



UNIVERSIDADE DO SUL DE SANTA CATARINA
JÉSSICA REIS FELIZARDO

**CULTIVO DE *TETRASELMIS GRACILIS* COM EFLUENTE DE
FARINHEIRA VISANDO A PRODUÇÃO DE BIOMASSA E LIPÍDIOS**

Palhoça, Santa Catarina, Brasil

2020

JÉSSICA REIS FELIZARDO

**CULTIVO DE *TETRASELMIS GRACILIS* COM EFLUENTE DE
FARINHEIRA VISANDO A PRODUÇÃO DE BIOMASSA E LIPÍDIOS**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Engenharia
Ambiental e Sanitária da Universidade do
Sul de Santa Catarina como requisito
parcial à obtenção do título de Bacharel em
Engenharia Ambiental e Sanitária.

Orientador: Prof^a. Elisa Helena Siegel Moecke, Dra.

Palhoça, Santa Catarina, Brasil

2020

JÉSSICA REIS FELIZARDO

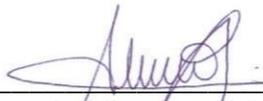
**CULTIVO DE *TETRASELMIS GRACILIS* COM EFLUENTE DE
FARINHEIRA VISANDO A PRODUÇÃO DE BIOMASSA E LIPÍDIOS**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado à obtenção do título de Engenheira Ambiental e Sanitarista e aprovado em sua forma final pelo Curso de Engenharia Ambiental e Sanitária da Universidade do Sul de Santa Catarina.

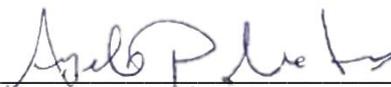
Palhoça, 16 de junho de 2020.



Prof^a. Dra. Elisa Helena Siegel Moecke.
Universidade do Sul de Santa Catarina



Prof^a. Dra. Anelise Leal Vieira Cubas.
Universidade do Sul de Santa Catarina



Bioquímico Dr. Ângelo Paggi Matos

*A minha querida mãe Maria Janete Reis e
a todos que me apoiaram nesta trajetória.*

Dedico.

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dra. Elisa Helena Siegel Moecke pela orientação, confiança e oportunidade para desenvolver a pesquisa.

Ao PUIC, Programa Unisul de Iniciação Científica, onde tive a oportunidade de iniciar como pesquisadora, adquirindo conhecimentos além do ambiente acadêmico.

Agradeço à USP, ao Banco de Micro-organismos Aidar & Kutner do Instituto Oceanográfico por gentilmente ceder a cepa da microalga *Tetraselmis gracilis*.

À professora, técnico e bolsistas do Laboratório de Engenharia Ambiental e Sanitária pelo apoio e auxílio no desenvolvimento da pesquisa.

A todos os demais professores que direta ou indiretamente contribuíram para minha formação e realização desta pesquisa.

Aos amigos que estiveram ao meu lado, pelo incentivo e apoio.

À minha mãe Maria Janete Reis pelo amor, carinho, apoio e esforço para a chegada desse momento.

“Que os nossos esforços desafiem as impossibilidades. Lembrai-vos de que as grandes proezas da história foram conquistadas daquilo que parecia impossível”

Charles Chaplin.

RESUMO

As microalgas são organismos fotossintetizantes capazes de realizar a biorremediação de um meio através da absorção de nutrientes. Sua biomassa é rica em subprodutos e apresenta diversas aplicações econômicas, como utilização na alimentação humana, animal e na produção de biocombustíveis. A composição do meio de cultura pode influenciar o perfil bioquímico das espécies algais, como o teor de lipídios e a concentração de ácidos graxos. São crescentes as pesquisas que objetivam o aumento da produtividade de biomassa algal, teor de lipídios e outros produtos de valor agregado visando a aplicação industrial dos cultivos de microalga. A manipueira é o efluente gerado a partir do processamento da mandioca (*Manihot esculenta*) na indústria e é caracterizado por ser rico em nutrientes que pode ser utilizado pelas microalgas como substrato alternativo. O presente estudo tem por objetivo avaliar o desenvolvimento da microalga *Tetraselmis gracilis* em meios de cultivo com concentração de manipueira e avaliar a produtividade da espécie frente a aplicação de diferentes salinidades nos meios de cultivo. As características físico-químicas do efluente foram determinadas por métodos colorimétricos usando os kits da HACH e gravimétricos. Os ensaios foram divididos em três etapas, sendo a primeira a determinação do crescimento celular, a produção de biomassa seca e o teor de lipídios dos cultivos realizados com diferentes salinidades 17 ‰, 26 ‰ e 35 ‰; a segunda etapa foi a determinação da biomassa seca dos cultivos com diluição da manipueira em dois meios, contendo apenas água do mar e em meio F/2 Guillard, sendo aplicado 10%, 20% e 40% de efluente; e a terceira etapa consistiu em determinar a biomassa seca e teor de lipídios dos cultivos com diluição de 5%, 15% e 25% de manipueira em meio F/2 Guillard. A densidade celular dos cultivos foi monitorada pela contagem de células. A biomassa seca e o teor de lipídios foram obtidos após o encerramento dos cultivos. O meio de cultivo controle foi o que apresentou maior teor de lipídios (27,88%), sendo superior ao encontrado na soja (19,70%), o que pode ser útil na possível conversão do óleo algal em biodiesel. A disponibilidade de nutrientes nos cultivos afetou a produtividade celular, sendo que o meio contendo 20% de manipueira apresentou a maior quantidade de biomassa seca (0,710 g.L⁻¹). Em suma e analisando os resultados, verificou-se como as variáveis influenciaram no comportamento e na produtividade do cultivo algal e, desta forma, é possível determinar qual meio de cultivo é ideal para a eficiente propagação de microalgas.

Palavras-chave: Manipueira. Microalgas. Substrato alternativo.

ABSTRACT

Microalgae are photosynthetic organisms capable of performing the bioremediation of a medium through the absorption of nutrients. Its biomass is rich in by-products and has several economic applications, such as in human and animal food and in the production of biofuels. The composition of the culture medium can influence the biochemical profile of the algal species such as the synthesis of lipids and fatty acids profile. There is an increase in research aimed at enhancing biomass productivity, lipid content and other value-added products from microalgae cultivation within industrial application. Manipueira is an effluent generated from the processing of cassava (*Manihot esculenta*) industry and is characterized by being rich in nutrients. The present study aims to evaluate the development of the microalgae *Tetraselmis gracilis* in culture medium with different manipueira concentration and evaluate the productivity of the algal species in terms of different salinities in the culture medium. The physical-chemical characteristics of the effluent were determined by colorimetric methods using HACH kits and gravimetric. The tests were divided into three stages, the first stage being the determination of cell growth, biomass concentration and lipid content with cultures carried out with different salinities, such as 17 ‰, 26 ‰ and 35 ‰; the second stage was determined the biomass concentration with dilution of manipueira in two medium, containing only sea water and F/2 Guillard medium, and with 10%, 20% and 40% effluent diluted ; and the third stage was characterized by the determination of dry biomass and lipid content of microalgae after dilution of culture medium with 5%, 15% and 25% of manipueira in F/2 Guillard medium. The cell density of algal cultivation was monitored by cell count. The biomass and lipid content were determined after collecting the biomass through centrifugation and dried the sample for further analysis. The control medium showed the highest lipid content (27.88%), being higher than that found in soybeans (19.70%), which may be advantageous for biodiesel application. The availability of nutrients presented in manipueira may affect the algal productivity since the medium containing 20% of manipueira presented greater amount of dry biomass (0.710 g.L⁻¹). In sum and analyzing the results, it was verified how the variables, including nutrients, can influence the cultivation behavior and cell productivity. In this way it is possible to determine which cultivation medium is ideal for the efficient utility for algal mass cultivation.

Keywords: Manipueira. Microalgae. Alternative substrate.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Microalga <i>Tetraselmis gracilis</i>	19
Figura 2 – Fases de crescimento de um micro-organismo.....	21
Figura 3 – Metabolismo das microalgas.....	23
Figura 4 - Cultivo em escala laboratorial.....	24
Figura 5 – Representação de uma lagoa <i>raceway</i>	25
Figura 6 - Fotobiorreator tubular.....	26
Figura 7 – Representação de um fotobiorreator tubular.....	27
Figura 8 – Fluxograma dos ensaios com diferentes salinidades.....	41
Figura 9 - Fluxograma dos ensaios com diferentes concentrações de manipueira...	42
Figura 10 – Cultivos da microalga <i>Tetraselmis gracilis</i> com diferentes salinidades ..	48
Figura 11 - Cultivos com 5%, 15% e 25% de efluente	50
Figura 12 - Câmara Neubauer e grade de contagem.....	51
Figura 13 - Grade de contagem (1) com a microalga <i>Tetraselmis gracilis</i>	52
Figura 14 - Extração de lipídios.....	54

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Concentração de células da microalga <i>Tetraselmis gracilis</i> em função do tempo de cultivo para três diferentes salinidades.....	57
Gráfico 2 - Fração lipídica presente na biomassa seca nos cultivos com diluição de manipueira.....	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição físico-química da manipueira encontrada na literatura.	39
Tabela 2 - Meio de cultivo utilizado para a cultura da microalga <i>Tetraselmis gracilis</i>	46
Tabela 3 - Solução traço de metais.....	47
Tabela 4 - Solução de vitaminas.	47
Tabela 5 - Características físico-químicas da manipueira.....	55
Tabela 6 - Biomassa e teor de lipídios da espécie <i>Tetraselmis gracilis</i> para diferentes salinidades.	58
Tabela 7 - Biomassa e pH dos cultivos com diluição em manipueira em água do mar com salinidade de 17 ‰.	60
Tabela 8 - Biomassa e pH dos cultivos com diluição em manipueira em meio F/2 Guillard.....	61
Tabela 9 - Biomassa e teor de lipídios da espécie <i>Tetraselmis gracilis</i> obtida em cultivos com diluição em manipueira em meio F/2.	62

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	15
2.1	OBJETIVO GERAL	15
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	16
3.1	MICROALGAS	16
3.1.1	Espécie <i>Tetraselmis gracilis</i>	18
3.1.2	Cultivos de microalgas	20
3.1.2.1	Fonte de carbono	22
3.1.2.2	Técnicas de cultivo	24
3.1.3	Produção de biomassa em diferentes condições de cultivos	27
3.1.3.1	Fatores físicos	28
3.1.3.2	Fatores químicos	29
3.1.4	Aplicações biotecnológicas	30
3.1.4.1	Biocombustíveis	31
3.1.4.2	Nutrição humana e animal	33
3.1.4.3	Pigmentos	34
3.1.4.4	Tratamento de efluentes	34
3.2	TRATAMENTO DE EFLUENTES	35
3.3	AGROINDÚSTRIA – MANDIOCA	37
3.3.1	Água residual da mandioca – manipueira	38
4	MATERIAIS E MÉTODOS	41
4.1	OBTENÇÃO DO EFLUENTE	42
4.1.1	Preparo do efluente	43
4.1.2	Características físico-químicas do efluente	43
4.2	ÁGUA DO MAR	45
4.2.1	Determinação de Cloretos	45
4.3	OBTENÇÃO DA MICROALGA	45
4.3.1	Cultivo controle da microalga	46
4.4	CULTIVO EM DIFERENTES SALINIDADES	48
4.5	CULTIVO COM EFLUENTE	49
4.6	DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS	51

4.6.1 Densidade celular dos cultivos	51
4.6.2 Biomassa	52
4.6.3 Extração de lipídios	53
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	55
5.1 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICA DO EFLUENTE.....	55
5.2 DETERMINAÇÃO DE CLORETOS EM ÁGUA DO MAR	56
5.3 CULTIVOS EM DIFERENTES SALINIDADES	56
5.4 CULTIVOS EM MANIPUEIRA	59
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	64
7 TRABALHOS FUTUROS	66
REFERÊNCIAS	67
APÊNDICES	77
APÊNDICE A – Artigo apresentado no ENSUS 2020 - VIII Encontro de sustentabilidade em projeto	78

1 INTRODUÇÃO

O crescimento populacional acelerado e de forma desordenada, além do desenvolvimento dos centros urbanos têm causado interferência no meio ambiente ocasionando diversos problemas ambientais. O ser humano tem utilizado diversos processos industriais, e assim, produz grandes quantidades de subprodutos ou resíduos que afetam diretamente sua saúde e o meio ambiente.

De acordo com a norma brasileira da Associação Brasileira de Normas Técnica ABNT – NBR 9800/1987 os efluentes industriais “são despejos líquidos provenientes das áreas de processamento industrial”. Segundo Cardoso (2013), as características físicas, químicas e biológicas destes efluentes variam de acordo com o tipo de indústria, com as matérias primas que são processadas, as etapas de processamento desenvolvidas, entre outras.

De acordo com Azzolini e Fabro (2013), cada indústria gera efluentes com diferentes composições físicas, químicas e biológicas e, por isso, recomenda-se que os efluentes sejam caracterizados, quantificados e tratados adequadamente antes da disposição no meio ambiente. A disposição de efluentes, principalmente industriais, após passar por um tratamento deficiente em corpos hídricos pode resultar em graves problemas ambientais, alteração dos ambientes naturais ocasionando a morte da fauna de rios e lagos (SINHOR, 2014).

Para conter a poluição ambiental causada pela disposição de efluentes são utilizados processos de tratamento, e segundo Costa *et al.*, (2009), o tratamento pode ser primário, secundário e terciário. O tratamento primário é constituído por processos físicos que podem receber combinadamente processos químicos, e são constituídos por flotação, decantação e neutralização, retirando os sólidos suspensos e sedimentais presentes no efluente. O tratamento secundário se baseia no processo natural de degradação da matéria orgânica e de alguns compostos inorgânicos presentes no meio ambiente. Sob condições artificiais os micro-organismos degradam a matéria orgânica.

Em efluentes no qual o tratamento primário e secundário não são eficientes na depuração e limpeza do efluente, se utiliza o tratamento terciário. Este por sua vez é mais caro que os demais pela utilização de produtos químicos e técnicas mais avançadas (COSTA *et. al.*, 2009). Os produtos químicos utilizados no tratamento podem ocasionar o aumento na quantidade de subprodutos gerados. Como exemplo,

tem-se a remoção do fósforo do efluente, este por sua vez causa o aumento na quantidade de alumínio no lodo, o que gera problemas ambientais pois este lodo precisa ser disposto de forma segura (AMINI *et al.*, 2013).

As microalgas são organismos que por meio da fotossíntese utilizam a energia solar e o carbono presente na atmosfera de forma eficiente. Estes organismos podem ser utilizados para a biorremediação de um meio ou substrato, pois possuem a capacidade de remover nutrientes como nitrogênio e fósforo, atuando no tratamento terciário de efluentes líquidos e melhorando sua qualidade final (MEZZOMO *et al.*, 2010).

Além de servir para biorremediação, o cultivo de microalgas é vantajoso devido a produção de biomassa rica em subprodutos de valor agregado (SATHASIVAM *et al.*, 2017) que podem ser aplicados para alimentação humana e animal e possuem grande quantidade de proteínas e carboidratos (CHISTI, 2013). As microalgas podem ser utilizadas também na indústria química, cosmética, farmacêutica, na agricultura e para produção de biocombustíveis (MORAIS, 2015).

O estudo para o desenvolvimento da microalga *Tetraselmis gracilis* em meio de cultivo contendo manipueira tem por incentivo o possível aproveitamento de resíduos gerados em processos agroindustriais e diminuição dos impactos ambientais. Diversas espécies do gênero *Tetraselmis* tem sido estudadas na biorremediação de efluentes por serem capazes de consumir os nutrientes presentes nos diversos em efluentes, convertendo-os em biomassa algal.

Os experimentos, deste estudo, foram divididos em três etapas, sendo a primeira etapa a avaliação do crescimento da *Tetraselmis gracilis* em meios de cultivo com diferentes salinidades (17 ‰, 26 ‰ e 35 ‰), e em meio F/2 Guillard com objetivo de avaliar a melhor condição de cultivo através da produção de biomassa e teor de lipídios. No segundo momento, foi avaliada a produção da biomassa seca pela microalga em cultivos com a utilização de manipueira diluída (10%, 20% e 40%) em dois meios, sendo o meio F/2 Guillard e apenas água do mar com objetivo de avaliar a adaptação e desenvolvimento da microalga em manipueira. Na terceira etapa, foi verificado o crescimento da microalga em cultivos com aplicação de manipueira diluída (5%, 15% e 25%) em meio F/2 Guillard com objetivo de avaliar a melhor concentração de efluente e da produção de biomassa seca e teor de lipídios.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o desenvolvimento da microalga *Tetraselmis gracilis* utilizando água residual da Mandioca e determinar a produção de biomassa e lipídios.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o crescimento celular da microalga *Tetraselmis gracilis* em diferentes concentrações de sal usando o meio de cultura F/2 Guillard;
- Avaliar o desenvolvimento da *Tetraselmis gracilis* na presença de água residual de mandioca em meio de cultura F/2 Guillard e água do mar com salinidade de 17 ‰;
- Determinar a concentração de biomassa e de lipídios nos cultivos com diferentes salinidades e diluições com água residual de mandioca.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Neste capítulo será apresentando o levantamento das bibliografias que serviram como base para o presente trabalho. São descritas considerações sobre microalgas, a espécie *Tetraselmis gracilis*, cultivos de microalgas, fatores que afetam a produção dos cultivos, aplicações biotecnológicas, tratamento de efluentes e água residual da mandioca –manipueira.

3.1 MICROALGAS

Segundo Lee (1980), os organismos comumente denominados de “algas” são plantas primitivas, talófitas que não apresentam raízes, caules ou folhas, e possuem a clorofila *a* como principal pigmento na realização da fotossíntese. As algas são divididas entre autotróficas e heterotróficas e apesar de serem similares as plantas não incluem as plantas terrestres (BOROWITZKA, 2016).

O habitat das algas é variado, apesar de serem frequentemente encontradas em água, seja doce, marinha ou salgada, estes organismos podem ser encontrados no solo, em rochas pelas associações com líquens e em fontes termais (LEE, 1980).

As algas são integrantes essenciais para a biota pois desempenham um papel importante no ciclo do carbono e através da energia solar produzem a matéria orgânica que mantem a vida no planeta (BOROWITZKA, 2018).

As microalgas são definidas como organismos microscópios e autotróficos que utilizam a fotossíntese para seu desenvolvimento (LOURENÇO, 2006). Segundo Borowitzka (2016), as microalgas são conhecidas como algas que requerem o uso de microscópio para visualizar um organismo individual.

