



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA

MARIA HELENA JUVITO DA COSTA

CULTIVO DE MICROALGAS EM EFLUENTE DA PISCICULTURA VISANDO A
OBTENÇÃO DE BIOMASSA COM POTENCIAL PROTEICO PARA APLICAÇÃO EM
RAÇÃO ANIMAL

JOÃO PESSOA – PB

Novembro de 2018

MARIA HELENA JUVITO DA COSTA

CULTIVO DE MICROALGAS EM EFLUENTE DA PISCICULTURA VISANDO A
OBTENÇÃO DE BIOMASSA COM POTENCIAL PROTEICO PARA APLICAÇÃO EM
RAÇÃO ANIMAL

Trabalho Final de Curso apresentado à
Universidade Federal da Paraíba como
requisito necessário para a obtenção do grau de
Bacharel em Engenharia Química sob
orientação da Professora Doutora Sharline
Florentino de Melo Santos e coorientação do
Professor Doutor Darlan Azevedo Pereira.

JOÃO PESSOA - PB

Novembro de 2018

Catálogo na publicação
Seção de Catálogo e Classificação

C838c Costa, Maria Helena Juvito da.

CULTIVO DE MICROALGAS EM EFLUENTE DA PISCICULTURA
VISANDO A OBTENÇÃO DE BIOMASSA COM POTENCIAL PROTEICO
PARA APLICAÇÃO EM RAÇÃO ANIMAL / Maria Helena Juvito da
Costa. - João Pessoa, 2018.
64 f. : il.

Orientação: Sharline Florentino de Melo Santos.
Coorientação: Darlan Azevedo Pereira.
Monografia (Graduação) - UFPB/CT.

1. proteínas. 2. bioprospecção. 3. aquicultura. 4.
Monoraphidium contortum. 5. Golenkinia radiata. I.
Santos, Sharline Florentino de Melo. II. Pereira,
Darlan Azevedo. III. Título.

UFPB/BC


MARIA HELENA JUVITO DA COSTA

CULTIVO DE MICROALGAS EM EFLUENTE DA PISCICULTURA VISANDO A
OBTENÇÃO DE BIOMASSA COM POTENCIAL PROTEICO PARA APLICAÇÃO EM
RAÇÃO ANIMAL

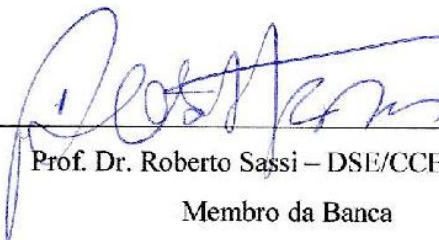
Trabalho aprovado em 07/11/2018



Prof.^a Dra. Sharline Florentino de Melo Santos – DEQ/CT/UFPB
Orientadora



Prof. Dr. Darlan Azevedo Pereira – DEP/CT/UFPB
Coorientador



Prof. Dr. Roberto Sassi – DSE/CCEN/UFPB
Membro da Banca



Msc. Viviane Pereira Tibúrcio Hamdan – PPGEQ - DEQ/CT/UFCG
Membro da Banca

JOÃO PESSOA - PB

Novembro de 2018

“Sonhe grande. Conquiste o mundo. Mas nunca esqueça do lugar de onde você partiu. Nunca esqueça. Você é isso. Você vem disso. Esse chão seco. Essa terra batida. Esse sertão”.

Severino Noé

Aos meus pais por acreditarem e perseguirem meus
sonhos comigo, dedico.

AGRADECIMENTOS

À Deus por ser fonte da minha força maior, por ser meu refúgio e fortaleza em momentos de dificuldades. Obrigada, por ser minha luz Senhor!

Aos meus amados pais, Maria Lúcia e Carlos Antonio que me educaram com princípios de amor e respeito, agradeço por acreditarem em cada objetivo que tracei para minha vida e pela torcida nas minhas conquistas. Todo meu amor pertence à vocês!

Às minhas queridas irmãs, Mayara Juvito e Samara Hellenn que são parte de mim e minha grande referência de humanidade. Obrigada pela paciência e amor recebidos durante toda minha trajetória. Amo vocês!

Ao meu irmão mais velho, Iradi Luna pelas palavras de incentivo e perseverança. Muito obrigada!

Aos meus avós, Severino Noé, Terezinha e Francisca por serem exemplo de simplicidade e perseverança. Obrigada por serem meus maiores mentores de vida.

À minha família, por acreditarem e apoiarem meu sonho.

À Marilene Kuhnen e família por me abraçarem como membro da família fornecendo suporte ao longo da minha graduação.

À professora Dra. Sharline Florentino por ter sido a primeira a me apresentar esse universo fantástico da engenharia. Obrigada pela paciência, compreensão e carinho.

Ao professor Dr. Darlan Azevedo por depositar toda confiança, paciência e compreensão em mim. Carregarei com enorme felicidade e gratidão todo aprendizado adquirido desde a iniciação científica. Minha jornada na pesquisa científica deve-se ao senhor, meu enorme obrigado.

Ao professor Dr. Roberto Sassi por me acolher no LARBIM e transmitir conhecimentos para a realização deste trabalho e para minha vida como pesquisadora. Obrigada por me revelar a beleza que é compartilhar conhecimentos.

À professora Dra. Cristiane Costa que juntamente com o professor Roberto concederam o ambiente do LARBIM para a realização deste trabalho.

Aos professores que no decorrer da graduação ensinaram-me a ser uma profissional e cidadã engajada em causas maiores. Em especial: Antônio Sales, Jannaíra Bueno, Marivaldo Matos, Nagel Alves, Josilene Cavalcante, Andrea Lopes, Aurélia Acuna e Vivian Stumpf.

À Viviane Tibúrcio e Roberta pela disposição em me auxiliar na pesquisa. Obrigada por todo suporte, paciência, compreensão, carinho e sem dúvidas por todo conhecimento compartilhado.

Ao LARBIM/UFPB pela estrutura, materiais e equipamentos cedidos para a realização deste trabalho.

Aos queridos companheiros de LARBIM: Evandro, Luís Celso, Patrícia, Andressa Coimbra, Jordana, Clediana, Julyanderson, Judson, Jéssica, Rebeca, Thaciana e Amanda por me acolherem de maneira tão humanizada e por todo suporte dado ao longo desses meses de pesquisa. A contribuição de vocês foi imprescindível para a realização deste trabalho. Meu enorme agradecimento!

Aos meus amigos queridos e companheiros que ganhei durante o curso, por toda força e apoio ao longo dos anos. Em especial: Ramilli Araújo, Nathalya Stephanni, Ariadnna Franco, Ana Paula Vieira, Thiago Rodrigues, Rayanne Barros, Manoel Teodoro, Juliana Ramos, Joicy Ferreira, Amanara Souza, Daniel Arnóbio, Ailson José, Andressa Aziz, Tatyana Alexandre, Camila Luciana, Laênia Cândido, Antonio Neto e Daniele da Cunha. Obrigada por todo amor, paciência e compreensão.

RESUMO

A crescente demanda na utilização de recursos para atividades humanas e industriais potencializa a geração de insumos que geralmente são descartados de maneira inadequada no meio ambiente. A aquicultura figura-se como uma indústria que mais cresce no setor de alimentos. Esta indústria gera águas residuais ricas em nutrientes como nitrato, fosfato, amônia e matéria orgânica que são componentes essenciais para o crescimento de microalgas. Com isso esse estudo tem como objetivo selecionar cepas de microalgas que apresentam um bom rendimento quando cultivada em efluentes de piscicultura e uma biomassa rica em proteína para ser usada na alimentação animal. Foram avaliadas seis espécies de microalgas provenientes do banco de cultivo de microalgas do Laboratório de Ambientes Recifais e Biotecnologia com Microalgas – LARBIM/UFPB: *Arthrospira platensis* (D9Z), *Chlorococcum sp hypnosporum* (D29Z), *Chlorella sp.* (D359 WC), *Monoraphidium contortum* (D173 WC), *Golenkina radiata* (D325 WC), e *Scenedesmus acuminatus* (D115WC). Os cultivos foram realizados em meio controle (WC e Zarrouk) e meio alternativo previamente tratado (efluente da piscicultura) em câmara de cultura a 25°C ±1°C dotada de um sistema de iluminação fotoperíodo de 12 horas. O crescimento foi acompanhado por medidas de fluorescência *in vivo*, em triplicata e ao final foram quantificados também o rendimento em biomassa para cada espécie estudada. As espécies *Monoraphidium contortum* (D173 WC) e *Golenkina radiata* (D325 WC) foram selecionadas para cultivo em escala maior em meio controle (WC) alternativo (efluente da piscicultura). Ao fim do crescimento, as biomassa obtidas foram centrifugadas, congeladas e liofilizadas. Foram determinados: teor de proteínas, lipídeos e carboidratos. Os valores de proteínas obtidos para *Monoraphidium contortum* (48,67 %) (cepa D173WC) e *Golenkina radiata* (44,75%) (cepa D325WC) cultivadas no efluente da piscicultura indicam que as microalgas estudadas podem ser aplicadas como componente na formulação de ração animal.

Palavras- chave: proteínas; bioprospecção; aquicultura; *Monoraphidium contortum*; *Golenkinia radiata*.

ABSTRACT

The increasing demand for the use of human and industrial activities resources increases the generation of inputs that are usually discarded in an inadequate way in the environment. Aquaculture is one of the fastest growing industries in the food industry. This industry generates wastewater rich in nutrients such as nitrate, phosphate, ammonia and organic matter that are essential components for the microalgae growth. Therefore, this study aims to select strains of microalgae that present biomass rich in protein to be used in animal feed, and good yield when grown in pisciculture effluent. Six microalgae species from the culture collection of the Laboratory of Reef Environments and Microalgae Biotechnology - LARBIM/UFPB were evaluated: *Arthrospira platensis* (D9Z), *Chlorococcum sp hypnosporum* (D29Z), *Chlorella sp.* (D359 WC), *Monoraphidium contortum* (D173 WC), *Golenkinia radiata* (D325 WC), and *Scenedesmus acuminatus* (D115WC). Culturing was carried out in a controlled growth medium (WC and Zarrouk), and also in a pre-treated non-controlled alternative growth medium (pisciculture effluent) in culture chamber at $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ equipped with a photoperiodic lighting used to submit the cultures to light for 12 hours/day. Growth was accompanied by in vivo fluorescence measurements in triplicate and, at the end, the biomass yield was also quantified for each species studied. The species *Monoraphidium contortum* (D173 WC) and *Golenkinia radiata* (D325 WC) were selected for larger scale cultivation in a controlled culture medium (WC) and in a non-controlled environment (pisciculture effluent). At the end of the microalgae growth, the biomass obtained was centrifuged, frozen and lyophilized. Protein, lipid, and carbohydrate contents were determined. The protein results for *Monoraphidium contortum* (48.67%) (strain D173WC) and *Golenkina radiata* (44.75%) (strain D325WC) cultivated in the pisciculture effluent indicate that the studied microalgae can be applied as a component in the animal feed formulation.

Keywords: proteins; bioprospecting; aquaculture; *Monoraphidium contortum*; *Golenkinia radiata*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Representação da taxa de crescimento de algas em cultura (linha sólida) e a concentração de nutrientes (linha tracejada).....	25
Figura 2 - Tanque de cultivo de microalgas do tipo raceway	27
Figura 3 - Lagoa do tipo circular para cultivo de microalgas.....	28
Figura 4 – Representação dos principais sistemas fechados para cultivo de microalgas.	28
Figura 5 – Local de coleta do efluente.....	39
Figura 6 – Sistema de filtração do efluente.....	39
Figura 7 – Etapa de bioprospecção.....	42
Figura 8 – Cepas otimizadas para fase 2 do experimento.....	43
Figura 9 – Inóculo em balões de 6L.....	43
Figura 10 – Desenvolvimento do cultivo em meio controle e meio alternativo.....	44
Figura 11 – Câmaras de contagem de células.....	45
Figura 12 – Fluorômetro Turner Design.....	45
Figura 13- Procedimento de obtenção do rendimento em biomassa seca.....	46
Figura 14 – Centrifugação da biomassa.....	46
Figura 15 – Biomassa concentrada.....	47
Figura 16 – Liofilizador Terroni (modelo LD1500).....	48
Figura 17 – Biomassa seca.....	48
Figura 18 – Determinação de proteínas em microalgas pelo método Lowry et al.....	49
Figura 19 – Determinação de carboidratos em microalgas pelo método Kochert.....	50
Figura 20 – Determinação de lipídios em microalgas pelo método Bligh e Dyer.....	50
Figura 21 – Curva de crescimento das 6 espécies de microalgas testadas em meio alternativo de cultivo.....	53
Figura 22 – Curva de crescimento da microalga <i>Monoraphidium contortum</i> em meio controle e alternativo.....	55
Figura 23 – Curva de crescimento da microalga <i>Golenkina radiata</i> em meio controle e meio alternativo.....	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Comparação entre sistemas de cultivo de microalgas	22
Tabela 2 – Parâmetros básicos operacionais: fórmulas e unidades	29
Tabela 3 – Relação das microalgas s nesta pesquisa e sua respectiva procedência	37
Tabela 4- Análises físicas e químicas do efluente de piscicultura.....	52
Tabela 5 – Rendimento em biomassa seca das 6 espécies de microalgas testadas em meio alternativo de cultivo.....	54
Tabela 6 – Rendimento em biomassa seca das 2 espécies de microalgas testadas em meio controle e alternativo de cultivo.....	56
Tabela 7 – Teores de proteínas, carboidratos e lipídios obtidos nas biomassas.....	56

LISTA DE PRANCHA

Prancha 1 – Espécies de microalgas utilizadas na pesquisa..... 38

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Comparação entre sistemas de cultivo de microalgas.....26

