender, por um lado, em que medida os mesmos podem ser utilizados como meio de crescimento de uma cultura microalgal, e por outro, em que medida as microalgas são eficientes no seu tratamento (BARATA, 2016).

De modo geral, o efluente de suinocultura biodigerido, coletado para a realização do experimento, apresentou pH acima da neutralidade, elevados valores de turbidez, condutividade elétrica e sólidos totais em suspensão, baixo valor de oxigênio dissolvido e valor de nitrogênio total muito superior ao de fósforo total, com maior contribuição da fração nitrogenada amoniacal, conforme mostrado na Tabela 2. Esses valores corroboram com dados da literatura que se referem às águas residuárias provenientes da produção de suínos, as quais chegam a apresentar valores de nitrogênio total e de fósforo total que podem atingir 3213 mg.L⁻¹ e 987 mg.L⁻¹, respectivamente (CAI et al., 2013). A elevada concentração destes nutrientes neste tipo de efluente constituem fonte potencial de poluição ambiental quando não tratado ou manejado inadequadamente.

Tabela 2: Caracterização físico-química do efluente de suinocultura após processo de biodigestão.

Parâmetros	Valores
pH	7,90
Turbidez (NTU)	450,30
Condutividade Elétrica (µS.cm⁻¹)	1575,00
Sólidos Totais em Suspensão (mg.L⁻¹)	3646,67
Oxigênio Dissolvido (mg.L⁻¹)	0,53
Fósforo Total (mg.L⁻¹)	44,00
Ortofosfato (mg.L⁻¹)	24,45
Nitrogênio Total (mg.L⁻¹)	2047,30
Nitrato (mg.L⁻¹)	0,67
Nitrito (mg.L⁻¹)	0,01
Nitrogênio Amoniacal (mg.L⁻¹)	2037,40

O fósforo é um importante nutriente para que ocorra a transferência de energia e biossíntese de DNA nas microalgas (CHO et al., 2011), podendo ser

encontrado nos meios de cultivo na forma de fosfatos e polifosfatos. Contudo, compostos como os fosfatos de cálcio e de ferro formam complexos indisponíveis para as algas, sendo necessária a presença de fósforo solúvel em excesso para sua assimilação. Nesta condição, as microalgas absorvem até 16 vezes mais do que sua necessidade mínima (assimilação de luxo), o que garante o crescimento da célula mesmo em períodos de privação desse nutriente (CHISTI, 2007; LOURENÇO, 2006). Por outro lado, a deficiência de fósforo no meio gera uma situação de estresse fisiológico, que pode resultar nas diminuições do crescimento celular e da produção de clorofila (LI et al., 2014; LOMBARDI; WANGERSKI, 1991), assim como pode afetar o conteúdo e o perfil lipídico da célula (SIRÓN et al., 1989).

Tão importante quanto o fósforo, o nitrogênio é um elemento essencial para a produção de microalgas, podendo ser assimilado através de várias fontes, como nitrogênio molecular, amoniacal, nitrato, nitrito, ureia, aminoácidos, purinas e pirimidinas, sendo preferencialmente assimilado nas formas amoniacal, de nitrato, nitrito e ureia, respectivamente (PEREZ-GARCIA et al., 2011). Entretanto, a preferência por determinada forma pode variar de acordo com a espécie, pH do meio e balanço nutricional. As espécies *Nitzschia laevis* e *Phaeodactylum tricorutum*, por exemplo, exibem preferência por nitrato ou ureia ao invés da forma amoniacal quando o pH é reduzido (TANGO, 2015).

No presente estudo, verificou-se que a maior parte do nitrogênio total no efluente biodigerido correspondeu à fração amoniacal. Segundo Perez-Garcia et al. (2011), esta é a fonte de nitrogênio preferencial das algas, quando o pH está controlado, além de ser a forma que requer menor gasto de energia para ser assimilada quando comparada a outras fontes de nitrogênio. Entretanto, concentrações acima de 28 mg.L⁻¹, como a registrada para o efluente analisado, são consideradas inibitórias em pH acima de 8,5 (SUTHERLAND et al., 2014).

As necessidades nutricionais das microalgas incluem, além de nitrogênio e fósforo, diversos micronutrientes em quantidades consideráveis, com limites e relações específicas para cada espécie (KLIGERMAN; BOUWER, 2015). No efluente analisado, os elevados valores de condutividade elétrica sugerem a presença de diversos íons que podem se configurar como macro e micronutrientes para o cultivo de microalgas a partir desse meio.

A turbidez e os sólidos totais em suspensão também se apresentam como parâmetros de interesse para determinar a adequação de águas residuárias para o

crescimento de microalgas, uma vez que elevados valores destas variáveis podem comprometer a penetração da luz no cultivo e limitar o processo de fotossíntese (CALIXTO, 2016). O elevado valor de turbidez registrado na amostra está diretamente relacionado com a concentração dos sólidos suspensos.

As altas concentrações de sólidos totais em suspensão, fósforo total, nitrogênio total, com maior contribuição de nitrogênio amoniacal, somadas a elevada turbidez e condutividade elétrica registrados no efluente de suinocultura biodigerido denota a necessidade de diluição significativamente maior do que normalmente ocorre em ensaios com outros tipos de efluentes para o crescimento de microalgas. Na Tabela 3 estão mostrados os valores iniciais de turbidez, condutividade elétrica, ortofosfato e nitrato determinados no meio de cultivo sintético e nos meios preparados a partir das diluições do efluente de suinocultura biodigerido, antes da inoculação de *S. acuminatus*, para a realização do presente experimento.

Tabela 3: Valores de turbidez, condutividade elétrica, ortofosfato e nitrato iniciais do meio sintético ASM1 (Controle) e dos meios com diferentes concentrações de efluente de suinocultura biodigerido (Tratamentos com 10%, 15% e 20% de efluente, respectivamente) utilizados para o cultivo de *S. acuminatus*.

	Turbidez (NTU)	Cond. Elétrica ($\mu\text{S.cm}^{-1}$)	Ortofosfato (mg.L^{-1})	Nitrato (mg.L^{-1})
Controle	0,00 \pm 0,00 ^D	468,33 \pm 16,67 ^D	17,78 \pm 5,36 ^A	11,97 \pm 0,67 ^A
10%	197,50 \pm 0,14 ^C	1784,67 \pm 13,69 ^C	2,61 \pm 0,09 ^D	0,60 \pm 0,18 ^B
15%	297,00 \pm 0,08 ^B	2557,67 \pm 20,34 ^B	3,62 \pm 0,03 ^C	0,21 \pm 0,03 ^{BC}
20%	401,30 \pm 0,35 ^A	3336,67 \pm 23,33 ^A	4,77 \pm 0,13 ^B	0,10 \pm 0,00 ^C

Valores expressos em média \pm erro padrão. Valores seguidos pela mesma letra, na mesma coluna, não diferem significativamente pelo teste t com correção de Bonferroni ($p < 0,05$).

Estes resultados permitiram verificar o gradiente físico-químico que se estabeleceu entre os tratamentos com diferentes concentrações de efluente, especialmente para a turbidez, condutividade elétrica e ortofosfato, que foram significativamente maiores no meio com maior concentração de resíduo ($p < 0,05$). Por outro lado, as concentrações de nitrato em todos os tratamentos foram muito inferiores a do controle, aproximando-se do Limite de Quantificação (LQ) do método adotado para a análise ($\text{LQ} = 0,1 \text{ mg.L}^{-1}$).

A partir destes cultivos foi possível avaliar os efeitos que as diferentes concentrações do efluente geraram no crescimento microalgal, na composição química de sua biomassa, bem como o seu potencial biorremediativo, conforme discutido nas próximas secções.

3.2 Crescimento e biomassa

O crescimento de *S. acuminatus* foi avaliado pela determinação da densidade celular em função do tempo, conforme pode ser observado nas diferentes curvas de crescimento nos meios de cultura provenientes da biodigestão de resíduos suínos (10%, 15% e 20% de efluente) comparados ao meio sintético ASM1, escolhido como padrão (Fig. 8 A e B).

As fases de crescimento apresentaram diferentes dias de duração de acordo com o meio de cultivo utilizado em cada tratamento. Para o cálculo da taxa de crescimento e tempo de duplicação foram utilizados os valores de densidade celular correspondentes ao início e ao final da fase exponencial de crescimento dos cultivos (Fase Log), conforme consta na Tabela 4.

Dentre os meios testados, o cultivo controle foi o que apresentou menor fase de indução ao crescimento, com duração de 2 dias, comparado aos 6 dias de adaptação em 10% de efluente e 4 dias nos tratamentos com 15% e 20% de efluente, respectivamente. Essas diferenças nas fases iniciais dos cultivos podem estar relacionadas à elevada turbidez dos meios preparados a partir do efluente (Tab. 3), o que limita a entrada de luz nos cultivos.

Além da redução luminosa, a presença de fatores inibitórios, como a elevada concentração de nitrogênio amoniacal (estimada pelo valor registrado no efluente bruto) e a baixa concentração de nitrato, também podem ter influenciado para um maior período de indução ao crescimento nos meios com efluente suíno.

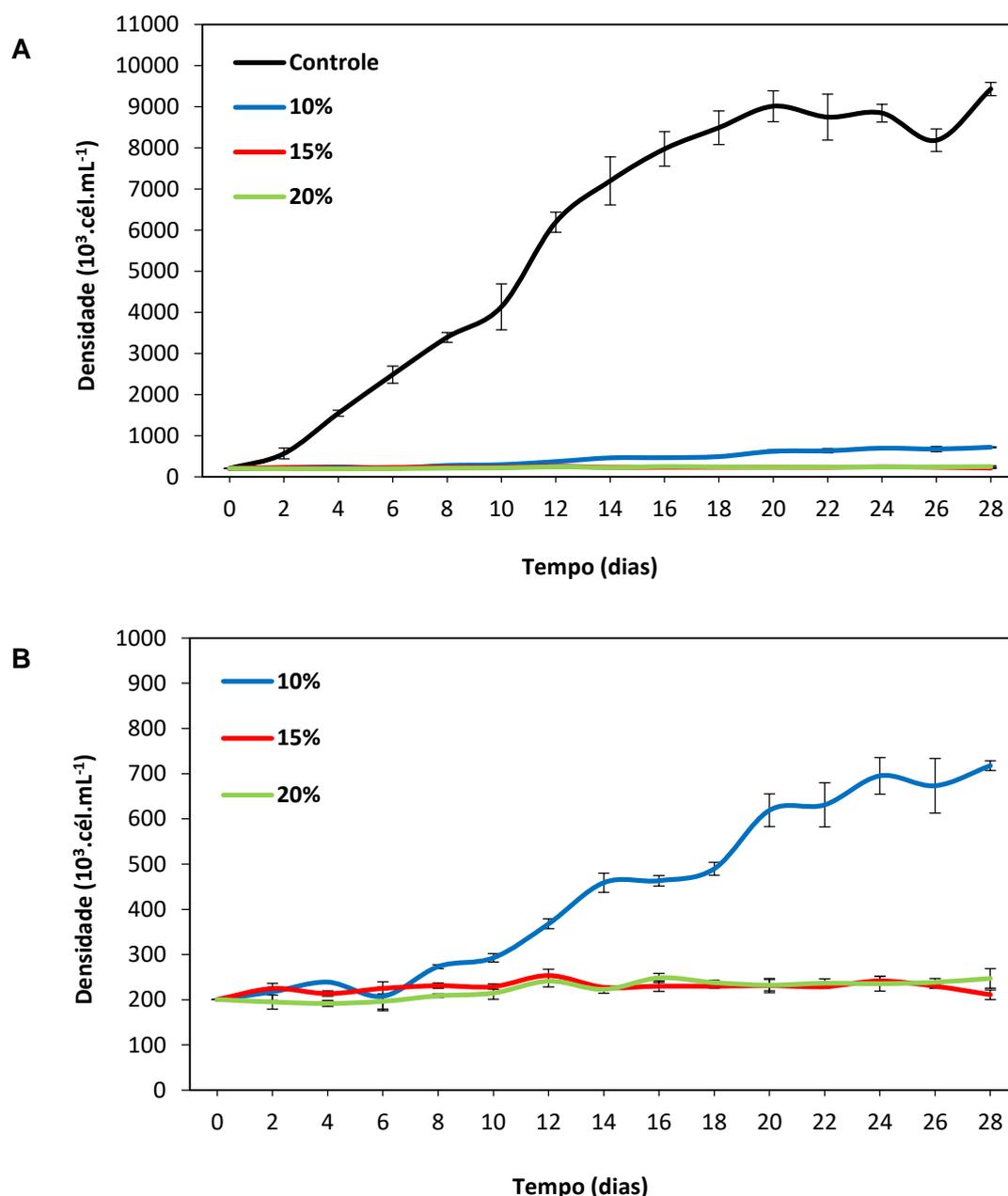


Figura 8: Curvas de crescimento de *S. acuminatus* no meio sintético ASM1 (Controle) e nos meios com diferentes concentrações de efluente de suinocultura biodigerido (Tratamentos com 10%, 15% e 20% de efluente, respectivamente). A. Curvas do Controle e dos Tratamentos com 10%, 15% e 20% de efluente. B. Curvas dos Tratamentos com 10%, 15% e 20% de efluente, em maior escala. Valores expressos em média \pm erro padrão (barras verticais).