O termo “microalgas” é utilizado para descrever uma variedade de organismos fotossintéticos divididos em grupo de organismos procarióticos e eucarióticos (WALKER *et al.* 2005). As microalgas são algas eucarióticas, unicelulares, coloniais e filamentosas, que incluem organismos procarióticos, como as cianobactérias (BOROWITZKA, 2018). Apresentam coloração devido aos pigmentos acessório e fotossintéticos (OLAIZOLA, 2003), como a clorofila *a* e outros pigmentos como carotenóides e ficobilinas (RICHMOND, 2004). De acordo com Chrétiennot-

dinet *et al.* (1995), são divididas ainda em não-móveis ou móveis com uso de flagelos ou outros meios.

As microalgas foram os primeiros organismos capazes de realizar fotossíntese sendo uma das formas mais antigas de vida do planeta (CHISTI, 2007), estão presentes em diferentes ambientes aquáticos e úmidos, como rios, lagos, oceanos e solos (EMBRAPA, 2016). Estes organismos podem flutuar livremente ou se desenvolver presos em substratos como plantas, rochas, grãos etc. (BOROWITZKA, 2018) além de serem encontrados em locais com grande variação físico-química do meio (LOURENÇO, 2006).

Segundo Borowitzka (2018), a maior parte do carbono inorgânico é fixado pelas microalgas nos oceanos. Além do carbono, as microalgas desempenham um importante papel no ciclo do nitrogênio (FOWLER *et al.*, 2013). Todas as cianobactérias que apresentam heterocistos e diversas outras que não apresentam são as principais contribuintes na fixação biológica do nitrogênio (BERGMAN, 2013).

As microalgas apresentam grande variabilidade metabólica, consequência dos vários ambientes onde podem ser encontradas. Em alguns momentos o habitat natural das microalgas apresenta condições que afetam negativamente a realização da fotossíntese, principalmente pela disponibilidade de luz. Com o propósito de garantir sua manutenção e crescimento, as microalgas desenvolveram diferentes formas de metabolismo durante sua evolução (JEONG *et al.*, 2010). O sistema de produção das microalgas é determinado pelo objetivo do cultivo (ANGELO *et al.*, 2014) e pelas exigências nutricionais de cada espécie (VIÊGAS, 2010).

A classificação taxonômica é muito extensa devido à grande diversidade de espécies. Esta se baseia nas características da microalga, como a estrutura da parede celular, o tamanho, mobilidade e quanto a existência e tipos de pigmentos (MADIGAN *et al.*, 2004). As microalgas possuem uma variedade de morfologias e tamanhos, sendo que a menor microalga apresenta tamanho médio de célula de 0,8 μm (CHRÉTIENNOT-DINET *et al.*, 1995). Segundo Mobin *et al.* (2017), supõe-se que existam mais de 200.000 espécies de microalgas sendo que cerca de 50.000 espécies estão descritas. As classes mais importantes de microalgas são as algas verdes (Chlorophyta), algas vermelhas (Rhodophyta) e diatomáceas (Bacillariophyta) (BRENNAN e OWENDE, 2010).

As algas verdes pertencem ao grupo mais diversificado de organismos do reino protista, são fotoautotróficos e apresentam uma grande variedade de formas,

tamanhos e hábitos. As dimensões desses organismos podem variar de micrometros a centímetros e são divididos em móveis, não-móveis, coloniais e filamentosos. As algas verdes estão presentes em ambientes variados, como solo, água doce e hipersalina, ambientes ácidos, alcalinos, lênticos e lóticos. O seu desenvolvimento depende da disponibilidade de nutrientes e luz (NASELLI-FIORES e BARONE, 2009).

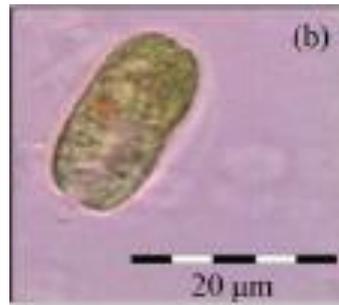
Segundo Bewicke *et al.* (1984), as microalgas são utilizadas como fonte de proteínas e vitaminas desde a antiguidade. São produtoras de compostos bioativos que podem gerar diversos benefícios à saúde humana (MOBIN *et al.*, 2019). Na maioria das microalgas os compostos bioativos produzidos são acumulados na biomassa e em alguns casos podem ser excretados para o meio. Os bioprodutos de origem microalgal possuem alto valor agregado como proteínas, ácidos graxos, vitaminas, pigmentos, entre outros. Devido a sua composição e a presença de substâncias antioxidantes, a biomassa possui diversas aplicações como alimentação humana, ração animal, cosméticos e medicamentos (RICHMOND e HU, 2013).

3.1.1 Espécie *Tetraselmis gracilis*

As microalgas *Tetraselmis* são um gênero de fitoplâncton importantes por serem a base da cadeia alimentar nos ecossistemas aquáticos pois muitos organismos aquáticos utilizam as microalgas como fonte de alimento (ANDRADE e FILHO, 2014).

De acordo com Norris *et al.* (1980), as microalgas do gênero *Tetraselmis* são algas marinhas, verdes e unicelulares, suas células são individuais e geralmente móveis. As algas apresentam tamanho entre 10 e 20 μm e possuem formato de ovóides a elipsóides. As espécies pertencentes a esse gênero se movimentam por meio de flagelos e a reprodução ocorre de forma assexuada pela divisão do protoplasto. Segundo Guiry e Guiry (2017), são amplamente encontradas em águas costeiras e em ambientes de transição entre rio e mar.

A espécie *Tetraselmis gracilis* (Figura 1) pertence ao Filo Chlorophyta, Classe Chlorodendrophyceae, Ordem Chlorodendrales, Família Chlorodendraceae e Gênero *Tetraselmis*. Segundo Butcher (1959), esta microalga foi descrita pela primeira vez por Kylin em 1935, encontrada em valas e poças em pântanos na Ilha de Wight e Kent no Reino Unido, as salinidades dos ambientes variavam de 12 ‰ a 25 ‰.

Figura 1 - Microalga *Tetraselmis gracilis*

Fonte: Gorgônio *et al.*, (2013).

O gênero *Tetraselmis*, é uma das microalgas mais utilizadas para alimentação na aquicultura devido ao seu alto valor nutricional (MOUSSA *et al.*, 2017) pois apresenta quantidades significativas de ácidos graxos poli-insaturados, além de ser capaz de se adaptar a diferentes meios de cultivo e condições ambientais (SELVAKUMAR e UMADEVI, 2014).

Segundo Molina *et al.* (1991), a microalga apresenta bom crescimento na produção em grande escala devido a sua capacidade de suportar diversas condições de cultivo, como variações de salinidade e temperatura (2 a 34°C), além da disponibilidade de nutrientes como ausência de vitaminas e sob diversas fontes de nitrogênio.

Diversos estudos têm sido realizados com a microalga *Tetraselmis gracilis*, sendo as mais frequentes pesquisas destinadas a avaliar o crescimento e a composição bioquímica em diferentes variáveis, como meios de cultivo, luminosidade, aeração e concentração de nutrientes. Nos estudos encontrados foram analisadas as atividades de enzimas antioxidantes, pigmentos fotossintéticos e o perfil bioquímico da microalga que contempla proteína, aminoácidos totais, carboidratos, lipídios, ácidos graxos, clorofila-a e carotenóides. Além da análise do perfil bioquímico, a *Tetraselmis gracilis* foi aplicada em estudos para analisar sua capacidade de biorremediação (SELVAKUMAR e UMADEVI, 2014; LOURENÇO *et al.*, 1997; AIDAR *et al.*, 1994).

A utilização de diferentes meios de cultivo e aplicação de diferentes variáveis são amplamente estudados pois afetam a composição bioquímica das microalgas. O aumento do teor de lipídios e ácidos graxos das microalgas *Tetraselmis gracilis* e *Platymonas convolutae* foi estudado por Selvakumar e Umadevi (2014), onde as espécies foram submetidas a condições heterotróficas. As duas microalgas

foram cultivadas em meios de cultura com diferentes concentrações de nitrato sob fotoperíodo natural. Para as duas espécies as concentrações totais de lipídios aumentaram sob a limitação de nitrato.

Dentre os trabalhos encontrados na literatura visando a utilização da microalga *Tetraselmis gracilis*, Asma e Mathew (2001) realizaram um estudo com objetivo de analisar a bioacumulação de um inseticida organoclorado aplicado no meio de cultivo. O inseticida aplicado foi o beta-hexaclorociclohexano (HCB) e o método utilizado para determinar a absorção do HCB pela microalga foi a cromatografia gasosa. Nos ensaios foram aplicadas concentrações de 0,5 ppm, 1,0 ppm, 2,0 ppm e 4,0 ppm de inseticida no meio de cultivo. A capacidade de acumulação da microalga foi respectivamente 21,2%, 25,3%, 29,3% e 29,4% após 10 dias de exposição. Com 20 dias de exposição a uma concentração inicial de 4 ppm de HCB a microalga acumulou 3,423 ppm de inseticida, correspondendo a 85,58% da concentração total.

Os estudos voltados para aplicação de efluentes nos cultivos de microalgas estão em constante crescimento. O uso do efluente é uma alternativa promissora pois através do aproveitamento de nutrientes presentes no efluente é possível reduzir os custos de produção, visando a biorremediação e diminuição dos custos do cultivo. Candido e Lombardi (2020), por exemplo, analisaram o crescimento e alguns aspectos fisiológicos relacionados à fotossíntese de algumas microalgas no meio de cultivo contendo vinhaça diluída. Entre as oito espécies estudadas, dentre elas a microalga *Tetraselmis gracilis*, o cultivo foi realizado com 5% de vinhaça no qual a microalga manteve o metabolismo fotossintético semelhante ao obtido no cultivo controle.

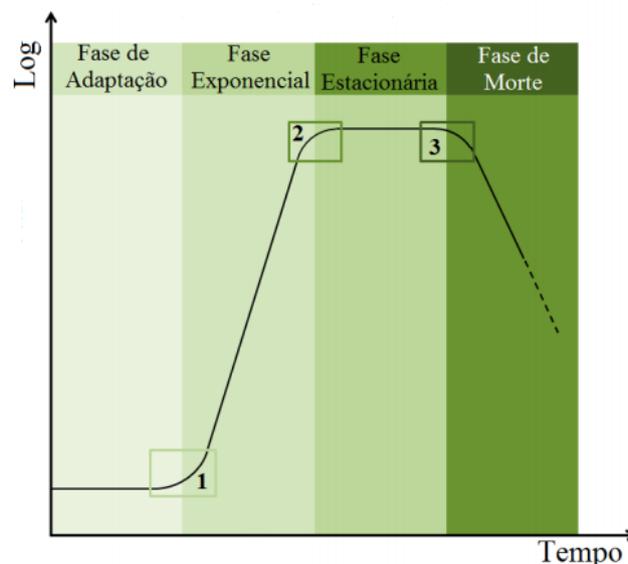
3.1.2 Cultivos de microalgas

De acordo com Raven (1988), o crescimento das microalgas no ambiente natural bem como nos meios de cultivos, é proveniente da interação dos organismos com as condições físicas, químicas e biológicas. As condições biológicas referem-se ao próprio metabolismo da espécie cultivada, e entre as principais condições físico-químicas que afetam o seu desenvolvimento encontram-se a temperatura, pH, luz, salinidade e disponibilidade de nutrientes. Cada espécie apresenta necessidades específicas, desta forma não existe um meio de cultivo único para todas as espécies (CHISTI, 2004).

O cultivo das microalgas pode ser realizado em meio marinho, de água doce ou salobra e a sua composição varia de acordo com a espécie (SOARES, 2010). Para seu melhor desenvolvimento, o meio de cultivo deve ser determinado de acordo com a espécie e a finalidade do cultivo (SOUZA, 2016). A composição do meio de cultura pode influenciar o perfil bioquímico da espécie como o teor de lipídios e concentrações de ácidos graxos (HAKALIN, 2014).

O desenvolvimento de um cultivo de microalga pode ser definido por meio da sua curva de crescimento. De acordo com Andrade (2014), uma curva característica de crescimento apresenta 4 fases: adaptação, exponencial, estacionária e morte celular (Figura 2). A partir da curva de crescimento algal é possível avaliar a densidade celular inicial do cultivo antes de transferir para um novo meio de cultura.

Figura 2 – Fases de crescimento de um micro-organismo



Fonte: Andrade, 2014.

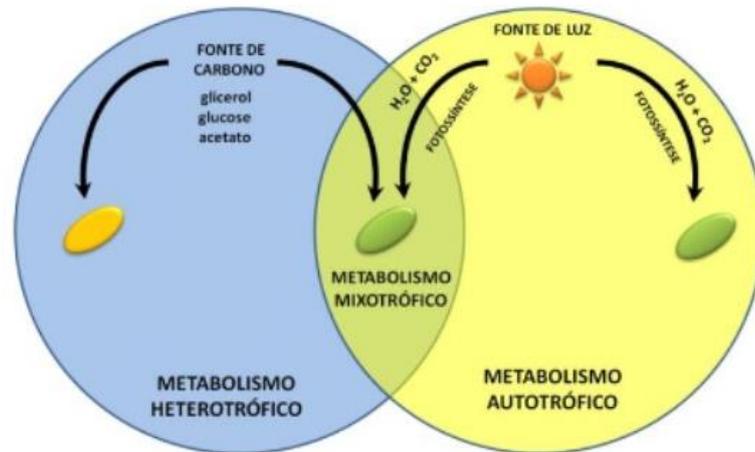
- Fase de adaptação:** refere-se ao período de adaptação das células retiradas de um cultivo durante a fase exponencial ou estacionária para um novo meio. Nesta fase os organismos sintetizam as enzimas necessárias para seu crescimento. O ponto 1, refere-se a fase de aceleração de crescimento. Neste intervalo as células já estão adaptadas ao meio e começam a se multiplicar, assim encontram-se células em crescimento e desenvolvimento (SANTOS, 2014).

- **Fase Exponencial:** se refere a fase de crescimento acelerado no qual a velocidade de crescimento das células se mantém constante e atinge seu valor máximo (SANTOS, 2014).
O ponto 2, trata-se da fase de desaceleração de crescimento onde ocorre a redução da velocidade de crescimento causado pela deficiência de nutrientes (ANDRADE, 2014).
- **Fase estacionária:** nesta fase o crescimento encontra-se limitado pela baixa disponibilidade de nutrientes no meio, assim as células não conseguem manter o crescimento exponencial, conseqüentemente ocorre a diminuição na velocidade de crescimento. A concentração de biomassa presente no meio é mantida durante um período devido a utilização dos nutrientes presentes nas reservas internas e dos nutrientes liberados ao meio de cultivo devido a lise celular (SANTOS, 2014).
No ponto 3 a fase de crescimento está diminuindo ou cessou enquanto a mortalidade está aumentando (ANDRADE, 2014).
- **Fase de morte:** Nesta fase ocorre o esgotamento dos nutrientes presentes no meio de cultivo, causando autólise, a membrana lisossômica das células é rompida ocasionando a liberação de enzimas e destruição da célula (SANTOS, 2014).

3.1.2.1 Fonte de carbono

De acordo com a fonte de carbono as microalgas podem apresentar metabolismo fotoautotrófico onde utilizam o carbono de fonte inorgânica e a luz como fonte de energia, heterotrófico onde a fonte de carbono e energia provém de compostos orgânicos e mixotrófico onde a fonte de carbono advém de compostos orgânicos ou CO₂ inorgânico e a fonte de energia de luz (LOPES *et al.*, 2015).

Figura 3 – Metabolismo das microalgas



Fonte: Mariano *et al.*, 2010.

Segundo Ortenzio *et al.* (2015), o cultivo autotrófico é o mais empregado nos cultivos de microalgas, principalmente em produção de larga escala. No cultivo autotrófico as microalgas são cultivadas na presença de luz e por meio da fotossíntese adquirem energia para fixar o carbono inorgânico (CO_2) e assim produzir biomassa (VIÊGAS, 2010). Apesar do sistema fotoautotrófico apresentar elevada luminosidade o crescimento do cultivo pode ser limitado pela fotoinibição, que consiste no excesso de luz sobre o cultivo (ZY *et al.*, 2003) ou pela alta densidade celular, provocando assim menor produtividade de biomassa (FRANCO *et al.*, 2013).

De acordo com Viêgas (2010), no sistema heterotrófico a fonte de carbono provém de compostos orgânicos como glicerol, glucose e acetato. Esse sistema apresenta diversas vantagens quando comparado ao sistema autotrófico. O método não necessita de luz, apresenta maior controle durante o cultivo e possui baixo custo para retirada da biomassa. O sistema apresenta também baixo custo com nutrientes e fontes de carbono para aplicação nos cultivos.

No cultivo mixotrófico são utilizadas fontes orgânicas de carbono relacionadas a fixação do carbono inorgânico durante a fotossíntese (MULITERNO *et al.*, 2005). Nesse método, conforme a disponibilidade de luz as microalgas substituem a fixação de carbono inorgânico presente na atmosfera por uma fonte de carbono orgânica dissolvida no meio de cultivo. Assim como no sistema heterotrófico as fontes de carbono orgânico comumente utilizadas nesse método são glucose, acetato e glicerol podendo também ser utilizadas águas residuárias. Entre essas fontes, destaca-se o acetato por ser um substrato de baixo custo e de grande disponibilidade

(BASTOS e BONINI, 2017). O cultivo mixotrófico apresenta algumas vantagens como maior facilidade do desenvolvimento do cultivo em meios contendo águas residuárias, aplicação de menor luminosidade se comparado ao sistema autotrófico, não ocorre a fotoinibição, entre outros. Entre as desvantagens do sistema destacam-se a dificuldade operacional e maior dificuldade de produção em grande escala (ANGELO *et al.*, 2014).

3.1.2.2 Técnicas de cultivo

O cultivo de microalgas pode ser realizados por diversas técnicas, com volumes e características de meio variadas. Os cultivos podem ser executados desde ambientes laboratoriais (Figura 4) com controle total de variáveis como em tanques ao ar livre (lagoas de pista). Os sistemas fechados (fotobiorreatores) apresentam maior produtividade, porém o custo operacional é maior. Desta forma, os custos operacionais devem ser equilibrados com a eficiência do cultivo algal (ANDRADE e FILHO, 2014).

Figura 4 - Cultivo em escala laboratorial



Fonte: NPDEAS, 2011.