Quadro 2 – Algumas aplicações de microalgas.....	30
Quadro 3 – produtividade lipídica de diferentes espécies de microalgas.	32
Quadro 4 – Fixação de CO ₂ por diferentes microalgas	34
Quadro 5 – Microalgas, produtos e aplicações.....	35
Quadro 6 – Composição de diferentes fontes de alimentos e microalgas, expressas em porcentagem de matéria seca.....	36
Quadro 7 – Composição do meio Zarrouk (ZARROUK, 1966)	40
Quadro 8 – Composição do meio WC (Guillard; Lorenzen,1972).....	41

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	17
2. OBJETIVOS E ETAPAS DA PESQUISA	20

2.1 Objetivo Geral.....	20
2.2 Objetivos Específicos.....	20
2.3 Etapas da pesquisa.....	19
3. REFERENCIAL TEÓRICO.....	22
3.1 Microalgas.....	22
3.2 Cultivo de microalgas.....	23
3.3 Crescimento de microalgas.....	25
3.4 Sistemas de cultivo de microalgas.....	26
3.4.1 Sistemas abertos.....	27
3.4.2 Sistemas Fechados.....	29
3.5 Aplicações comerciais de microalgas.....	31
3.5.1 Biocombustíveis.....	32
3.5.2 Captura de CO ₂	34
3.5.3 Química fina e compostos bioativos.....	35
3.5.4 Remediação.....	36
3.5.5 Nutrição e saúde humana.....	37
4.MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
4.1.. Seleção das espécies.....	38
4.2.. Coleta e Pré-tratamento do efluente.....	39
4.3 Análises químicas.....	40
4.4 Meios de cultura.....	41
4.6 Avaliação do crescimento dos cultivos.....	45
4.6.1 Rendimento de biomassa seca.....	46
4.7 Obtenção da biomassa.....	47
4.7.1 Centrifugação.....	47
4.7.2 Liofilização.....	48
4.8 Análises bioquímicas da biomassa.....	49
4.8.1 Proteínas.....	50
4.8.2 Carboidratos.....	50
4.8.3 Lipídios.....	51
4.9 Análise estatística.....	52
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
5.1 Características químicas do meio de cultivo.....	52

5.2 Parâmetros de crescimento das microalgas.....	53
5.2.1 Etapa de bioprospecção.....	53
5.2.2 Cultivo em escala superior.....	55
5.3 Composição bioquímica.....	57
6. CONCLUSÕES.....	58
7. REFERÊNCIAS.....	59

1. . INTRODUÇÃO

A produção de biomassa de microalgas é realizada há mais de um século por comunidades isoladas em alguns países da África e da América Central (RICHMOND, 2003). Segundo o mesmo autor, a biomassa produzida a partir de microalgas e cianobactérias como a *Arthrospira spp.* (Cyanophyceae) é a principal fonte de proteína na alimentação dessas comunidades na maior parte do ano. Atualmente, as pesquisas acerca das microalgas mostram a viabilidade técnica para a produção de diversos insumos e produtos nas áreas da medicina, nutrição e saúde humana e animal, química, produção de energia, dentre outros destacados por (ADENIYI; AZIMOV; BURLUKA, 2018; FARIED et al., 2017; M. BISHOP; M. ZUBECK, 2012; MATA; MARTINS; CAETANO, 2010; METTING; PYNE, 1986; RICHMOND, 2003; VIGANI et al., 2015). Como qualquer outro organismo fotossintético, microalgas crescem, multiplicam-se, produzem e acumulam componentes bioquímicos de interesse a partir do processo de fotossíntese. De forma geral, os fatores abióticos que afetam o crescimento da biomassa de microalgas são: concentração de nutrientes, oxigênio, dióxido de carbono (CO₂), pH, salinidade, substâncias tóxicas presentes no meio ou produzidas pelas microalgas, intensidade e duração da irradiação solar e temperatura. Com isso, é possível justificar os estudos que reconhecem o potencial das microalgas como alternativa técnica viável para captura de carbono industrial (BHOLA et al., 2014; JEONG; GILLIS; HWANG, 2003) e tratamento de efluentes domésticos e industriais, avaliados como fonte alternativa para redução de custos na substituição de nutrientes como nitrogênio e fósforo (CAI; PARK; LI, 2013).

Alinhado ao interesse científico, cresce o interesse comercial na produção de biomassa de microalgas devido às suas vantagens em termos de produtos mais eficazes e com custos menores. Os custos mais elevados nos processos de produção de biomassa de microalgas estão nos gastos com energia dos equipamentos como bombas e centrífugas para a colheita da biomassa e reagentes para o preparo do meio de cultivo. Existem alternativas para redução direta desses custos, entre essas está o reaproveitamento de nutrientes em efluentes que se mostram viáveis para produção da biomassa. O cultivo de microalgas torna-se atrativo devido a capacidade de conversão por parte desses organismos de poluentes presentes em determinado efluente em biomassa com elevado valor econômico e bioquímico, revelando o potencial das microalgas como agentes mitigadores.

Nesse contexto de reaproveitamento de efluentes e aproveitamento do potencial da biomassa de microalgas como fonte de alimentação ou suplementação alimentar rica em proteínas, a aquicultura e a piscicultura apresentam-se como potenciais práticas onde pode haver redução de custos para a produção de biomassa de microalgas e por outra via, reaproveitar a biomassa produzida para redução de custos com ração para alimentação ou suplementação alimentar de peixes.

A aquicultura é uma prática que abrange o cultivo de diversos organismos aquáticos em qualquer fase de desenvolvimento e que seja realizada em condições controladas, como plantas aquáticas, moluscos, crustáceos e peixes. O destaque dá-se ao cultivo de ostras, mariscos, mexilhões, camarão, carpas, tilápias e salmão. No Brasil, os produtos provenientes da aquicultura participam com 25,6% com a produção total de pescado, vindo a maior parte deste volume da aquicultura continental (DE OLIVEIRA, 2009).

Na piscicultura, os custos com alimentação representam cerca de 70% dos custos de produção (MEER et al., 1995). No processo de formulação e confecção de rações, é essencial a presença de nutrientes que abasteçam suas exigências e que as mesmas sejam processadas de forma a serem rapidamente consumidas e utilizadas pelos animais (NRC, 1993; WILSON, 1995).

Nos dos processos, piscicultura e aquicultura, a tilápia é o peixe mais produzido (DE OLIVEIRA, 2009). A alimentação é responsável pela maior parte do custo de produção na tilapicultura, sendo as proteínas consideradas os componentes de maior importância e que apresentam alto custo de produção associado.

A dieta constituída por proteínas influencia a produtividade dos peixes e a produção de resíduos nitrogenados que são excretados na água (TIBBETTS et al., 2000), que pode resultar em redução no desempenho dos animais e poluição do ambiente de criação e dos corpos d'água que receberem os efluentes. Segundo Mires et al. (1990), verifica-se atualmente que a principal fonte de poluição em sistemas intensivos de cultivo de peixes é proveniente do fornecimento de alimentos ricos em proteína.

2. OBJETIVOS E ETAPAS DA PESQUISA

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o uso do efluente proveniente da piscicultura como meio alternativo para o cultivo de microalgas.

2.2 Objetivos Específicos

1. Identificar as necessidades de pré-tratamento e ajustes em termos de nutrientes para viabilizar o efluente da piscicultura como meio alternativo para cultivo de microalgas;
2. Analisar o ciclo de crescimento de microalgas em meio alternativo para produção de ração animal;
3. Avaliar o potencial da biomassa de microalgas como suplementação proteica na ração de peixes e os benefícios na integração dos processos de biotecnologia em microalgas e piscicultura.

2.3 Etapas da pesquisa

1. Realizar coleta e pré-tratamento do efluente proveniente de tanque de criação de tilápia para testes em laboratório;
2. Caracterizar o efluente em termos de concentração de nutrientes e microrganismos para correção em termos de nutrientes e pré-tratamento para eliminação de microrganismos que podem competir com o crescimento da biomassa;
3. Selecionar seis espécies de microalgas (bioprospecção) do banco de culturas do LARBIM/UFPB com potencial para produção de biomassa rica em proteína para alimentação de peixes;
4. Realizar o cultivo das diferentes espécies de microalgas em meio alternativo, ou seja, efluente da piscicultura pré-tratado e concentração de nutrientes ajustada, para produção de biomassa;
5. Determinar, dentre as espécies testadas, a que apresenta maior rendimento em termos de biomassa produzida e repetir os testes aumentando a escala em laboratório para análise da concentração de proteínas na biomassa produzida;
6. Obter biomassa liofilizada e determinar os componentes bioquímicos presentes para avaliar a viabilidade do seu reaproveitamento como fonte alternativa de proteína para alimentação de peixes;

7. Analisar diferentes aspectos do processo para verificar a viabilidade da utilização de biomassa de microalgas cultivadas em meio alternativo visando a produção de ração animal.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Microalgas

As algas são reconhecidas como uma das mais antigas formas de vida. O termo “alga” não detém de valor taxonômico, pois designa organismos muito diferentes entre si quanto à origem, composição química e morfologia (LOURENÇO, 2006). Estes organismos, ao utilizar CO₂ como fonte de carbono e outros nutrientes disponíveis em excesso como nitrogênio e fósforo, são capazes de produzir uma quantidade maior de biomassa que as plantas terrestres por unidade de área devido à sua alta eficiência fotossintética e produzem cerca de 50% do oxigênio atmosférico. Em virtude disto, algumas algas atuam como organismos sequestradores de CO₂ (fixam aproximadamente 183 toneladas de CO₂ para produzir 100 toneladas de biomassa) e remediadores de resíduos ricos em nutrientes (CHISTI, 2007), (RIZWAN et al., 2018), (TAELEMAN et al., 2013), (UDAIYAPPAN et al., 2017),

As microalgas são organismos heterogêneos, microscópicos, unicelulares, coloridos que com auxílio da luz como catalisador sintetizam os componentes de interesse presentes na célula e possuem a vantagem de crescer rapidamente em diversos ambientes, como em água doce, águas marinhas e águas residuais. Filogeneticamente, podem ser eucarióticos ou procarióticos e se encontram presentes em todos os ecossistemas terrestres. (MORENO-GARCIA et al., 2017), (OLAIZOLA, 2003). As células procarióticas (cianobactérias) não possuem organelas ligadas à membrana e são mais parecidos com bactérias do que com algas. Já as células eucarióticas, que compreendem muitos tipos diferentes de algas comuns. As classes mais importantes são: algas verdes (Chlorophyta), algas vermelhas (Rhodophyta), cianofíceas (Cyanophyta) e diatomáceas (Bacillariophyta). (BRENNAN & OWENDE, 2010)

As microalgas podem crescer utilizando diferentes rotas metabólicas como mostra a Tabela 1: i) fotoautotroficamente, utilizando a luz como fonte de energia e CO₂ como fonte de carbono inorgânico formando a adenosina trifosfato (ATP) e oxigênio; ii) heterotroficamente, utilizando substratos orgânicos como fonte de energia e de carbono; e iii) mixotroficamente, em que a microalga realiza a fotossíntese como principal fonte de energia, mas tanto os compostos orgânicos e CO₂ são essenciais para o cultivo (MORENO-GARCIA et al., 2017). *Arthrospira platensis*, *Chlorella vulgaris*, e *Haematococcus pluvialis* são alguns exemplos de cepas que podem crescer em condições fotoautotróficas, heterotróficas e mixotróficas. Enquanto outras microalgas, por exemplo, *Scenedesmus acutus* e *Selenastrum capricornutum* pode crescer fotoautotroficamente, heterotroficamente, ou fotoheterotroficamente (RIZWAN et al., 2018)

Tabela 1 - Comparação entre sistemas de cultivo de microalgas

Condição de cultivo	Fonte de energia	Fonte de carbono	Densidade celular	Sistema de cultivo	Ex. espécie de microalga
Fotoautotrófico	Luz	Carbono inorgânico	Baixa	Lagoas ou sistemas fechados	<i>Chlorella vulgaris</i> ,
Heterotrófico	Carbono orgânico	Carbono orgânico	Alta	Fermentador convencional	<i>Haematococcus pluviialis</i> e <i>Arthrospira (Spirulina) platensis</i>
Mixotrófico	Luz e carbono orgânico	Carbono orgânico e inorgânico	Média	Sistemas fechados	
Fotoheterotrófico	Luz	Carbono orgânico	Média	Sistemas fechados	<i>Selenastrum capricornutum</i> e <i>Scenedesmus acutus</i>

Fonte: PEREIRA, D. A. (2014)

As microalgas são capazes de metabolizar uma gama de componentes de interesse com aplicações em diferentes setores industriais como biocombustíveis, cosméticos, aquicultura, ração animal, aditivos alimentares, diferentes tipos de antioxidantes, ômega, carotenoides, polímeros enzimáticos e corantes. Também podem produzir compostos usados na indústria farmacêutica, bioativos com alto valor agregado como ácidos acetílicos, ágar, B-caroteno, vitamina B e luteína (RIZWAN et al., 2018).

3.2 Cultivo de microalgas

O estudo voltado para o cultivo de microalgas é abordado em dois períodos importantes da história. O primeiro foi caracterizado por um período de descobertas que foram fundamentais para melhor compreensão e formas de cultivar as microalgas. O segundo se destaca pela diversificação nos estudos e as aplicações biotecnológicas de microalgas (LOURENÇO, 2006).

As microalgas apresentam perfis diferentes mediante as condições de cultivo a qual ela é submetida. Sabe-se que esses microrganismos podem crescer nos mais variados meios como águas doces e marinhas, águas residuais agrícolas, industriais e municipais; todos demandam de componentes com características químicas e físicas diferentes para o desenvolvimento das espécies em estudo. O desempenho das microalgas é indicado pela biomassa obtida, teor de carboidratos, lipídios e proteínas, peso das células secas e produtividade (CHEAH et al., 2016).

Em geral, o monitoramento de variáveis como temperatura, luminosidade, pH, aeração, quantidade de nutrientes no meio permite avaliar a influência que estes possuem no crescimento e na produtividade das microalgas. A diversificação nas condições de cultivo permite ampliar e determinar a importância que cada variável possui para o cultivo.