Os cultivos em meio controle e em 10% de efluente apresentaram fase exponencial de crescimento com 18 dias de duração, iniciando nos dias 2 e 4, e finalizando nos dias 20 e 24, respectivamente, a partir dos quais se mantiveram na fase estacionária de crescimento. Já os cultivos com 15% e 20% de efluente tiveram

início da fase exponencial no dia 4, com duração de 8 e 12 dias, respectivamente, a partir dos quais também entraram na fase estacionária.

Todos os parâmetros de crescimento avaliados apresentaram efeito de variância significativo ($p < 0,05$), sendo encontrados maiores valores de taxa de crescimento (μ) e rendimento máximo ($R_{\text{máx}}$) no controle, quando comparado aos demais tratamentos, segundo o teste t com correção de Bonferroni (Tab. 4). Os cultivos com 15% e 20% de efluente não apresentaram diferença estatística entre si para os três parâmetros cinéticos analisados, entretanto, exibiram sempre valores significativamente distintos em relação ao controle, inclusive para o tempo de duplicação.

Tabela 4: Parâmetros cinéticos de crescimento (taxa de crescimento - μ , tempo de duplicação - G e rendimento máximo - $R_{\text{máx}}$) e dias de duração da fase de crescimento exponencial (Log) do meio sintético ASM-1 (Controle) e dos meios com diferentes concentrações de efluente de suinocultura biodigerido (Tratamentos com 10%, 15% e 20% de efluente, respectivamente).

	μ (d ⁻¹)	G (dias)	$R_{\text{máx}}$ (10 ³ .cél.mL ⁻¹)	Duração da Fase Log (dias)
Controle	0,16 ± 0,01 ^A	4,46 ± 0,30 ^B	9.232,26 ± 162,67 ^A	2-20
10%	0,07 ± 0,01 ^B	10,36 ± 1,05 ^{AB}	517,30 ± 10,72 ^B	6-24
15%	0,02 ± 0,01 ^C	41,82 ± 12,45 ^A	53,00 ± 13,79 ^C	4-12
20%	0,02 ± 0,01 ^C	36,19 ± 8,15 ^A	47,85 ± 9,66 ^C	4-16

Valores de μ , G e $R_{\text{máx}}$ expressos em média ± erro padrão. Valores seguidos pela mesma letra, na mesma coluna, não diferem significativamente pelo teste t com correção de Bonferroni ($p < 0,05$).

Dentre as três concentrações testadas com meio de suinocultura como alternativa para produção da microalga *S. acuminatus*, o que mais se destacou foi o cultivo com 10% de efluente, conforme evidenciado na Figura 8 B. Neste tratamento a densidade celular máxima alcançada foi de $71,77 \pm 1,07 \times 10^4$ cél.mL⁻¹ no último dia de cultivo, cerca de 3 vezes maior do que os cultivos com 15% e 20% de efluente, os quais apresentaram concentrações celulares máximas de $25,34 \pm 1,37 \times 10^4$ cél.mL⁻¹ e $24,83 \pm 0,96 \times 10^4$ cél.mL⁻¹, no 12º e 16º dia de cultivo, respectivamente.

Apesar do meio com 10% de efluente ter apresentado taxa de crescimento e rendimento máximo significativamente maiores que os tratamentos 15% e 20%, sua curva de crescimento apresentou-se muito abaixo do controle, o qual chegou

ao final do experimento com densidade cerca de 13 vezes maior que a do meio com 10% de efluente. Os mesmos fatores que contribuíram para maior fase de adaptação da microalga nos meios preparados com resíduo suíno, também podem ter influenciado nas demais fases de crescimento ao longo do cultivo.

Gonzalez-Fernandez et al. (2011), ao avaliar o desenvolvimento de consórcios de microalgas e bactérias em resíduos de suínos, já haviam relatado a dificuldade de cultivar microalgas em efluentes tratados anaerobicamente devido à coloração escura do meio. Wang et al. (2010) também demonstraram que apenas meios com turbidez inferior a 95 NTU, obtidos a partir de diluições, não seriam afetados por problemas de difusão de luz e inibição do crescimento em ensaios com *Chlorella* sp. em meio preparado a partir de esterco digerido anaerobicamente. No presente estudo, todos os meios utilizados apresentaram valores de turbidez inferiores (Tab. 3) ao máximo sugerido por Wang et al. (2010), entretanto, nos tratamentos com 15% e 20% de efluente ($29,70 \pm 0,08$ NTU e $40,13 \pm 0,35$ NTU, respectivamente), o crescimento foi significativamente limitado.

As divergências observadas nos parâmetros cinéticos de crescimento de *S. acuminatus* também podem estar associadas à natureza química do efluente utilizado, inclusive devido à presença de substâncias tóxicas que podem inibir o crescimento de determinadas espécies (CAI et al., 2013), como observado nas culturas que apresentaram maiores concentrações de resíduo suíno. Nestas, a elevada concentração de nitrogênio amoniacal pode ter sido o principal fator inibitório do crescimento, conforme já mencionado.

Apesar das reduzidas taxas de crescimento e rendimento máximo registrados nos cultivos com efluente de suinocultura no presente estudo, outros autores obtiveram resultados mais interessantes para o mesmo tipo de efluente. No estudo de Vendrúscolo (2009), por exemplo, em que o mesmo cultivou a microalga *Scenedesmus quadricauda* em efluentes de biodigestão de suínos em comparação ao meio padrão CHU, o pico máximo de crescimento celular alcançado foi de 102×10^4 cél.mL⁻¹ em meio CHU e 105×10^4 cél.mL⁻¹ em meio suíno bruto no 11º dia de experimento. Taher (2013), em estudo similar realizado com a microalga *Scenedesmus* sp., também obteve resultados positivos na utilização de dejetos suíno biodigerido como meio de cultura alternativo para produção de microalgas, alcançando densidade celular de $5199 \pm 458 \times 10^4$ cél.mL⁻¹, após o 15º dia de

cultivo. Cabe ressaltar que este valor foi registrado no meio contendo 10% do resíduo suíno sem nenhum tipo de pré-tratamento.

De maneira geral, pode-se perceber que o efluente de suinocultura biodigerido utilizado no presente estudo não se mostrou tão interessante em relação ao crescimento, o que refletiu diretamente na produção de biomassa microalgal.

As Figuras 9 e 10 mostram a variação da massa seca ao longo dos cultivos com os diferentes meios testados e a produtividade média de biomassa, respectivamente. Observa-se que houve incremento significativo em biomassa ($p < 0,05$), entre o primeiro e o último dia de cultivo, em todos os tratamentos. Entretanto, todos os meios preparados a partir das diluições do efluente suíno apresentaram valores de massa seca significativamente inferiores em relação ao meio sintético.

As concentrações máximas de biomassa seca foram obtidas ao final do experimento, no 28º dia de cultivo, quando o meio controle apresentou $1,11 \pm 0,02 \text{ g.L}^{-1}$ e os meios com 10%, 15% e 20% de efluente apresentaram $0,18 \pm 0,01 \text{ g.L}^{-1}$, $0,14 \pm 0,01 \text{ g.L}^{-1}$ e $0,16 \pm 0,02 \text{ g.L}^{-1}$, respectivamente. Contudo, quando comparados entre si, os tratamentos com efluente de suinocultura não exibiram diferença estatística ($p > 0,05$).

Para o meio sintético ASM1, a principal fonte de nitrogênio e fósforo provém de sais de sódio e potássio (NaNO_3 ; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$; K_2HPO_4). Por outro lado, nos meios preparados a partir do efluente de suinocultura percebe-se a presença de reduzidas concentrações de nitrato (Tab. 3) e, possivelmente, altas quantidades de nitrogênio amoniacal (baseado na composição do efluente bruto - Tab. 2).

As diferenças de resposta da microalga nos meios preparados a partir do efluente de suinocultura em relação ao meio sintético estão associadas com a concentração de nutrientes, e conseqüentemente com a disponibilidade desses elementos para as microalgas. Em meios de cultura com grande disponibilidade de nitrogênio as células tendem a se multiplicar. Por outro lado, em meio com deficiência de nitrogênio as algas tendem a armazenar lipídeos, aumentando assim o tamanho da célula (LOURENÇO, 2006).

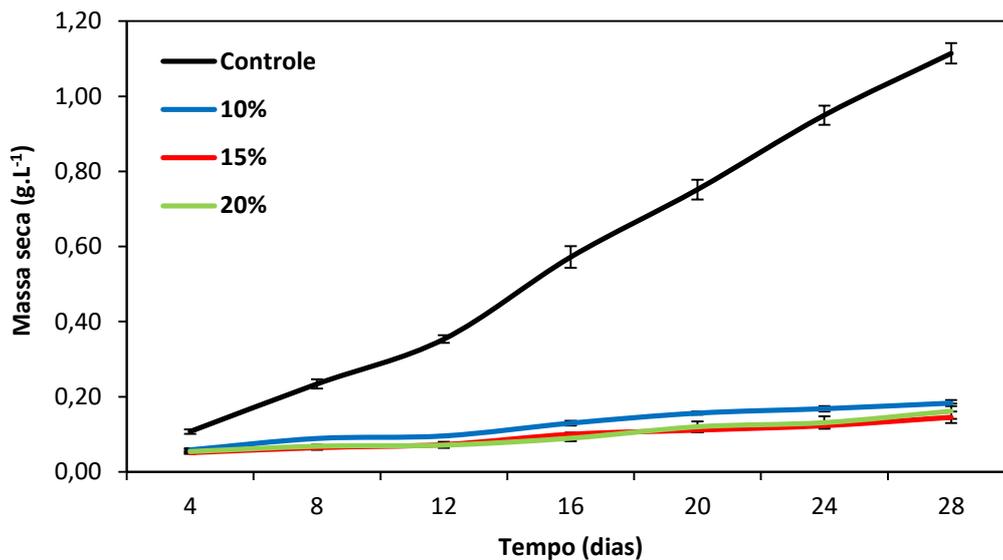


Figura 9: Curvas de biomassa seca no meio sintético ASM1 (Controle) e nos meios com diferentes concentrações de efluente de suinocultura biodigerido (Tratamentos com 10%, 15% e 20% de efluente, respectivamente). Valores expressos em média \pm erro padrão (barras verticais).