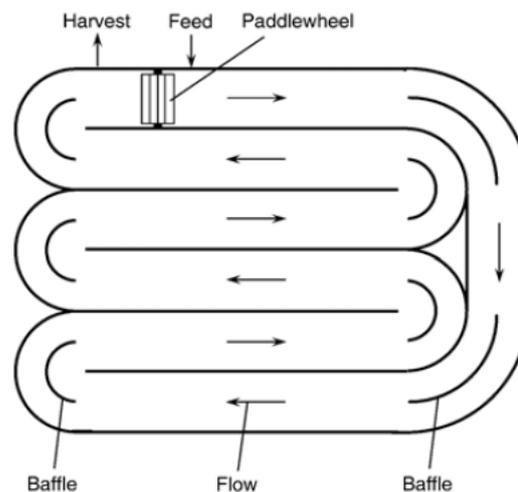
Os sistemas podem ser classificados em abertos e fechados. As lagoas abertas são menos favoráveis pela dificuldade no controle de contaminação enquanto os sistemas fechados como fotobiorreatores além de ocorrer menos riscos de contaminações, possui facilidade para o controle de variáveis como temperatura, disponibilidade de nutrientes, CO₂ dissolvido e pH. Entretanto os fotobiorreatores

apresentam alto custo de instalação e são aplicados para espécies específicas de microalgas (HARUN *et al.*, 2010).

Os sistemas abertos são caracterizados por lagoas e são usualmente empregadas em pesquisas e nas indústrias. Entre as lagoas mais utilizadas estão lagoas de pista, grandes lagoas rasas, circulares e fechadas (HARUN *et al.*, 2010). Esse tipo de sistema é comumente utilizado e apresenta diversas formas e tamanhos, são mais simples e apresentam menor custo para instalação. Os cultivos podem ser realizados em lagoas sem mecanismos que promovam a mistura ou em tanque de recirculação a céu aberto (ANDRADE e FILHO, 2014). Os tanques devem ser construídos com profundidade entre 10 a 50 cm permitindo a difusão do CO₂ presente na atmosfera e a penetração de luz solar por todo seu volume (SANTOS, 2014).

De acordo com Chisti (2007), o sistema aberto aplicável para produção em larga escala são as lagoas de pista (*raceway ponds*). A lagoa consiste em um canal de circuito fechado que permite a recirculação e apresenta aproximadamente 30 cm de profundidade. A mistura e circulação do cultivo é realizada por pás mecanizadas (Figura 5). A construção das lagoas é realizada com concreto ou terra compactada e podem ser revestidos com plástico.

Figura 5 – Representação de uma lagoa *raceway*



Fonte: Chisti (2007).

Os sistemas abertos apesar de apresentarem baixo custo de instalação e operação, apresentam baixa produtividade celular. A eficiência dos cultivos é afetada pela contaminação por micro-organismos predadores e pelas variações climáticas que apresentam grande impacto no cultivo. As possíveis variações na mudança no clima

são representadas pelas variações de luminosidade, temperatura e evaporação. Desta forma, a produtividade dos cultivos pode variar sazonalmente (SANTOS, 2014).

Segundo Santos (2014), os sistemas fechados são chamados de fotobiorreatores e possuem como maior característica o controle das variáveis de cultivo. Os materiais comumente utilizados para construção desse sistema são acrílico ou vidro, permitindo maior área de contato com a luz e conseqüentemente maior penetração. O sistema permite o controle de luminosidade, vazão de ar e menor risco de contaminação. Com isto, o meio de cultivo pode ser adaptado de acordo com as necessidades específicas da espécie a ser cultivada e apresenta melhor eficiência para produção em grande escala comparado aos sistemas abertos.

Os fotobiorreatores tubulares geralmente são usados para produção em grande escala. Esse sistema consiste em uma série de tubos retos produzidos com material transparente como vidro, acrílico ou plástico. Os tubos possuem geralmente 10 cm de diâmetro e a sua orientação pode ser horizontal, vertical ou inclinado. O diâmetro dos tubos é limitado para permitir a penetração de luz por todo cultivo, garantindo alta produtividade. Existem diversas configurações como em paralelo disposto no solo ou paralelo na vertical disposto como uma cerca (Figura 6). A orientação da tubulação deve ser escolhida para capturar o máximo de luz (CHISTI, 2007).

Figura 6 - Fotobiorreator tubular



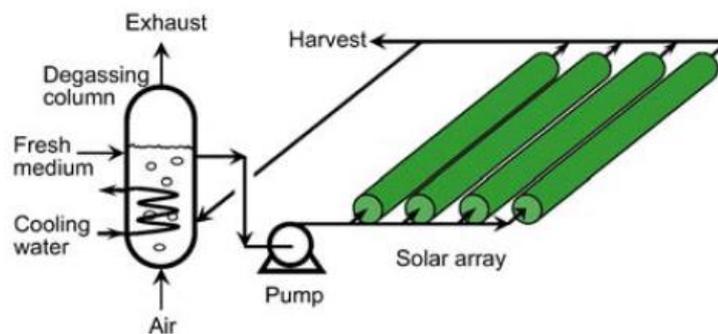
Fonte: Greenwell *et al.*, 2010.

No fotobiorreator tubular o cultivo de microalgas é circulado de um reservatório para os tubos e novamente para o reservatório (Figura 7). O fluxo

turbulento produzido por uma bomba mecânica impede que a biomassa sedimente nos tubos (CHISTI, 2007).

O sistema pode ser iluminado com luz artificial ou luz solar. Nos cultivos *indoors* a desvantagem é o alto custo com a iluminação artificial. Porém os cultivos expostos a luz solar estão sujeitos a danos fotooxidativos, causados pela combinação do oxigênio gerado durante a fotossíntese com a intensa luminosidade, limitando o crescimento microalgal (LIMA, 2019).

Figura 7 – Representação de um fotobiorreator tubular



Fonte: Chisti (2007).

. As trocas gasosas nos sistemas fechados são reduzidas podendo ocasionar o acúmulo de oxigênio e quantidades insuficientes de CO_2 para realização da fotossíntese. Segundo Chisti (2007), para remoção do oxigênio acumulado e alimentação do meio com CO_2 , o cultivo deve ser encaminhado para uma zona de degaseificação que promove a agitação do cultivo pela injeção de ar (Figura 7).

3.1.3 Produção de biomassa em diferentes condições de cultivos

As necessidades de crescimento das microalgas são relativamente simples, mas uma mesma espécie pode se desenvolver e apresentar diferentes composições bioquímicas de acordo com o meio de cultivo e condições de cultivos aplicadas (TORRES, 2014).

Existem diversos estudos realizados sobre o efeito das condições de cultivo no comportamento das microalgas. De acordo com Andrade e Filho (2014), algumas espécies de microalga quando expostas a condições de estresse aumentam a produção de lipídios. O estresse celular pode ser provado pela mudança nas

condições de cultivo, como salinidade, luz, temperatura e disponibilidade de nutrientes. Outras variáveis como pH e agitação do cultivo também são determinantes para o desenvolvimento da microalga.

3.1.3.1 Fatores físicos

Os fatores físicos como luz e temperatura estão associados diretamente ao desenvolvimento da microalga no meio de cultivo. Como muitas espécies são fotoautotróficas, a luz é fundamental para realização da fotossíntese (ANDRADE e FILHO, 2014). A quantidade de luz recebida pelas células influencia na taxa de crescimento do cultivo pois está diretamente associada a fixação de carbono pelas microalgas (SANTOS, 2016). Desta forma, a aplicação da intensidade luminosa ideal no cultivo possibilita o aumento da taxa fotossintética (ANDRADE e FILHO, 2014).

A exposição do cultivo a alta intensidade luminosa gera excesso de elétrons o que pode ocasionar o aumento de espécies de oxigênio reativas, como H_2O_2 que danificam a estrutura celular (MURATA *et al.* 2007), ou produzir a fotoinibição reduzindo a capacidade de fotossíntese da microalga provocando o branqueamento e morte das células (ANDRADE, 2014).

A variação de temperatura nos cultivos de microalgas é um fator importante a ser estudado devido a alteração no seu comportamento em diferentes faixas de temperatura. A temperatura influencia nas reações enzimáticas e apesar da maioria das espécies sobreviverem em extensa faixa térmica cada espécie apresenta uma faixa de temperatura específica para seu desenvolvimento (ANDRADE e FILHO, 2014).

A exposição da microalga a temperaturas abaixo ou acima da sua faixa ideal, ocasiona a redução da velocidade de crescimento, alterações no metabolismo e fisiologia e até morte celular. Apesar da temperatura ideal variar de acordo com a espécie, a temperatura comumente aplicada nos cultivos está entre 20 e 24 °C (SANTOS, 2016). A temperatura além de afetar o crescimento celular influencia no perfil bioquímico da microalga como no teor de lipídios e concentração de ácidos graxos saturados e insaturados. A elevação da temperatura pode ocasionar aumento na produção de lipídios (SANTOS, 2014) e aumento na concentração ácidos graxos saturados em algumas espécies (THOMPSON, 1992).

A aeração dos cultivos é uma variável importante pois mantém o meio homogêneo. Com aeração constante todas as células são expostas a luz e as mesmas condições de cultivo, além de disponibilizar os nutrientes para todo meio e impedir a sedimentação das células (ANDRADE, 2014).

3.1.3.2 Fatores químicos

As microalgas e os elementos químicos presentes no meio de cultivo são diretamente afetados pelo pH. A solubilidade do CO₂ e minerais em meio aquoso é influenciada pelo pH que pode interferir direta ou indiretamente no metabolismo das microalgas. Para a maioria das espécies a faixa ideal de pH está entre 5 e 9 (ANDRADE, 2014).

O aumento do pH durante o cultivo é indicativo de crescimento microalgal ocasionado pelo consumo de CO₂ dissolvido no meio. Porém o aumento na concentração de CO₂ pode reduzir o pH do cultivo e desta forma inibir o crescimento das microalgas. Entre as formas de controlar o pH dos cultivos tem-se a aeração do meio com ar atmosférico ou ar enriquecido com CO₂, ou aplicação de soluções tampão. Porém o uso de soluções tampão pode inviabilizar os sistemas de cultivo em larga escala devido aos custos (SANTOS, 2016).

A salinidade do cultivo pode afetar o crescimento e a composição bioquímica das microalgas. A condição ideal de salinidade varia de acordo com a espécie. Em resposta ao estresse celular ocasionado pelo aumento da salinidade no meio de cultivo ocorre maior produção de compostos secundários, protegendo as células das microalgas e mantendo a pressão osmótica. A variação de salinidade pode influenciar também na produção de lipídios (MONTEIRO, 2014).

Os meios de cultivo são compostos por vitaminas, macronutrientes e elementos traços. Os principais macronutrientes são nitrogênio e fósforo, e para algumas espécies o silício, entre os principais íons estão o sódio (Na⁺), potássio (K⁺), magnésio (Mg⁺²), cálcio (Ca⁺²), cloro (Cl⁻¹), e sulfato (SO₄⁻²) (TORRES, 2014). A presença de carbono é essencial para o crescimento das microalgas em vista que esse elemento está presente em cerca de 50% da biomassa microalgal (SOUZA, 2016).

Dentre os elementos traços os mais aplicados são os metais, como ferro, manganês, cobre, zinco, cobalto e molibdênio. Apesar de estarem presentes em

pequenas quantidades, os elementos traços são fundamentais para o metabolismo das microalgas e a sua ausência pode limitar o desenvolvimento do cultivo. Diferentemente dos macronutrientes, quando presentes em maiores quantidades os elementos traços se tornam tóxicos ao cultivo (TORRES, 2014).

As vitaminas são compostos orgânicos essenciais para o metabolismo das microalgas, sendo vitais para manutenção, crescimento e armazenamento de biomoléculas na célula. Dentre as vitaminas comumente aplicadas nos cultivos estão a vitamina B₁ (tiamina-HCl), vitamina B₁₂ (cianocobalamina) e a Vitamina H (biotina) (HAKALIN, 2014).

3.1.4 Aplicações biotecnológicas

As microalgas têm sido alvo de diversos estudos voltados para sua aplicação biotecnológica em razão da sua importância econômica, nutricional e ecológica (SCHMITZ *et al.*, 2012). As pesquisas têm sido direcionadas para o aumento da produtividade de biomassa, teor de lipídios e outros produtos de valor agregado (SANTOS, 2016). As microalgas produzem compostos com alto valor agregado e, por isso, são de grande interesse para o mercado mundial, como ácidos graxos poli-insaturados, carotenóides, polissacarídeos, vitaminas e compostos bioativos (BAUMGARTNER *et al.*, 2013).

A biomassa microalgal pode ser encaminhada para diversas aplicações. Na alimentação humana e animal são utilizadas por meio de suplementos alimentares, por ser fonte de proteínas, carboidratos, ácidos graxos, pigmentos e vitaminas. Os pigmentos presentes na biomassa podem ser utilizados pelas indústrias de alimentos e cosméticos, além da aplicação em indústrias farmacêuticas pela presença de compostos bioativos como antioxidantes e antibióticos (RICHMOND e HU, 2013). Os cultivos podem ser voltados para a produção de biocombustíveis e aplicados para tratamento de águas residuárias (BAUMGARTNER *et al.*, 2013). No Quadro 1 estão apresentadas algumas das aplicações biotecnológicas das microalgas.

Quadro 1 – Produtos derivados de microalgas e possíveis aplicações

COMPOSTO	APLICAÇÕES
Pigmentos	- Nutrição humana e animal - Biomédica (corantes)
Ácidos graxos poli-insaturados	- Nutrição humana e animal - Cosméticos (antioxidantes)
Aminoácidos e proteínas	- Nutrição humana e animal
Carboidratos	- Etanol - Bioplásticos - Blocos construtores químicos
Lipídios	- Biodiesel e bioquerosene - Surfactantes - Lubrificantes - Polímeros
Biomassa	- Biogás e energia - Fertilizantes - Biofixação de CO ₂ e tratamento de efluentes

Fonte: Embrapa Agroenergia, 2016.

Os compostos derivados das microalgas podem ser originados no metabolismo primário ou ser sintetizados pelo metabolismo secundário. A maioria das espécies de microalgas acumulam esses compostos na biomassa, mas em alguns casos podem ser expelidos para o meio (MOBIN *et al.*, 2019).

3.1.4.1 Biocombustíveis

- Biodiesel

De acordo com Andrade e Filho (2014), o biodiesel é um combustível biodegradável derivado de biomassa que possui como principal objetivo a substituição parcial ou total do diesel por razões econômicas e ambientais. O biodiesel pode ser produzido por diversas matérias-primas incluindo óleos vegetais e gorduras animais

(HARUN et al., 2010). Segundo Andrade e Filho (2014), atualmente no Brasil a principal matéria-prima usada na produção de biodiesel é o óleo de soja.

As pesquisas têm focado no desenvolvimento de tecnologias que permitam a produção de biodiesel sem a utilização de terras para cultivar a matéria-prima, evitando conflito com o setor de alimentos. Uma das alternativas encontradas é o aproveitamento da biomassa das microalgas por possuir grandes quantidades de lipídios servindo de fonte para produção de biodiesel (ANDRADE e FILHO, 2014). Os biocombustíveis advindos da biomassa microalgal não apresentam impacto no setor alimentício, pois os cultivos não necessitam essencialmente de terra ou água doce para sua produção (MONTEIRO, 2014).

Todas as células de microalgas apresentam lipídios em sua composição, porém nem todas as espécies possuem quantidades significativas de lipídios comparadas as culturas convencionais de obtenção de óleo (RICHMOND e HU, 2013). Algumas espécies podem apresentar mais de 50% de lipídios (MONTEIRO, 2014), valor muito superior ao encontrado na soja onde o teor médio de lipídios no grão é de 20% (CAVALCANTE *et al.*, 2011).

Os lipídios são moléculas orgânicas com diferentes estruturas químicas que apresentam importantes funções nas células. Apesar de algumas espécies de microalgas possuírem grandes quantidade de lipídios nem todos são de interesse para a produção de combustíveis. Os lipídios geralmente utilizados são os triglicerídeos (TAG) que possuem como função o armazenamento de energia e carbono, e o restante dos lipídios apresentam outras funções como estrutural (MONTEIRO, 2014). Na produção de biocombustível os triglicerídeos reagem com o metanol produzindo ésteres metílicos de ácidos graxos, que é o biodiesel e produz também o glicerol como co-produto (CHISTI, 2007).

- Bioetanol

Os carboidratos presentes na biomassa microalgal podem ser utilizados para a produção de outro biocombustível, o bioetanol (ANDRADE e FILHO, 2014). As microalgas são capazes de excretar glicose e sacarose para o meio de cultivo por meio da fermentação anaeróbia. Desta forma, o etanol pode ser retirado diretamente do meio sem a necessidade de extrair a biomassa, diminuindo as etapas do processo (LÚCIO, 2013). A produção do bioetanol pode ser realizada com o aproveitamento da

biomassa remanescente após a produção do biodiesel (ANDRADE e FILHO, 2014). O bioetanol é produzido pela fermentação alcoólica que converte os carboidratos (açúcar, amido ou celulose) em etanol. O resíduo resultante do processo pode ser usado para alimentação de gado ou para queima e cogeração de energia (BRENNAN e OWENDE, 2010).

- Bio-hidrogênio

Segundo Brennan e Owende (2010), o hidrogênio molecular ocorre naturalmente e serve como transporte para energia limpa. As microalgas são capazes de produzir H_2 durante a fotossíntese. Na fotossíntese ocorre a conversão das moléculas de água em íons de hidrogênio e oxigênio, e sob condições anaeróbias ocorre a conversão dos íons hidrogênio em H_2 pela enzima hidrogenase.

Para produção do hidrogênio os cultivos de microalgas devem ser submetidos as condições anaeróbias devido a inibição da enzima hidrogenase pelo oxigênio gerado durante a fotossíntese. Os cultivos podem ser realizados em duas etapas, sendo a primeira cultivado em condições normais com atividade fotossintética e na segunda etapa a indução do cultivo sob condições anaeróbias para estimular a produção de hidrogênio. A produção pode ser realizada também em condições fotossintéticas, porém o cultivo sofre inibição da hidrogenase após um pequeno período (BRENNAN e OWENDE, 2010).

3.1.4.2 Nutrição humana e animal

Segundo Mobin *et al.* (2019), o conceito de alimento funcional vai além de seus efeitos nutritivos, devido as outras respostas provocadas ao organismo como melhora da saúde e bem-estar. Os micronutrientes que compõe o alimento funcional estão presentes em baixas concentrações nos alimentos convencionais ou não estão presentes. Os nutrientes funcionais são, ácidos graxos, probióticos, carotenóides, vitaminas, entre outros. As microalgas apresentam maiores quantidades de proteínas comparadas as outras fontes vegetais, porém em menor quantidade em alimentos de origem animal.

O consumo humano de biomassa microalgal está sujeito principalmente as normas de segurança alimentar, as demandas de mercado e as condições de

comércio e fabricação, restringindo a produção a poucas espécies, sendo as mais utilizadas a *Chorella*, *Spirulina* e *Dunaliella* (BRENNAN e OWENDE, 2010). A partir da biomassa são produzidos e comercializados comprimidos e cápsulas para suplementação alimentar (MOBIN *et al.*, 2019).

As microalgas são a base da cadeia alimentar e parte da energia produzida durante a fotossíntese é assimilada por peixes, moluscos e crustáceos. A energia é absorvida por esses organismos pelo consumo das microalgas e distribuída ao longo da cadeia trófica marinha (LAVENS e SORGELOOS, 1996).