Os meios de cultivo sintéticos são constituídos por nutrientes que atendem às necessidades das espécies assemelhando-se às condições naturais. Os nutrientes, de acordo com os processos metabólicos, são classificados em duas categorias fundamentais: macronutrientes (C, H, O, N, P, S, K, Mg, Si, Fe) e micronutrientes (Mn, Cu, Zn, Mo, V, B, Co, Ca, Na, Se, Ni) (LOURENÇO, 2006).

Nitrogênio e fosfato são dois importantes macronutrientes para o crescimento e metabolismo das células de microalgas. O nitrogênio é um componente essencial na formação de proteínas, ácidos nucleicos e pigmentos fotossintetizantes (clorofilas e ficobilinas). Este elemento encontra-se disposto em diferentes configurações: nitrato (NO_3^-), nitrito (NO_2^-), amônia (NH_3) e íon amônio (NH_4^+). Sua disponibilidade no meio influencia a atividade metabólica do organismo. Quando suas concentrações são elevadas, verifica-se um aumento nas concentrações de proteínas e clorofila nas células. O fosfato relaciona-se a processos que envolvem trocas energéticas nas células de ATP, açúcares fosfatados, ácidos nucleicos e fosfoenzimas. O fósforo assume a função de transferir energia e constituir moléculas estruturais. A restrição desse nutriente implica em um acúmulo de lipídeos e astaxantina (LOURENÇO, 2006), (JUNEJA et al., 2013).

O carbono é o nutriente necessário em maiores concentrações no cultivo uma vez que é o elemento essencial para fotossíntese e constituição de todas as substâncias orgânicas sintetizadas pelas células (proteínas, lipídeos, carboidratos, ácidos nucleicos, vitaminas, etc.). A biomassa microalgal contém em média, aproximadamente 50% de carbono por peso seco (CHISTI, 2007). O carbono pode ser utilizado na forma de CO_2 , carbonato ou bicarbonato para crescimento autotrófico e forma de acetato ou glicose para crescimento heterotrófico.

O pH do meio é influenciado pelas proporções entre as formas de carbono dissolvidas no mesmo, em que o crescimento de microalgas é propiciado pelo consumo de CO_2 dissolvido no meio aumentando o pH do sistema, que ao atingir níveis muito elevados torna-se tóxico para muitas espécies (LOURENÇO, 2006). O crescimento máximo da microalga se encontra no pH próximo do neutro, no entanto, o pH ideal para o desenvolvimento da cultura é o inicial

em que a alga está adaptada para crescer (JUNEJA et al., 2013). Contudo, o ajuste do pH no meio também irá depender da espécie que irá crescer, visto que algumas espécies se adaptam em meio de pH ácido, bem como espécies que se desenvolvem melhor em meio alcalino.

Outra variável que exerce forte influência para o crescimento microalgal afetando a taxa metabólica dos organismos é a temperatura. Esta deve ser mantida de acordo com a necessidade de cada espécie e a finalidade do cultivo (LOURENÇO, 2006). Os valores ideais de temperatura se encontram entre 15 e 26 °C. Valores mais elevados podem inibir a atividade metabólica e reduzir a solubilidade de componentes gasosos, isto é CO₂, no meio de cultura. Por outro lado, valores baixos de temperatura diminuem a cinética das atividades metabólicas. Entretanto, existem algumas microalgas que podem crescer em temperaturas fora da faixa ideal (PIRES et al., 2017). A temperatura tem papel fundamental na fotoinibição, que é conhecida por proporcionar alterações na taxa de crescimento das microalgas (JUNEJA et al., 2013). Em cultivos feitos em laboratório a temperatura é mantida constante, isto viabiliza o desenvolvimento e garante uma maior reprodutibilidade das espécies. Já em grandes sistemas a dificuldade encontra-se em manter a temperatura constante no processo (LOURENÇO, 2006).

A luz é um elemento imprescindível para o crescimento celular, já que os organismos a utilizam para a fotossíntese e assim converter dióxido de carbono em compostos orgânicos, em especial açúcares (JUNEJA et al., 2013).

A aeração permite a homogeneização do sistema promovendo a movimentação das células em suspensão, estabilidade do pH e controle da temperatura e exposição da célula à luz. Em cultivos de grande escala recomenda-se a injeção de CO₂ para facilitar a fotossíntese. Cultivos em pequena escala não necessitam de aeração, apenas agitação mecânica diária (LOURENÇO, 2006).

3.3 Crescimento de microalgas

As curvas de crescimento, mostrada na Figura 1 é utilizada como critério avaliativo do comportamento de microalgas ao longo do cultivo e pode ser identificada de acordo com as suas respectivas fases de crescimento:

1 – Fase de adaptação (fase lag): constitui-se da fase de adaptação das células e ocorre após o inóculo das células;

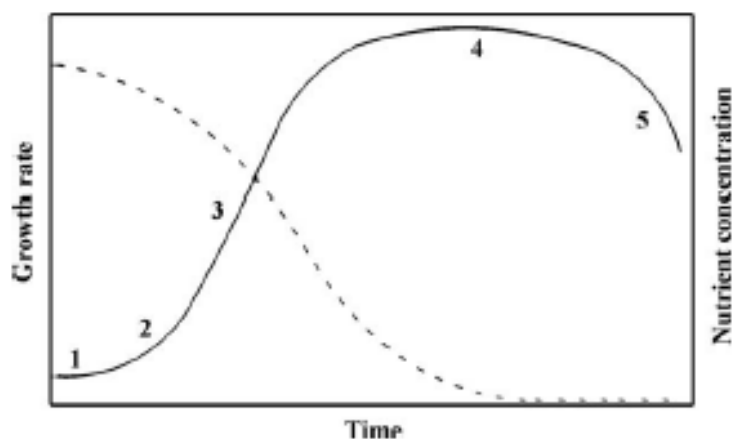
2 – Fase exponencial: o crescimento dá-se de maneira acelerada, em que sua taxa torna-se maior e aproximadamente constante por um curto período (alguns dias), chegando ao seu valor máximo;

3 – Fase de redução do crescimento: ocorre o decréscimo relativo da taxa de crescimento ocasionado pela diminuição de nutrientes dissolvidos no meio e pelos efeitos de limitação da energia luminosa (autosombreamento);

4 – Fase estacionária: o cultivo apresenta rendimento final máximo. A velocidade de crescimento diminui e iguala-se à taxa de morte;

5 – Fase de declínio: é ocasionada pelo esgotamento dos nutrientes e efeitos de autosombreamento; a taxa de crescimento é negativa uma vez que poucas células ainda podem crescer (LOURENÇO, 2006).

Figura 3 - Representação da taxa de crescimento de algas em cultura (linha sólida) e a concentração de nutrientes (linha tracejada) em função de um período de tempo.



Fonte: Mata; Martins; Caetano, (2010).

3.4 Sistemas de cultivo de microalgas

O crescimento das espécies de microalgas atende à uma série de fatores, tendo como principais destaques: o volume operacional do sistema, o qual inclui as fases líquida e gasosa; área iluminada total, que indica o quanto de luz o sistema recebe; área ocupada pelo sistema; e, concentração de nutrientes presente no meio. Para que ocorra o desenvolvimento da cultura é necessário a implantação de um sistema de cultivo que atenda às necessidades essenciais desses

microrganismos. Em virtude disso, as microalgas podem ser cultivadas em dois tipos de sistemas: abertos ou fechados, em relação a atmosfera (ANYANWU et al., 2018).

Os sistemas de cultivo são diferenciados inicialmente pela troca direta ou não de gases com a atmosfera. A escolha do sistema de cultivo afeta significativamente os custos de um processo de produção de biomassa para qualquer finalidade (MATA; MARTINS; CAETANO, 2010). O Quadro 1 mostra um comparativo entre os sistemas de cultivo.

Quadro 1 - Comparação entre sistemas de cultivo de microalgas.

Cultivo de microalgas	Sistemas fechados	Sistemas abertos
Controle de contaminação	Fácil	Difícil
Risco de contaminação	Reduzido	Alto
Esterilidade	Realizável	Nenhuma
Controle de processo	Fácil	Difícil
Controle das espécies	Fácil	Difícil
Regime de operação	Batelada ou semi-contínuo	Batelada ou semi-contínuo
Controle de temperatura	Uniforme	Difícil
Produtividade	3 – 5 vezes mais produtivo	Baixo
Custos de operação	Alto	Baixo
Área/Volume	Alto (20 – 200 m ³)	Baixo (5 – 10 m ³)

Fonte: Adaptado MATA; MARTINS; CAETANO (2010).

3.4.1 Sistemas abertos

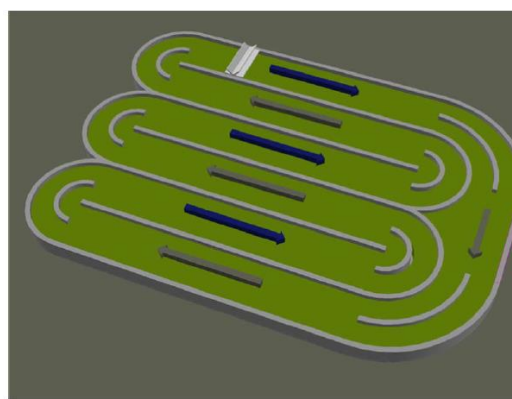
Sistemas abertos geralmente são mais baratos e possuem custos operacionais e de manutenção mais baixos, mas apresentam uma série de problemas quanto a contaminação devido à exposição com a atmosfera, baixa produtividade que está relacionada à aeração, carência de CO₂ e intensidade luminosa e controle da temperatura. A suscetibilidade à contaminação neste tipo de sistema de cultivo é superior comparado ao sistema fechado, logo, recomenda-se uma manutenção da cultura mantendo-a em condições ótimas para possibilitar o crescimento das células em taxas superiores. Tanques abertos à atmosfera são comumente

utilizados no tratamento de efluentes, produção de energia ou na produção de biomassa destinada à alimentação animal. À medida que a biomassa microalgal adquire valor agregado, por exemplo, na produção de pigmentos ou determinado bioativo, a cultura adquire maior exigência quanto a sua pureza e para isto requer-se uma verificação das condições de cultivo mais elevada em sistemas abertos. (LOURENÇO, 2006), (ACIÉN et al., 2012). Os sistemas abertos são classificados em duas configurações: i) tipo raceway; ii) lagoa.

i. Tipo raceway

São formadas por um canal de recirculação fechado com cerca de 0,3 m de profundidade mostrado na Figura 2 com a mistura sendo realizada por um conjunto de pás, que promove difusão dos gases e a homogeneização dos nutrientes e da cultura algal. No período de incidência luminosa, a cultura é alimentada continuamente na frente da roda de pás onde o fluxo, guiado por defletores, se inicia (CHISTI,2007).

Figura 4 - Tanque de cultivo de microalgas do tipo raceway.



Fonte: Aban Infrastructure Ltd.,(2018) ; RAZZAK (2017).

ii. Lagoa

Sistemas do tipo lagoas, mostrado na Figura 3, possuem troca de gases direta com a atmosfera o que provoca a evaporação do líquido e um equilíbrio na temperatura do sistema, são sistemas mais básicos e usados preferencialmente em cultivos de cepas em condições extremas: como pH elevado ou salinidade e para produzir uma biomassa destinada à suplementação alimentar e pigmentos (DE LA HOZ SIEGLER et al., 2011; MARKOU; NERANTZIS, 2013; MOAZAMI et al., 2011).

Figura 3 - Lagoa do tipo circular para cultivo de microalgas.



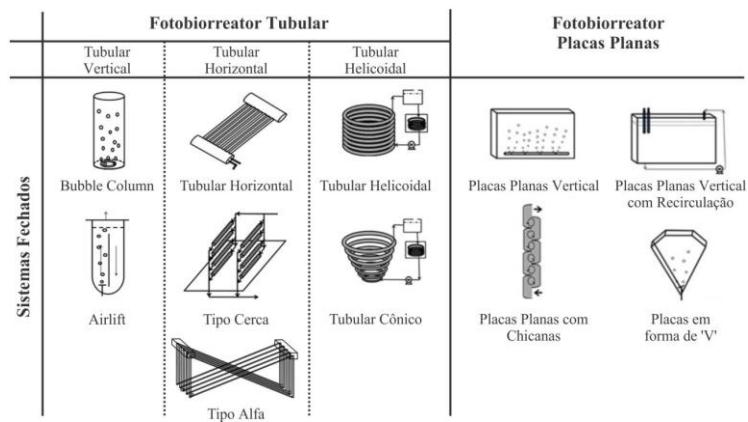
Fonte: Open Pond Biofuels: What You Have To Chose From, 2018.

Segundo Richmond (2004), o sistema de lagoas utiliza uma maior demanda de energia para homogeneização dos nutrientes e o nível de água apresenta um limite ótimo de 15 cm para que ocorra a penetração da luz solar e conseqüentemente o desenvolvimento da cultura. Além disso, possuem grande viabilidade econômica e manutenção da cultura. No entanto, apresentam limitações a contaminantes restringindo o número de cepas e reduzindo o tempo de cultivo para determinada cultura.

3.4.2 Sistemas Fechados

São sistemas de cultivo constituídos por fotobiorreatores de material transparente, como plásticos (acrílico) e vidro que permitem a incidência de luz, e que apresentam diferentes configurações geométricas sendo as mais recorrentes as que possuem formato tubular ou cilíndrico, com disposição vertical ou horizontal; e fotobiorreatores de placas planas como é ilustrado na Figura 4.

Figura 4 – Representação dos principais sistemas fechados para cultivo de microalgas.



Fonte: PEREIRA, 2014.

Os fotobiorreatores apresentam inúmeras vantagens quando comparados à sistemas abertos, são elas: controle da temperatura em que se encontra o cultivo, podendo ser adicionados sistemas de troca de calor como serpentinas ou trocadores de calor; sistemas de injeção de ar e controle de trocas gasosas entre o cultivo e o ar atmosférico; redução de problemas atenuados por contaminação da cultura como o surgimento de outros microrganismos; elevadas taxas de produtividade e área de ocupação muito baixa (LOURENÇO, 2006).