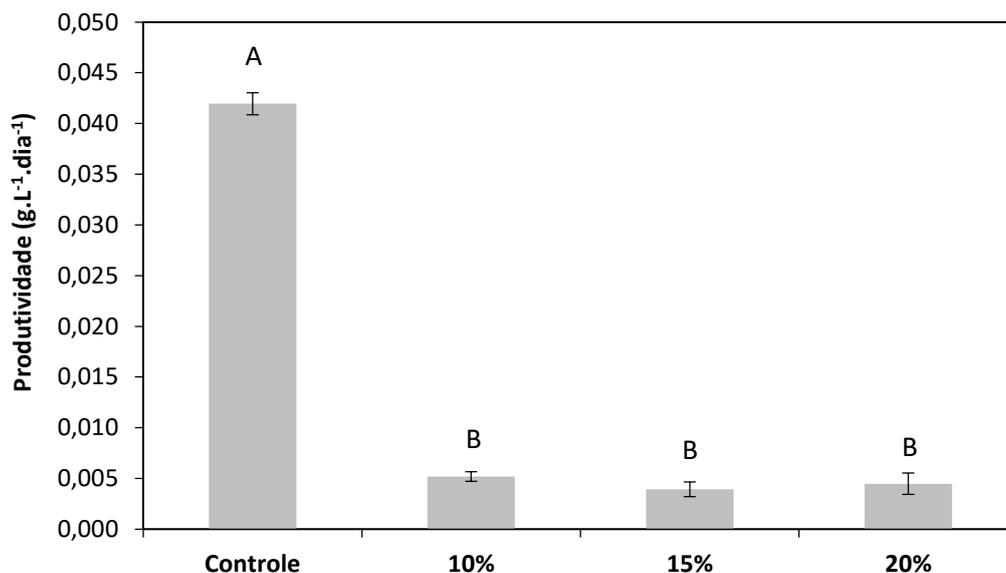


Figura 10: Produtividade média do cultivo de *S. acuminatus* no meio sintético ASM1 (Controle) e nos meios com diferentes concentrações de efluente de suinocultura biodigerido (Tratamentos com 10%, 15% e 20% de efluente, respectivamente). Valores expressos em média \pm erro padrão (barras verticais). Colunas com a mesma letra não diferem significativamente pelo teste t com correção de Bonferroni ($p < 0,05$).

Segundo Perdomo et al. (2001), os efluentes originados na biodigestão podem apresentar considerável variação em sua composição, devido,

principalmente, ao tratamento nutricional dos animais e ao processo de biodigestão utilizado. Desta forma, a composição química do meio de cultura a base de efluentes pode variar na concentração de nutrientes e também na turbidez, tendo efeito direto sobre a irradiação luminosa nos cultivos.

Os resultados de biomassa seca dos cultivos com diferentes concentrações de efluente suíno encontrados no presente trabalho estão abaixo dos valores máximos registrados em outros estudos como o de Abou-Shanab et al. (2013), que obteve $0,43 \text{ g.L}^{-1}$ de biomassa seca cultivando *Scenedesmus obliquus* em resíduo suíno. Além deste, Miyawaki (2014), realizando cultivos experimentais de *Scenedesmus disciformis* com diferentes efluentes agroindustriais em reatores *airlifts*, registrou maior concentração de biomassa em meio com 5% de efluente suíno, apresentando valor de $1,2 \text{ g.L}^{-1}$ no 17º dia de experimento. Por outro lado, Oliveira (2013), cultivando a microalga *Scenedesmus* sp. em escala laboratorial com efluente bovino na concentração de 30% como meio de cultivo, registrou biomassa de $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ ao final do experimento, valor este menor que o registrado no controle da presente pesquisa e maior que os encontrados nos tratamentos com diferentes concentrações de efluente suíno (Fig. 9).

As produtividades em biomassa dos tratamentos com as diferentes concentrações de efluente suíno também não apresentaram diferença estatística entre si e foram significativamente menores em relação ao cultivo em meio sintético (Fig. 10), da mesma forma que ocorreu para a concentração de massa seca.

Outros estudos encontrados na literatura com o mesmo gênero de microalga em diferentes tipos de resíduos têm revelado valores maiores de produtividade de biomassa, do que os reportados na presente pesquisa. A exemplo, os trabalhos de McGinn et al. (2012) com cultivo de *Scenedesmus* sp. em efluente secundário de esgoto ($0,27 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$) e o de Bjornsson et al. (2013) com cultivo de *Scenedesmus* sp. em resíduos diluídos da digestão anaeróbica de esterco bovino e suíno ($0,15$ e $0,19 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, respectivamente).

3.3 Concentração de pigmentos fotossintéticos

As concentrações dos principais pigmentos fotossintéticos analisados nos diferentes meios de cultivo durante o experimento estão representadas na Figura 11 A, B e C. Observa-se que houve incremento dos pigmentos no cultivo controle, com pico de concentração de clorofila *a*, *b* e carotenoides totais no 16º dia do

experimento. Já o cultivo com 10% de efluente apresentou maiores valores médios de clorofila *a*, *b* e carotenoides totais nos dias 20, 28 e 24, respectivamente. No meio com 15% de efluente, as maiores médias de clorofila *a* e carotenoides totais ocorreram no 12º de cultivo e a clorofila *b* foi maior no 4º dia. Já no cultivo com 20% de efluente as maiores concentrações médias dos três pigmentos foram registradas no 4º dia de cultivo.

De maneira geral, os valores das clorofilas *a* e *b* e dos carotenoides totais foram maiores no controle, seguidos pelo tratamento com 10% de efluente e pelos tratamentos com 15% e 20% de efluente, respectivamente. Comparando-se somente os meios com resíduo suíno, ao final do experimento, constatou-se concentrações significativamente maiores ($p < 0,05$) dos pigmentos no tratamento com 10% de efluente, o qual apresentou $1636 \pm 45 \mu\text{g.L}^{-1}$ de clorofila *a*, $754 \pm 23 \mu\text{g.L}^{-1}$ de clorofila *b* e $1034 \pm 32 \mu\text{g.L}^{-1}$ de carotenoides totais. Os meios com 15% e 20% de efluente suíno apresentaram redução da concentração de pigmentos ao longo dos cultivos e não diferiram significativamente entre si ($p > 0,05$).

A limitação do crescimento de *S. acuminatus* nos meios preparados com o efluente de suinocultura biodigerido, especialmente nos mais concentrados, pode ter influenciado diretamente nas concentrações dos pigmentos, uma vez que a taxa reprodutiva das algas acompanha a taxa fotossintética em cultivos autotróficos. Foi possível verificar tendência de incremento de pigmentos com a redução da concentração de resíduo suíno nos meios alternativos. Nota-se expressivo aumento na concentração dos pigmentos em relação à biomassa gerada no tratamento com 10% de efluente, com destaque para a clorofila *b*, que, ao final do experimento, não diferiu significativamente do controle ($1106 \pm 187 \mu\text{g.L}^{-1}$), para o mesmo dia ($p < 0,05$).

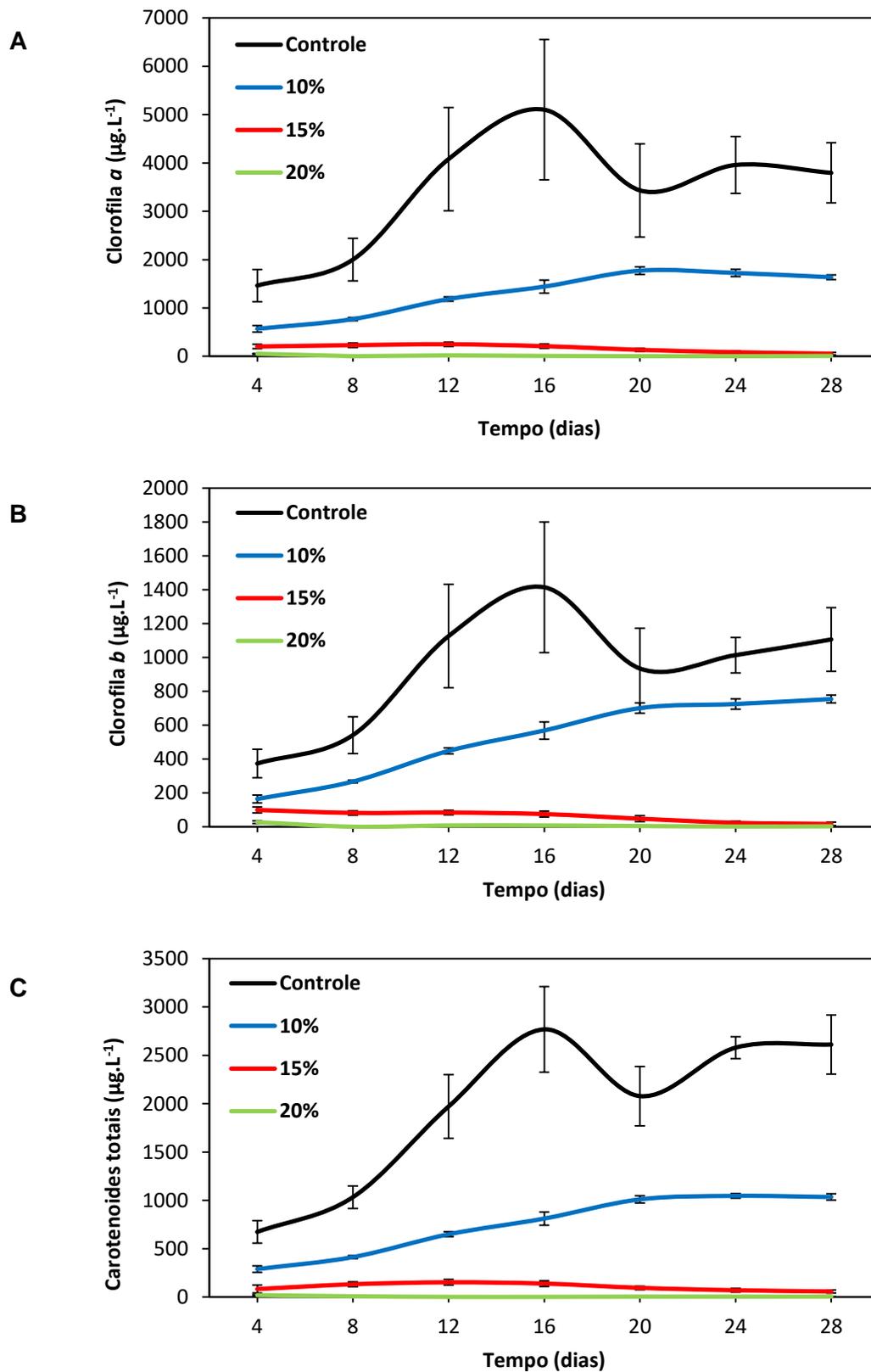


Figura 11: Concentrações de pigmentos fotossintéticos do cultivo de *S. acuminatus* no meio sintético ASM1 (Controle) e nos meios com diferentes concentrações de efluente de suinocultura biodigerido (10%, 15% e 20% de efluente, respectivamente). A. Clorofila *a*. B. Clorofila *b*. C. Carotenoides totais. Valores expressos em média \pm erro padrão (barras verticais).

Os pigmentos produzidos por microrganismos como fungos, bactérias e microalgas tem ganhado cada vez mais espaço no mercado industrial de corantes, na aquicultura e na suplementação animal e humana (VALDUGA et al., 2009; LOURENÇO, 2006). As clorofilas são os pigmentos encontrados em maior quantidade nas microalgas, no entanto o maior interesse comercial está nos carotenoides como o β -caroteno e a astaxantina, uma vez que clorofilas não possuem valor nutricional (LOURENÇO, 2006). Por outro lado, as clorofilas apresentam efeitos benéficos à saúde por suas propriedades anticancerígenas, efeitos anti-inflamatórios e antioxidativos, prevenindo o processo da aterosclerose, bem como doenças cardiovasculares aterotrombóticas (HSU et al., 2005; SIMONICH et al., 2008).

Embora o cultivo com a menor concentração de efluente tenha apresentado consideráveis quantidades de pigmentos em relação à biomassa gerada, esses valores não são tão expressivos e ficam abaixo do que é encontrado em microrganismos utilizados atualmente para essa finalidade no mercado, como por exemplo a microalga *Dunaliella salina* que pode produzir β -caroteno correspondente a 14% de sua massa seca (LOURENÇO, 2006) e tem produtividade por dia estimada de $102,5 \text{ mg.m}^{-2}.\text{d}^{-1}$ de carotenoides totais e $13,5 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ de β -caroteno, em condições ideais (GUEDES et al., 2011).