3.1.4.3 Pigmentos

As espécies de microalgas apresentam diferentes pigmentos, como verde, amarelo, laranja e vermelho. A pigmentação verde é proveniente das clorofilas e as demais estão disponíveis em carotenóides (MOBIN *et al.*, 2019).

Os carotenóides são fortes antioxidantes e desempenham funções importantes no metabolismo das microalgas, como captura da energia solar funcionando como pigmento acessório e protege o aparelho fotossintético (MENDONÇA, 2014). De acordo com Mobin *et al.* (2019), a concentração média de carotenóides na maioria das microalgas varia de 0,1 a 2% de biomassa seca.

Existe uma variedade de carotenóides porém apenas alguns são produzidos comercialmente, como o β -caroteno e astaxantina. O β -caroteno pode ser convertido em vitamina A em alimentos naturais e auxilia na coloração de peixes como salmão e gema de ovos. A astaxantina também é aplicada na aquicultura para melhora na coloração de peixes e clareamento de conchas (MOBIN *et al.*, 2019).

3.1.4.4 Tratamento de efluentes

A composição físico-química e biológica dos efluentes varia de acordo com a sua origem. Os efluentes podem conter alto teor de matéria orgânica e metais pesados, que podem ocasionar graves impactos ambientais se disposto de forma inadequada no meio ambiente (SCHMITZ *et al.*, 2012).

As microalgas possuem a capacidade de assimilar nutrientes e, por isso, são utilizadas há décadas na biorremediação e tratamento de efluentes (TAHER, 2013). Segundo Andrade *et al.* (2010), a biorremediação é um processo no qual se

utiliza micro-organismos para degradação de contaminantes. Este processo tem por objetivo minimizar os impactos ocasionados por compostos com potencial poluidor (CRAPEZ *et al.*, 2002).

O cultivo de microalgas utilizado para o pós-tratamento de águas residuárias fornece o polimento deste efluente juntamente com a produção de biomassa que pode ser usada para diversos fins. Segundo Lourenço (2006) as microalgas possuem a capacidade de usar principalmente o nitrogênio e fósforo presente no efluente, servindo desta forma como fonte de nutrientes para seu desenvolvimento. As microalgas possuem capacidade de assimilar metais pesados e alguns compostos orgânicos tóxicos, diminuindo o potencial poluidor do efluente.

De acordo com Souza (2016), um dos maiores desafios na produção laboratorial e em grande escala de microalgas são os custos com nutrientes e demais elementos necessários para o preparo dos meios de cultivo. Desta forma, o uso de alternativas de baixo custo podem facilitar a produção em grande escala.

A utilização de microalgas para o polimento de efluentes domésticos, industriais e agrícolas é uma forma eficiente para diminuir os custos da produção de microalgas, a diluição em efluente diminui a aplicação de meio de cultivo artificial (MIYAWAKI, 2014). Segundo Chisti (2007), o tratamento de efluentes pode ser associado a obtenção de produtos com alto valor agregado pela produção de biomassa microalgal.

3.2 TRATAMENTO DE EFLUENTES

A utilização da água nos processos naturais e antrópicos é inevitável e por consequência há a geração de efluente que ocasiona a redução da qualidade da água, por isso é necessário que se procure por meios para o tratamento eficaz dos efluentes e a minimização dos possíveis impactos no seu lançamento em corpos hídricos. Os processos comumente utilizados para o tratamento de efluentes são a coagulação, floculação e decantação (MARTINS, 2014).

Os esgotos são provenientes de três fontes distintas, que são os esgotos domésticos, águas de infiltração e despejos industriais (SPERLING, 1996). O esgoto doméstico provém de residências e estabelecimentos comerciais, públicos ou institucionais. O esgoto industrial é dejetado líquido gerado nos processos produtivos das indústrias. E as águas de infiltração são águas externas que penetram na rede

coletora por meio de juntas danificadas e tubulações com ruptura (METCALF e EDDY, 2015).

Atualmente existem diversos processos para se utilizar no tratamento de esgoto que podem ser individuais ou combinados. A escolha pelo melhor tipo de tratamento vai variar de acordo com a origem do efluente, com a capacidade de autodepuração do corpo receptor, com a composição do efluente, além dos limites de lançamento permissíveis pela legislação (IMHOFF K. R. e IMHOFF K., 1996).

Os processos de tratamento podem ser classificados em físicos, químicos e biológicos. Nos processos físicos ocorre a retirada de sólidos grosseiros, a decantação de materiais em suspensão, bem como a filtração. O processo químico é caracterizado pela adição de produtos químicos no efluente. E no processo biológico tem-se a utilização de micro-organismos para depuração do esgoto (SPERLING, 1996).

De acordo com Sperling (1996), o tratamento de efluentes é classificado de acordo com as etapas, como tratamento preliminar, primário, secundário e terciário. O tratamento preliminar tem por objetivo a remoção de sólidos grosseiros; o tratamento primário tem por finalidade a remoção de sólidos sedimentáveis e parte da matéria orgânica; o tratamento secundário tem por objetivo a remoção da matéria orgânica e nutrientes; e o tratamento terciário tem por finalidade a remoção de poluentes específicos como composto tóxicos.

O tratamento preliminar em uma Estação de Tratamento de Esgoto tem por objetivo a remoção de sólidos grosseiros, areia e gordura presentes no efluente, através de mecanismos físicos como grades e peneiras ocasionando a retenção e sedimentação (BORGES, 2014). As grades e peneiras (gradeamento) são responsáveis pela remoção de sólidos grosseiros e a separação da areia ocorre por sedimentação durante a passagem do efluente pelas caixas de areia (desarenação) (SCHLUSAZ, 2014). A remoção desses materiais auxilia na proteção dos equipamentos e tubulações evitando entupimentos e obstruções, além de melhorar o funcionamento das etapas seguintes do tratamento (BORGES, 2014).

No tratamento primário ocorre a remoção de sólidos sedimentáveis e conseqüentemente a retirada de uma parte da matéria orgânica. O material é removido por processos físicos e fazem parte desta etapa a sedimentação, decantação e flotação (VON SPERLING, 1995). Os sólidos são removidos com uso de um decantador, o efluente passa lentamente pelos decantadores permitindo que

os sólidos em suspensão sedimentem gradativamente no fundo. A concentração de sólidos é chamada de lodo primário bruto. Os óleos, graxas e outros materiais flutuantes formam a espuma e se acumulam e são removidos na superfície (SCHLUSAZ, 2014).

De acordo com Metcalf e Eddy (2015), o tratamento secundário visa a remoção de sólidos em suspensão, compostos orgânicos biodegradáveis como matéria orgânica dissolvida ou em suspensão, além de nutrientes como nitrogênio (N) e fósforo (F). A degradação destes compostos ocorre por processos biológicos através da atuação de microrganismos. Os processos para a degradação da matéria em Estações de Tratamento de Efluentes são semelhantes ao que ocorre na natureza, porém de forma acelerada.

3.3 AGROINDÚSTRIA – MANDIOCA

A espécie *Manihot esculenta* Crantz popularmente conhecida por mandioca, é uma planta pertencente à família *Euphorbiaceae* originária da América Sul (DÓSEA *et al.*, 2010). A mandioca é a espécie mais cultivada para consumo humano e pode ser utilizada como matéria prima para o desenvolvimento de diversos produtos em indústrias (SILVA, 2009). De acordo com a Embrapa (2006), as espécies *M. Caerulescens* e *M. Dichotoma* var. *Undulate* também podem ser utilizadas para alimentação humana e animal (doméstico) pelo consumo de sementes após a retirada da casca.

No Brasil o processamento da mandioca em indústrias concentra-se na produção de farinha, extração da fécula e alimentação animal (EMBRAPA, 2006). Os produtos derivados da mandioca são distribuídos para diversos setores, sendo 33,9% encaminhados para alimentação humana, 50,2% para alimentação animal e 15,9% corresponde a exportação, perdas e outros usos (AMORIM, 2015).

O nordeste brasileiro é a região do país com a maior produção de mandioca e apresenta também o maior consumo farinha (SILVA, 2009). O cultivo de mandioca enfrenta problemas nessa região o que limita seu desenvolvimento, como a seleção de variedades, manejo e conservação do solo, manejo de pragas e doenças, falta de tecnologias para o desenvolvimento das lavouras, entre outros (EMBRAPA, 2006). Além do cultivo da mandioca, a produção de fécula também é limitada devido a necessidade de grande quantidade de água de boa qualidade (SILVA, 2009).

A composição da mandioca pode variar de acordo com o método de cultivo, época de colheita, entre outros. A mandioca apresenta menos de 1% de proteína, baixos teores de lipídios e minerais. No entanto, carboidratos e água são encontrados em grande quantidade sendo o carboidrato constituído principalmente por amido que pode atingir 35% da matéria fresca (SILVA, 2009).

Diferentemente de outras culturas produtoras de amido a mandioca é capaz de acumular dois glicosídeos cianogênicos, a linamarina e lotaustralina que podem gerar ácido cianídrico (HCN), caracterizado como composto tóxico (AMORIM, 2015). A liberação do ácido cianídrico ocorre após a ruptura da estrutura celular da raiz onde os glicosídeos entram em contato com enzimas e são degradados liberando o ácido (CHISTÉ *et al.*, 2010).

A quantidade de glicosídeo na raiz da mandioca determina sua classificação e uso, são chamadas de amargas ou bravas a mandioca com alto teor de glicosídeo cianogênico e devem ser utilizadas apenas para fins industriais, e aquelas que apresentam baixos teores de glicosídeos são chamadas de doce ou mansas (aipins ou macaxeiras) e podem ser usadas diretamente para consumo humano (EMBRAPA, 2006).

Em indústrias a raiz da mandioca pode ser processada para a produção de farinha e para extração da fécula. Na produção de farinha de mandioca são gerados resíduos sólidos, líquidos e emissões atmosféricas. Entre os efluentes líquidos tem-se a água de lavagem gerada durante a limpeza das raízes e a manipueira gerada na fabricação da farinha ou fécula (AMORIM, 2015).

3.3.1 Água residual da mandioca – manipueira

De acordo com Cassoni e Cereda (2011), a manipueira é o efluente líquido gerado no processo de fabricação da farinha de mandioca (*Manihot esculenta*) ou fécula. Este efluente possui aspecto leitoso e coloração amarelada, apresenta em sua composição açúcares, proteínas, amidos (CASSONI e CEREDA, 2011), pH baixo, grande quantidade de carboidratos, de demanda química de oxigênio (DQO), de demanda bioquímica de oxigênio (DBO) (AMORIM, 2015), linamarina, derivados cianogênicos (ácido cianídrico, e cianetos) e outros compostos (SILVA, 2009).

No processamento da mandioca para produção de farinha ou fécula, ocorre a trituração da raiz e conseqüente liberação dos glicosídeos cianogênicos para o meio.

A presença destes compostos no efluente líquido gerado no processamento pode ocasionar impactos negativos no meio ambiente se descartado de forma inadequada (AMORIM, 2015).

De acordo com Fioretto (2001), a composição química da manipueira depende das condições de cultivo da mandioca, uma tonelada de raízes de mandioca pode apresentar 60% de umidade que durante seu processamento, 20 a 30% dessa água é eliminada. Esta por sua vez, pode conter 5 a 7% de fécula, proteínas, glicose, ácido cianídrico, nutrientes essenciais, entre outros compostos.

A variação na composição físico-química da manipueira ocorre principalmente pela diferença no tipo de raiz e nos métodos de cultivo (SILVA, 2009). A Tabela 1 apresenta a composição média da manipueira proveniente de casas de farinha relatada por alguns autores, é possível observar a presença de macro e micronutrientes essenciais para o desenvolvimento das microalgas como nitrogênio e fósforo.

Tabela 1 – Composição físico-química da manipueira encontrada na literatura.

Parâmetros	Unidade	Silva (2009)	Melo (2010)	Novaes (2011)	Correia et al., (2018)
pH¹	-	4,6	-	4,41	4,6
Potássio	mg.L ⁻¹	3910	1863,5	-	-
Cálcio	mg.L ⁻¹	260	227,5	-	-
Magnésio	mg.L ⁻¹	710	405,0	-	-
Zinco	mg.L ⁻¹	-	4,2	-	-
Fósforo total	mg.L ⁻¹	700	259,5	-	-
Nitrogênio	mg.L ⁻¹	-	425,5	-	-
Manganês	mg.L ⁻¹	-	3,7	-	-
Carbono	mg.L ⁻¹	28900	-	-	-
Cobre	mg.L ⁻¹	-	11,5	-	-
Ferro	mg.L ⁻¹	-	15,3	-	-
Sólidos totais	mg.L ⁻¹	58000	-	1280	44500
Sólidos voláteis	mg.L ⁻¹	-	-	1130	37100
Sólidos fixos	mg.L ⁻¹	-	-	150	7400
Nitrato	mg.L ⁻¹	-	-	18	-
Cianeto total	mg.L ⁻¹	-	604,0	-	-

¹ Potencial Hidrogeniônico.

Segundo Wosiacki e Cereda (2002), a disposição inadequada da manipueira ocasiona sérios danos ambientais devido ao seu alto potencial poluidor e toxicidade. O descarte inadequado pode causar a eutrofização de corpos hídricos devido à grande quantidade de nutrientes como nitrogênio e fósforo, inibir a oxigenação de células pelo consumo de cianeto (CORREIA *et al.*, 2018), e se lançado no solo pode causar desequilíbrio de nutrientes deixando-o impróprio para cultivo (MELO, 2010).

Segundo Amorim (2015), manipueira é comumente disposta em tanques escavados no solo, podendo ser utilizada como inseticida pela existência de cianeto ou biofertilizante pela presença de nutrientes como nitrogênio, potássio e fósforo e outros micronutrientes em sua composição.

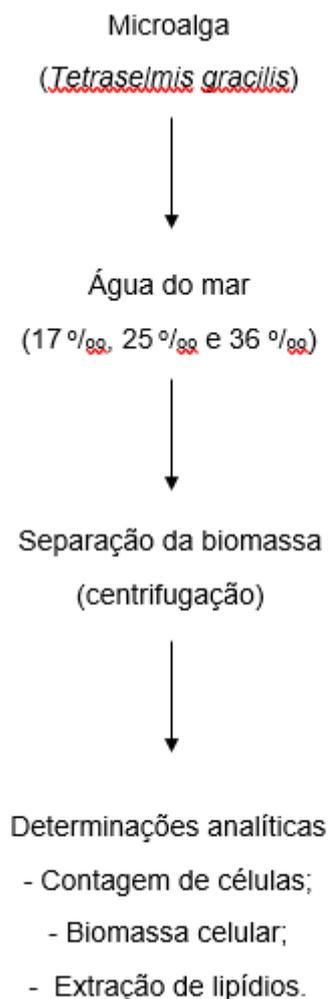
O tratamento da manipueira pode ser realizado por diversos processos visando a redução de matéria orgânica e/ou redução da carga tóxica. As lagoas de estabilização são aplicadas na maioria das indústrias para o tratamento da manipueira, onde o efluente é tratado biologicamente através da decomposição da matéria orgânica por microrganismos. Por não ser adicionado produtos químicos no processo, o efluente pode ser aplicado posteriormente para produção de produtos com valor agregado como uso para produção de energia, fertilizante e inseticida (AMORIM, 2015).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo adotado neste trabalho é do tipo experimental/exploratório em vista que envolve experimentos em bancada e a observação dos efeitos no crescimento da microalga quando cultivada em diferentes concentrações de salinidade e com diferentes concentrações de manipueira.

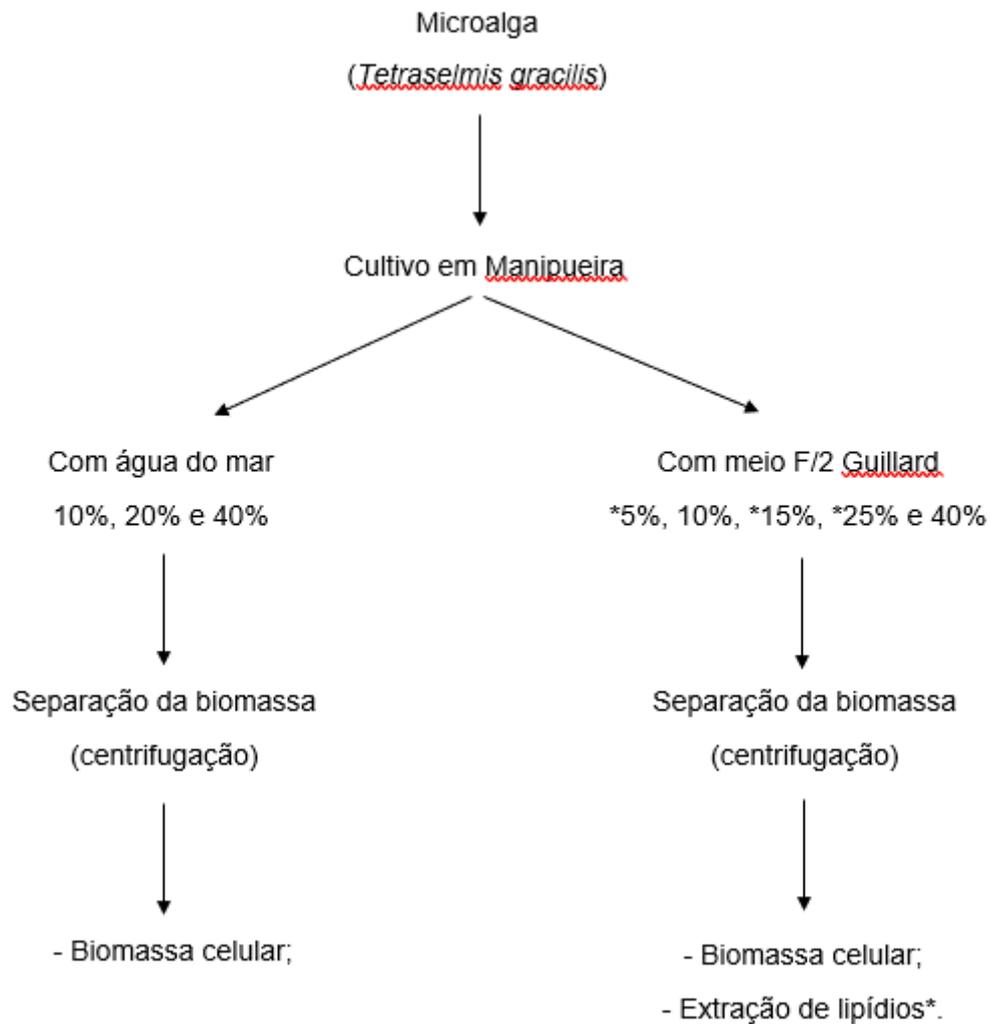
Os experimentos foram realizados no Laboratório de Engenharia Ambiental e Sanitária (LEA) da Unidade Pedra Branca do *campus* Grande Florianópolis da Universidade do Sul de Santa Catarina (Unisul), conforme os fluxogramas das figuras 8 e 9.