O sistema de aeração permite a movimentação das células no interior do cultivo e conseqüentemente uma redução nos efeitos de autosombreamento proporcionando um maior rendimento da cultura. A adição de pequenas bolhas no cultivo promove a dissolução de CO₂ e oxigenação do meio de cultura; a demanda desses elementos influencia diretamente no cultivo. A presença de CO₂ em grande excesso pode ocasionar uma acidificação do meio de cultura, já altas demandas de O₂ origina danos fotooxidativos e causam um comprometimento na produtividade do cultivo. Outro fator de relevância primordial é a incidência luminosa que é função da posição e o do ângulo em que os feixes de luz atravessam o reator e assim promove diferentes taxas fotossintéticas em um único cultivo. (LOURENÇO, 2006), (MATA; MARTINS; CAETANO, 2010).

Os principais parâmetros físicos em um sistema de cultivo são: volume operacional do sistema, o qual inclui as fases: líquida e gasosa; área iluminada total, que indica o quanto de luz o sistema recebe; área ocupada pelo sistema. Os cálculos que relacionam e definem esses parâmetros, assim como as equações e unidades são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Parâmetros básicos operacionais: fórmulas e unidades

Parâmetro	Fórmula	Unidade
Produtividade volumétrica P_R	$\frac{dm_x}{V_R dt_C}$	$\text{g L}^{-1} \text{d}^{-1}$
Produtividade areal P_G	$\frac{dm_x}{A_G dt_C}$	$\text{g m}^{-2} \text{d}^{-1} = 3.65 \text{ t ha}^{-1} \text{a}^{-1}$
Irradiância (da superfície), I_0	-	Densidade do fluxo de fótons (PFD), $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, onde E (Einstein) = mol por fótons
Volume do reator, V_R	-	Litros (L)
Área superficial do reator, A_R	-	m^2
Área total ocupada, A_G	-	m^2
Concentração da biomassa, c_X	-	g L^{-1}

Fonte: (PEREIRA, 2014).

3.5 Aplicações comerciais de microalgas

As microalgas podem produzir lipídeos, proteínas e carboidratos. As aplicações mais simples de microalgas constituem-se do seu uso na alimentação humana e de animais. Outras aplicações são: biocombustíveis, a extração de substâncias de importância farmacêutica, pigmentos utilizados como corantes de alimentos, cosméticos, etc (LOURENÇO, 2006). Atualmente, os estudos estão voltados para a aplicação dos diversos bioprodutos, ilustrado no Quadro 2, que são resultantes das microalgas como pigmentos, ácidos graxos, vitaminas, carotenoides e outros compostos bioativos (GULDHE et al., 2017).

Quadro 2 – Algumas aplicações de microalgas

Componentes	Bioativos	Microalga/cianobactéria	Atividade	Aplicação
Esteróis	Brassicasterol, estigmasterol	<i>I. galbana</i> ; <i>Chaetoceros</i> , <i>Skeletonema</i> ; <i>P. lutheri</i>	Hipocolesterolmicos	Alimentos de ostra
Pigmentos	Ficocianina, ficoeritrina,, β -Caroteno, astaxantina, luteína.	<i>Arthrospira/Spirulina</i> , <i>P. creuntum</i> , <i>Dunaliella salina</i> , <i>Haematococcus pluvialis</i>	Pigmento natural, anti-inflamatório, antioxidante, aditivo alimentar, suplemento alimentar	Suplemento alimentar, farmacêutico, tratamento de síndrome do túnel do carpo.
Proteínas	Proteína	<i>Dunaliella</i> , <i>Phaeodactylum truncornutum</i> , <i>Arthrospira platenisa</i> , <i>P. creuentum</i> .	Antioxidante	Suplemento de saúde alimentar

Fonte: De Jesus et al., 2013.

3.5.1 Biocombustíveis

Um dos maiores interesses consiste na utilização desses microrganismos para produção de biocombustíveis, isto se dá devido à grande capacidade desses seres em produzir e acumular energia em suas células e consequentemente apresentam em uma alta porcentagem de lipídeos, cerca de 30 a 50% do seu peso total (Quadro 3) (CHEW et al., 2017).

As condições de cultivo influenciam na disposição de lipídeos presentes na microalga, como por exemplo, em um meio deficiente de nitrogênio ocorre um aumento no armazenamento lipídico e diminuição no teor de proteína. Outro mecanismo abordado consiste em simular condições de estresse na microalga manipulando além da fonte de nitrogênio e carbono outros fatores determinantes no cultivo (temperatura, pH, salinidade, luminosidade) (SAJJADI et al., 2018).

Biocombustíveis de 3ª geração podem ser originados de biomassa cultivada para este propósito e que não tenha nenhuma competição com a produção de alimentos, como por exemplo as microalgas que podem ser cultivadas com impacto mínimo ao meio ambiente em águas residuais e salinas. Os rendimentos são de 10 a 100 vezes mais de combustível por unidade de área do que os biocombustíveis de 1ª e 2ª geração (MOTA e MONTEIRO, 2013). Os biocombustíveis derivados de microalgas se apresentam atualmente como um dos campos líder das pesquisas mundiais que podem trazer enormes benefícios para os seres humanos e principalmente para o meio ambiente. (CALIXTO, 2016).

Quadro 3 – produtividade lipídica de diferentes espécies de microalgas.

Microalga	%Lipídeo	Produtividade Lipídica (mg/L/d)
<i>Ankistrodesmus sp.</i>	24,0 – 31,0	ND
<i>Botryococcus braunii</i>	25,0 – 75,0	ND
<i>Chaetoceros muelleri</i>	33,6	21,8
<i>Chaetoceros calcitrans</i>	14,6 – 16,4/39,8	17,6
<i>Chlorella emersonii</i>	25,0 – 63,0	10,3 – 50,0
<i>Chlorella protothecoides</i>	14,6 – 57,8	1214
<i>Chlorella vulgaris</i>	5,0 – 58,0	11,2 – 40,0
<i>Chlorella sp.</i>	10,0 – 48,0	42,1
<i>Dunaliella salina</i>	6,0 – 25,0	116,0
<i>Isochrysis galbana</i>	7,0 – 40,0	-
<i>Nannochloris sp.</i>	20,0 – 56,0	60,9 – 76,5
<i>Nitzschia sp.</i>	16,0 – 47,0	ND
<i>Oocystis pusilla</i>	10,5	ND
<i>Pavlova salina</i>	30,9	ND
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	18,0 – 57,0	44,8

<i>Scenedesmus obliquus</i>	11,0 – 55,0	ND
<i>Scenedesmus sp.</i>	19,6 – 21,1	40,8 – 53,9
<i>Skeletonema costatum</i>	13,5 – 51,3	17,4
<i>Spirulina platensis</i>	4,0 – 16,6	ND
<i>Spirulina maxima</i>	4,0 – 9,0	ND
<i>Thalassiosira pseudonana</i>	20,6	17,4
<i>Tetraselmis sp.</i>	12,6 – 14,7	43,4

Fonte: Adaptado de Mata et al., (2010)

Apesar das inúmeras vantagens relacionadas à produção de biodiesel usando microalgas, a viabilidade econômica para produção em larga escala desse insumo ainda está sendo investigado, uma vez que enfrenta uma série de obstáculos técnicos, como processos complexos, exigência de altos custos de produção e entrada de energia (KADDIR et al., 2017).

3.5.2 Captura de CO₂

A temperatura da terra aumentou em 0,85 °C de 1880 a 2012, dos quais 0,6 °C ocorreu nos últimos 30 anos (GOEPPERT et al., 2012). Prevê-se ainda que no cenário global a temperatura aumente para 5,8 °C até 2100 (DE SILVA et al., 2015). Essa crescente mudança no perfil climático do planeta adverte para os atenuantes causados pela emissão de gases de efeito estufa provenientes principalmente de atividades humanas e de usinas de energia (RAZZAK et al., 2017).

O dióxido de carbono (CO₂) é um gás de efeito estufa liberado de fontes naturais e produzido como resultado do processo de industrialização e atividade humana. Existem, portanto, em maior evidência duas estratégias para a mitigação desse componente: reações químicas e mitigação biológica. A primeira abordagem apresenta certa desvantagem, uma vez que atende a processos que demandam elevado consumo de energia e reagentes, além de problemas de descarte dos resíduos convertidos ao longo do processo. Em contrapartida, o método de captura de CO₂ por via biológica tornou-se uma alternativa atraente (Quadro 4). O dióxido de carbono através da fotossíntese é convertido em matéria orgânica utilizando luz solar como fonte de energia (MATA. MARTINS, CAETANO, 2010); (RAZZAK et al., 2017).

Quadro 4 – Fixação de CO₂ por diferentes microalgas

Microalga	Taxa de fixação de CO₂ (g/m³/h)
<i>Chlorogleopsis sp.</i>	0,8 – 1,9
<i>Chlorella vulgaris</i>	80 – 260
<i>Euglena gracilis</i>	3,1
<i>Porphyridium sp.</i>	3 – 18
<i>Spirulina platensis</i>	38,3 – 60

Fonte: Maity et al., 2014.

3.5.3 Química fina e compostos bioativos

Uma diversidade de espécies de microalgas foi identificada com várias propriedades bioquímicas e fisiológicas. O potencial das microalgas como novas fontes de produtos químicos valiosos e outros produtos ampliam os esforços no desenvolvimento de pesquisas no setor (BOROWITZKA, 2013).

Estes organismos produzem vários componentes bioquímicos importantes que são usados como matéria-prima para alimentos, combustíveis, produtos cosméticos, pigmentos, no processo de extração de moléculas de alto valor, isótopos bioquímicos estáveis, e para a síntese de agentes antimicrobianos, antivirais, antibacterianos e drogas anticâncer. As espécies de microalgas são capazes de produzir diferentes tipos de antioxidantes, carotenóides, polímeros enzimáticos, lipídios, naturais corante, ácido graxo poliinsaturado, peptídeo, toxina e esteróis (Quadro 5). Também podem produzir vários compostos que podem ser utilizados na indústria farmacêutica e pigmentos naturais. Muitos compostos antioxidantes (por exemplo, astaxantina, β-caroteno, dimetilsulfonopropionato, micosporinas e alguns outros carotenóides) são produzidos por microalgas. Esses compostos antioxidantes têm a capacidade de proteger do estresse oxidativo (RIZWANN et al., 2018).

Quadro 5 – Microalgas, produtos e aplicações.

Microalga	Produto	Aplicação
<i>Sprulina platensis</i>	Ficocianina, biomassa	Alimentação saudável, cosméticos
<i>Chlorella vulgaris</i>	Biomassa, ácido ascórbico	Alimentação saudável, suplemento alimentar
<i>Dunaliella salina</i>	Beta- caroteno	Nutrição humana
<i>Haematococcus pluvialis</i>	Astaxantina	Nutracêuticos, cosméticos, alimentação.
<i>Cylindrospermum sp.</i>	Vitamina B12	Propulsor do crescimento
<i>Chlorella sp.</i>	Ácido ascórbico (Vitamina C)	Nutrição humana

Fonte: Adaptado de Rizwan et al., 2018.

3.5.4 Remediação

Aproximadamente 71% da superfície da terra é coberta por água. No entanto, o cenário atual evidencia rios e costas poluídos devido à potencialização de atividades humanas e industriais. A redução de espécies antropogênicas insumos de nutrientes (práticas agrícolas, águas residuais urbanas e indústrias) nos ecossistemas aquáticos é necessário para proteger o abastecimento de água potável e reduzir a eutrofização (PIRES et al., 2017). O tratamento adequado desses efluentes precisa ser intensivo encorajado a reduzir os contaminantes a níveis aceitáveis com qualidade microbiológica e química recomendada antes de ser descarregada para corpos de água. Atualmente, a inserção de processos de tratamento que utilizam microalgas na remoção de nutrientes inorgânicos, contaminantes orgânicos e metais pesados, associados à produção de biomassa de vários tipos de águas residuais, tem sido amplamente estudado e é considerado um método viável para economizar grande quantidade de nutrientes e água necessários para o cultivo de microalgas (KADIR et al., 2018); (PIRES et al.,2013).

Existem vários trabalhos que exploraram o crescimento de microalgas águas residuais, tais como águas residuais cruas, tratadas e lixiviação de aterro onde a biomassa foi produzida a partir de espécies de microalgas ou de consórcios de microalgas e bactérias. Espécies como *Chlorella*, *Scenedesmus*, *Desmodesmus*, *Oscillatoria*, *Arthrospira*, *Spirulina*, *Nannochloris*, *Botryococcus*, *Phormidium*, e *Nannochloropsis* foram demonstrados ter o potencial de remoção de altas concentrações de nitrogênio, fósforo e íons metálicos. Além disso, as células microalgas têm o potencial de ser utilizados para remoção de metais pesados devido à sua capacidade de acumular Hg, Cd, Zn, Au, Ag, Co, Mn, Cs, Ni, Fe, Cu e Cr nas suas células.

Portanto, o uso direto de águas residuais traz consigo uma vantagem econômica adicional por meio de compensações de custo de tratamento de águas residuais (Moreno - Garcia et al., 2017)

3.5.5 Nutrição e saúde humana

Microalgas são capazes de incrementar a o conteúdo nutricional de alimentos convencionais, sua biomassa oferece uma melhor qualidade de proteína do que os legumes, arroz, trigo e proteína animal, como leite e carne. (Quadro 6). O consumo humano de biomassa de microalgas é restrito a poucas espécies devido aos regulamentos rígidos de segurança alimentar, fatores comerciais, demanda de mercado e preparação específica. *Chlorella*, *Spirulina* e *Dunaliella* são as espécies de microalgas que dominam o mercado. O teor de proteína na *Spirulina* é de 55-70% do total biomassa seca, demonstrando o alto valor nutricional que essas microalgas possuem (RIZWANN et al., 2018).

Quadro 6 – Composição de diferentes fontes de alimentos e microalgas, expressas em porcentagem de matéria seca.