3.4 Proteínas hidrossolúveis, carboidratos e lipídeos totais

Os resultados obtidos para as análises de proteínas hidrossolúveis, carboidratos e lipídeos totais dos cultivos da microalga *S. acuminatus* em meios com diferentes concentrações de efluente de suinocultura biodigerido e em meio sintético ASM1 estão apresentados na Figura 12.

O teste de variância seguido do teste t com correção de Bonferroni mostrou haver diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos para todas as variáveis analisadas, indicando que as diferentes concentrações dos meios com efluente suíno influenciaram a composição química da biomassa produzida.

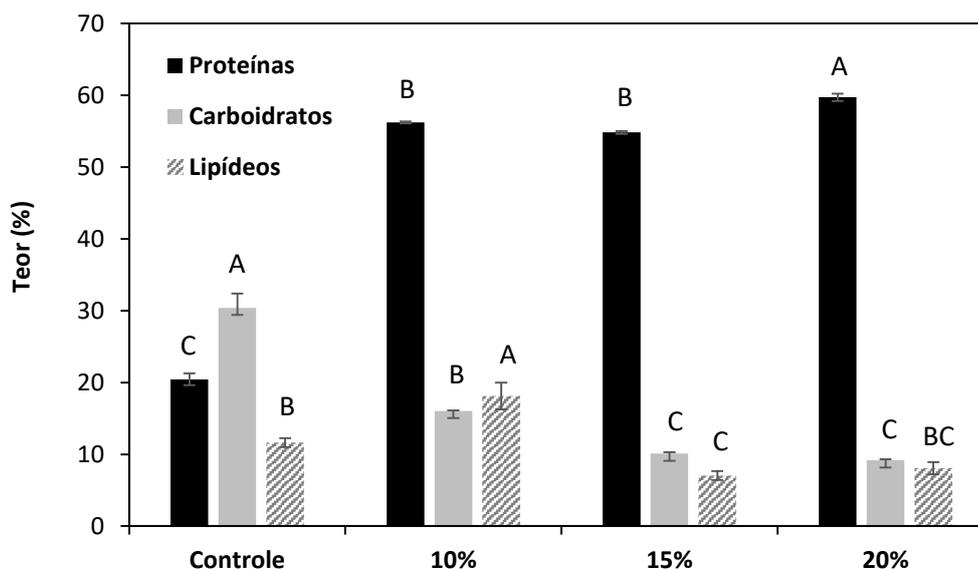


Figura 12: Teores de Proteínas, Carbohidratos e Lipídeos na biomassa de *S. acuminatus* cultivado em meio sintético ASM1 (Controle) e nos meios com diferentes concentrações de efluente de suinocultura biodigerido (Tratamentos com 10%, 15% e 20% de efluente, respectivamente). Valores expressos em média \pm erro padrão (barras verticais). Colunas da mesma cor ou textura seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste t com correção de Bonferroni ($p < 0,05$).

Os teores de proteínas totais solúveis foram significativamente maiores na biomassa dos tratamentos com efluente suíno, quando comparados ao controle (20,4%). Os meios com 10% e 15% de efluente tiveram médias de 56,2% e 54,8%, respectivamente, e não diferiram entre si; entretanto, foram significativamente menores que no meio com 20% de efluente (59,7%).

Ao avaliar a qualidade nutricional de 12 cepas de microalgas do Nordeste do Brasil, Sassi (2016) registrou maior percentual de proteínas (37,7%) em *Scenedesmus acuminatus*, em meio WC (GUILLARD; LORENZEN, 1972). Com base nos resultados desta autora, pode-se inferir que os teores proteicos registrados na presente pesquisa, para a mesma microalga em efluente de suinocultura, foram bastante significativos. Li et al. (2011) demonstraram que as células de microalgas possuem um nível basal de amido em cultivos com baixas quantidades de compostos nitrogenados, mas em ambiente rico em nitrogênio as microalgas tendem a utilizar este nutriente para sintetizar mais proteínas, ácidos nucléicos e fosfolipídeos e promover altas taxas de fixação de dióxido de carbono. De forma similar, no estudo de Ge e Champagne (2016) verificou-se que os maiores teores de proteínas foram registrados em meios com alto teor de nitrogênio em

cultivos de *Chlorella vulgaris* em diferentes concentrações de esgoto doméstico. Estes autores constataram que meios com teores mais elevados de nitrogênio (principalmente o nitrogênio amoniacal) e fósforo propiciavam diminuição nas concentrações de carboidratos e aumento em proteínas, como também foi observado no presente estudo.

As elevadas concentrações de proteínas determinadas nos meios com maiores concentrações de efluente também podem estar relacionadas ao crescimento bacteriano (comumente registrado em culturas não axênicas), uma vez que nestes tratamentos foram registradas reduzidas densidades celulares de *S. acuminatus* ao longo dos cultivos (Fig. 8 B).

Efeito inverso ao do teor de proteínas foi observado para a concentração de carboidratos, sendo esta significativamente maior no meio controle (30,4%) quando comparado aos demais tratamentos. O meio com 10% de efluente suíno apresentou teor médio de 16% de carboidratos, sendo estatisticamente maior que as médias registradas para os meios com 15% e 20% de efluente (10,1% e 9,1%, respectivamente). Este resultado está relacionado ao maior crescimento microalgal no tratamento 10%, quando comparado aos demais meios preparados com efluente suíno.

Os carboidratos presentes nas microalgas apresentam interesse não apenas para fabricação de suplementos e rações animais, mas também para a produção de biocombustível, por ser importante fonte de carbono para a fermentação (CHEN et al., 2013). Os valores de carboidratos totais obtidos com a utilização do efluente de suinocultura não foram tão expressivas, entretanto, se aproximam de valores encontrados em outros estudos, como o de Sassi (2016), que registrou concentração de carboidratos de 14,5% para a mesma microalga em meio sintético.

O maior teor de lipídeos totais foi registrado para o cultivo com 10% de resíduo suíno (média de 18,1%), sendo significativamente diferente do teor lipídico registrado no controle (11,6%). Os meios com 15% e 20% de efluente apresentaram valores médios de 7,0% e 8,0%, respectivamente, e não houve diferença significativa entre eles e entre o controle e o tratamento 20% ($p > 0,05$).

Apesar de produzir menor quantidade de massa seca em relação ao meio controle, o cultivo em 10% de efluente suíno parece ter atingido uma condição mais próxima ao ideal para o aumento do teor lipídico total na biomassa. Tal diluição do efluente pode ter propiciado uma concentração de nitrogênio amoniacal que

favorecesse o acúmulo celular de lipídeos. Segundo Ho et al. (2014), a depleção de nitrogênio força o metabolismo das microalgas a diminuir os teores de proteínas ou peptídeos, aumentando assim o percentual de compostos ricos em energia tais como carboidratos e lipídios, ou polissacarídeos e ácidos graxos. Além da concentração e do balanço nutricional dos meios, Drira et al. (2016) apontam que outros parâmetros, como intensidade luminosa, pH e temperatura, podem influenciar diretamente na acumulação lipídica.

Sassi (2016) registrou concentração menor (6,9%) que as do presente estudo, trabalhando com a mesma espécie em meio sintético WC. Por outro lado, na literatura é possível encontrar valores de lipídeos próximos aos registrados neste estudo, porém em outros substratos residuais, tal como efluente urbano e resíduo de laticínio digerido, com valores de 11% (LI et al., 2011) e 10,1% (WANG et al., 2010) de lipídeos, respectivamente, em *Chorella* sp.; e águas residuárias industriais, com 18,4% de lipídeos em *Chlamydomonas* sp. (WU et al., 2012). Em esgoto doméstico tem-se verificado produtividade lipídica de microalgas inferior a 10% (WU et al., 2014).

O teste comparativo de médias mostrou haver decréscimo significativo no conteúdo de carboidratos com o aumento da concentração de efluente de suinocultura nos meios, ao passo que houve acréscimo no teor proteico dos mesmos, além de evidenciar maior concentração lipídica no cultivo com 10% de efluente. Esse resultado é interessante, considerando que o meio de cultivo com efluente de suinocultura biodigerido pode ser empregado para a produção de proteínas e lipídeos na biomassa microalgal, podendo ser utilizada para diversas finalidades: produção de biodiesel, agregando valor ao processo produtivo através do uso da biomassa residual da extração lipídica (HU et al., 2008); incorporação da biomassa em ração animal em substituição aos farelos convencionais e na aquicultura. Ressalta-se, que dependendo das condições de cultivo e estágio da fase de crescimento no momento da colheita é possível direcionar o metabolismo dos nutrientes para a produção do metabólito desejado.

3.5 Perfil de ésteres metílicos de ácidos graxos

A composição dos ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME - *Fatty Acids Methyl Esters*) extraídos da biomassa de *S. acuminatus* obtida ao final do

experimento, bem como os teores de insaturações e o total de ésteres presentes em cada cultivo estão relacionados na Tabela 5.

Tabela 5: Composição de Ésteres Metílicos de Ácidos Graxos - FAME (% do total de ésteres), teores de instauração e total de ésteres na biomassa de *S. acuminatus* cultivado em meio sintético ASM1 (Controle) e nos meios com diferentes concentrações de efluente de suinocultura biodigerido (Tratamentos com 10%, 15% e 20% de efluente, respectivamente).

FAME (%)	Controle	10%	15%	20%
Mirístico (C14:0)	0,34 ^B	0,66 ^A	ND	ND
Miristoleico (C14:1)	ND	0,50	ND	ND
Pentadecanoico (C15:0)	0,29 ^C	0,38 ^{BC}	1,00 ^{AB}	1,49 ^A
Pentadecenoico (C15:1)	1,79 ^B	3,10 ^A	ND	ND
Palmitico (C16:0)	25,18 ^A	22,01 ^B	20,10 ^B	16,07 ^C
Palmitoleico (C16:1)	0,50 ^C	2,36 ^B	5,52 ^A	2,59 ^B
Hexadecadienoico (C16:2)	0,83 ^B	1,37 ^A	ND	ND
Hexadecatrienoico (C16:3) ω-3	2,83 ^B	4,29 ^A	1,54 ^C	1,16 ^C
Heptadecenoico (C17:1)	4,95 ^B	6,31 ^A	ND	ND
Estearico (C18:0)	1,73 ^B	1,58 ^B	4,24 ^A	4,19 ^A
Oleico (C18:1) ω-9	27,18 ^B	13,70 ^C	41,49 ^A	45,92 ^A
Linoleico (C18:2) ω-6	11,22 ^B	14,60 ^A	3,67 ^C	3,23 ^C
Linolênico (C18:3) ω-3 + ω-6	17,28 ^A	18,72 ^A	11,20 ^B	10,62 ^B
Araquídico (C20:0)	0,63 ^B	1,59 ^A	ND	ND
Erúcico (C22:1)	0,84 ^B	1,35 ^A	ND	ND
OUTROS	4,42 ^C	7,48 ^{BC}	11,25 ^{AB}	14,73 ^A
SFA	28,16 ^A	26,21 ^{AB}	25,34 ^{BC}	21,75 ^C
MUFA	35,25 ^{BC}	27,33 ^C	47,00 ^{AB}	48,51 ^A
DUFA	12,05 ^A	15,97 ^A	3,67 ^B	3,23 ^B
TUFA	20,11 ^{AB}	23,01 ^A	12,74 ^{BC}	11,78 ^C
Ésteres totais (mg.g⁻¹ms)	52,5 ^A	36,8 ^{AB}	20,1 ^B	22,2 ^B

Médias seguidas pela mesma letra, na mesma linha, não diferem significativamente pelo teste t com correção de Bonferroni ($p < 0,05$). SFA - ácidos graxos saturados. MUFA - ácidos graxos monoinsaturados. DUFA - ácidos graxos di-insaturados. TUFA - ácidos graxos tri-insaturados. ND - Não Detectado na amostra. ms - massa seca. ω -3 - ômega 3. ω -6 - ômega 6. ω -9 - ômega 9.