Figura 8 – Fluxograma dos ensaios com diferentes salinidades



Fonte: Autor, 2020.

Figura 9 - Fluxograma dos ensaios com diferentes concentrações de manipueira



Fonte: Autor, 2020.

4.1 OBTENÇÃO DO EFLUENTE

O efluente foi coletado em uma Indústria de produção de farinha de mandioca, localizada no município de Paulo Lopes em Santa Catarina. As amostras foram coletadas na lagoa onde se encontrava o efluente gerado da lavagem e prensagem da mandioca (*Manihot esculenta*). O efluente coletado havia permanecido por no mínimo 15 dias na lagoa para que fosse garantido total volatilização do ácido cianídrico.

Após coletado, o efluente foi transferido para garrafas de 500 mL e armazenados ao abrigo de luz e à temperatura de aproximadamente -10 °C.

4.1.1 Preparo do efluente

Primeiramente o efluente foi preparado para realização da caracterização físico-química e posterior aplicação nos cultivos da microalga.

A manipueira foi previamente autoclavada a 121°C e 1,1 atm durante 15 minutos. Após seu esfriamento em temperatura ambiente, o efluente foi filtrado com papel filtro em funil Buchner com auxílio de bomba a vácuo.

4.1.2 Características físico-químicas do efluente

- Nutrientes

Para a caracterização do efluente alguns nutrientes foram determinados como nitrato ($\text{NO}^3\text{-N}$), nitrito ($\text{NO}^2\text{-N}$) e fósforo total (P). As concentrações foram determinadas por métodos colorimétricos usando os kits da HACH (Hach Company, Ames, Iowa, EUA) que são metodologias adaptadas do *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*.

- Sólidos Totais (ST)

Para a determinação dos sólidos totais secou-se um cadinho em estufa a 105 °C por 2h, posteriormente levou-se ao dessecador para esfriamento e após foi pesado em balança analítica. Com o peso do cadinho conhecido adicionou-se 50 mL de amostra tratada e homogeneizada e colocou-se em banho-maria para evaporação e posterior secagem em estufa. Os sólidos totais foram determinados pela equação 1.

$$ST = \frac{(P2 - P1) \times 10^6}{V} \quad (\text{mg/L}) \quad (1)$$

Sendo:

P1 – Peso do cadinho seco (g)

P2 – Peso do cadinho com amostra (g)

V – Volume da amostra (mL)

- Sólidos Suspensos (SS)

Em um cadinho de Gooch previamente seco em estufa a 105°C por 2h, esfriado em dessecador e pesado em balança analítica, filtrou-se 10 mL de amostra tratada e homogeneizada. Posteriormente o cadinho de Gooch foi levado a estufa para secagem e após foi pesado. Os sólidos totais foram determinados pela equação 2.

$$SS = \frac{(P2 - P1) \times 10^6}{V} \text{ (mg/L)} \quad (2)$$

Sendo:

P1 – Peso do cadinho seco (g)

P2 – Peso do cadinho com amostra (g)

V – Volume da amostra (mL)

- Sólidos Dissolvidos (SD)

A determinação dos sólidos dissolvidos foi possível após os resultados de sólidos totais e suspensos. Desta forma se obteve os sólidos dissolvidos através da equação 3.

$$SD = ST - SS \text{ (mg/L)} \quad (3)$$

Sendo:

ST – Sólidos Totais (mg.L⁻¹)

SS – Sólidos Suspensos (mg.L⁻¹)

- pH

O pH da amostra foi determinada por meio do uso do pHmetro digital de bancada Sensoglass previamente calibrado.

4.2 ÁGUA DO MAR

A água do mar utilizada para o preparo dos cultivos foi coletada na Baía de São José pelo acesso do Trapiche do Balneário Guararema localizado no bairro Ponta de Baixo em São José, SC. Após a coleta a água foi preparada para determinação de cloretos e posterior aplicação nos meios de cultivo. Em temperatura ambiente, foi filtrada e posteriormente levada a autoclave (121°C e 1,1 atm) durante 15 minutos.

4.2.1 Determinação de Cloretos

Para esta análise foi realizada a diluição da amostra em 1:500 devido à alta concentração de cloretos. O pH se encontrava entre 7,0 e 10,0 e, desta forma, não foi necessário ajuste. Se adicionou 1 mL da solução indicadora de Cromato de Potássio (K_2CrO_4) em 100 mL de amostra, deixando o meio com coloração amarelada.

Titulou-se a amostra com a solução padrão de Nitrato de Prata 0,0141 N até a mudança de coloração para amarelo avermelhado. Se repetiu o procedimento para determinação do branco com água deionizada.

A concentração de cloreto foi determinada a partir da equação 4.

$$C = \frac{(A - B) \times N \times 35,45}{V} \text{ (mg/L de Cl)} \quad (4)$$

Sendo:

A - Volume de titulante gasto na amostra (mL);

B - Volume do titulante gasto no branco (mL);

N - Normalidade do titulante;

V – Volume de amostra (mL)

4.3 OBTENÇÃO DA MICROALGA

A microalga *Tetraselmis gracilis* utilizada nos cultivos foi gentilmente cedida pelo Banco de Micro-organismos Aidar & Kutner do Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo (USP).

4.3.1 Cultivo controle da microalga

Por se tratar de uma espécie marinha o cultivo controle da microalga *Tetraselmis gracilis* foi realizado em meio F/2 Guillard (GUILLARD, 1975) preparado com água do mar com salinidade natural de aproximadamente 17 ‰. Todo material necessário para o preparo do cultivo foi esterilizado em autoclave (121°C e 1,1 atm) durante 15 minutos para garantir que não houvesse contaminação. A Tabela 2, 3 e 4 apresentam os nutrientes que compõe o meio F/2 Guillard utilizado para os cultivos da microalga.

Tabela 2 - Meio de cultivo utilizado para a cultura da microalga *Tetraselmis gracilis*.

Meio	Reagente	Solução estoque (g.L ⁻¹)	Quantidade para cultivo/L
Nitrato de sódio	NaNO ₃	75	1 mL
Hipofosfito de sódio	NaH ₂ PO ₄ . H ₂ O	5	1 mL
Silicato de sódio	Na ₂ SiO ₃ .9 H ₂ O	30	1 mL
Solução traço de metal	*	*	1 mL
Solução de vitaminas	**	**	0,5 mL

Fonte: Guillard, 1975.

*Os reagentes para a solução traço de metal estão disponíveis na Tabela 3

** Os reagentes para a solução de vitaminas estão disponíveis na Tabela 4.

Tabela 3 - Solução traço de metais.

Reagente	Solução estoque primário (g.L ⁻¹)	Quantidade/L
FeCl ₃ .6H ₂ O	--	3,15 g
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	--	4,36 g
CuSO ₄ .5H ₂ O	9,8	1 mL
Na ₂ MoO ₄ .H ₂ O	6,3	1 mL
ZnSO ₄ .7H ₂ O	22,0	1 mL
CoCl ₂ .6H ₂ O	10,0	1 mL
MnCl ₂ .4H ₂ O	180,0	1 mL

Fonte: Guillard, 1975.

Tabela 4 - Solução de vitaminas.

Reagente	Solução estoque primário (g.L ⁻¹)	Quantidade/L
Tiamina HCl (Vit. B ₁)	--	0,2 g
Biotina (Vit. H)	1,0	1 mL
Cianocobalamina (vit. B ₁₂)	1,0	1 mL

Fonte: Guillard, 1975.

Os cultivos foram realizados em sistema fechado sendo possível o controle de variáveis como temperatura e luminosidade. As condições de temperatura foram mantidas em $30 \pm 5^\circ\text{C}$ e para luminosidade foi aplicado fotoperíodo de 16 horas com luz e 8 horas sem luminosidade, fornecida por lâmpadas fluorescentes de 9 Watts. O cultivo foi constantemente aerado por meio de um mini compressor com ar estéril em filtro de 0,2 μm .

Os cultivos foram realizados em frascos de coleta de 1L, sendo o volume inicial de meio de cultivo 700 mL. A concentração inicial de inóculo foi de 1:10 utilizando cultivos em fase de crescimento. O cultivo controle da microalga *Tetraselmis gracilis* teve duração de aproximadamente 11 dias.

4.4 CULTIVO EM DIFERENTES SALINIDADES

A microalga *Tetraselmis gracilis* foi submetida a três meios de cultivos com diferentes salinidades. Foi aplicado o meio de cultivo proposto pela literatura para a essa espécie, desta forma os cultivos foram preparados semelhantes ao cultivo controle e após a salinidade foi ajustada com adição de cloreto de sódio (NaCl).

Após o preparo do cultivo controle, a salinidade dos cultivos foi ajustada para 26 ‰ e 35 ‰, cultivados juntamente com um cultivo controle com salinidade natural de aproximadamente 17 ‰.

Os cultivos foram realizados em sistema fechado com controle de temperatura e luminosidade. A temperatura foi mantida em $30 \pm 5^{\circ}\text{C}$ e para a condição de luminosidade foi aplicado fotoperíodo de 16 horas com luz e 8 horas sem luminosidade, fornecida por lâmpadas fluorescentes de 9 Watts. Os cultivos foram aerados constantemente por meio de um mini compressor com ar estéril em filtro de $0,2 \mu\text{m}$.

Os meios foram cultivados em frascos de coleta de 1L, sendo o volume inicial de cultivo 800 mL (Figura 10). A razão volumétrica inóculo:cultivo foi de 1:10, o inóculo foi obtido de cultivos em fase de crescimento. Os três cultivos tiveram duração de aproximadamente 11 dias.

Figura 10 – Cultivos da microalga *Tetraselmis gracilis* com diferentes salinidades



Fonte: Autor, 2020.

4.5 CULTIVO COM EFLUENTE

- Cultivos com meio F/2 Guillard

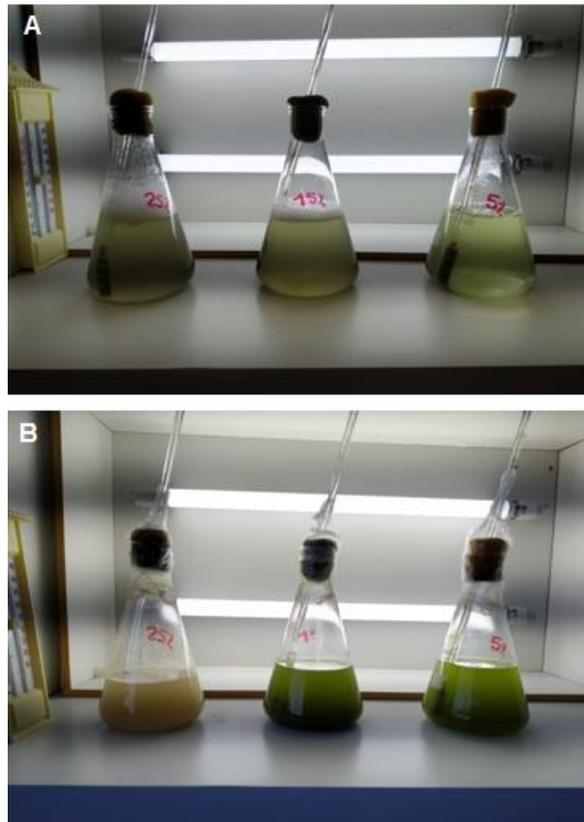
A microalga *Tetraselmis gracilis* foi submetida a seis concentrações diferentes de manípueira. Os cultivos foram realizados a partir do meio F/2 Guillard (GUILLARD, 1975) preparado com água do mar com salinidade de 17 ‰, seguindo o preparo do cultivo controle. O efluente aplicado nos cultivos foi previamente preparado, como descrito anteriormente.

Após o preparo dos cultivos, adicionou-se diferentes concentrações de efluente nos meios, os cultivos foram compostos por 5%, 10%, 15%, 20%, 25% e 40% de efluente em meio de cultivo F/2 Guillard. Quando necessário o pH foi ajustado para faixa de 6 a 7,5.

Os cultivos foram realizados em bancada com controle de temperatura por meio de ar condicionado e luminosidade. As condições de temperatura foram em $23 \pm 5^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas com luz e 8 horas sem luminosidade, fornecida por lâmpadas fluorescentes de 9 Watts. Os cultivos foram aerados constantemente no período de duração dos cultivos, por meio de um mini compressor com ar estéril em filtro de $0,2 \mu\text{m}$.

Os meios contendo 10%, 20% e 40% de efluente foram cultivados em frascos de coleta de 1L, sendo o volume inicial de cultivo 700 mL. E os meios contendo 5%, 15% e 25% foram cultivados em erlenmeyers de 500 mL, sendo o volume inicial do cultivo 400 mL (Figura 11 – A). A razão volumétrica inóculo:cultivo foi de 1:10, o inóculo foi obtido de cultivos em fase de crescimento. Os cultivos tiveram duração de aproximadamente 9 dias.

Figura 11 - Cultivos com 5%, 15% e 25% de efluente



*A – 1º dia de cultivo; B – 9º dia de cultivo.

Fonte: Acervo do autor, 2020.

- Cultivos sem meio F/2 Guillard

Devido a presença de nutrientes na manipueira e visando a economia do meio de cultivo sintético, realizou-se a diluição do efluente em água do mar previamente preparada com salinidade de 17 ‰. Após o preparo da água do mar, adicionou-se diferentes concentrações de efluente nos meios, os cultivos foram compostos por 10%, 20% e 40% de efluente. Quando necessário o pH foi ajustado para faixa de 6 a 7,5.

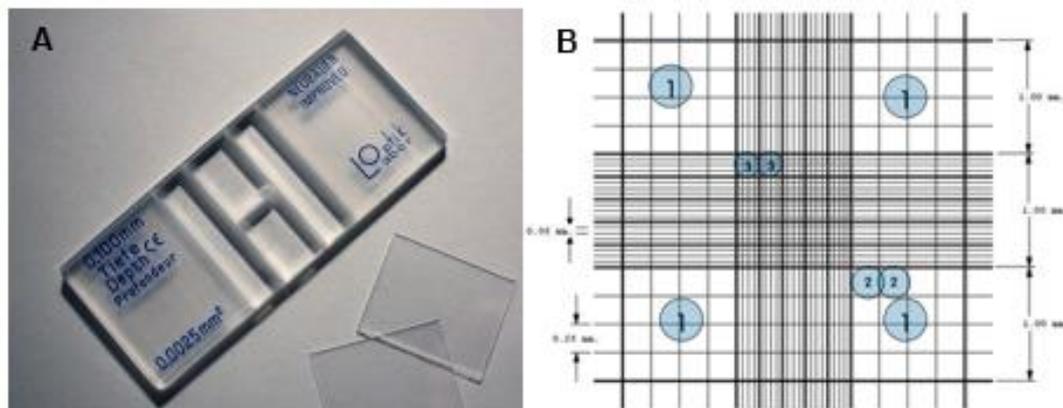
Esses cultivos foram preparados e mantidos seguindo as etapas descritas para os cultivos com efluente em meio F/2 Guillard. Os meios foram realizados em frascos de coleta de 1L, sendo o volume inicial de cultivo de 700 mL. Os cultivos tiveram duração de aproximadamente 9 dias.

4.6 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS

4.6.1 Densidade celular dos cultivos

A densidade celular dos cultivos foi determinada pela contagem de células utilizando a Câmara Neubauer em microscópio óptico (Figura 12 - A). As amostras foram retiradas a partir do primeiro dia de cultivo, com intervalo máximo de um dia para nova contagem. Quando separadas, as amostras foram imediatamente fixadas com formaldeído 4%.

Figura 12 - Câmara Neubauer e grade de contagem



*A – Câmara Neubauer; B – Grade de contagem

Fonte: Câmara, 2015.

Para realização da contagem se aplicou uma alíquota de 0,05 mL de amostra, sendo o volume suficiente para cobrir a câmara. Se aplicou um aumento de 400x para visualização do quadrante e da microalga.

O melhor quadrante para se realizar a contagem foi determinado pelo tamanho da microalga e por sua concentração celular, assim se optou pela leitura no maior quadrante (1) da câmara (Figura 12 - B). Para obter a concentração de células foram realizadas as contagens nos quatro quadrantes (1) e posteriormente calculou-se a média. Sendo o número de células e o número de quadrantes valores conhecidos, foi possível determinar a concentração celular em células por mililitro de cultivo (cél.mL^{-1}) através da equação 5. A Figura 13 apresenta a grade (1) com a microalga *Tetraselmis gracilis*, visualizada durante a contagem.

Figura 13 - Grade de contagem (1) com a microalga *Tetraselmis gracilis*



Fonte: Acervo do autor, 2020.

Com dados experimentais foram elaboradas as curvas de crescimento da espécie para três salinidades aplicadas nos cultivos. Aplicando no eixo da ordenada o número de células em cel.mL^{-1} e no eixo da abscissa o tempo de cultivo em dia.

$$C (\text{cél/mL}) = \frac{\text{Total de células}}{n^{\circ}} \times 10^4 \quad (5)$$

Sendo:

C = concentração de células (Cél.mL^{-1});

n° = número de quadrantes.

4.6.2 Biomassa

A concentração de biomassa seca em (g.L^{-1}) dos cultivos foi determinada com base na metodologia de sólidos totais, adaptada do Standard Methods (APHA, 2005). A extração da biomassa microalgal dos meios de cultura ocorreu após seu encerramento do crescimento celular.

Os cultivos foram centrifugados a 3000 rpm, em temperatura de 20°C durante 15 minutos. Após a separação, a biomassa foi lavada com Formiato de Amônio (0,5 Molar) para retirada do sal e centrifugada novamente. O processo de lavagem foi realizado duas vezes para retirada completa dos sais.

Para determinação de biomassa, secou-se um cadinho em estufa a 105 °C por 2h, após seu esfriamento foi pesado em balança analítica. Conhecendo o peso do cadinho adicionou-se a biomassa resultante. O cadinho com a amostra foi levado a estufa e seco à 60 °C durante 24 h. A concentração de biomassa das microalgas foi estimada gravimetricamente pela equação 6.

$$\text{Biomassa seca} = P2 - P1 \text{ (g/volume de amostra)} \quad (6)$$

Sendo:

P1 – Peso do cadinho seco (g);

P2 – Peso do cadinho com amostra (g).

4.6.3 Extração de lipídios

A determinação de lipídios presentes na biomassa seca ocorreu por meio do método Bligh e Dyer (1959) modificado, utilizando extração a frio com uma mistura de clorofórmio:metanol:água (2:1:0,8 v/v/v).