Fonte	Proteína	Carboidratos	Lipídeos
<i>Spirulina platensis</i>	63	15	11
<i>Arthrospira maxima</i>	60-71	13-16	6-7
<i>Chlorella pyreïnodos</i>	51-58	12-17	2
<i>Dunaliella salina</i>	57	32	6
<i>Scenedesmus obliquus</i>	50-56	10-17	12-14
<i>Haematococcus pluvialis</i>	48	27	15
Fermento de padeiro	39	38	1
Carne	43	1	34
Leite	26	38	28
Arroz	8	77	2
Soja	37	30	20

Fonte: Adaptado Lourenço, 2006.

4.MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Seleção das espécies

Foram testadas um número de seis espécies de microalgas dulcícolas, isoladas de diferentes ambientes da região nordeste mostradas na Tabela 3 que se encontram depositadas no banco de cultivo de microalgas do Laboratório de Ambientes Recifais e Biotecnologia com Microalgas da Universidade Federal da Paraíba (LARBIM/UFPB): *Arthrospira platensis* (D9Z), *Chlorococcum sp hypnosporum* (D29Z), mantidas em meio Zarrouk (ZARROUK, 1966); e *Chlorella sp.* (D359 WC), *Monoraphidium contortum* (D173 WC), *Golenkina radiata* (D325 WC), *Scenedesmus acuminatus* (D115WC) mantidas em meio WC(GUILLARD;LORENZEN, 1972). A escolha das espécies deu-se devido as mesmas apresentarem altos teores proteicos, coincidindo com objetivo deste trabalho. Todas as espécies foram fotografadas em microscópio LEICA DM 2500 e suas imagens encontram-se na Prancha 1.

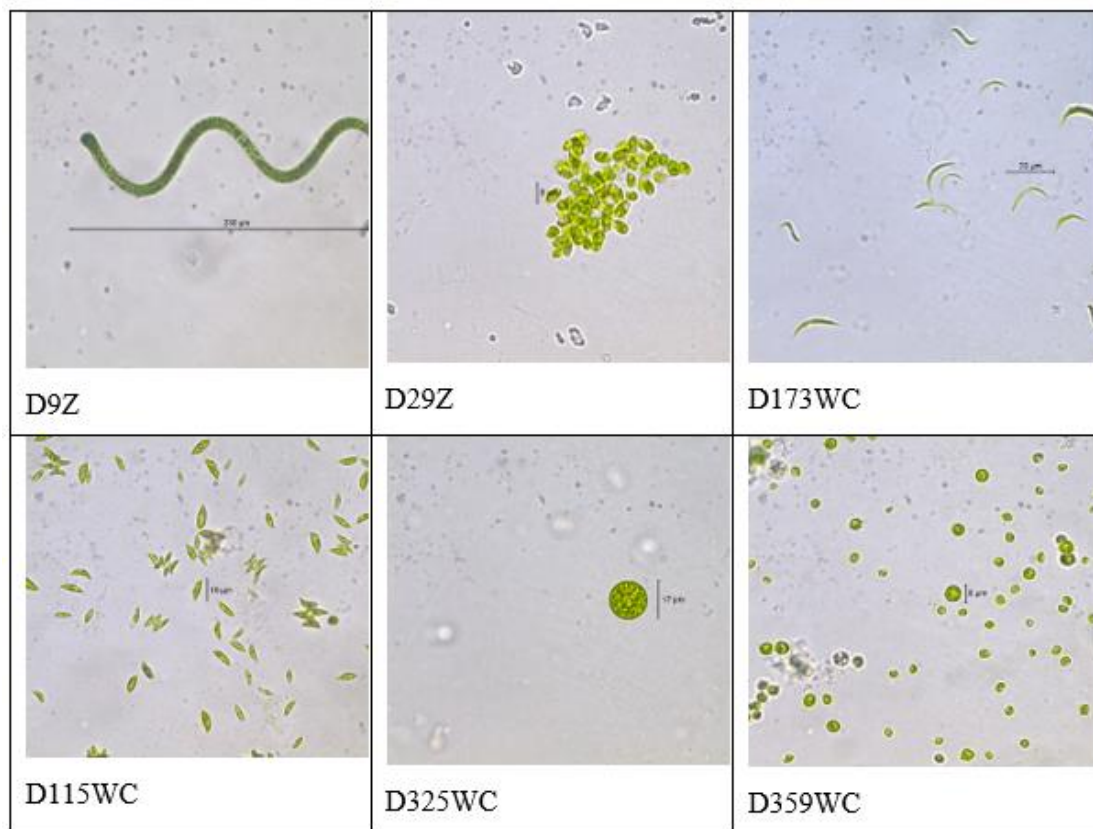
Tabela 3 – Relação das microalgas utilizadas nesta pesquisa e sua respectiva procedência

Código	Espécie	Procedência
D9Z	<i>Arthrospira platensis</i>	UFF
D29Z	<i>Chlorococcum sp cf hypnosporum</i>	Açude do Cais, Cuité – PB
D173WC	<i>Monoraphidium contortum</i>	Lagoa Tapada Córrego – PB
D115WC	<i>Scenedesmus acuminatus</i>	Bebedouro das Ovelhas, Frei Martinho – PB
D325WC	<i>Golenkina radiata</i>	Ilha do Rodeadouro, Rio São Francisco – PE
D359WC	<i>Chorella sp.</i>	Filtro de água potável residencial, João Pessoa – PB

*cf. = confere com; WC = meio WC água doce; Z = meio Zarrouk água doce.

Fonte: LARBIM/UFPB, 2018.

Prancha 1 – Espécies de microalgas utilizadas na pesquisa



Fonte: LARBIM/UFPB, 2018.

4.2 Coleta e Pré-tratamento do efluente

O efluente em estudo foi coletado proveniente de tanques de criação de tilápias, localizado no município do Conde-PB. A primeira coleta, de um material de 20 L, foi realizada no dia 23 de julho de 2018 (Figura 5). Posteriormente foi realizada outra coleta, de um material de 30 L, no dia 05 de setembro de 2018. Em ambas as coletas, o material foi levado ao Laboratório de Ambientes Recifais e Biotecnologia com Microalgas da Universidade Federal da Paraíba (LARBIM/UFPB), em que foi realizada filtração (Figura 6) a vácuo utilizando filtro de café e filtro de fibra de vidro e em seguida autoclavado.

Figura 5 – Local de coleta do efluente.



Fonte: Autora, 2018.

Figura 6 – Sistema de filtração do efluente.



Fonte: Autora, 2018.

4.3 Análises químicas

A qualidade do meio de cultivo foi avaliada através de parâmetros físicos e químicos, como pH, nitrato, fosfato, DBO e DQO, segundo os procedimentos analíticos do *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 1998).

4.4 Meios de cultura

Inicialmente as espécies foram cultivadas em 2 condições diferentes: como meio sintético (controle) foram utilizados o meio Zarrouk (ZARROUK, 1966) e o meio WC (GUILLARD;LORENZEN, 1972); já para meio alternativo utilizou-se o efluente sem diluição.

Os meios sintéticos foram preparados com água destilada e autoclavada seguida da adição dos macronutrientes, micronutrientes e vitaminas que constituem os meios descritos nas Quadros 7 e 8.

Quadro 7 – Composição do meio Zarrouk (ZARROUK, 1966).

Soluções de Trabalho	
Reagentes	Quantidades (g) dissolvida em água destilada
1- KNO ₃	15,0 em 200 mL
2- NaCl	33,0 em 200 mL
3- MgSO ₄ .7H ₂ O	1,5 em 200 mL
4- K ₂ HPO ₄	1,5 em 200 mL
5- CaCl ₂ .2H ₂ O	0,58 em 200 mL
6- Na ₂ EDTA	6,4 em 200 mL
7- FeSO ₄ .7H ₂ O	0,5 em 200 mL
8- H ₃ BO ₃	1,142 em 200 mL
9 – Solução Mista	*
*Solução mista: Dissolver os cinco sais abaixo (g) em 100 mL de água destilada.	
Co(NO ₃) ₂ . 6H ₂ O	0,049 g
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,144 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,882 g
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,0157 g
MoO ₃	0,071 g
Preparação de 1,0 L de meio de cultura (água destilada)	
A – Dissolver em 600 mL de água destilada 15,0 g de NaHCO ₃ .	
B – Na solução anterior, dissolver 2,0 g de Na ₂ CO ₃ .	
C – Acrescentar 10,0 mL das soluções 1,2,3,4 e 5.	
D – Acrescentar 1,0 mL das soluções 6,7,8 e 9.	
E – Completar o volume a 1000 mL e autoclavar.	

Fonte: SANTANA, 2014.

Quadro 8 – Composição do meio WC (Guillard; Lorenzen, 1972).

Solução estoque	Fórmula	Quantidade
Cloreto de Cálcio 2.H ₂ O	CaCl ₂ .2H ₂ O	36,8 g
Sulfato de Magnésio 7. H ₂ O	MgSO ₄ .7H ₂ O	37 g
Bicarbonato de sódio	NaHCO ₃	12,6 g
Fosfato de potássio 3.H ₂ O	K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	11,4 g
Nitrato de sódio	NaNO ₃	85 g
Água destilada		1 L
Solução de silicato	Fórmula	Quantidade
Metasilicato de sódio 9.H ₂ O	NaSiO ₃ .9H ₂ O	21,2 g
Água destilada		1 L
Solução de micronutrientes	Fórmula	Quantidade
Sal dissódico	Na ₂ EDTA	4,36 g
Cloreto férrico 6.H ₂ O	FeCl ₃ .6H ₂ O	3,15 g
Sulfato de cobre 5.H ₂ O	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,01 g
Sulfato de zinco 7.H ₂ O	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,022 g
Cloreto de cobalto 6.H ₂ O	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,01 g
Cloreto de manganês 4.H ₂ O	MnCl ₂ .4H ₂ O	0,18 g
Molibdato de sódio 2.H ₂ O	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,006 g
Ácido bórico	H ₃ BO ₃	1 g
Água destilada		1 L
Solução de vitaminas		Quantidade
Tiamina HCl		0,1
Biotina		0,0005
Água destilada		1L
Composição do meio		Quantidade
Solução estoque, Solução de silicato, solução de micronutrientes e solução de vitaminas: Usar 1 mL para cada 1L de meio.		
Tri (hidroximetil)-aminometano	0,115 g a cada litro	

Fonte: SANTANA, 2014.

O meio alternativo foi suplementado com uma solução de Fosfato de Potássio 11,4 g/L e Nitrato de Sódio 85 g/L, sendo adicionados 1 mL da solução para 1L de cultivo. O pH foi aferido e corrigido com bicarbonato de sódio (NaHCO₃) para a *Arthrospira platensis* já que esta espécie cresce em pH alcalino.

4.5 Condições de cultivo

O experimento foi realizado em triplicata cultivando as 6 diferentes espécies de microalgas em balões de 250 mL, contendo 200mL de meio (sintético e alternativo) apenas com agitação manual durante um período de aproximadamente 14 dias (Figura 7), para que fosse obtida a taxa de crescimento de cada microalga nos diferentes meios, e com isto, fossem selecionadas as espécies com melhores desempenho em termos de crescimento celular para um cultivo em escala maior.

Figura 7 – Etapa de bioprospecção.



Fonte: Autora, 2018.

Posteriormente, as espécies já selecionadas foram otimizadas durante um período de 5 dias (Figura 8) para o cultivo (em triplicata) em balões de 6L de capacidade (Figura 9), constituídos de 5L de meio e inóculo da etapa anterior, numa câmara de cultivo climatizada, com temperatura mantida em $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, com sistema de iluminação constituído por lâmpadas fluorescentes tipo luz-do-dia, fotoperíodo de 12 horas, e aeração contínua de ar atmosférico ($2\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$), usando um mini compressor de membrana (Figura 10). Foi realizado um acompanhamento até que as espécies atingissem a fase estacionária. Ao chegar na fase estacionária, os experimentos foram interrompidos e então foram determinadas a taxa máxima de crescimento da população ($R_{\text{máx}}$), que corresponde ao número máximo de células registrado ao final de cada experimento subtraindo o valor da densidade celular dos inóculos, e o rendimento máximo em biomassa ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), após a liofilização.