Segundo Hu et al. (2008), o conteúdo e a composição de ácidos graxos em microalgas são específicos para cada espécie, predominando, em geral, uma

mistura de ácidos graxos insaturados: palmitoleico (C16:1), oleico (C18:1), linoleico (C18:2) e linolênico (C18:3); e ácidos graxos saturados: palmítico (C16: 0) e esteárico (C18:0) (ABOU-SHANAB et al., 2013). Esta mesma composição foi encontrada nos cultivos avaliados no presente estudo, com variações nos teores específicos de cada éster, em função das diferentes concentrações do efluente de suinocultura utilizadas para compor os meios alternativos, além do meio controle.

Os ácidos graxos com maior representatividade, considerando todos os tratamentos, foram o ácido graxo oleico (13,70-45,92%), palmítico (16,07-25,18%) e linolênico (10,62-18,72%), conforme evidenciado na Figura 13. Tal composição para *S. acuminatus* corrobora com a literatura, visto que esta aponta que as clorofíceas apresentam predominância destes três ácidos graxos. Mishra et al. (2015), por exemplo, verificaram que a clorofícea do gênero *Chlamydomonas* é caracterizada por sintetizar ácidos graxos de cadeia curta a média, sendo que dentre esses últimos se destacam principalmente os ácidos palmítico, oleico e linolênico. Essa composição também foi constatada para a clorofícea *Scenedesmus obliquus* (SALAMA et al., 2013).

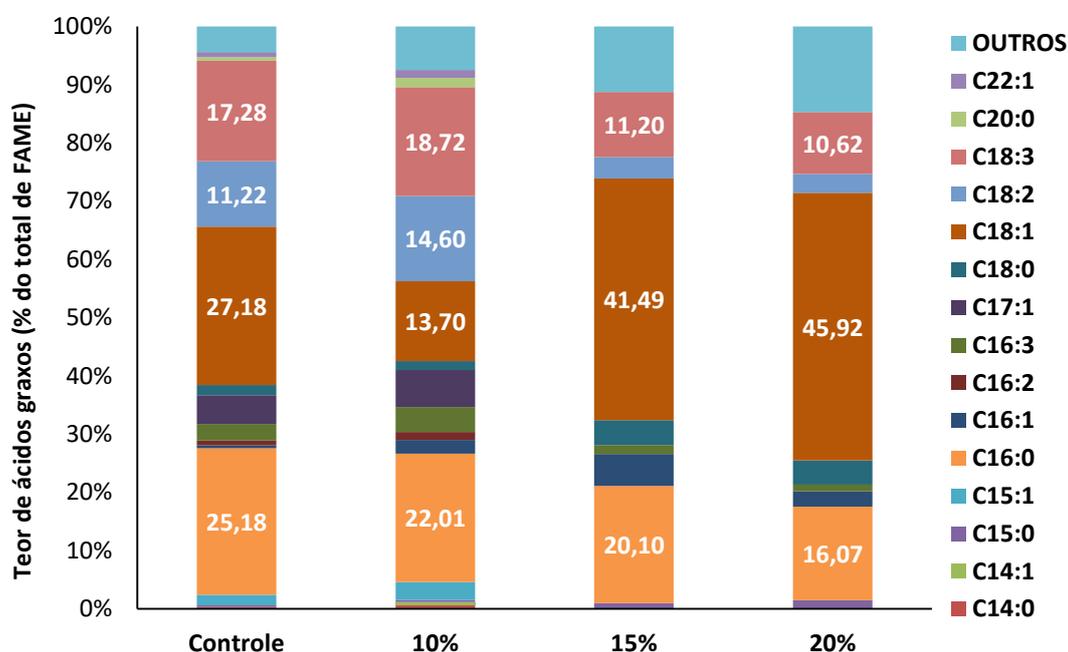


Figura 13: Perfil de Ésteres Metílicos de Ácidos Graxos (% do total de FAME) na biomassa de *S. acuminatus* cultivado em meio sintético (Controle) e nos meios com diferentes concentrações de efluente de suinocultura biodigerido (Tratamentos com 10%, 15% e 20% de efluente, respectivamente).

A composição dos FAME na biomassa microalgal variou de forma significativa ($p < 0,05$) no que diz respeito ao número de insaturações (Tab. 5). Entre os tratamentos, as concentrações dos ácidos graxos saturados (SFA), monoinsaturados (MUFA), di-insaturados (DUFA) e tri-insaturados (TUFA) variaram entre 21,75-28,16%, 27,33-48,51%, 3,23-15,97% e 11,78-23,01%, respectivamente. Tanto no cultivo controle quanto nos tratamentos com as diluições do efluente de suinocultura, os MUFA foram os que apresentaram maior contribuição na composição do perfil de FAME. Os tratamentos 15% e 20% apresentaram maiores valores médios de MUFA (47% e 48,51%, respectivamente) e não diferiram significativamente entre si ($p > 0,05$). Por outro lado, o meio com 10% de efluente apresentou menor teor médio de MUFA (27,33), sendo estatisticamente equivalente ao meio controle (35,25%).

Dentre os ésteres monoinsaturados, o ácido oleico se destacou nos meios com 15% e 20% de efluente, contribuindo com percentuais de 41,49% e 45,92% do total de FAME, respectivamente. Este éster também foi predominante na fração lipídica do controle, que apresentou teor de 27,18%, sendo significativamente inferior aos tratamentos anteriormente mencionados. Já o meio com 10% de efluente apresentou o ácido palmítico (saturado) como o éster de maior teor (22,01%) na composição do perfil de FAME, entretanto, não diferiu em relação ao tratamento com 15% de efluente ($p > 0,05$) e foi significativamente menor que o percentual deste mesmo ácido no meio controle ($p < 0,05$). O ácido palmítico é reconhecido por sua vasta aplicação na produção de cosméticos (MOHAN et al., 2011) e nos últimos anos vem sendo apontado como um novo e específico inibidor do HIV-1 (LIN et al., 2011). Esse ácido também pode ser utilizado como surfactante em produtos de limpeza, sendo sua principal fonte a palma (dendê) que produz cerca de 40% (ZAMBIAZI et al., 2007).

Variações nos teores de ácido palmítico (C16:0), oleico (C18:1) e linolênico (C18:3) também foram observadas por Wu et al. (2012) em cultivo de *Chlamydomonas* sp. em águas residuárias industriais. Do mesmo modo, Zheng et al. (2016) observaram aumento nas proporções de ácidos graxos saturados e monoinsaturados (MUFA) e diminuição de ácidos graxos poli-insaturados em cultivos de *Chlorella* sp., *Chlorella sorokiniana*, *Phaeodactylum tricornutum* efetuados em concentrações elevadas de extratos de resíduos de kelps (6,0-8,0%),

indicando que a adição do extrato aumenta o potencial destas espécies para produção de biodiesel.

Chisti (2007) considera que o biodiesel produzido a partir de óleos de microalgas seja a única fonte renovável capaz de substituir o diesel derivado do petróleo e prover sua demanda no ramo dos transportes. Todavia, para que a utilização desse óleo se torne viável, é imperioso que sua composição de ésteres metílicos cumpra algumas exigências que garantam a qualidade final do biodiesel produzido (RAWAT et al., 2013). De acordo com Knothe et al. (2006), as normativas europeias EN 14214, para biodiesel destinado ao uso nos transportes, e EN 14213, do biodiesel como óleo de aquecimento, determinam que o teor máximo de TUFA aceitável, principalmente o ácido graxo linolênico, seja de 12%; e de 1% para PUFA - ácidos graxos poli-insaturados. No presente trabalho, apenas o perfil de FAME do tratamento com 20% de efluente atenderia a normativa quanto ao teor de TUFA, enquanto em nenhum dos tratamentos foram identificadas espécies de PUFA.

Segundo Boamar (2010), as principais propriedades do biodiesel influenciadas diretamente pela composição de ácidos graxos no óleo são: o número de cetano, viscosidade, ponto de entupimento a frio, estabilidade oxidativa e índice de iodo. Tendo em vista os parâmetros de qualidade do biodiesel, é importante que as microalgas cultivadas apresentem elevado teor de ácidos graxos, preferencialmente saturados e monoinsaturados, bem como baixa quantidade de poli-insaturados. Quanto maior o número de insaturações, menor a estabilidade do biodiesel à oxidação. Dessa forma, biodiesels com predomínio de ácidos graxos monoinsaturados são os que apresentam os melhores resultados nas propriedades pertinentes (KNOTHE et al., 2009; KNOTHE, 2005). Neste trabalho, tais condições foram observadas, principalmente, no perfil de FAME dos cultivos realizados com as maiores concentrações de efluente suíno (Tab. 5).

Além do potencial de aplicação na área de biocombustíveis, as microalgas também são importantes fontes primárias de ácidos graxos que constituem os ômegas utilizados para aplicações diversas na indústria nutracêutica, tais como aditivos para leite de formulação infantil e enriquecimento de ovos através da adição da biomassa rica em ômega na ração de frangos (PULZ; GROSS, 2004). De acordo com Gómez-Cortés et al. (2016), alguns ômegas, como o ω -3, são fundamentais para prevenção de doenças cardiovasculares e aterosclerose. Em termos percentuais de ômegas (somatório de ω -3, ω -6 e ω -9), todos os cultivos

realizados no presente estudo apresentaram em sua composição de FAME mais de 50%. Esse resultado indica potencial para utilização na indústria de alimentos, que, conforme Calixto (2016), agregado ao biodiesel, reforça a possibilidade de produção segundo o conceito de biorrefinaria.

Apesar dos perfis de FAME de *S. acuminatus* terem sido interessantes para fins biotecnológicos, a quantidade de ésteres totais na biomassa produzida foi muito pequena, comprometendo sua aplicação. As maiores concentrações médias de ésteres totais foram registradas no cultivo controle (52,5 mg.g⁻¹) e no meio com 10% de efluente suíno (36,8 mg.g⁻¹), sendo que as mesmas não apresentaram diferença estatística entre si ($p < 0,05$), conforme mostrado na Tabela 5. Os tratamentos com 15% e 20% de efluente de suinocultura tiveram concentrações significativamente mais baixas, quando comparadas ao controle, com médias de 20,1 mg.g⁻¹ e 22,2 mg.g⁻¹, respectivamente. Dados da literatura evidenciam teores de ésteres muito variados em diferentes espécies, entretanto, na maioria deles os valores reportados ultrapassam os encontrados neste estudo. Soares et al. (2014), por exemplo, registraram valores de ésteres de 50,2 mg.g⁻¹ em *Chlorella* sp. e 636,4 mg.g⁻¹ em *Chaetoceros muelleri*. Menezes et al. (2013) reportaram teores de ésteres entre 198 a 422 mg.g⁻¹, superior aos 196,9 mg.g⁻¹ encontrado na soja, para *Choricystis* sp., *Monoraphidium komarkovae*, *Kirchneriella lunaris*, e *Tetranephris brasiliensis*, concluindo que estas espécies apresentam potencial para produção de biodiesel. Nenhum dos meios testados no presente estudo, incluindo o meio sintético, produziu biomassa com teor de ésteres que superasse ou se aproximasse ao valor obtido para a soja, indicando que os mesmos devem ser melhorados para que possam ser utilizados para a produção de biodiesel a partir de *S. acuminatus* ou que outras cepas de microalgas sejam testadas utilizando este efluente.

3.6 Remoção de nutrientes

Na Tabela 6 são apresentados os percentuais de remoção de ortofosfato e nitrato e a redução da condutividade elétrica nos meios com diferentes concentrações do efluente suíno biodigerido, bem como no controle com meio sintético ASM1, após a separação da biomassa microalgal, no 28º dia de cultivo.

Tabela 6: Percentual de remoção de nutrientes (ortofosfato - PO_4^{3-} - e nitrato - NO_3^-) e de redução da Condutividade Elétrica (CE) ao final dos cultivos no meio sintético (Controle) e nos meios com diferentes concentrações de efluente de suinocultura biodigerido (Tratamentos com 10%, 15% e 20% de efluente, respectivamente).