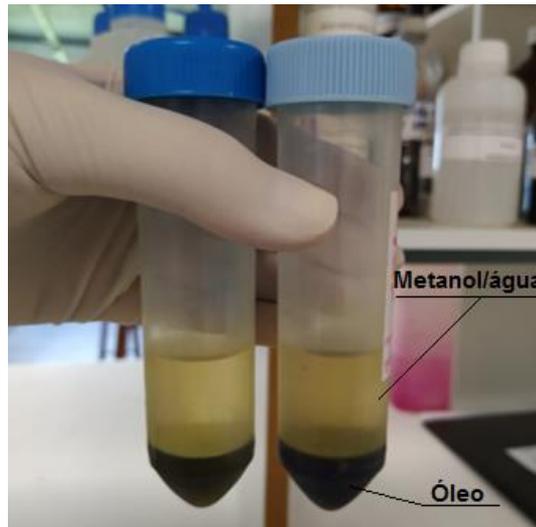
O peso conhecido de uma amostra da biomassa seca foi transferido para um tubo de centrífuga. Adicionou-se 7,7 mL da mistura de clorofórmio:metanol:água no tubo e se homogeneizou com auxílio do vortex. Após a amostra foi centrifugada a 2000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante contendo óleo foi transferido cuidadosamente para outro tubo de centrífuga.

Realizou-se uma segunda extração com a biomassa restante. Adicionou-se 5,7 mL da mistura de clorofórmio:metanol:água e se repetiu o procedimento.

Após a segunda extração se adicionou 3 mL de água destilada e 3 mL de clorofórmio no tubo contendo o sobrenadante e homogeneizou-se com auxílio do vortex.

A amostra foi armazenada em geladeira, ao abrigo de luz por 24h para a separação de fases observada na Figura 14. A fase do topo contendo metanol e água foi extraída e o restante foi transferido para um cadinho previamente seco em estufa a 105 °C por 2h. O cadinho foi levado a estufa e seco a 50°C por 24h. Após o esfriamento, o cadinho com o óleo foi pesado em balança analítica.

Figura 14 - Extração de lipídios



Fonte: Acervo do autor, 2020.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICA DO EFLUENTE

Os valores obtidos na caracterização do efluente de uma Indústria de produção de farinha de mandioca estão expressos na Tabela 5. Os parâmetros analisados foram: pH, nitrito (NO₂ - N), nitrato (NO₃ - N), fósforo total, sólidos totais (ST), sólidos dissolvidos (SD) e sólidos suspensos (SS).

Tabela 5 - Características físico-químicas da manipueira.

Parâmetros	Unidade	Valor obtido	Literatura ²
pH¹	-	4,05	4,41 - 4,6
Nitrito	mg.L ⁻¹	3,50	-
Nitrato	mg.L ⁻¹	75,00	18
Fosfato total	mg.L ⁻¹	12,50	259,5 - 700
Sólidos totais	mg.L ⁻¹	15880,00	1280 - 58000
Sólidos dissolvidos	mg.L ⁻¹	15560,00	-
Sólidos suspensos	mg.L ⁻¹	320,00	-

¹Potencial Hidrogeniônico. ²Valores mínimos e máximos de Silva (2009), Melo (2010), Novaes (2011), Correia *et al.* (2018).

Fonte: Autor, 2020.

O pH da manipueira se apresentou ácido e próximo a faixa encontrada na literatura. Segundo Correia *et al.* (2018), a acidez do efluente pode ser possivelmente ocasionada pela presença de ácido cianídrico no meio.

Entre os principais parâmetros físicos analisados para caracterização de águas naturais e efluentes são cor, turbidez, os variados níveis de sólidos, entre outros. Os sólidos em suspensão estão diretamente relacionados à turbidez da amostra e os sólidos dissolvidos estão associados à cor.

A concentração de sólidos totais encontra-se dentro dos valores relatados pela literatura. Segundo Silva (2009), a alta concentração de sólidos totais encontrada é causada pela presença de amido, sendo que 74% dos sólidos totais eram constituídos por sólidos voláteis. Os sólidos dissolvidos no efluente apesar de não serem

encontrados valores na literatura para comparação, apresentaram alta concentração (15560 mg L^{-1}). De acordo com Correia *et al.* (2018), a coloração amarelada da manipueira é ocasionada pela presença de sólidos dissolvidos, devido a presença de partículas e estado coloidal orgânico e inorgânico.

Quanto aos nutrientes, o valor obtido para fósforo total está bem abaixo da faixa encontrada na literatura, sendo obtido $12,5 \text{ mg.L}^{-1}$ e o menor valor apresentado ($259,5 \text{ mg.L}^{-1}$) foi relatado por Melo (2010). Já o valor obtido para nitrato (75 mg.L^{-1}) foi superior (18 mg.L^{-1}) ao reportado por Novaes (2011). A diferença nos valores obtidos com relação ao encontrado por outros autores evidencia a variação das características físicas e químicas da manipueira.

5.2 DETERMINAÇÃO DE CLORETOS EM ÁGUA DO MAR

A determinação de cloretos em água do mar foi necessária para se conhecer a salinidade da água utilizada nos cultivos. A concentração de cloretos obtida para água do mar, coletada no bairro Ponta de Baixo foi de $17,4 \text{ g. L}^{-1}$ de Cl.

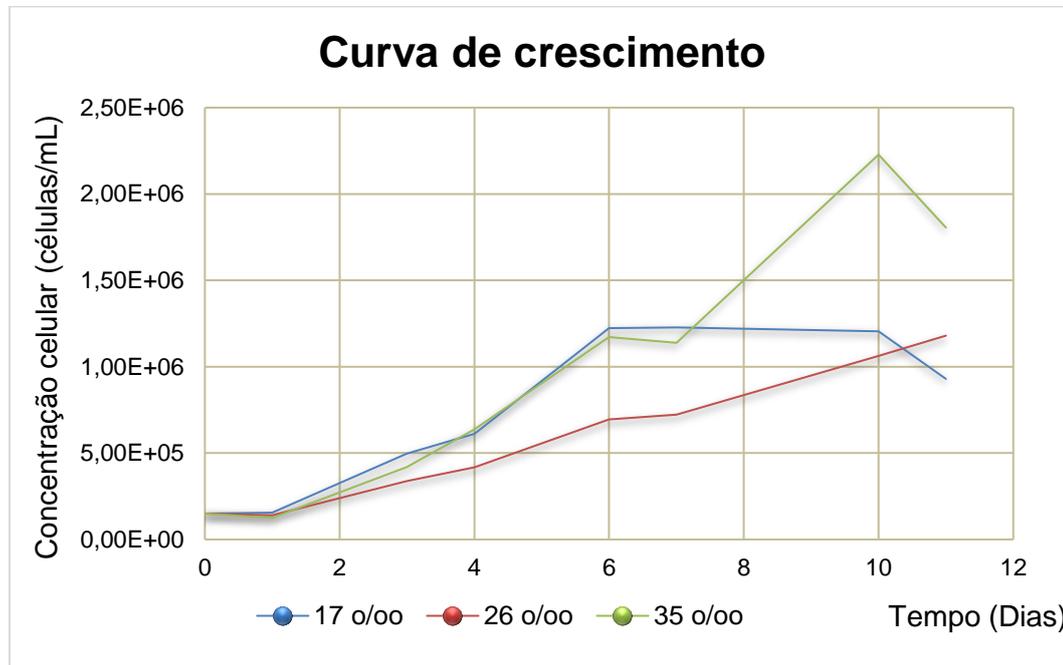
De acordo com Brandini (2008), a salinidade média dos oceanos é de 35 g.L^{-1} e pode variar de região para região. Em regiões costeiras a salinidade é geralmente menor devido a influência direta de rios, principalmente em regiões estuarinas onde ocorre a transição de habitats de água doce e marinhos. O valor obtido está abaixo da média encontrada em oceanos, assim a salinidade da água no ponto de coleta pode ser influenciada pela região, pois se caracteriza como zona costeira.

5.3 CULTIVOS EM DIFERENTES SALINIDADES

A curva de crescimento das microalgas foi expressa em concentração de células em função do tempo. De acordo com Lourenço (2006) a contagem de células é uma técnica simples para o monitoramento do crescimento das microalgas que podem variar de acordo com as condições de cultivo aplicadas.

Ainda segundo Lourenço (2006), o aumento na concentração de células durante o período de crescimento do cultivo é equivalente à biomassa. O gráfico 1 apresenta a densidade celular dos cultivos da microalga *Tetraselmis gracilis* para os meios com salinidade de 17 ‰ , 26 ‰ e 35 ‰ .

Gráfico 1 - Concentração de células da microalga *Tetraselmis gracilis* em função do tempo de cultivo para três diferentes salinidades



Fonte: Autor, 2020.

Entre o 1º e 2º dia de cultivo pode-se observar a fase de adaptação das células aos novos meios de cultivos que apresentam condições diferentes ao cultivo controle. É possível observar no Gráfico 1 o aumento no crescimento celular de forma sutil e semelhante para os diferentes meios.

A partir do terceiro dia de cultivo é possível observar o aumento na concentração celular caracterizando a fase de aceleração do crescimento. De acordo com Santos (2014), nesta fase as células já estão adaptadas aos meios e começam a se multiplicar. A partir da fase de aceleração do crescimento é possível observar a diferença no comportamento da microalga com relação as diferentes salinidades.

Do 4º ao 6º dia é possível observar para os três cultivos a fase de crescimento exponencial. De acordo com Santos (2014), esta fase é representada por uma reta inclinada. Os meios com salinidade de 17 ‰ e 35 ‰ apresentaram crescimento semelhante nesta fase, sendo o cultivo com 26 ‰ o que mais se difere, estando bem abaixo dos outros com relação ao crescimento celular.

Entre o 6º e 7º dia de cultivo, pode-se observar a fase linear de crescimento para os três cultivos, onde de acordo com Santos (2014) a velocidade

de reprodução das células é constante e no gráfico está representada por uma reta com inclinação menor que na fase de aceleração do crescimento devido a menor taxa de crescimento (fase estacionária).

Os meios com salinidade de 17 ‰ e 35 ‰ começaram a apresentar morte celular a partir do 11º de cultivo. De acordo com Santos (2014), a morte celular é causada pela deficiência de nutrientes no meio de cultivo. O cultivo com salinidade de 26 ‰ apresentou menor crescimento celular durante todo período de análise se comparado aos outros meios, porém apontou crescimento até o encerramento dos cultivos no 11º dia.

De modo geral, o meio com salinidade de 35 ‰ apresentou melhor crescimento seguido do meio com salinidade de 17 ‰, e o cultivo com salinidade de 26 ‰ foi o que apresentou menor concentração celular.

A biomassa produzida foi determinada após o 11º dia de cultivo, consecutivamente determinou-se o teor de lipídios na biomassa seca sendo os resultados apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 - Biomassa e teor de lipídios da espécie *Tetraselmis gracilis* para diferentes salinidades.

Salinidade (‰)	Biomassa (g.L ⁻¹)	Lipídios (%)
17	0,35	27,88
26	0,34	15,36
35	0,62	8,72

Fonte: Autor, 2020.

A quantidade de biomassa para as diferentes salinidades está de acordo com a concentração celular apresentada no Gráfico 1. Sendo a maior produtividade obtida para a salinidade de 35 ‰ (0,62 g/L), seguida pelo meio com salinidade de 17 ‰ (0,35 g/L) e por último 26 ‰ (0,34 g/L).

O comportamento da microalga *Tetraselmis gracilis* frente a diferentes salinidades e temperatura foi estudado por Sigaud e Aidar (1993), no qual se avaliou o crescimento da espécie em meios com salinidade de 0 a 40 ‰ e temperaturas de 11°C a 31 °C. Os resultados mostraram crescimento da microalga em cultivos com faixa de salinidade de 4 a 40 ‰ na faixa de temperatura de 11°C a 31°C. A taxa máxima de crescimento e rendimento da espécie foi encontrada em salinidade de 14 a 40 ‰.

O cultivo com a maior produção de biomassa foi o que apresentou o menor teor de lipídios sendo 8,72 % para o meio com salinidade de 35 ‰, o maior teor de lipídios foi observado no cultivo com salinidade de 17 ‰ sendo 27,88%.

Segundo Brennan e Owende (2010), é possível aumentar o teor de lípidos aplicando um meio de cultivo ideal para o crescimento da microalga, como as condições de luminosidade, temperatura, salinidade, disponibilidade de nitrogênio, entre outros fatores determinantes para o desenvolvimento da espécie.

O teor de lipídios obtido é superior ao encontrado no estudo feito por Soares (2010) no qual foi de 6,13%. O cultivo foi realizado em meio F/2 Guillard e foram aplicadas diferentes condições de cultivo. O meio foi exposto a 24h de luz através de 4 lâmpadas frias de 40 Watts, a temperatura foi mantida entre 18°C à 22°C e o cultivo teve duração de 8 dias. O estudo não aponta a salinidade do meio aplicado para o cultivo. O método aplicado para extração de lípidos foi o mesmo, sendo método Bligh e Dyer (1959).

O teor de lipídios encontrado no cultivo controle (27,88%) foi superior ao determinado por Santos *et al.* (2014) no estudo realizado para determinação dos teores de lipídio e proteína em grãos de soja no qual obteve em média 19,70% de teor de lipídio. O teor de lipídios presente na microalga *Tetraselmis gracilis* é um indicativo que a espécie pode ser uma matéria prima em potencial para a produção de biodiesel, pois além de apresentar quantidade de óleo próxima e superior à soja, de acordo com Gomes (2013), a produtividade por área é muito maior e o cultivo pode ser renovado em menor período de tempo.

Os resultados obtidos nesse estudo para a espécie *Tetraselmis gracilis* se diferem de outros já feitos, desta forma é possível verificar como as variáveis influenciam no comportamento e na produtividade do cultivo, devendo sempre buscar as condições que tornem a produção celular algal mais eficiente.

5.4 CULTIVOS EM MANIPUEIRA

Diversos estudos foram realizados visando o aproveitamento da manipueira devido a presença de grande quantidade de macro e micronutrientes. De acordo com Souza (2013), a manipueira pode ser utilizada como fonte de nutrientes para plantas, podendo ser aplicada para adubação e como completento na

alimentação animal. Além disso, pode ser utilizada para produção de biogás devido a grande quantidade de matéria orgânica, e outros.

Os meios de cultivo foram realizados com diferentes concentrações de manipueira com objetivo de encontrar a concentração ideal para o desenvolvimento da microalga *Tetraselmis gracilis*. Devido a grande quantidade de nitrogênio e fósforo foram realizados cultivos sem o meio F/2 Guillard com objetivo de avaliar a adaptação da microalga apenas com os nutrientes disponibilizados pela manipueira.

O cultivo controle da microalga *Tetraselmis gracilis* apresentou crescimento até aproximadamente o 12º dia porém os cultivos diluídos em efluente foram retirados no 9º dia pois alguns meios apresentaram declínio celular sendo possível visualizar na Figura 11 - B . Os cultivos foram divididos em aplicação da manipueira em meio de cultivo F/2 Guillard e manipueira em água do mar filtrada com salinidade 17 ‰.

Devido ao baixo valor de pH encontrado na caracterização da manipueira causado pela presença de ácido cianídrico, todos os meios tiveram o pH inicial ajustado para faixa de 6 a 7,5, com intuito de avaliar o crescimento com relação aos nutrientes presentes no meio, sem a aplicação de mais uma variável como a acidez do meio de cultivo.

A tabela 7 e 8 apresentam a quantidade de biomassa seca obtida até o 9º dia de cultivo, o pH inicial e final dos cultivos com diluição de manipueira sem meio F/2 Guillard e com diluição de manipueira em meio F/2 Guillard, respectivamente.

Tabela 7 - Biomassa e pH dos cultivos com diluição em manipueira em água do mar com salinidade de 17 ‰.

Ensaio	Manipueira/água do mar		
	10%	20%	40%
pH inicial	6,5	6,6	7,5
pH final	8,7	8,8	-
Biomassa (g/L)	0,301	0,582	-

Fonte: Autor, 2020.

Tabela 8 - Biomassa e pH dos cultivos com diluição em manipueira em meio F/2 Guillard

Ensaio	Manipueira/Meio F/2					
	5%	10%	15%	20%	25%	40%
pH inicial	6,1	7,2	6,1	6,6	6,1	7,4
pH final	8,0	8,7	8,4	8,8	-	-
Biomassa (g.L ⁻¹)	0,633	0,449	0,646	0,710	-	-

Fonte: Autor, 2020.

Segundo Borghetti (2009), o pH da água está diretamente associado a forma como o CO₂ encontra-se disponível no meio. O aumento do pH no cultivo ocorre devido ao consumo de CO₂ na forma de HCO₃⁻¹ sendo indicativo de crescimento das microalgas (SANTOS, 2016). Nas tabelas 7 e 8 é possível observar o aumento significativo do pH inicial para o pH final determinado no 9º (último) dia de cultivo, apontando crescimento celular.

A quantidade de biomassa seca e o pH dos cultivos não foram determinados para as diluições de 25% e 40% de efluente, pois apresentaram morte celular. Na Figura 11 - B é possível observar que o cultivo contendo 25% de manipueira apresentou branqueamento na coloração caracterizando a morte celular.

O cultivo contendo o meio F/2 Guillard e 20% de manipueira foi o que apresentou maior quantidade de biomassa seca (0,71 g/L). Observa-se que os valores obtidos para respectivas diluições utilizando o meio F/2 Guillard são superiores ao dos cultivos com água do mar. Sendo assim os cultivos com maior disponibilidade de nutrientes foram aqueles que apresentaram maior quantidade de biomassa seca. Os cultivos realizados com diluição de manipueira apresentaram quantidade de biomassa seca superior ou próximo ao valor obtido no cultivo controle (0,35 g/L).

Os cultivos com diluição de 5%, 15% e 25% de manipueira em meio F/2 Guillard foram realizados após os ensaios com 10%, 20% e 40% de efluente, visando encontrar a concentração ideal de manipueira para o crescimento da microalga através da quantificação de biomassa seca. A tabela 9 apresenta os valores obtidos para biomassa e teor de lipídios do cultivo da espécie *Tetraselmis gracilis* em diluição de 5% e 15% de manipueira em meio F/2 Guillard.