Figura 8 – Cepas otimizadas para fase 2 do experimento



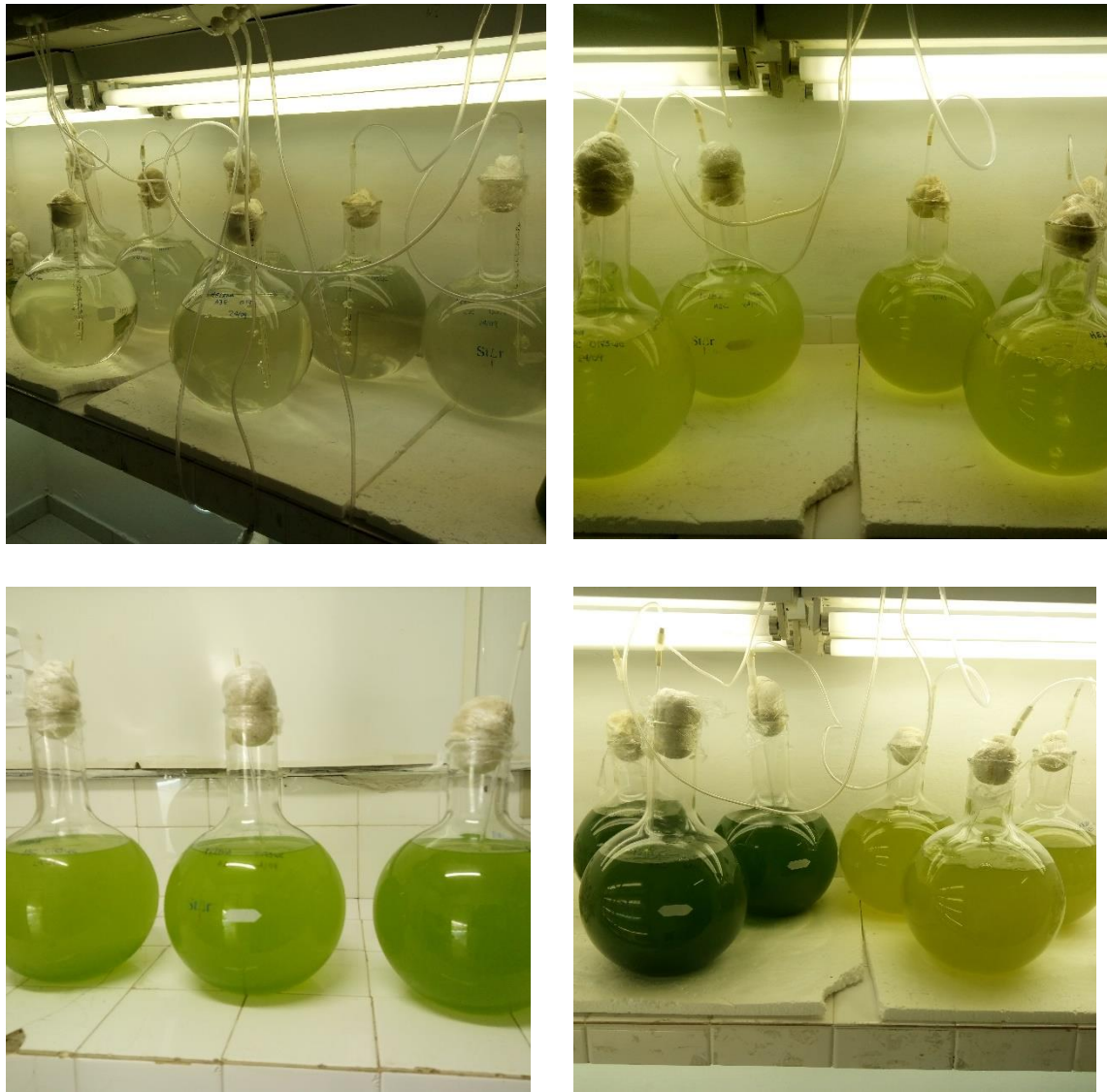
Fonte: Autora, 2018.

Figura 9 – Inóculo em balões de 6L.



Fonte: Autora, 2018.

Figura 10 – Desenvolvimento do cultivo em meio controle e meio alternativo.

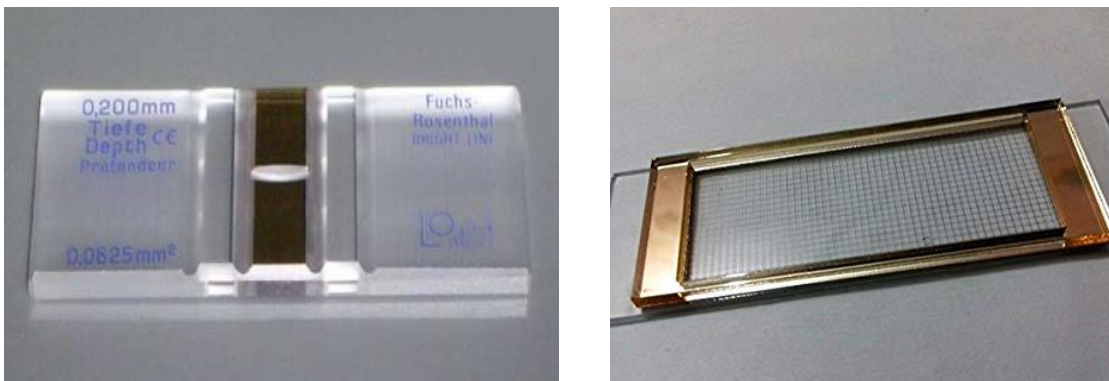


Fonte: Autora, 2018.

4.6 Avaliação do crescimento dos cultivos

O desenvolvimento dos cultivos foi acompanhado diariamente por meio da contagem celular em microscópio binocular Leica, em câmaras de Fuchs- Rozenthal para células coloniais e Sedgwick-Rafter para células filamentosas (Figura 11), e através de medidas de fluorescência *in vivo* utilizando um Fluorômetro Turner Design (Figura 12) para determinação das curvas de crescimento.

Figura 11 – Câmaras de contagem de células.



Fonte: Câmara para contagem Fuchs Rosenthal; Gridded Sedgewick-Rafter Counting Cell with Case.

Figura 12 – Fluorômetro Turner Design.

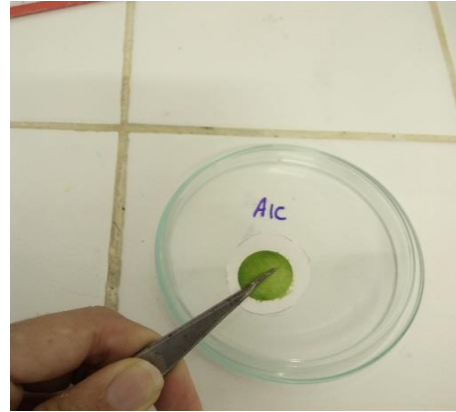


Fonte: Autora, 2018.

4.6.1 Rendimento de biomassa seca

Durante os experimentos também foram retiradas alíquotas de 5mL de cultivo para determinação do rendimento da biomassa seca ao longo do cultivo (Figura 13).

Figura 13 – Procedimento de obtenção do rendimento em biomassa seca



Fonte: Autora, 2018.

4.7 Obtenção da biomassa

Ao chegar na fase estacionária o cultivo foi interrompido, em seguida centrifugado e liofilizado para a obtenção da biomassa seca.

4.7.1 Centrifugação

A biomassa foi centrifugada em uma centrífuga refrigerada a 20°C (NOVA TÉCNICA-NT825), com capacidade para centrifugação de 4 tubos de 500 mL (Figura 14). As condições de centrifugação foram de 4500 rpm em um período de 18 minutos. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado e a biomassa, com auxílio de uma pipeta, foi armazenada em bandejas de alumínio envolvidas em plástico filme e então congelada a -30°C (Figura 15)

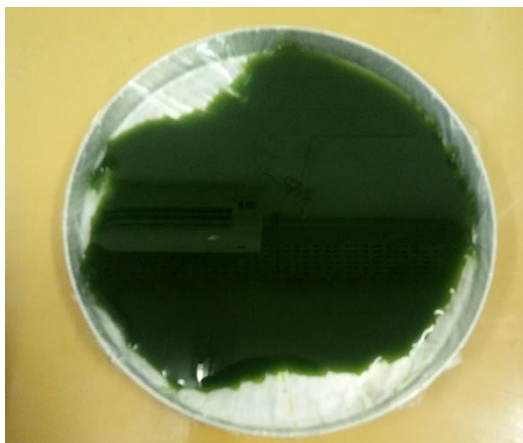
Figura 14 – Centrifugação da biomassa.





Fonte: Autora, 2018.

Figura 15 – Biomassa concentrada



Fonte: Autora, 2018.

4.7.2 Liofilização

As bandejas de alumínio contendo a biomassa concentrada foram congeladas em ultrafreezer (-30°C) e em seguidas liofilizadas em um liofilizador Terroni (modelo LD1500) (Figura 16).

Figura 16 – Liofilizador Terroni (modelo LD1500)



Fonte: Autora, 2018.

4.8 Análises bioquímicas da biomassa

A biomassa seca foi armazenada em envelopes plásticos e pesadas com seu valor registrado (Figura 17). Em seguida foram realizados ensaios para determinação dos componentes de interesse presentes na biomassa.

Figura 17 – Biomassa seca



Fonte: Autora, 2018.

As proteínas foram determinadas pelo método de Lowry et al., 1951, adaptado por Derner et al., 2006, utilizando albumina bovina como padrão (Figura 18). Os carboidratos foram determinados pelo método de Kochert (1978) adaptado por Derner et al., 2006, utilizando glicose como padrão (Figura 19). Por fim, os lipídios foram determinados pelo método gravimétrico de Bligh e Dyer (1959), utilizando 50 mg da biomassa seca (Figura 20).

4.8.1 Proteínas

Foram pesadas 5 mg da biomassa seca de microalgas. Adicionou-se 4 mL de hidróxido de sódio 1,0 N e aqueceu-se em banho-maria em um período de hora à 100 °C, em seguida as amostras foram resfriadas em temperatura ambiente e centrifugadas a 3.000 x g por 30 min. Retirou-se 0,5 mL do extrato alcalino (sobrenadante) e adicionou-se 1,0 mL de NaOH (hidróxido de sódio) 1,0 N e 5 mL de Fenol 4%. O sistema foi agitado em vórtex e deixado em repouso por 30 min. Em seguida, foram adicionados 2,5 mL de H₂SO₄ (ácido sulfúrico) concentrado e agitado novamente. As amostras resfriadas foram lidas em espectrofotômetro UV-vis (Thermo Fisher Scientific, modelo Evolution 60S) no comprimento de onda de 750nm. Uma curva padrão com proteína de soro bovino foi preparada com gradiente de concentração de 0 - 400 µg/mL.

Figura 18 – Determinação de proteínas em microalgas pelo método Lowry et al. (1951)



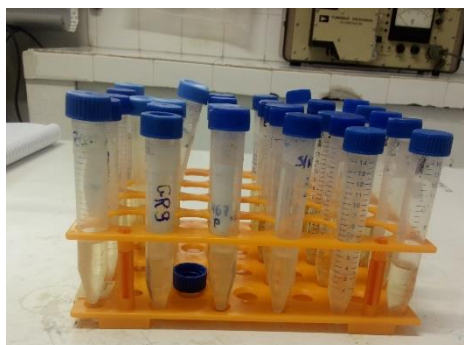
Fonte: Autora, 2018.

4.8.2 Carboidratos

Foram pesadas 5 mg da biomassa seca de microalgas. Adicionou-se 4 mL de hidróxido de sódio 1,0 N e aqueceu-se em banho-maria por uma hora à 100 °C, em seguida as amostras foram resfriadas em temperatura ambiente e centrifugadas a 3.000 x g por 10 min. Foram retiradas alíquotas de 0,5 mL do extrato alcalino (sobrenadante) e adicionou-se 1,0 mL de NaOH 1,0 N e 5 mL de Fenol 4%, o sistema foi agitado em vortex e deixado em repouso por 30 min. Logo após, foram adicionados 2,5 mL de H₂SO₄ concentrado e agitado novamente. As amostras foram resfriadas e lidas em espectrofotômetro UV-vis (Thermo Fisher Scientific, modelo

Evolution 60S) no comprimento de onda de 485 nm. Uma curva padrão com glicose anidra foi preparada com gradiente de concentração de 0 - 400 $\mu\text{g/mL}$.

Figura 19 – Determinação de carboidratos em microalgas pelo método Kochert (1978)

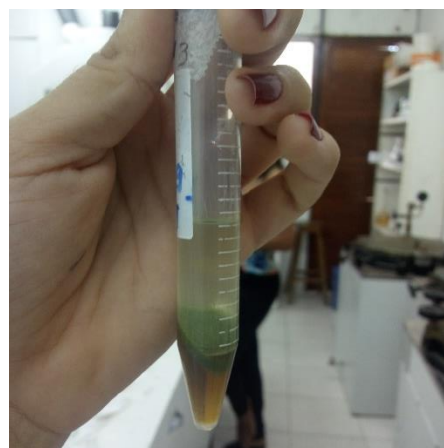
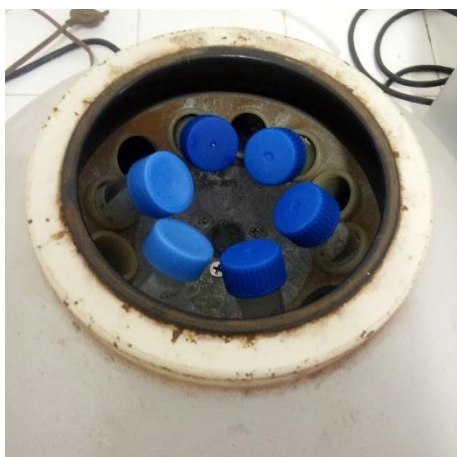


Fonte: Autora, 2018.

4.8.3 Lipídios

Foram pesados 50 mg das amostras, adicionados 3 mL de uma mistura de clorofórmio:metanol (1:2) com 2 mL de água, foram sonicadas (Unique, modelo USC-1400A) em banho de gelo por 40 min. Adicionou-se 1 mL de clorofórmio e 1 mL de uma solução de sulfato de sódio a 1,5%, sendo sonicadas por mais 20 min. O sistema foi centrifugado a 4.000 x g por 10 min. As amostras foram mantidas em repouso, e logo após foi realizado uma separação e remoção da fase superior por aspiração. As amostras foram filtradas com papel de filtro. Uma alíquota de 1 mL desta solução foi tomada em frascos de vidros pré-pesados em balança analítica para determinação dos lipídios totais por gravimetria após a evaporação total do solvente em estufa à 80 °C.

Figura 20 – Determinação de lipídios em microalgas pelo método Bligh e Dyer (1959)





Fonte: Autora, 2018.

4.9 Análise estatística

Os dados da composição bioquímica das microalgas foram submetidos à análise de variância (ANOVA), em delineamento inteiramente casualizado (DIC), e o teste de Kruskal-Wallis (Teste H) quando os dados não foram paramétricos utilizando o programa Statística 6.0 (STATSOFT, 2010).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Características químicas do meio de cultivo

O efluente da piscicultura apresentou um pH de 7,37, com teores de nitrato e fosfato (Tabela 4) muito baixos quando comparados aos meios sintéticos (2,8 e 12,6 mgL⁻¹, respectivamente para o meio WC e Zarrouk), de tal forma que antes de ser iniciado o inóculo foi realizada uma suplementação do meio alternativo com estes nutrientes.