	% Remoção PO_4^{3-}	% Remoção NO_3^-	% Redução CE
Controle	99,58 ± 0,19 ^A	93,40 ± 0,49	35,48 ± 2,56 ^A
10%	94,27 ± 3,83 ^A	ND	33,38 ± 0,43 ^A
15%	90,67 ± 4,72 ^A	ND	33,39 ± 1,04 ^A
20%	68,57 ± 15,44 ^A	ND	33,44 ± 1,26 ^A

Valores expressos em média ± erro padrão. ND - Não Determinado devido a valor final abaixo do Limite de Quantificação do método (LQ = 0,10 mg.L⁻¹).

Apesar da microalga *S. acuminatus* ter apresentado crescimento pouco expressivo e baixa produção de biomassa nos meios com efluente, observou-se, ao final do experimento, elevado percentual de remoção de ortofosfato. Cabe destacar que não foi possível calcular o percentual de remoção de nitrato dos meios, uma vez que as concentrações deste nutriente, ao final do experimento, não estavam dentro do limite mínimo de quantificação do método utilizado (LQ = 0,10 mg.L⁻¹). Entretanto, estima-se que o nitrato tenha sido removido em sua totalidade, ou quase toda, uma vez que as concentrações iniciais foram muito menores que a reportada para o meio controle, conforme mostrado anteriormente na Tabela 3.

A eficiência de remoção destes e de outros nutrientes também foi avaliada no trabalho realizado por Wang et al. (2010). Nele, os autores realizaram experimentos com a microalga *Chlorella* sp. em meios de cultivo alternativos elaborados com efluente de suinocultura biodigerido em diferentes diluições, sendo uma delas 10%. As remoções de nitrogênio total, nitrogênio amoniacal e fosfato relatadas foram da ordem de 82,5%; 100% e 70,1%, respectivamente. No presente estudo, pode-se perceber que o percentual de remoção de fosfato no meio com 10% de efluente apresentou média superior ao registrado por Wang et al. (2010), não diferindo estatisticamente dos demais tratamentos ($p > 0,05$). Outro estudo, realizado por Woertz et al. (2009), com resíduo proveniente da indústria de laticínios diluídos a 10% e 25% com mix de microalgas (dentre elas a *Scenedesmus* sp.) apresentou remoção de 96% de nitrogênio amoniacal e mais de 99% de fosfato. Esse comportamento também foi observado por diversos autores,

independentemente do resíduo e espécie utilizados (LIM et al., 2010; CHINNASAMY et al., 2010; CHO et al., 2011).

A condutividade elétrica é a capacidade de uma solução em conduzir corrente elétrica em função dos íons presentes nela, constituindo uma variável importante a ser analisada, visto que pode fornecer informações relevantes sobre a condição nutricional dos meios (ESTEVES, 2011). No presente estudo, o percentual de redução desta variável permitiu estimar, de forma indireta, o quanto os cultivos de *S. acuminatus* puderam assimilar dos sais minerais dissolvidos presentes nos meios. Em todos os tratamentos com efluente suíno, bem como no controle, a média de redução da condutividade elétrica esteve acima de 30% e não diferiu significativamente entre os diferentes meios ($p > 0,05$).

Os dados obtidos para os cultivos em meios com efluente suíno mostraram eficiência na remoção de nutrientes por *S. acuminatus*, indicando que esta microalga também pode ser utilizada para reduzir cargas de nutrientes de outros tipos de águas residuárias, podendo assim gerar biomassa de menor custo destinada a diversas aplicações, como a produção de biodiesel e coprodutos (JI et al., 2013).

É importante destacar que alterações nas respostas fisiológicas da microalga cultivada, induzidas por meio de variações da temperatura e da luminosidade, ou mesmo por meio da introdução de complementos nutricionais que aproxime a composição do efluente suíno ao meio sintético, poderiam incrementar a produção de biomassa, o que seria de grande interesse às indústrias que geram este tipo de efluente.

4. CONCLUSÕES

De maneira geral, o efluente de suinocultura biodigerido utilizado no experimento não se mostrou tão interessante em relação ao crescimento e produção de biomassa microalgal. Os tratamentos com as diferentes diluições do resíduo biodigerido apresentaram taxa de crescimento, rendimento celular máximo e produtividade de biomassa muito inferiores ao cultivo com meio sintético. Dentre as concentrações testadas, destacou-se o cultivo com 10% de efluente. Nos demais tratamentos (15% e 20% de efluente), o crescimento de *S. acuminatus* foi, provavelmente, limitado pelas elevadas concentrações de nitrogênio amoniacal nos meios.

Embora o cultivo com a menor concentração de efluente tenha apresentado consideráveis quantidades de clorofilas e carotenoides em relação à biomassa gerada, esses valores não foram tão expressivos, em termos de produtividade desses pigmentos para fins comerciais.

Com relação à composição química da biomassa produzida, foi constatado decréscimo no conteúdo de carboidratos com o aumento da concentração de efluente de suinocultura nos meios, ao passo que houve acréscimo no teor proteico dos mesmos. Além disso, maior concentração lipídica foi observada no cultivo com 10% de efluente. Apesar dessas variações, em todos os cultivos com efluente de suinocultura, o teor de proteínas esteve acima de 50%, em relação a biomassa total, evidenciando potencial uso na suplementação alimentar humana e como fonte proteica em rações animais, desde que avaliados os possíveis riscos de contaminação.

Apesar de *S. acuminatus* ter apresentado perfis de FAME interessantes do ponto de vista biotecnológico, a quantidade de ésteres totais na biomassa produzida foi muito baixa, comprometendo a sua aplicação nas condições testadas. Nenhum dos tratamentos, incluindo o meio sintético, produziu biomassa com teor de ésteres que superasse ou se aproximasse ao valor obtido para a soja, indicando que os mesmos devem ser melhorados para que possam ser utilizados para a produção de biodiesel a partir de *S. acuminatus* ou que outras cepas de microalgas sejam testadas utilizando este efluente.

Ainda que a microalga tenha apresentado um reduzido crescimento, os dados obtidos para os cultivos em meios com efluente suíno mostraram eficiência

na remoção de nutrientes e redução da condutividade elétrica, indicando que *S. acuminatus* apresenta potencial para ser empregada na biorremediação deste e de outros tipos de águas residuárias, podendo assim gerar biomassa de menor custo.

A partir desta pesquisa, conclui-se que a microalga estudada pode atuar como biorremediadora do efluente de suinocultura biodigerido, entretanto, novas pesquisas devem ser realizadas com o intuito de otimizar a produção da biomassa gerada para que possa ser empregada como fonte de produtos de interesse biotecnológico. Nesse sentido, para as futuras investigações com este tipo de efluente, sugere-se que sejam avaliadas concentrações ainda menores que as testadas no presente estudo, como alternativa de meio de cultivo; que o efluente seja testado como complemento nutricional para a composição de meios de cultivo de menor custo, considerando que consiste em rica fonte de nutrientes; que o efluente seja coletado em diferentes momentos após sua liberação (antes de passar pelo biodigestor e após passar pela lagoa de estabilização) para avaliar seu potencial como meio de cultivo; e que sejam testadas outras cepas de algas com a utilização do efluente em questão, avaliando seu desenvolvimento, inclusive, em cultivos heterotróficos.

5. REFERÊNCIAS

- ABOU-SHANAB, R.A.I.; JI, M.K.; KIM, H.C.; PAENG, K.J.; JEON, B.H. Microalgal species growing on piggery wastewater as a valuable candidate for nutrient removal and biodiesel production. **J. Environ. Manage**, v.115, p.257–264, 2013.
- ABPA - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL. **Relatório Anual** 2016. Disponível em: <http://abpa-br.com.br/setores/avicultura/publicacoes/relatorios-anuais/2016>. Acesso em 24 nov. 2017.
- APHA. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**, American Public Health Association, 21^o ed., Washington, D.C., 2012.
- APPELS, L.; BAEYENS, J.; DEGREVE, J.; DEWIL, R.; Principles and potential of the anaerobic digestion of waste-activated sludge, **Progress in Energy and Combustion Science**, vol. 34, p.755-781, 2008.
- BARATA, A.F.L. Microalgas: produção econômica e ambientalmente sustentável. **Dissertação de Mestrado Integrado em Engenharia da Energia e do Ambiente**, Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências – FCUL, 2016. 81p.
- BECKER, E. W. **Microalgae: biotechnology and microbiology**, Ed. Baddiley, J. et al., Cambridge Univ. Press, Cambridge, New York. 1994.
- BICUDO, C. E. M.; MENEZES, M. **Gêneros de algas de águas continentais do Brasil: chave para identificação e descrições**. São Carlos: Rima. 502p. 2006.
- BJORNSSON, W.J.; NICOL, R.W.; DICKINSON, K.E.; MCGINN, P.J. Anaerobic digestates are useful nutrient sources for microalgae cultivation: functional coupling of energy and biomass production. **J. Appl. Phycol**, v.25, p.1523–1528, 2013.
- BLIGH, E.G.; DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, p. 911-917, 1959.
- BOAMAR, P.F.A. **Combustíveis Automotivos – Especificações Técnicas, Tributos e Legislação**. 1.ed. Florianópolis: ed. Insular, 832 p., 2010.
- BORGHETTI, I.A. Avaliação do crescimento da microalga *Chlorella minutíssima* em meio de cultura com diferentes concentrações de manipueira. **Dissertação de Mestrado em Engenharia de Bioprocessos**. Universidade Federal do Paraná - UFPR, 2009. 103p.

- CAI, T.; PARK, S.Y.; LI, Y.B. Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: status and prospects. **Renew. Sust. Energ. Ver**, v.19, p.360–369, 2013.
- CALIXTO, C.D. Potencial de microalgas regionais cultivadas em meios alternativos para produção de biodiesel. **Tese de Doutorado em Química**, Universidade Federal da Paraíba, UFPB, 2016. 155p.
- CANTRELL, K. B.; DUCEY, T.; RO, K. S.; HUNT, P. G. Livestock waste-to-bioenergy generation opportunities. **Bioresource technology**, v. 99, n. 17, p. 7941–53, 2008.
- CHEAH, W. Y.; SHOW, P. L.; CHANG, J.-S.; LING, T. C.; CHING JUAN, J. Biosequestration of atmospheric CO₂ and flue gas-containing CO₂ by microalgae. **Bioresource Technology**, 2014.
- CHEN, C-Y.; ZHAO, X-Q.; YEN, H-W.; HO, S-H.; CHENG, C-L.; LEE, D-J.; BAI, F-W.; CHANG, J-S. Microalgae-based carbohydrates for biofuel production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 78, p. 1-10, 2013.
- CHINNASAMY, S.; BHATNAGAR, A.; HUNT, R.W.; DAS, K.C. Microalgae cultivation in a wastewater dominated by carpet mil effluents for biofuel applications. **Bioresource Technology**, v.101, n.9, p.3097–3105, 2010.
- CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, v. 25, p. 294-306, 2007.
- CHIU, S.Y.; KAO, C.Y.; CHEN, T.Y.; CHANG, Y.B.; KUO, C.M. Cultivation of microalgal *Chlorella* for biomass and lipid production using wastewater as nutrient resource. **Bioresource Technology**, v. 184, p. 179–189, 2015.
- CHO, S.; LUONG, T. T.; LEE, D.; OH, Y.-K.; LEE, T. Reuse of effluent water from a municipal wastewater treatment plant in microalgae cultivation for biofuel production. **Bioresource Technology**, 102(18), p. 8639–45. 2011.
- DERNER, R.B.; OHSE, S.; VILLELA, M.; CARVALHO, S.M.; FETT, R. Microalgas, produtos e aplicações. **Ciencia Rural**, v. 36, n. 6, p. 1959-1967, 2006.
- DRIRA, N.; PIRAS, A.; ROSA, A.; PORCEDDA, S.; DHAOUADI, H. Microalgae from domestic wastewater facility's high rate algal pond: Lipids extraction, characterization and biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 206, p.239–244, 2016.
- EN ISO 5509, "Animal and vegetable fats and oils - preparation of methyl esters of fatty acids." 2000.