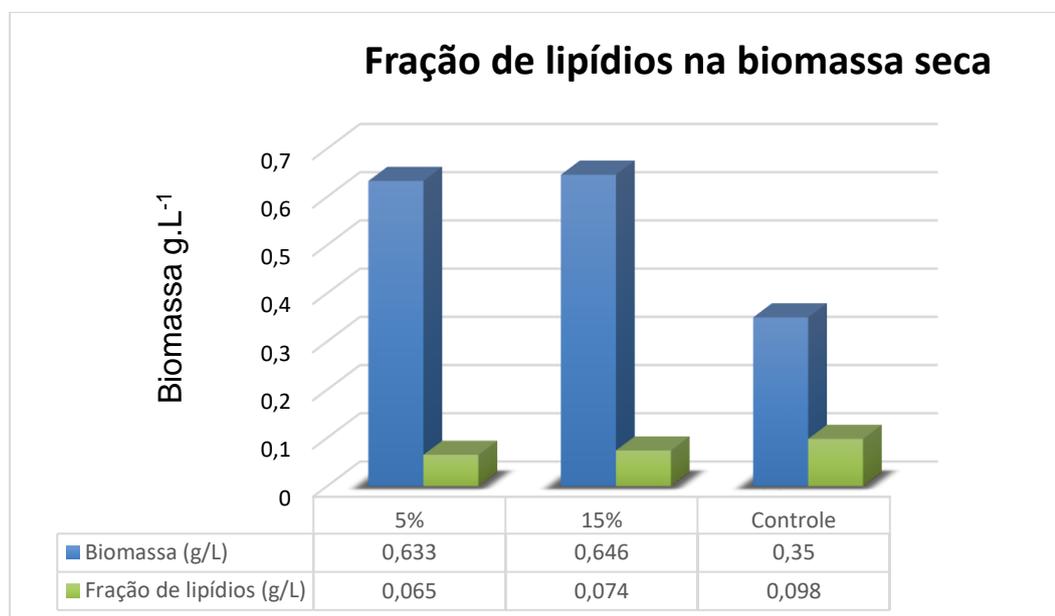
Tabela 9 - Biomassa e teor de lipídios da espécie *Tetraselmis gracilis* obtida em cultivos com diluição em manipueira em meio F/2.

Meio de cultivo	Biomassa (g.L ⁻¹)	Lipídios (%)
5% de manipueira	0,633	10,278
15% de manipueira	0,646	11,569
Controle	0,350	27,88

Fonte: Autor, 2020.

Analisando os valores apresentados na tabela 9, verifica-se que apesar da quantidade de biomassa seca obtida nos cultivos com manipueira ser superior ao cultivo controle, os teores de lípidos encontram-se abaixo do valor obtido no cultivo controle. A diferença no teor de lípidos também foi observada na variação de salinidade do meio cultivo, mostrando como a variação do meio pode modificar a composição bioquímica das microalgas.

Gráfico 2 - Fração lipídica presente na biomassa seca nos cultivos com diluição de manipueira.



Fonte: Autor, 2020.

A partir dos dados obtidos no estudo foi determinado quanto da biomassa seca é representada por lipídios (Gráfico 2), onde é possível verificar que apesar da quantidade de biomassa no cultivo controle ser inferior, a fração lipídica encontrada é consideravelmente maior comparada aos demais cultivos, principalmente entre o valor

obtido para o cultivo com 5% de manipueira que apresentou 0,065 g.L⁻¹ de lipídios em 0,633 g.L⁻¹ de biomassa seca. O cultivo com 15% de manipueira foi o que apresentou a fração lipídica mais próxima do cultivo controle. Desta forma, visando a produção de biodiesel o cultivo controle seria o mais adequado. Porém deve ser levado em consideração os custos do meio sintético usado nos cultivos em comparação com a diluição da manipueira no meio de cultura e conseqüente aproveitamento dos nutrientes.

Diversos estudos apontam como a disponibilidade de carbono, nitrogênio e fósforo influenciam na composição bioquímica das microalgas. De acordo com Gao *et al.* (2019), a baixa disponibilidade de nitrogênio no meio de cultivo causa o aumento do conteúdo lipídico e baixa produtividade de biomassa. Com o objetivo de verificar a influência da disponibilidade de nitrogênio, Macedo e Alegre (2001) realizaram um estudo aplicando três concentrações de nitrogênio no cultivo de *Spirulina maxima* sob duas variações de temperatura (25 e 35 °C) e verificaram uma maior produtividade lipídica em baixos teores de nitrogênio comparados ao cultivo proposto pela literatura. À temperatura de 25 °C, os cultivos com 0,2 g/L KNO₃ e 0,0 g/L KNO₃ apresentaram aumento médio de lipídios totais de 3,2 vezes e 3,1 vezes em relação ao cultivo com 2,5 g/L KNO₃. E à temperatura de 35 °C, os cultivos com 0,2 g/L KNO₃ e 0,0 g/L KNO₃ apresentaram aumento médio de lipídios totais de 2,8 vezes e 2,7 vezes em comparação com o cultivo com 2,5 g/L KNO₃.

A disponibilidade de nitrogênio foi diferente para todos os meios estudados. Os cultivos realizados com diluição em manipueira apresentaram maior concentração de nutrientes como nitrogênio, carbono e fósforo, comparados ao cultivo controle realizado apenas com meio F/2 Guillard. Os resultados apresentados na tabela 9 mostram que o meio de cultivo controle que conteve o menor teor de nitrogênio foi o que apresentou maior teor de lipídios (27,88%) e menor quantidade de biomassa (0,35 g.L⁻¹). De qualquer maneira, o uso de manipueira no cultivo microalgal demonstrou que a microalga *Tetraselmis gracilis* é capaz de sintetizar lipídio com uma produtividade celular comparada com dados encontrados na literatura.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O crescimento e a composição bioquímica das microalgas variam de acordo com o meio de cultura e as variáveis aplicadas no meio de cultivo. No presente estudo a microalga *Tetraselmis gracilis* apresentou quantidades distintas de biomassa seca e teor lipídios quando submetida à diferentes condições de cultivo, desde aplicação de meios com diferentes salinidades à diluição com manipueira. Desta forma, verificou-se como as variáveis influenciaram no comportamento algal e produtividade celular nos cultivos, devendo sempre buscar condições que tornem a produção celular algal mais eficiente.

Nos cultivos com diferentes salinidades a espécie *Tetraselmis gracilis* apresentou maior quantidade de biomassa seca no meio com salinidade de 35 ‰, o valor encontrado para biomassa foi compatível a curva de crescimento que apontou maior concentração de células compara aos demais cultivos. Porém o teor de lipídios obtido foi o menor (8,72%) entre os meios estudados.

Desta forma, visando a produção de lipídios, o meio de cultivo ideal para a espécie *Tetraselmis gracilis* é a aplicação do meio F/2 Guillard modificadodiluído em água do mar com salinidade natural de aproximadamente 17 ‰, no qual o teor de lipídios foi de 27,88% na biomassa seca.

Os cultivos com diluição em manipueira apresentaram quantidade de biomassa seca e teor de lipídios diferentes. A diluição realizada com 20% de manipueira apresentou um aumento significativo na quantidade de biomassa produzida para o meio com F/2 apresentando 0,71 g.L⁻¹, sendo superior ao valor encontrado para o cultivo controle (0,350 g.L⁻¹). Sendo assim, a quantidade de nutrientes que constituíram os meios de cultivo foi um fator determinante no crescimento da microalga.

Os cultivos realizados com 5% e 15% de manipueira em meio F/2 apresentaram quase o dobro de biomassa seca se comparados ao cultivo controle. Apesar da quantidade de biomassa ser superior, a produtividade lipídica foi menor, representando uma fração menor na biomassa seca dos cultivos.

Quando se tem o objetivo a produção de biodiesel, o cultivo controle seria o mais adequado, mas nestes casos é importante levar em consideração os custos do meio de cultivo sintético usado em comparação com a diluição da manipueira no

meio de cultura e conseqüente aproveitamento dos nutrientes. Deve-se também considerar o quantitativo de biomassa produzida em virtude das várias aplicações da biomassa algal, como na possível produção de bioetanol.

7 TRABALHOS FUTUROS

Para ter um entendimento mais abrangente do comportamento da microalga *Tetraselmis gracilis*, os seguintes estudos são sugeridos:

- Realizar cultivos usando concentrações de manipueira com água do mar sob diferentes variáveis, como temperatura, pH, luminosidade e aeração;
- Realizar cultivos usando diferentes concentrações de manipueira com água do mar e avaliar a biomassa e lipídios;
- Determinar a concentração de ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poli-insaturados da fração lipídica;
- Analisar as características físico-químicas no líquido após o cultivo das microalgas para avaliar a capacidade de remoção dos compostos poluidores como nitrato, nitrito e fósforo.

REFERÊNCIAS

AIDAR, E., GIANESELLA-GALVÃO, S. M. F., SIGAUD, T. C. S., ASANO, C. S., LIANG, T. H., REZENDE, K. R. V., SANDES, M. A. L. Effects of light quality on growth, biochemical composition and photo synthetic production in *Cyclotella caspia* Grunow and *Tetraselmis gracilis* (Kyllin) Butcher. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 180, n. 2, p. 175–187, 1994.

AMINI, M., YOUNESI, H., ZINATIZADEH LORESTANI, A.A., NAJAFPOUR, G. Determination of optimum conditions for dairy wastewater treatment in UAASB reactor for removal of nutrients, **Bioresource Technology**, v. 145, p. 71-79, 2013.

ANDRADE, Diva S., FILHO, Arnaldo C. Microalgas das águas continentais: produção de biomassa e coprodutos. **Londrina: IAPAR**, v. 2, 2014.

ANDRADE, L. M. **Produção de microalgas e caracterização de sua composição protéica e lipídica via espectrometria de massas**. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

ANDRADE, J. A.; AUGUSTO, F.; JARDIM, I. C. S. F. Biorremediação de Solos Contaminados por Petróleo e seus Derivados. **Eclética Química**, São Paulo, v. 35, n. 3, p. 17-43, 2010.

ANGELO, Elisangela A.; ANDRADE, Diva S.; FILHO, Arnaldo C. Cultivo não-fotoautotrófico de microalgas: uma visão geral. **Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 35, n. 2, p. 115-134, 2014.

APHA. **Standard methods for examination of water and wastewater**. 21. ed. Washington: American Water Works Association, 2005.

ASMA, V., MATHEW, K. Uptake of an organochlorine insecticide by a microalga *Tetraselmis gracilis*. **Indian Journal of Fisheries**, v. 48, n. 1, p. 49-53, 2001.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 9800: Critérios para lançamento de efluentes líquidos industriais no sistema coletor público de esgoto sanitário**. Rio de Janeiro, 1987.

AZZOLINI, J.C.; FABRO, L.F. **Monitoramento da eficiência do sistema de tratamento de efluentes de um laticínio da região Meio Oeste de Santa Catarina**. Unoesc & Ciência - ACET, Joaçaba, v.4, n.1, p.43-60, 2013.

BASTOS, R.G.; BONINI, M. A. Produção de biomassa de microalgas a partir de cultivo mixotrófico em acetato. **Revista Ciência, tecnologia & ambiente**, v. 4, n. 1 p. 38-44, 2017.

BAUMGARTNER, Tatiana R. da S.; BURAK, Jorge A. M.; KOGIKOSKI, Marta E.; SEBASTIEN, Nyamien Y.; ARROYO, Pedro A. Avaliação da produtividade da microalga *Scenedesmus acuminatus* (Lagerheim) Chodat em diferentes meios de

cultivo. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 11, n. 2, p. 250-255, abr. 2013.

BEN-AMORTZ, A., POLLE, J.E. W., RAO, D. V.S. **The Alga Dunaliella: Biodiversity, physiology, genomics and biotechnology**. Science Publishers. ed 1. p. 189-190. 2009.

BERGMAN, B., SANDH, G., Lin, S., LARSSON, J., CARPENTER, E.J. *Trichodesmium*—a widespread marine cyanobacterium with unusual nitrogen fixation properties. **FEMS Microbiology Reviews**, v.37, p. 286–302, 2013.

BEWICKE, Dhyana; POTTER, Beverly A. et al. **Chlorella: the emerald food**. Berkeley, 1984.

BIOMEDICINA PADRAO. Disponível em: <<https://www.biomedicinapadrao.com.br/2013/10/conhecendo-camara-de-neubauer.html>> Acesso em 01 de julho de 2020.

BLIGH, E. G; AND DYER, W.J. A rapid method of total lipid extracion and purification. **Cann. J. biochem. Phy.**, v 37, n. 8, p. 911-917, 1959.

BORGES, N. B. **Estudo sobre os processos de coagulação, floculação e decantação em efluentes oriundos de usina canavieira**. Tese (Doutorado em Ciências: Engenharia Hidráulica e Saneamento). Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.

BORGHETTI, Ivo Alberto. **Avaliação do crescimento da microalga *Chlorella minutíssima* em meio de cultura com diferentes concentrações de manipueira**. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, 104p., 2009.

BOROWITZKA, M. A. Biology of Microalgae. **Microalgae in Health and Disease Prevention**, p. 23–72, 2018.

BOROWITZKA, M. A. 2016. Systematics, Taxonomy and Species Names: Do They Matter? **The Physiology of Microalgae**, 655–681, 2016.

BRANDINI, Frederico. **Eco – A salinização costeira**. 2008. Disponível em:< <https://www.oeco.org.br/colunas/frederico-brandini/19110-oeco-d2-28680/>> Acesso em 01 de julho de 2020.

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, n. 2, p. 557-577, 2010.

BUTCHER, R.W. **An introductory account of the smaller algae of British coastal waters**. Part I: Introduction and Chlorophyceae. Fisheries Investigations, London, p. 67, 1959.

CASSONI, V.; CEREDA, M. P. Avaliação do processo de fermentação acética da manipueira. **Energia na Agricultura**, v. 26, n. 4, p. 101-113, 2011.

CANDIDO, C., & LOMBARDI, A. T. Mixotrophy in green microalgae grown on an organic and nutrient rich waste. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 36, n. 2, 2020.

CARDOSO, J.M.P. **Influência duma indústria de laticínios num processo global de tratamento de água**. 2013. 109f. Dissertação (Mestrado em Qualidade e Segurança Alimentar) - Instituto Politécnico de Bragança, Bragança, 2013.

CAVALCANTE, A. K.; SOUSA, L. B.; HAMAWAKI, O. T. Determinação e avaliação do teor de óleo em sementes de soja pelos métodos de ressonância agnética nuclear e soxhlet. **Biosci.** v. 27, n. 1, p. 8-15, 2011.

CAVALCANTE DE AMORIM, Miriam Cleide. **Estudos de caracterização, biodegradabilidade e tratamento de manipueira proveniente de casas de farinha**. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2015.

CEREDA, M. P. **Manejo, uso e tratamento de subprodutos da industrialização da mandioca**. 1.ed. São Paulo: Fundação Cargill, 2001. 320p.

CEREDA, M. P. **Tecnologia, usos e potencialidades de tuberosas amiláceas Latino Americanas**. São Paulo: Fundação Cargill, v. 2, 2002.

CHISTÉ, R. C., COHEN, K. de O., MATHIAS, E. de A., & OLIVEIRA, S. S. Quantificação de cianeto total nas etapas de processamento das farinhas de mandioca dos grupos seca e d'água. **Acta Amazonica**, v. 40, n. 1, 221–226, 2010.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 3, p. 294–306, 2007.

CHISTI, Y. Constraints to commercialization of algal fuels. **Journal of Biotechnology**. 167, 201–214. 2013.

CHISTI, Y. Microalgae: our marine forests. **Biotechnology Advances**, v. 22, n. 7, p. 565-566, 2004.

CHRÉTIENNOT-DINET, M.-J., COURTIES, C., VAQUER, A., NEVEUX, J., CLAUSTRE, H., LAUTIER, J., & MACHADO, M. C. A new marine picoeucaryote: *Ostreococcus tauri* gen. et sp. nov. (*Chlorophyta, Prasinophyceae*). **Phycologia**, v. 34, n. 4, p. 285–292, 1995.

CRAPEZ, M.A.C.; BORGES, A. L. N.; BISPO, M. G. S.; PEREIRA, D. C. **Biorremediação: tratamento para derrames de petróleo**. Ciência Hoje, Rio de Janeiro, v. 30, n. 179, p. 32-37, 2002

CORREIA, Igor A.; SCANDELAI, Ana Paula J.; SILVA, Nadine C. B.; SOUZA, Alexandre T. de S. Caracterização da manipueira e possibilidades de tratamento. **Colloquium Exactarum**, v. 10, n. Especial, p. 180-185, 2018.

COSTA, Ana Paula Javaroti da; SILVA, André Luis da; MARTINS, Reinaldo dos Santos. Um estudo sobre estações de tratamento de efluentes industriais e sanitários da empresa Dori Alimentos LTDA.1. **Regrad: Revista de Graduação UNIVEM**, Marília, v. 1, n. 2, p.6-22, 2009.

DELABARY, Gabriela S. **Avaliação do crescimento de três microalgas para a remoção de nutrientes de efluente de estação de tratamento de dejetos suínos**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

DÓSEA, R. R.; MARCELLINI, P. S.; SANTOS, A. A.; RAMOS, A. L. D.; LIMA, A. S.; Qualidade microbiológica na obtenção de farinha e fécula de mandioca em unidades tradicionais e modelo. **Ciência Rural**, v.40, n.2, p.441-446, 2010.

DUARTE, Anamaria de S. et al. Uso de diferentes doses de manipueira na cultura da alface em substituição à adubação mineral. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 16, n. 3, p.262-267, maio 2011.

EMBRAPA. **Mandioca: o produtor pergunta, a Embrapa responde**. 2 ed., 2006.

EMBRAPA AGROENERGIA. Microalgas. **Agroenergia em revista**, ano IV, n. 10, 2016.

FRANCO, A. L. C.; LÔBO, I. P.; CRUZ, R. S. Biodiesel de microalgas: avanços e desafios. **Química Nova**, v. 36, n. 3, p. 437-448; 2013.

FIORETTO, R. A. Uso direto da manipueira em fertirrigação. In: CEREDA, M. P. (Coord.) **Manejo, uso e tratamento de subprodutos da industrialização da mandioca**. São Paulo: Fundação Cargill, v. 4, 320p. 2001.

FOWLER, D., COYLE, M., SKIBA, U., SUTTON, M.A., CAPE, J.N., REIS, S., SHEPPARD, L.J., JENKINS, A., GRIZZETTI, B., GALLOWAY, J.N., VITOUSEK, P., LEACH, A., BOUWMAN, A.F., BUTTERBACH-BAHL, K., DENTENER, F., STEVENSON, D., AMANN, M., VOSS, M. The global nitrogen cycle in the twenty-first century. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 368, 2013.

GAO, Feng *et al.* Effect of organic carbon to nitrogen ratio in wastewater on growth, nutrient uptake and lipid accumulation of a mixotrophic microalgae *Chlorella* sp. **Bioresource Technology**, v. 282, p. 118-124, 2019.

GOMES, Anderson Fernandes. **Extração e análise da fração lipídica da microalga *monoraphidium* sp., síntese e caracterização do seu biodiesel**. Dissertação (Mestrado em Físico-Química; Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 82p., 2013.

GORGÔNIO, Cristiane M. da S., ARANDA, Donato A. G., COURI, Sônia. Morphological and chemical aspects of *Chorella pyrenoidosa*, *Dunaliella tertiolecta*, *Isochrvisis galbana* and *Tetraselmis gracilis* microalgae. **Natural Science**, v. 5, n. 7, 2013.