Tabela 4- Análises físicas e químicas do efluente de piscicultura

Parâmetros	Valores quantificados
pH	7,37

NO ₃ ⁻ (mgL ⁻¹)	0,02
PO ₄ ⁺ (mgL ⁻¹)	0,69
DQO (mgO ₂ L ⁻¹)	36,5
DBO (mgL ⁻¹)	14

Fonte: Autora, 2018.

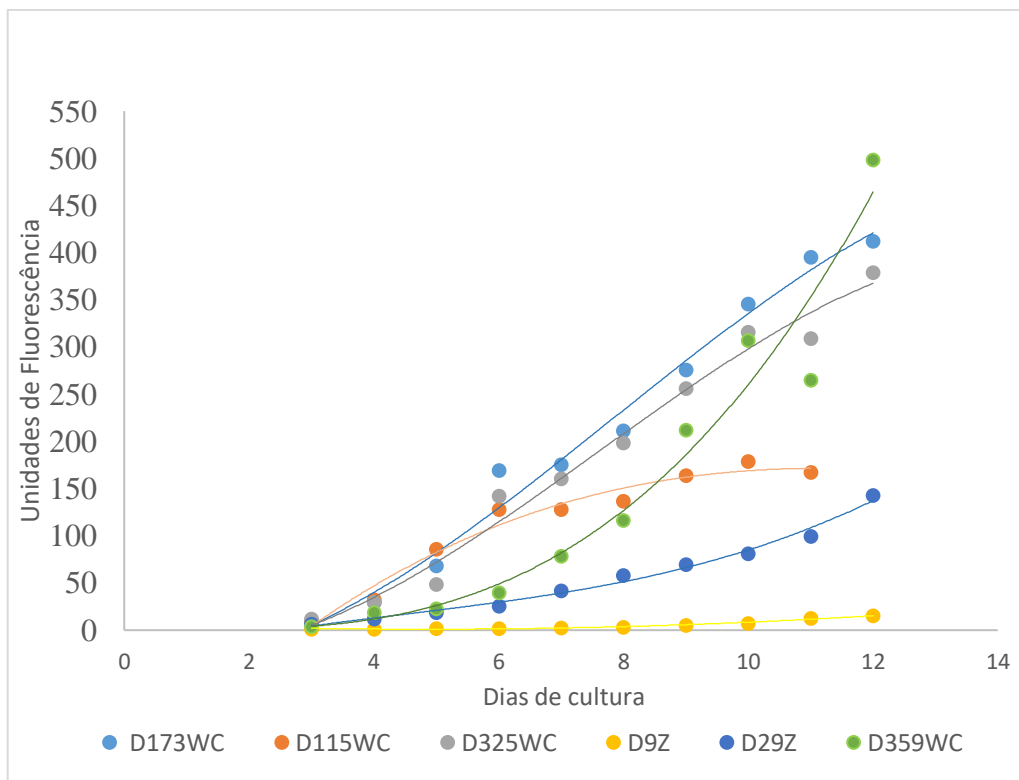
5.2 Parâmetros de crescimento das microalgas

O acompanhamento do crescimento das populações em cultivo é fundamental para determinar o momento ótimo da coleta e obtenção da biomassa uma vez que à medida que ocorre o crescimento diversos metabólitos são formados. Foram realizadas amostragens com periodicidade de 48 horas para realização de contagem celular e fluorescência in vivo.

5.2.1 Etapa de bioprospecção

Nesta etapa foram avaliadas seis espécies de microalgas isoladas predominantemente da região nordeste com intuito de selecionar aquelas que apresentassem um maior desempenho no crescimento no efluente da piscicultura. A duração do cultivo foi de aproximadamente de 14 dias, mas o comportamento do crescimento variou para cada espécie analisada (Figura 21).

Figura 21 – Curva de crescimento das 6 espécies de microalgas testadas em meio alternativo de cultivo.



Fonte: Autora, 2018.

As espécies selecionadas para a etapa posterior seguiram o critério de: i) crescimento no meio alternativo e ii) rendimento em biomassa seca. E a partir disso crescimentos mais expressivos foram apresentados para as espécies D173WC (*Monoraphidium contortum*) e D325WC (*Golenkina radiata*). Os valores para rendimento da biomassa seca (Tabela 5) também coincidiram para as espécies citadas anteriormente, sendo então estas selecionadas para cultivo em escala maior para obtenção de biomassa e posteriores análises.

Tabela 5 – Rendimento em biomassa seca das 6 espécies de microalgas testadas em meio alternativo de cultivo.

Código da cepa	Biomassa (g/L)
D173WC	0,206667
D115WC	0,146667
D325WC	0,113333
D9Z	0,686667
D29Z	0,1
D359WC	0,10

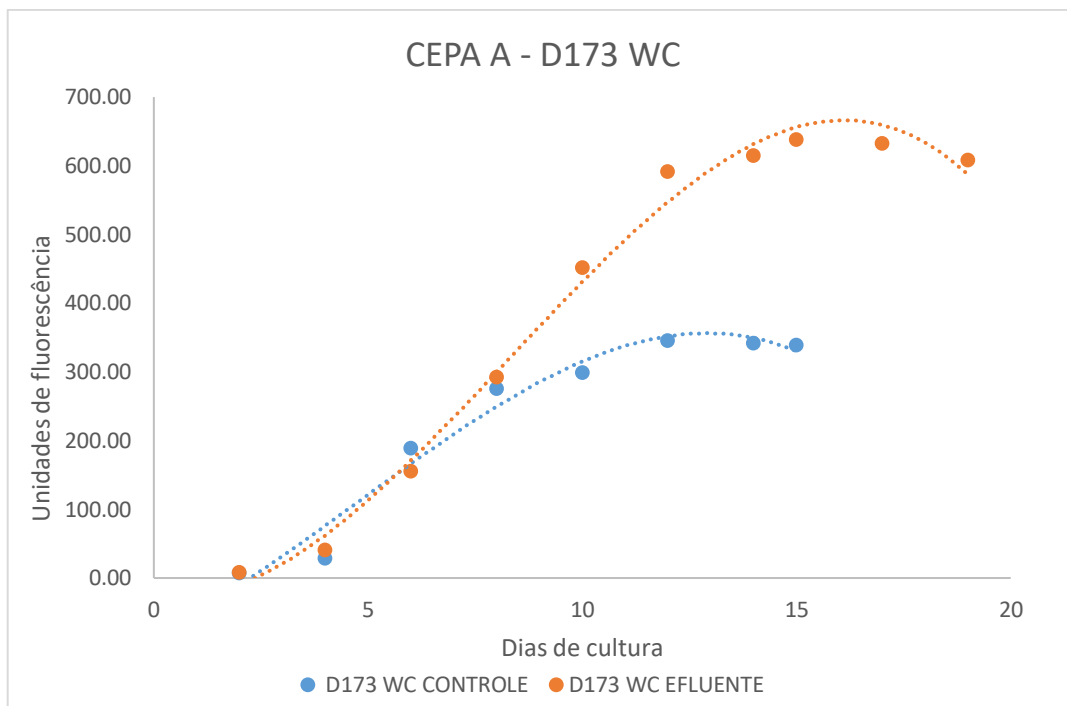
Fonte: Autora, 2018.

Apesar de ser adotada como controle e apresentar um elevado valor de biomassa 0,68667 g/L, a espécie *Arthospira platensis* não se desenvolveu no efluente, requerendo mais testes com diferentes diluições para encontrar o percentual ótimo de cultivo a ser adotado. Esta microalga destaca-se por apresentar uma concentração de proteínas na ordem de 60-70% (Habib et al., 2008) e com isto torna-se um atrativo para a indústria alimentícia. Neste estudo, *Arthospira platensis* foi adotada como parâmetro de controle devido seu percentual ótimo de proteínas para a investigação dos componentes de interesse que as microalgas em estudo apresentaram.

5.2.2 Cultivo em escala superior

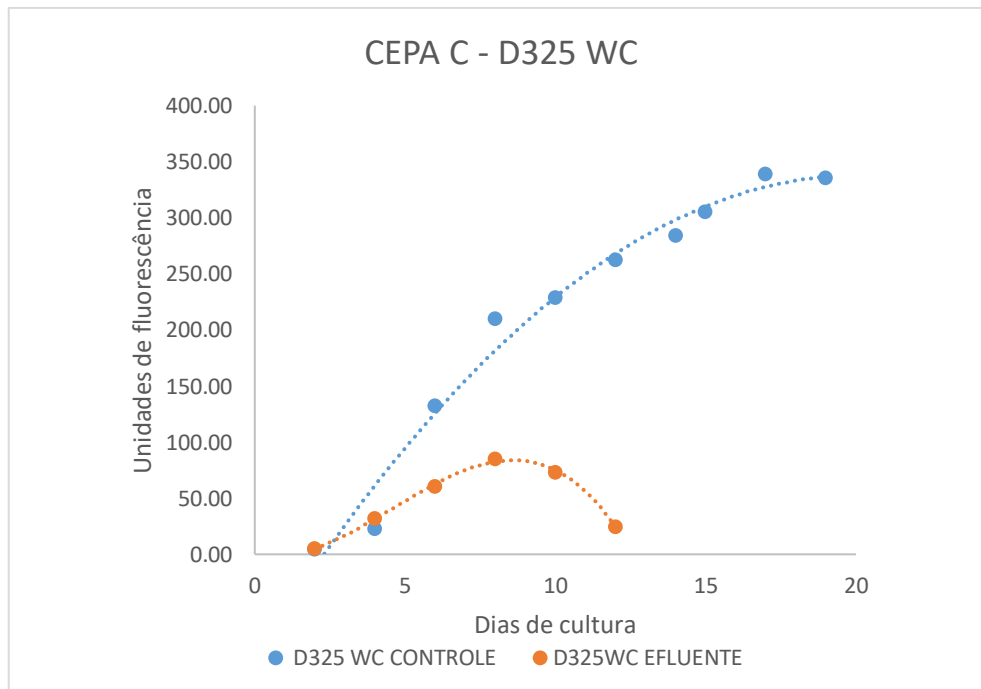
As espécies selecionadas anteriormente foram cultivadas em triplicata em balões de 6L no meio alternativo e meio controle. Novamente, apresentaram comportamento de cultivo diferentes para cada espécie. Observou-se que a cepa D173 WC (*Monoraphidium contortum*) (Figura 22) apresentou um crescimento mais expressivo no meio alternativo e revelou a aplicabilidade do efluente da piscicultura como meio de cultivo para esta microalga.

Figura 22 – Curva de crescimento da microalga *Monoraphidium contortum* em meio controle e alternativo.



Fonte: Autora, 2018.

Figura 23 – Curva de crescimento da microalga *Golenkina radiata* em meio controle e meio alternativo.



Fonte: Autora, 2018.

Em contrapartida, a cepa D325 WC (*Golenkina radiata*) não apresentou o crescimento esperado para essa fase do experimento (Figura 23) tal comportamento pode ser atribuído às

sucessivas etapas de autoclavagem do efluente e perda de nutrientes para o crescimento da microalga de interesse.

Foram realizados paralelamente medidas de peso seco (em triplicata) para as microalgas testadas em meio controle e meio alternativo ao longo dos dias de cultivo. Ao fim, obteve-se o rendimento em biomassa seca (Tabela 6).

Tabela 6 – Rendimento em biomassa seca das 2 espécies de microalgas testadas em meio controle e alternativo de cultivo

Código da cepa	Biomassa (g/L)
D173WC - CONTROLE	0,14667
D173WC - EFLUENTE	0,19333
D325WC - CONTROLE	0,444
D325WC - EFLUENTE	0,08

Fonte: Autora, 2018

5.3 Composição bioquímica

Os valores de proteínas, carboidratos e lipídios (Tabela 7) obtidos nas biomassas das microalgas estudadas evidenciaram a potencialidade destas na metabolização de proteínas como componentes em maior abundância na biomassa.

Tabela 7 – Teores de proteínas, carboidratos e lipídios obtidos nas biomassas estudadas

Microalga	Proteínas (%)	Carboidratos (%)	Lipídios (%)	Soma
D173 WC - Controle	61,62	17,98	12,0	91,56
D173 WC - Efluente	48,67	15,30	6,4	70,38
D325 WC - Controle	62,94	19,32	7,9	90,17
D325 WC- Efluente	44,75	19,47	2,5	66,77

*Teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$) – Lipídios: $p = 0,1641$; Proteínas: $p = 0,0779$; Carboidratos: $p = 0,1549$. Fonte: Autora, 2018.

Guerrero-Cabrera et al., 2014 cultivaram em meio composto de efluente de tanque de tilápia em um volume de 4L e obtiveram valores de 45,4% de proteína e 10,4% de lipídios para a microalga *Monoraphidium sp.*, valores equivalentes aos encontrados que foi de 48,67% de proteínas e 15,30% de lipídios respectivamente.

Em contrapartida, Che et al., 2017 realizaram o cultivo com tratamento de ácido fúlvico e obtiveram valores de 54,3% de lipídios, 39,7% de proteínas e 32,5% de carboidratos para a *Monoraphidium sp.* Santhakumaran et al., 2018 procederam o cultivo de 14 espécies em águas provenientes de Kerala incluindo a *Monoraphidium contortum* e exprimiram valores de 12,84% para proteínas, 25,60% para lipídios e 5,95% para carboidratos respectivamente. Ambos os trabalhos revelaram o potencial desse gênero de microalga para produção de lipídios o que diverge dos valores obtidos nessa pesquisa apontando o potencial para produção de proteínas.

Matos et al. (2015) cultivaram *Chlorella sp.* em meio alternativo formado por concentrado de dessalinização residual obtiveram 46,80% de proteínas, valor próximo ao registrado para as microalgas *Monoraphidium contortum* (48,67 %) (cepa D173WC) e *Golenkina radiata* (44,75%) (cepa D325WC).

A microalga *Arthospira platensis* foi utilizada como parâmetro de controle para esse estudo, Varandas, 2016 cultivou esta espécie em meio sintético e a mesma apresentou um teor de 50,02% de proteínas. Os valores de proteínas obtidos para ambas as microalgas cultivadas em meio alternativo que foram estudadas nesta etapa de escala maior corroboram com o valor da *Arthospira platensis*

Visca et al. (2017) e Araújo (2018) obtiveram 40,39% e 54,30% de proteínas respectivamente para a microalga *Golenkinia radiata* valores que corroboram com os resultados obtidos nessa pesquisa que foram de (44,75%).