- ESTEVEES, F. A. **Fundamentos de Limnologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Interciência, 2011.
- FERREIRA, A.; RIBEIRO, B.; MARQUES, A.P.S.S.; FERREIRA, A.F.; DIAS, A.P.; PINHEIRO, H.M.; REIS, A.; GOUVEIA, L. *Scenedesmus obliquus* mediated brewery wastewater remediation and CO₂ biofixation for green energy purposes. **Journal of Cleaner Production**. V.165, p.1316-1327, 2017.
- FOGG, G. E.; THAKE, B., **Algae Cultures and Phytoplankton Ecology**, ed. 3. University of Wisconsin Press. London, p. 269, 1987.
- GE, S.; CHAMPAGNE, P. Nutrient removal, microalgal biomass growth, harvesting and lipid yield in response to centrate wastewater loadings. **Water Res**, v.88, p.604-612, 2016.
- GENTILI, F.G. Microalgal biomass and lipid production in mixed municipal, dairy, pulp and paper wastewater together with added flue gases. **Bioresource Technology**, v.169, p.27–32, 2014.
- GHOSH, A.; KHANRA, S.; MONDAL, M.; HALDER, G.; TIWARI, O. N.; SAINI, S.; BHOWMICK, T. K.; GAYEN, K. Progress toward isolation of strains and genetically engineered strains of microalgae for production of biofuel and other value added chemicals. **Energy Conversion and Management**, v. 113, p. 104-118, 2016.
- GODINHO, L.R., GONZÁLEZ, A.A.C.; BICUDO, C.E.M. Criptógamos do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, SP. Algas, 30: Chlorophyceae (família Scenedesmaceae). **Hoehnea**, v. 37, n. 3, p. 513-553, 2010.
- GÓMEZ-CORTÉS, P.; BRENNAN, J.T.; LAWRENCE, P.; FUENTE, M.A. Novel characterisation of minor α -linolenic acid isomers in linseed oil by gas chromatography and covalent adduct chemical ionisation tandem mass spectrometry. **Food Chem**, v.200, p.141–145, 2016.
- GONÇALVES, A. L.; PIRES, J. C. M.; SIMÕES, M. Biotechnological potential of *Synechocystis salina* co-cultures with selected microalgae and cyanobacteria: Nutrients removal, biomass and lipid production. **Bioresource Technology**, v. 200, p.279-286, 2016.
- GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, C.; RIAÑO-IRAZÁBAL, B.; MOLINUEVO-SALCES, B.; BLANCO, S.; GARCÍA-GONZÁLEZ, M.C. Effect of operational conditions on the degradation of organic matter and development of microalgae–bacteria consortia when treating swine slurry. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 90, n. 3, p. 1147-1153, 2011.

GORHAM, P.R.; MCLACHLAN, J.; HAMMER, U.T.; KIM, W.K. Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena flos-aquae* (Lyngb.) de Breb. **Verh. Internat. Verein. Limnol.**, v. 15, p. 796–804, 1964.

GOUVEIA, L.; OLIVEIRA, A. C. Microalgae as a raw material for biofuels production. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 36, n. 2, p. 269-274, 2009.

GUEDES, A. C.; AMARO, H. M.; MALCATA, F. X. Microalgae as Sources of Carotenoids. **Marine Drugs**, v. 9, n. 12, p.625-644, 2011.

GUILLARD, R.R. L.; LORENZEN, C.J. Yellow-green algae with chlorophyllide c. **Journal of Phycology**, v. 8, p. 10-14, 1972.

HENA, S.; FATIMAH, S.; TABASSUM, S. Cultivation of algae consortium in a dairy farm wastewater for biodiesel production. **Water Resour. Ind**, v.10, p.1–14, 2015.

HO, S-H.; NAKANISHI, A.; YE, X.; CHANG, J-S.; HARA, K.; HASUNUMA, T.; KONDO, A. Optimizing biodiesel production in marine *Chlamydomonas* sp. JSC4 through metabolic profiling and an innovative salinity-gradient strategy. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, p. 97-113, 2014.

HODAIFA, G.; MARTÍNEZ, M.; SÁNCHEZ, S. Daily doses of light in relation to the growth of *Scenedesmus obliquus* in diluted three-phase olive mill wastewater. **Journal of chemical technology and biotechnology**, v. 84, n. 10, p. 1550-1558, 2009.

HSU, C. Y.; YANG, C.M.; CHEN, C.M.; CHAO, P.Y.; HU, S.P. Effects of chlorophyll-related compounds on hydrogen peroxide induced DNA damage within human lymphocytes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 7, p. 2746-2750, 2005.

HU, B.; MIN, M.; ZHOU, W.; DU, Z.; MOHR, M.; CHEN, P.; ZHU, J.; CHENG, Y.; LIU, Y.; RUAN, R. Enhanced mixotrophic growth of microalga *Chlorella* sp. on pretreated swine manure for simultaneous biofuel feedstock production and nutrient removal. **Bioresource Technology**, v. 126, p. 71-79, 2012.

HU, Q.; SOMMERFELD, M.; JARVIS, E.; GHIRARDI, M.; POSEWITZ, M.; SEIBERT, M.; DARZINS, A. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. **Plant Journal**, v. 54, n. 4, p. 621–639, 2008.

JEBALI, A.; ACIÉN, F.G.; GÓMEZ, C.; FERNÁNDEZ-SEVILLA, J.M.; MHIRI, N.; KARRAY, F.; DHOUB, A.; MOLINA-GRIMA, E.; SAYADI, S. Selection of native

Tunisian microalgae for simultaneous wastewater treatment and biofuel production. **Bioresource Technology**, v.198, p.424–430, 2015.

JEFFREY, S.W.; HUMPHREY, G. F. New Spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae, and natural phytoplankton. **Biochem. Physiol. Pflanz.** 167: 191-194, 1975.

JI, M.-K.; JEON, B.-H.; KIM, H.-C.; SAPIREDDY, V. R.; YUN, H.-S.; ABOU-SHANAB, R.A.I.; CHOI, J.; LEE, W.; TIMMES, T.C.; INAMUDDIN. Simultaneous nutrient removal and lipid production from pretreated piggery wastewater by *Chlorella vulgaris* ysw-04. **Applied microbiology and biotechnology**, v.97, n.6, p.2701–2710, 2013.

KLIGERMAN, D.C.; BOUWER, E.J. Prospects for biodiesel production from algae-based wastewater treatment in Brazil: A review. **Renew. Sust. Energ. Ver**, v.52, p.1834-1846, 2015.

KNOTHE, G. Dependence of biodiesel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters. **Fuel Processing Technology**, v.86, p.1059–1070, 2005.

KNOTHE, G.; DUNN, R.O.; VAUGHN, S.F.; ISBELL, T.A. A comprehensive evaluation of the melting points of fatty acids and esters determined by differential scanning calorimetry. **J Am Oil Chem Soc**, v.86, p.843–856, 2009.

KNOTHE, G.; GERPEN J. V.; KRAHL J.; RAMOS, L. P. **Manual de Biodiesel**. 1^a edição, Editora Edgard Blücher, 2006.

KOCHERT, G. Carbohydrate determination by phenol–sulfuric acid method, In: Hellebust, J.A., Craigie, J.S. (Eds.), **Handbook of Physiological and Biochemical Methods**. Cambridge Univ. Press, Cambridge, p. 96–97, 1978.

KOTHARI, R.; PRASAD, R.; KUMAR, V.; SINGH, D.P. Production of biodiesel from microalgae *Chlamidomonas poopyrenoideum* grown on dairy industry wastewater. **Bioresource Technology**, v. 144, p. 499-503, 2013.

KUMAR, M. S.; MIAO, Z. H.; WYATT, S. K. Influence of nutrient loads, feeding frequency and inoculum source on growth of *Chlorella vulgaris* in digested piggery effluent culture medium. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 15, p. 6012-6018, 2010.

LAM, M.K.; LEE, K.T. Renewable and sustainable bioenergies production from oil mil effluente (POME): Win-win strategies toward better environmental protection. **Biotechnol. Adv**, v.29, p.124-141, 2011.

- LI, Y.; CHEN, Y.F.; CHEN, P.; MIN, M.; ZHOU, W.; MARTINEZ, B.; ZHU, J.; RUAN, R. Characterization of a microalga *Chlorella* sp. well adapted to highly concentrated municipal wastewater for nutrient removal and biodiesel production. **Bioresource Technology**, v.102, p.5138–5144, 2011.
- LI, Y.-R.; TSAI, W.-T.; HSU, Y.-C.; XIE, M.-Z.; CHEN, J.-J. Comparison of autotrophic and mixotrophic cultivation of green microalgal for biodiesel production. **Energy Procedia** 52, p. 371-376, 2014.
- LIM, S-L.; CHU, W-L.; PHANG, S-M. Use *Chlorella vulgaris* for bioremediation of textile wastewater. **Bioresource Techonology**, v. 101, p. 7314-7322, 2010.
- LIN, X.; PASKALEVA, E.E.; CHANG, W.; SHEKHTMAN, A.; CANKI, M. Inhibition of HIV-1 infection in *ex vivo* cervical tissue model of human vagina by palmitic acid; implications for a microbicide development, **PLoS One**. 6, e24803, 2011.
- LOMBARDI, A. T.; WANGERSKY, P. J. Influence of phosphorus and silicon on lipid class production by the marine diatom *Chaetoceros gracilis* grown in turbidostat cage cultures. **Marine Ecology Progress Series**, 77, p. 39-47. 1991.
- LOURENÇO, S. O. **Cultivo de Microalgas Marinhas**: Princípios e aplicações. ed. 1, São Carlos: RiMa, 2006.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem**, v.193, p.265–275, 1951.
- MAITY, J. P.; BUNDSCHUH, V.; CHEN, C.; BHATTACHARYA, P. Microalgae for third generation biofuel production, mitigation of greenhouse gas emissions and wastewater treatment: Present and future perspectives: A mini review. **Energy**, p.1-10, 2014.
- MANDAL, S., MALLICK, N. Waste utilization and biodiesel production by the green Microalga *Scenedesmus obliquus*. **Appl. Environ. Microbiol**, v.77, p.374–377, 2011.
- MCGINN, P.J.; DICKINSON, K.E.; PARK, K.C.; WHITNEY, C.G.; MACQUARRIE, S.P.; BLACK, F.J.; O'LEARY, S. J. Assessment of the bioenergy and bioremediation potentials of the microalga *Scenedesmus* sp. AMDD cultivated in municipal wastewater effluent in batch and continuous mode. **Algal Research**, v. 1, n. 2, p. 155-165, 2012.

MEDEIROS, D. L.; SALES, E. A.; KIPERSTOK, A. Energy production from microalgae biomass: carbon footprint and energy balance. **Journal of Cleaner Production**, v. 96, p.493-500, 2015.

MENEZES, R.S.; LELES, M.I.G.; SOARES, A.T.; FRANCO, P.I.B.M.F.; FILHO, N.R.A.; SANT'ANNA, C.L.; VIEIRA, A.A.H. Avaliação da potencialidade de microalgas dulcícolas como fonte de matéria-prima graxa para a produção de biodiesel. **Química Nova**, v. 36, n. 1, p. 10-15, 2013.

MEZZARI, M.P.; DA SILVA, M.L.; NICOLOSO, R.S.; IBELI, A.M.; BORTOLI, M.; VIANCELLI, A.; SOARES, H.M. Assessment of N₂O emission from a photobioreactor treating ammonia-rich swine wastewater digestate. **Bioresource Technology**, v. 149, p. 327–332, 2013.

MEZZOMO, N.; SAGGIORATO, A.G.; SIEBERT, R.; TATSCH, P.O.; LAGO, M.C.; HEMKEMEIER, M.; COSTA, J.A.V.; BERTOLIN, T.E.; COLLA, L.M. Cultivation of microalgae *Spirulina platensis* (*Arthrospira platensis*) from biological treatment of swine wastewater. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 1, p. 173-178, 2010.

MISHRA, S.; SINGH, N.; SARMA, A.K. Assessment of a Novel Algal Strain *Chlamydomonas debaryana* NIREMACC03 for Mass Cultivation, Biofuels Production and Kinetic Studies. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 176, n. 8, p. 2253-2266, 2015.

MIYAWAKI, B. Purificação de biogás através de cultivo de microalgas em resíduos agroindustriais. **Dissertação de Mestrado em Engenharia e Ciência dos Materiais** – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, 2014. 137p.

MOHAN, S.V.; DEVI, M.P.; MOHANAKRISHNA, G.; AMARNATH, N.; BABU, M.L.; SARMA, P.N. Potential of mixed microalgae to harness biodiesel from ecological waterbodies with simultaneous treatment, **Bioresource technology**, v.102, p.1109–1117, 2011.

OLIVEIRA, A.C. Produção de biomassa de microalgas *Scenedesmus* sp. em efluente de bovinocultura biodigerido. **Dissertação de Mestrado em Engenharia e Ciência dos Materiais** - Universidade Federal do Paraná, 2013. 82p.

PEQUENO, M.A.G. Avaliação do Potencial Produtivo de Óleos Obtidos a Partir de Microalgas por Cromatografia Gasosa. 2010. 66 p. **Dissertação de Mestrado** - Departamento de Química, Universidade Federal da Paraíba, 2010.

- PERDOMO, C.C.; LIMA, G.J.M.M.; NONES, K. Suinocultura e estratégias para a redução de gases e poluentes. In: LIMA, M.A.; CABRAL, O.M.R.; MIGUEZ, J.D.G. (Ed.) **Mudanças climáticas globais e a agropecuária brasileira**. Jaguariúna: EMBRAPA/CNPMA, cap. 16, p.325-45, 2001.
- PEREZ-GARCIA, O.; ESCALANTE, F. M. E.; DE-BASHAN, L. E.; BASHAN, Y. Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. **Water Research**, 45, p. 11-36, 2011.
- PULZ, O.; GROSS, W. Valuable products from biotechnology of microalgae. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.65, p.635–648, 2004.
- R CORE TEAM. R. **A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical computing, Viena, Áustria. URL: [https:// www.R-project.org/](https://www.R-project.org/). 2017.
- RAMIREZ, N.N.V.; FARENZENA, M.; TRIERWEILER, J. O. Growth of Microalgae *Scenedesmus* sp. in Ethanol Vinasse. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 57, n. 5, p. 630-635, 2014.
- RAWAT, I.; RANJITH, K.R.; MUTANDA, F.B.T. Biodiesel from microalgae: a critical evaluation from laboratory to large scale production. **Appl Energy**, v.103, p.444-467, 2013.
- SALAMA, E-S.; KIM, H.C.; ABOU-SHANAB, R.A.; JI, M.K.; OH, Y. K.; KIM, S. H.; JEON, B.H. Biomass, lipid content, and fatty acid composition of freshwater *Chlamydomonas mexicana* and *Scenedesmus obliquus* grown under salt stress. **Bioprocess and biosystems engineering**, v. 36, n. 6, p. 827-833, 2013.
- SASSI, K.K.B. Bioprospecção de metabólitos de interesse à indústria de alimentos produzidos por cepas regionais de microalgas em cultivos mono-específicos. **Tese de Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Universidade Federal da Paraíba, UFPB, 2016. 108p.
- SAWAENGSAK, W.; SILALERTRUKSA, T.; BANGVIWAT, A.; GHEEWALA, S. H. Life cycle cost of biodiesel production from microalgae in Thailand. **Energy for Sustainable Development**, v. 18, p. 67-74, 2014.
- SCHENK P., Second Generation Biofuels: High-Efficiency Microalgae for Biodiesel Production. **Bioenergy Research**, v.1, p.20–43, mar. 2008.
- SILVA, C. L. S.; BASSI, N. S. S. **Análise dos impactos ambientais no Oeste catarinense e das tecnologias desenvolvidas pela Embrapa Suínos e Aves**. Belém, PA, 2012.

- SIMONICH, M. T. *et al.* Low-dose dietary chlorophyll inhibits multi-organ carcinogenesis in the rainbow trout. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 3, p. 1014-1024, 2008.
- SIRÓN, R., GIUSTI, G., BERLAND, B. Changes in the fatty acid composition of *Phaeodactylum tricornutum* and *Dunaliella tertiolecta* during growth and under phosphorus deficiency. **Marine Ecology Progress Series**, 55, p.95-100. 1989.
- SUTHERLAND, D. L.; TURNBULL, M. H.; CRAGGS, R. J. Increased pond depth improves algal productivity and nutrient removal in wastewater treatment high rate algal ponds. **Water Research**, v. 53, p. 271-281, 2014.
- TAHER, D.M. Biodiesel de microalgas cultivadas em dejetos suíno biodigerido. **Dissertação de Mestrado em Engenharia e Ciência dos Materiais – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná**, 2013. 108p.
- TANGO, M.D. Cultivo de microalgas em efluentes da indústria de beneficiamento de carnes em fotobiorreator do tipo coluna de bolhas. **Dissertação de Mestrado em Engenharia Civil, Universidade Federal de Viçosa – UFV**, 2015. 87p.
- TERCERO, E. A. R.; DOMENICALI, G.; BERTUCCO, A. Autotrophic production of biodiesel from microalgae: An updated process and economic analysis. **Energy**, v. 76, p. 807-815, 2014.
- USDA – UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **Livestock and Poultry: World Markets and Trade**. Foreign Agricultural Service, 2016.
- UTERMÖHL, H. Zur vervollkommung der quantitativen phytoplankton: methodik. **Mitt. Int. Verein. Theor. Angew. Limnol.**, v. 9, p. 1-38, 1958.
- VALDUGA, E.; TATSCH, P.O.; TIGGEMANN, L.; TREICHEL, H.; TONIAZZO, G.; ZENI, J.; LUCCIO, M.D.; JUNIOR, A.F. Produção de carotenoides: microrganismos como fonte de pigmentos naturais. **Química Nova**, v. 32, n. 9, p.2429-2436, 2009.
- VANTHOOR-KOOPMANS, M.; WIJFEELS, R. H.; BARBOSA, M, J. Biorefinery of microalgae for food and fuel. **Bioresource Technology**, v.135, p.142-149, 2013.
- VENDRUSCULO, J. B. G. Cultivo da microalga *Scenedesmus quadricauda* em efluentes de biodigestão de aves e suínos. **Dissertação de Mestrado em Aquicultura Continental, Universidade Católica de Goiás**, 2009. 45p.
- WANG, L.; LI, Y.; CHEN, P.; MIN, M.; CHEN, Y.; ZHU, J.; RUAN, R.R. Anaerobic digested dairy manure as a nutrient supplement for cultivation of oil-rich green microalgae *Chlorella* sp. **Bioresource Technology**, v.101, p.2623-2628, 2010.

WOERTZ, I.; FEFFER, A.; LUNDQUIST, T.; NELSON, Y. Algae grown on dairy and municipal wastewater for simultaneous nutrient removal and lipid production for biofuel feedstock. **J. Environ. Eng**, v.135, p.1115–1122, 2009.

WU, L.F.; CHEN, P.C.; HUANG, A.P.; LEE, C.M. The feasibility of biodiesel production by microalgae using industrial wastewater. **Bioresource Technology**, v.113, p.14-18, 2012.

WU, Y.H.; HU, H.Y.; YU, Y.; ZHANG, T.Y.; ZHU, S.F.; ZHUANG, L.L.; ZHANG, X.; LU, Y. Microalgal species for sustainable biomass lipid production using wastewater as resource: a review. **Renew. Sustain. Energy Ver**, v.33, p.675–688, 2014.

ZAMBIAZI, R. U. I. C.; PRZYBYLSKI, R.; ZAMBIAZI, M. W.; MENDONÇA, C. B. Fatty Acid Composition Of Vegetable Oils And Fats. **Boletim CEPPA**, Curitiba, v. 25, n. 1, p. 111-120, 2007.

ZENG, X.; GUO, X.; SU, G.; DANQUAH, M.K.; ZHANG, S.; LU, Y.; LIN, L. Bioprocess considerations for microalgal-based wastewater treatment and biomass production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 42, p. 1385-1392, 2015.

ZHU, L. Biorefinery as a promising approach to promote microalgae industry: An innovative framework. **Renewable and sustainable energy reviews**, v. 41, p. 1376-1384, 2015.

ZHU, L.; WANG, Z.; SHU, Q.; TAKALA, J.; HILTUNEN, E.; XENG, P.; YUAN, Z. Nutrient removal and biodiesel production by integration of freshwater algae cultivation with piggery wastewater treatment. **Water Res**, v.47, p.4294-4302, 2013.

5. CONCLUSÃO GERAL

Os experimentos realizados nesta pesquisa contribuíram para aprimorar o conhecimento ecofisiológico acerca das microalgas *Desmodesmus communis* e *Scenedesmus acuminatus*, Scenedesmaceae, acrescentando informações importantes sobre as respostas destas microalgas cultivadas sob diferentes condições físicas e meios de cultivo alternativos.

Os distintos níveis de sombreamento e a variação de temperatura testados em cultivos com *D. communis* possibilitaram concluir que esta alga apresenta grande tolerância ambiental às condições físicas testadas, o que favorece seu cultivo em maior escala e possibilita a utilização dessa espécie como fonte de compostos de interesse econômico, incluindo a produção de biocombustíveis. Entretanto, para tal, ainda é fundamental que se realizem mais estudos para caracterizar quimicamente sua biomassa e avaliar seu potencial biotecnológico.

A partir dos ensaios com a utilização de efluente hidropônico da produção de alface e efluente de suinocultura biodigerido no cultivo de *S. acuminatus*, concluiu-se que esta microalga pode atuar como eficiente biorremediadora destes resíduos, reduzindo significativamente as concentrações de nitrogênio e fósforo. O resíduo hidropônico destacou-se por possibilitar a obtenção de elevada biomassa microalgal, rica em proteínas, clorofilas e carotenoides, além de ácidos graxos de grande valor nutricional, sugerindo potencial uso na suplementação alimentar humana e como aditivo em rações animais.

Para os dois efluentes testados, o teor total de ésteres metílicos de ácidos graxos apresentou baixo rendimento, comprometendo sua aplicação na indústria como fonte de matéria prima para a produção de biodiesel. Entretanto, os altos níveis de carboidratos encontrados nos cultivos com menores concentrações de efluente hidropônico, apontam um potencial para a produção de bioetanol a partir da biomassa gerada.

Diante desse contexto, o estudo abre novas perspectivas de investigação com a utilização de *D. communis* e *S. acuminatus*, bem como com os efluentes de hidroponia e de suinocultura testados, sugerindo-se: a realização de cultivos com a prévia aclimação das microalgas aos novos meios, a fim de se intensificar o ganho em biomassa; a utilização dos efluentes em diferentes concentrações e/ou de forma complementar para compor os meios de cultivo, sem comprometer a produtividade

de biomassa microalgal; a caracterização química fina da matéria orgânica produzida nos cultivos com estes resíduos, verificando possíveis riscos e avaliando sua utilização na alimentação humana e animal; a realização de cultivos fora do ambiente controlado de laboratório para tentar simular as repostas geradas pelas microalgas em maior escala; a investigação de formas de incrementar a síntese de produtos de interesse nos cultivos, como lipídeos e carboidratos, possibilitando sua utilização como fonte de matéria-prima para biocombustíveis; o uso de fontes de CO₂ emitido por atividades industriais, objetivando aumentar a produção de biomassa e melhorar a qualidade das emissões; e a biorremediação provocada pelo cultivo das microalgas para outros parâmetros físico-químicos que não foram avaliados neste trabalho, atentando-se para as condições e padrões de lançamento de efluentes dispostos pelos órgãos ambientais competentes.