Varandas (2016), cultivando microalgas para produção de ração animal, obteve até 72,1% de proteínas para *Chlorococcum sp. cf. hypnosporum* e 62,5% para *Chlorella sp.*. Tais resultados apontados na pesquisa sugerem a utilização de meios alternativos para a redução de custos e barateamento do processo além da obtenção de uma biomassa com valor proteico que pode ser aplicada na formulação de ração animal.

6. CONCLUSÕES

A bioprospeção das espécies com potencial proteico demonstrou sua relevância ao gerar resultados que permitem investigar o comportamento da microalga em determinado meio que

distingue do meio sintético, atingindo valores que podem ser aplicados em determinada atividade.

As espécies *Monoraphidium contortum* e *Golenkinia radiata* cultivadas no efluente da piscicultura apresentaram altos valores de proteínas, como era esperado na pesquisa, mostrando a aplicabilidade da microalga como agente remediador de águas residuais bem como sua biomassa rica em proteínas podendo ser utilizada na formulação de rações para o próprio peixe integrando o sistema de cultivo.

7. REFERÊNCIAS

Aban Infrastructure Ltd. Disponível em <<http://www.aban.com/facilities.html>> Acesso em: Outubro, 2018.

ACIÉN, F.G.; FERNÁNDEZ, J.M, MAGÁN, J.J, MOLINA, E .Production cost of a real microalgae production plant and strategies to reduce it. **Biotechnol Adv**, v.30, n.6,p.1344–1353, nov – dez, 2012.

ADENIYI, O. M.; AZIMOV, U.; BURLUKA, A. Algae biofuel: Current status and future applications. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 90, p. 316–335, 2018.

ANYANWU, R.C; RODRIGUEZ, C.; DURRANT, A.; OLABI, A. G. Microalgae Cultivation Technologies, 2018.

ARAÚJO, V. B. D. **Metabólitos de interesse á indústria alimentícia, produzidos por microalgas isoladas da região nordeste do Brasil João Pessoa**. UFPB, 2018. 143p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2018.

APHA. Standard Methods for the examination of water and wastewater. American public health Association. American Water Works Association, Water Environmental Federation, 20th ed. Washington, 1998.

BHOLA, V. et al. Overview of the potential of microalgae for CO₂ sequestration. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 11, n. 7, p. 2103–2118, 2014.

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.

BOROWITZKA, M.A. High- value products from microalgae – their development and commercialisation. **8th Asia-Pacific Conference on Algal Biotechnology**, Adelaide, Australia, 2012.

BRENNAN, L.; OWENDE, P. Biofuels from microalgae – A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v.14, p. 557- 577, 2010.

CAI, T.; PARK, S. Y.; LI, Y. Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: Status and prospects. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 19, p. 360–369, mar. 2013.

CALIXTO, C.D. **Potencial de microalgas regionais cultivadas em meios alternativos para produção de biodiesel. João Pessoa**. UFPB, 2016. 115p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2016.

Câmara para contagem Fuchs Rosenthal. Disponível em <<http://www.qualividros.com/produto/70361/camara-para-contagem-fuchs-rosenthal>> Acesso em: Outubro, 2018.

CHE, R.; HUANG, L.; XU, J-W; ZHAO, P.; LI, T.; MA, H.; YU, X. Effect of fulvic acid induction on the physiology, metabolism, and lipid biosynthesis-related gene transcription of *Monoraphidium* sp. FXY-10. **Bioresource Technology**, v.227,p.324-334, 2017.

CHEAH, W.Y; LING, T.C; SHOW, P.L; JUAN, J.C; CHANG, J-S; LEE, D-J. Cultivation in wastewaters for energy: A microalgae platform. **Applied Energy**, v. 179, p.609-625,2016.

CHEW, K. W.; YAP, J. Y.; SHOW, P.L.; SUAN, N. H.; JUAN, J. C.; LING, T. C.; LEE, D-J.; CHANG, J-S. Microalgae biorefinery: high value products perspectives. **Bioresource Technology**, 2017.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology**, v.25, p. 294–306, 2007.

DE JESUS RAPOSO, M. F.; DE MORAIS, R. M. S. C.; DE MORAIS, A. M. M. B. Health applications of bioactive compounds from marine microalgae. **Life sciences**, v.93, n.15, p.479–86, 2013.

DE LA HOZ SIEGLER, H. *et al.*, The dynamics of heterotrophic algal cultures. **Bioresource technology**, v. 102, n. 10, p. 5764–5774, maio 2011.

DE OLIVEIRA, R.C. O panorama da aquicultura no Brasil: a prática com foco na sustentabilidade. **Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade**, v.2, n.1, 2009.

DERNER, R. B. et al. Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural**, v. 36, n. 6, p. 1959–1967, 2006.

DE SILVA GPD, RANJITH PG, PERERA MSA. Geochemical aspects of CO₂ sequestration in deep saline aquifers: a review. **Fuel**, v.155, n.1, p.28–43, 2015.

FARIED, M. et al. Biodiesel production from microalgae: Processes, technologies and recent advancements. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 79, p. 893–913, 2017.

GOEPPERT A, CZAUN M, SURYA PRAKASH GK, OLAH GA. Air as the renewable carbon source of the future: an overview of CO₂ capture from the atmosphere. **Energy Environ Sci**,v.5, n. 78, p.33–53,2012.

Gridded Sedgewick-Rafter Counting Cell with Case. Disponível em <[https://www.amazon.com/Gridded-Sedgewick-Rafter-Counting-Cell Case/dp/B073V5C6Y4](https://www.amazon.com/Gridded-Sedgewick-Rafter-Counting-Cell-Case/dp/B073V5C6Y4)> Acesso em: Outubro, 2018.

GUERRERO-CABRERA, L.; RUEDA, J.A; GARCÍA-LOZANO, H.; NAVARRO, A.K. Cultivation of *Monoraphidium* sp., *Chlorella* sp. and *Scenedesmus* sp. algae in Batch culture using Nile tilapia effluent. **Bioresource Technology**, v.161, p.455-460, 2014.

GUILLARD, R. R. L.; LORENZEN, C. J. Yellow-green algae with chlorophyllidc. *Journal of Phycology*, v.8, p.10-14, 1972.GULDHE, A.; ANSARI, F.A.; SINGH, P.; BUX, F.

Heterotrophic cultivation of microalgae using aquaculture wastewater: A biorefinery concept for biomass production and nutrient remediation. **Ecological Engineering**, v.99, p.47-53, 2017.

HABIB, M.A.B.; PARVIN, T.C. HUNTINGTON, HASAN, R.N. A review on culture, production and use of *Spirulina* as food for humans and feeds for domestic animals and fish, **FAO Fisheries and Aquaculture Circular**, n.1034, FAO, Rome, 2008.

HOSSEINI, N. S.; SHANG, H.; SCOTT, J.A. Biosequestration of industrial off-gas CO₂ for enhanced lipid productivity in open microalgae cultivation systems. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.92, p.458-469, 2018.

JEONG, M. L.; GILLIS, J. M.; HWANG, J. Carbon Dioxide Mitigation by Microalgal **Photosynthesis**. v. 24, n. 12, p. 1763–1766, 2003.

JUNEJA, A.; CEBALLOS, R.M.; MURTHY, G.S. 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.

KADIR, W. N. A.; LAM, M. K.; UEMURA, Y.; LIM, J.W. Harvesting and pre-treatment of microalgae cultivated in wastewater for biodiesel production: A review. **Energy Conversion and Management**, v.171, p. 1416-1429, 2018.

LOURENÇO, S.O. **Cultivo de Microalgas Marinhas: Princípios e Aplicações**. São Carlos, Rima Editora. 2006.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265–75, 1951.

M. BISHOP, W.; M. ZUBECK, H. Evaluation of Microalgae for use as Nutraceuticals and Nutritional Supplements. **Journal of Nutrition & Food Sciences**, v. 02, n. 05, 2012.

MARKOU, G.; NERANTZIS, E. Microalgae for high-value compounds and biofuels production: a review with focus on cultivation under stress conditions. **Biotechnology advances**, v. 31, n. 8, p. 1532–42, dez. 2013.

MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Portugal, v.14, p.217-232, 2010.

MATOS, Â. P. et al. Teores de proteínas e lipídeos de *Chlorella* sp . cultivada em concentrado de dessalinização residual. **Ciência Rural**, v. 45, n. 2, p. 364–370, 2015.

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.

MEER, M.B.; MACHIELS, M.A.M.; VERDEGEM, M.C.J. The effect of dietary protein level on growth, protein utilization and body composition of *Colossoma macropomum* (Cuvier). **Aquacult. Res.**, 26(12):901-909, 1995.

METTING, B.; PYNE, J. W. Biologically active compounds from microalgae. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 8, n. 7, p. 386–394, jul. 1986.

MIRES, D.; AMIT, Y.; AVNIMELECH, S. et al. Water quality in a recycled intensive fish culture system under field conditions. **The Israeli Journal of Aquaculture**, v.42, p.110-121, 1990.

MOAZAMI, N. *et al.*. Biomass and lipid productivities of marine microalgae isolated from the Persian Gulf and the Qeshm Island. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, n. 5, p. 1935–1939, maio 2011.

MORENO-GARCIA, L.; ADJALLÉ, K.; BARNABÉ, S.; RAGHAVAN, G.S.V. Microalgae biomass production for a biorefinery system: Recent advances and the way towards sustainability. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.76, p. 493-506, 2017.

MOTA, C.J.A.; MONTEIRO, R.S. Química e sustentabilidade: novas fronteiras em biocombustíveis. **Quim. Nova**, v.36, n.10, p.1483-1490, 2013.

National Research Council. **Nutrient Requirements of Fish**. Washington: National. Academy Press, 1993.

OLAIZOLA, M. Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. **Biomolecular Engineering**, v.20, p.459-466, 2003.

Open Pond Biofuels: What You Have To Chose From. Disponível em< <http://making-biodiesel-books.com/about-algae/open-pond-biofuels/>> Acesso em: Outubro, 2018.

PEREIRA, D.A. **Controle da temperatura e irradiância em fotobiorreatores de placas planas para cultivo de microalgas**. Salvador. UFBA, 2014.77 p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Industrial, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2014.

PEREIRA, D. A. *et al.*. Hollow glass microspheres for temperature and irradiance control in photobioreactors. **Bioresource technology**, v. 158, p. 98–104, abr. 2014.

PIRES, J. C.M.; ALVIM-FERRAZ, M. C.M; MARTINS, F.G; SIMÕES, M. Wastewater treatment to enhance the economic viability of microalgae culture. *Environ Sci Pollut Res*, 2013.

PIRES, J. C.M.; ALVIM-FERRAZ, M. C.M; MARTINS, F.G. Photobioreactor design for microalgae production through computational fluid dynamics: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 79, p. 248-254, 2017.

RAZZAK, S. A.; ALI, S. S. M.; HOSSAIN, M. M.; DELASA, H. Biological CO₂ fixation with production of microalgae in wastewater – A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 76, p. 379 – 390, 2017.

RICHMOND, A. **Handbook of Microalgal Culture**. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd, 2003.

RICHMOND A. **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. Blackwell Science Ltd; 2004.

RIZWAN, M.; MUJTABA, G.; MEMON, S. A.; LEE, K.; RASHID, N. Exploring the potential of microalgae for new biotechnonology applications and beyond: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.92, p. 394-404, 2018.

SAJJADI, B.; CHEN, W-C; AZIZ, A.; RAMAN, A.; IBRAHIM, S. Microalgae lipid and biomass for biofuel production: A comprehensive review on lipid enhancement strategies and their effects on fatty acid composition. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 97, p. 200-232, 2018.

SANTANA,S.K.J. **Microalgas sob a ótica da biotecnologia e do uso popular em comunidades rurais com ênfase em espécies isoladas do bioma caatinga**. 141 p. Dissertação (Mestrado Desenvolvimento e Meio Ambiente).PRODEMA. Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2014.

Taelman, S.E.; DE MEESTER, S.; MICHIELS, M.; DEWULF, J. The environmental sustainability of microalgae as feed for aquaculture: A life cycle perspective. **Bioresource Technology**, v.150, p. 513-522, 2013.

TIBBETTS, S.M.; CALL, S.P.; ANDERSON, D.M. Dietary protein requirement of juvenile American eel (*Anguilla rostrata*) fed practical diets. **Aquaculture**, v.186, n.1/2, p.145-155, 2000.

UDAIYAPPAN, A. F. M.; HASAN, H. A.; TAKRIFF, M. S.; ABDULLAH, S. R. S. A review of the potentials, challenges and current status of microalgae biomass applications in industrial wastewater treatment. **Journal of Water Process Engineering**, v. 20, p.8-21, 2017.

VARANDAS, R. C. R. **Formulação de ração para juvenis de *Litopenaeus vanammei* a partir de espécies regionais de microalgas**.2016. Dissertação. (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

VISCA, A. et al. Microalgae cultivation for lipids and carbohydrates production. **Chemical Engineering Transactions**, v. 57, p. 127–132, 2017.

VIGANI, M. et al. Food and feed products from micro-algae: Market opportunities and challenges for the EU. **Trends in Food Science & Technology**, v. 42, n. 1, p. 81–92, 1 mar. 2015.

WILSON, R.P. Fish feed formulation and processing. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE NUTRIÇÃO DE PEIXES E CRUSTÁCEOS, 1995, Piracicaba. Anais... Piracicaba: CBNA, 1995. p. 53-68.

ZARROUK, C. Contribution a l'etuded'unecyanophycee: influence de divers facteurs physiques etchimiquessur la croissance et la photosynthese de Spirulina maxima (Setch et Gardner) Geitler. Theises. Faculty of Science.Universite des Paris; 1966.