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. **Journal of the American Oil Chemist's Society**, Berlin, v. 7, p. 703-26, 2010.

GUIRY, M.D; Guiry G. M. *Tetraselmis gracilis*. AlgaeBase, 2017. Disponível: <<https://www.algaebase.org>>. Acesso em: 22 jan. 2020.

HAKALIN, Neumara L. S. **Otimização das condições de cultivo da microalga *Scenedesmus sp.* para a produção de biodiesel**. Tese de Doutorado – Universidade de Brasília, Instituto de Ciências Biológicas, Brasília, 2014.

HARUN, Razif; SINGH, Manjinder; FORDE, Gareth M. et al. Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. Austrália, v.14, p.1037–1047, 2010.

IMHOFF, K. R.; IMHOFF, K. **Manual de tratamento de águas residuárias**. Editora Edgard Blucher. São Paulo, 1996.

JEONG, H. J.; YOO, Y. D.; KIM, J. S.; SEONG, K. A.; KIM, T. H. Growth, feeding and ecological roles of the mixotrophic and heterotrophic dinoflagellates in marine planktonic food webs. **Ocean Science Journal**, Ansan, v. 45, n. 2, p. 65-91, 2010.

KIM, S. K.; WIJESEKARA, I. **Development and biological activities of marine-derived bioactive peptides: A review**. Journal of Functional Foods, 2010.

LAVENS, P.; SORGELOOS, P. Manual on the production and use of life food for aquaculture. **FAO Fisheries Technical Paper**., v. 361, Rome, 1996, 295p.

LEE RE. **Phycology**. Nova York: Cambridge University Press, 1980.

LIMA, Urgel de Almeida. **Biotecnologia Industrial - Processos fermentados e enzimáticos**. v. 3, ed. Blucher, 2019. 760p.

LOPES, Thiago S. de A.; SILVA, André L. A. da S.; SILVA, Andreia F.; DANTAS, Gabriely D.; FERREIRA, Weruska B. Estudo do potencial de geração de biocombustíveis líquidos a partir de microalgas: Utilização de efluentes agroindustriais e domésticos no desenvolvimento da *Chlorella sp.* **Revista Ciência e Tecnologia**, v. 18, n. 33, p. 25-36, 2015.

LOURENÇO, S. O. Cultivo de microalgas marinhas- princípios e aplicações. Rima: São Carlos, 2006.

LOURENÇO, S. O., MARQUEZ, U. M. L., MANCINI-FILHO, J., BARBARINO, E., and AIDAR, E. Changes in biochemical profile of *Tetraselmis gracilis* I. Comparison of two culture media. **Aquaculture**, v. 148, ed. 2-3, p. 153–168, 1997.

LÚCIO, M. J. **Cultivo de microalgas *chlorella vulgaris* com efluente doméstico como meio de cultura alternativo**. TCC (Graduação em Engenharia Sanitária e Ambiental). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.

MACEDO, Ricardo Verthein Tavares de; ALEGRE, Ranulfo Monte. Influência do teor de nitrogênio no cultivo de Spirulina máxima em dois níveis de temperatura: Parte II: Produção de lipídios. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 21, n. 2, p. 183-186, 2001.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brok**. 10 ed. São Paulo; p. 608, 2004.

MANCUSO, PEDRO C. S.; SANTOS, F. **Reúso da água**. 3 ed. Barueri: Manuelie, 2003.

MARIANO, A. B.; RAMOS, L. P.; VARGAS, J. V. C; PULLIAN, R.; BALMANT, W.; MORAIS, K. C. C.; DZUMAN, M. J.; ARANTES, A. C. C. **Comparação de meios de cultivo autotróficos, mixotróficos e heterotróficos para produção de biomassa de microalga com foco em biocombustíveis e co-produtos**. 2010. Disponível em:<<https://pt.slideshare.net/andrebmariano/artigo-3-comparao-de-meios-de-cultivo-autotrficos-mixotrficos-e-heterotrficos-para-produo-de-biomassa-de-microalgas-com-foco-em-biocombustveis-e-coprodutos>> Acesso em 01, julho de 2020.

MARTINS, H. C. **Estudo sobre os processos de coagulação, floculação e decantação em efluentes oriundos de usina canavieira**. TCC (Graduação em Engenharia Ambiental). Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, 2014.

MELO, Vitor e S. **Eficiência da manipueira como quelatizante de zinco e seu efeito na nutrição mineral do feijoeiro (*phaseolus vulgaris l.*)**. Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas). Universidade Federal de Sergipe, São Cristovão, 2010.

METCALF, L.; EDDY, H. P. **Tratamento de Efluentes e Recuperação de Recursos**. 5ª ed. Ed: Mcgraw Hill, 2015.

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. 2010. **Cultivation of microalgae *Spirulina platensis* (*Arthrospira platensis*) from biological treatment of swine wastewater**. *Fd. Sci. and Technol.* 30 n.1. Campinas.

MITROVIC T.; LAZOVIC S.; NASTASIJEVIC B.; PASTI I. A.; VASIC V.; LAZAREVIC-PASTI T.; 2019. **Non-thermal plasma needle as an effective tool in dimethoate removal from water**. *J. of Environmental Management.* 246. 63-70.

MIYAWAKI, B. **Purificação de biogás através de cultivo de microalgas em resíduos agroindustriais**. 2014. 137 f. Tese (Mestrado em Engenharia e Ciência dos Materiais) Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

MOBIN, Saleh MA and FIROZ Alam. Some promising microalgal species for commercial applications - **A review Energy Procedia**, v. 110, p. 510-517, 2017.

MOLINA, E., MARTÍNEZ, E., SAÑCHEZ, S., GARCÍA, F., e CONTRERAS A. The influence of temperature and the initial N:P ratio on the growth of microalgae *Tetraselmis* sp. **Process Biochemistry**. v. 26, n. 3, p. 183-187, 1991.

MONTEIRO, I. J. A. **Estudo do efeito da salinidade e concentração de ferro no crescimento e conteúdo lipídico da estirpe de microalga CTP4**. Dissertação (Mestrado em Biologia Marinha). Universidade do Algarve, Faro, 2014.

MORAIS, Michele Greque de; VAZ, Bruna da S.; DE MORAIS, Etiele G.; Costa, Alberto V. Biologically Active Metabolites Synthesized by Microalgae. **BioMed Research International**, v. 2015, 15p., 2015.

MOUSSA, Ines D., CHTOUROU, H., KARRAY, F., SAYADI, S., DHOUIB, A., Nitrogen or phosphorus repletion strategies for enhancing lipid or carotenoid production from *Tetraselmis marina*, **Bioresource Technology**, v. 238, p. 325-332, 2017.

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.**, Lavras, v. 29, n. 6, p. 1132-1138, 2005.

MURATA, N.; TAKAHASHI, S.; NISHIYAMA, Y.; ALLAKHVERDIEV, S. I. Photoinhibition of photosystem II under environmental stress. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, v. 1767, p. 414–421, 2007.

NASELLI-FLORES, L.; and BARONE, Rossella. Green Algae. **Encyclopedia of Inland Waters**, v. 1, p. 166-173, 2009.

NORRIS, RE, HARI t. Floyd LG. **Revision of the genus *Tetraselmis*** (class Prasinophyceae), 1980.

NOVAES, Thaís A. C. **Fungos no tratamento de manipueira**. Dissertação – Mestrado. Centro de Ciências de Exatas e Tecnologia – Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Campo Grande – MS, 2011.

NÚCLEO DE PD DE ENERGIA SUSTENTÁVEL - NPDEAS. **Sala de Cultivo de Microalgas**, 2011. Disponível em: < <http://npdeas.blogspot.com/2013/03/sala-de-cultivo-de-microalgas-npdeas.html>> Acesso em 01 de julho de 2020.

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

ORTENZIO, Ygor Tadeu; AMARAL, Gustavo Garcia do; ALMEIDA, Sara dos Santos; OLIVEIRA, Eláiny Cristina A. Martins de. Cultivo de Microalgas utilizando resíduos agroindustriais para a produção de biocombustíveis: perspectivas e desafios. **Bioenergia em revista: diálogos**, ano 5, n. 1, p. 58-65, 2015.

PEREZ-GARCIA, O.; ESCALANTE, F. M. E.; DE-BASHAN, L. E.; BASHAN, Y. Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products. **Water Research**, Oxford, v. 45, n. 1, p. 11-36, 2011.

- RAVEN, J.A. Limits to growth. In: BOROWITZKA, M.A.; BOROWITZKA, L.J. (Eds). **Micro-algal biotechnology**. Cambridge: Cambridge University, p.331-356, 1988.
- RICHMOND, A. Handbook of the microalgal culture. Oxford, UK: **Blackwell Publishing**, p.3-19, 2004.
- RICHMOND, A.; HU, Q.; Eds. **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**: Wiley-Backwell, p. 588, ed. 2, 2013
- SALEH M.A. MOBIN, Harun Chowdhury, FIROZ Alam. Commercially important bioproducts from microalgae and their current applications – **A review Energy Procedia**, v. 160, p. 752-760, 2019.
- SANTOS, B. **Estratégias para aumentar a produtividade de biomassa de microalgas com carbono orgânico**. Dissertação (Mestre em Engenharia e Ciência dos Materiais) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2016.
- SANTOS, D. O. **Estudo do crescimento da microalga *Chlorella sp.*** Monografia (Bacharel em Engenharia Química) – Universidade de São Paulo, Escola de Engenharia de Lorena, Lorena, 2014.
- SANTOS, Weber F.; *et al.* Teores de lipídeo e proteína em grãos de soja visando aplicação industrial. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**. João Pessoa, v. 8, n. 3, p. 61-64, 2014.
- SATHASIVAM, Ramaraj *et al.* **Expressed sequence tag library of the marine green alga *Tetraselmis suecica*: a focus on stress-related genes formarine pollution**. **Journal Of Applied Phycology**, v. 30, n. 4, mar. 2018.
- SCHLUSAZ, M. **Avaliação da eficiência da estação de tratamento de efluentes (ete – ronda, ponta grossa – pr) através da análise de parâmetros físico-químicos**. TCC (Graduação em Engenharia Química). Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, 2014.
- SCHMITZ, Roberta; MAGRO, Clinei Dal; COLLA, Luciane M. 48 APLICAÇÕES AMBIENTAIS DE MICROALGAS ENVIRONMENTAL APPLICATIONS OF MICROALGAE, **Revista CIATEC – UPF**, v. 4, n. 1, p. 48-60, 2012.
- SELVAKUMAR, P., UMADEVI, K. Enhanced lipid and fatty acid content under photoheterotrophic condition in the mass cultures of *Tetraselmis gracilis* and *Platymonas convolutae*. **Algal Research**, v. 6, p. 180–185. 2014.
- SILVA, João de L. **Desempenho do Reator Anaeróbio Horizontal com Chicanas no tratamento da manipueira em fases separadas e estabilização do pH com conchas de sururu**. Dissertação (Mestre em Recursos Hídricos e Saneamento). Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2009.

SINHORA, Vanderleia. **Separação de biomassa microalgal gerada no tratamento de efluente**. 2014. 60 f. TCC (Graduação) - Curso de Engenharia Ambiental e Sanitária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2014.

SOARES, D. **Avaliação do crescimento celular e da produtividade de lipídeos de microalgas marinhas em diferentes regimes de cultivo**. Dissertação (Mestrado em Ciências – Bioquímica) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

SOARES, Lucas Ferrari Granado. **Microalgas na Produção de Biodiesel: Extração e Composição Lipídica**. Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2010. Disponível em: <<https://repositorio.unesp.br/handle/11449/121348>> Acesso em 01 de julho de 2020.

SOARES, Maria Isonilde. **Cultivo da microalga marinha *Tetraselmis gracilis*, em laboratório - Extração e purificação de polissacarídeos sulfatados**. 2007. 43 f. TCC (Graduação) – Curso de Engenheiro de Pesca, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.

SOUZA, Luana dos S. **Caracterização morfofisiológica, produção de lipídios e carotenóides em diferentes condições de cultivo de duas microalgas com potencial biotecnológico**. Tese (Doutorado em Biotecnologia e Biociências). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.

SOUZA, Shenia de O. **Avaliação do impacto ambiental em mananciais causado pelo descarte indiscriminado de manipueira visando a preservação do ambiente aquático no semiárido alagoano**. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal de Alagoas, Instituto de Química e Biotecnologia, 2013.

TAHER, D. M. **Biodiesel de microalgas cultivadas em dejetos suíno biodigeridos**. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência dos Materiais). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

THOMPSON, P. A. GUO, M. HARRISON, P. J. Effects of variation in temperature: On the biochemical composition of eight species of marine phytoplankton. **Journal of Phycology**, v. 28, p. 481-488, 1992.

TORRES, Helenice S. de Jesus. **Cultivo de microalgas em efluente de tratamento anaeróbico de esgoto**. Tese (Doutorado em Engenharia Ambiental). Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2014.

VIÊGAS, C.V. **Extração e caracterização dos lipídeos da microalga *Chlorella pyrenoidosa* visando à produção de ésteres graxos**. 2010. Dissertação (Mestrado). Rio Grande: Universidade Federal do Rio Grande, 2010.

VON SPERLING, M. **Princípios do tratamento biológico de águas residuárias – Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos**. Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental - UFMG. Belo Horizonte, v. 1, 240 p., 1995.

ZY, W.; JIANG, Y.; CHEN, F.; Heterotrophic production of eicosapentaenoic acid by microalgae. **Biotechnology Advances**, v. 21, n. 4, p. 273-294, 2003.

Walker TL, Purton S, Becker DK, Collet C. Microalgae as bioreactor. **Plant Cell Reports**, v. 24, p. 629–641, 2005.

WOSIACKI, G.; CEREDA, M. P. Valorização de resíduos do processamento de mandioca. **Exact and Soil Sciences, Agrarian S. and Engineering**. v. 8, n. 1, 27-43, 2002.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Artigo apresentado no ENSUS 2020 - VIII Encontro de sustentabilidade em projeto

Influência da Salinidade na Produção de Biomassa e de Lipídios Durante o Cultivo das Microalgas *Tetraselmis gracilis* e *Phaeodactylum tricornutum*

Influence of Salinity on Biomass and Lipid Production During the Cultivation of Microalgae *Tetraselmis gracilis* and *Phaeodactylum tricornutum*

Jéssica Reis Felizardo, graduanda, UNISUL

jessicareisfelizardo@gmail.com

Vinícius José Coelho, graduando, UNISUL

Vjc.coelho@gmail.com

Ângelo P. Matos, doutor, UNISUL

angelosotam@gmail.com

Elisa Helena Siegel Moecke, doutora, UNISUL

elisa.moecke@unisul.br

RESUMO

As microalgas são organismos fotossintetizantes que apresentam diversas aplicações econômicas, como utilização na alimentação humana, animal e na produção de biocombustíveis devido a sua biomassa rica em subprodutos. O presente estudo teve como objetivo avaliar a produtividade das espécies *Tetraselmis gracilis* e *Phaeodactylum tricornutum* frente as salinidades de 17 ‰, 26 ‰ e 35 ‰, aplicadas nos meios de cultivo. Os cultivos foram realizados em meio F/2 Guillard modificado utilizando água do mar filtrada com salinidade natural de 17 ‰. A densidade celular dos cultivos foi monitorada através da contagem de células, a biomassa e o teor de lipídios foram obtidos na fase estacionária dos cultivos. Os cultivos com maior produtividade de biomassa foram os que apresentaram menor teor de lipídios da biomassa seca. Desta forma, visando a produção de lipídios a salinidade ideal para espécie *Tetraselmis gracilis* é de 17 ‰ com teor de lipídios de 27,88% e para a espécie *Phaeodactylum tricornutum* seria aplicável 26 ‰ pois apresentou 12,26%.

Palavras-chave: Microalgas marinhas; Lipídios; Biomassa

Abstract

*Microalgae are photosynthetic organisms that have several economic applications, such as the use in human and animal food and in the production of biofuels due to their biomass rich in by-products. The present study aimed to evaluate the species *Tetraselmis gracilis* and *Phaeodactylum tricornutum* front as salinities of 17‰, 26‰ and 35‰ use in the culture media. Cultures were carried out in modified F/2 Guillard medium using filtered seawater with natural salinity of 17 ‰. The cell density of the cultures was monitored by counting cells, the biomass and the lipid content were obtained in the stationary phase of the cultures. The cultures with the highest biomass productivity were those with the lowest lipid content in dry biomass. Thus, aiming at the production of lipids, the ideal salinity for the species *Tetraselmis gracilis* is 17 ‰ with a lipid content of 27,88% and for the species *Phaeodactylum tricornutum* it would be applicable 26 ‰ because it presented 12,26%.*

Keywords: *Marine microalgae; Lipids; Biomass*

1. INTRODUÇÃO

As microalgas pertencem ao grupo de microrganismos fotossintéticos unicelulares apresentam alta versatilidade, incluindo espécies de diferentes nichos ecológicos que com uma variedade de caminhos para sintetizar um amplo espectro de compostos bioativos (PERIN, 2020). São produtores primários e representam uma grande quantidade de biomassa aquática (ALSTERBERG et al., 2013). Apresentam grande importância na produção e no equilíbrio do oxigênio dissolvido em ambientes aquáticos.

A classificação taxonômica é muito extensa devido à grande diversidade de espécies. Esta se baseia nas características da microalga, como a estrutura da parede celular, o tamanho, mobilidade e quanto a existência e tipos de pigmentos (MADIGAN *et al.*, 2004), a coloração se dá devido aos pigmentos acessórios e fotossintéticos (OLAIZOLA, 2003).

O cultivo de microalgas é vantajoso devido a produção de biomassa rica em subprodutos de valor agregado. A biomassa produzida possui diversas aplicações, como o uso para alimentação humana e animal, possui grande quantidade de proteínas e carboidratos (CHISTI, 2013), pode ser utilizada como fertilizante, além da produção de pigmentos e lipídeos, sendo assim uma fonte para a produção de biocombustíveis (ANDRADE e FILHO, 2014).

O crescente desenvolvimento de tecnologias para a produção de biocombustíveis tem como enfoque causas socioeconômicas e ambientais que visam diminuir o presente conflito no setor alimentício (FERRERO, 2011) tendo em vista que a principal matéria prima utilizada na produção de biodiesel é o óleo de soja (BRASIL, 2014). São diversas as matérias primas utilizadas para a produção do biodiesel, incluindo óleos vegetais, gorduras animais e até óleos provenientes de fritura (AHMAD, 2011). Várias espécies de microalgas possuem grande quantidade de lipídios em sua composição sendo possível o aproveitamento da biomassa para a produção de biodiesel (FERRERO, 2011).

A produção de biodiesel através dos cultivos de microalga, embora seja uma prática nova, apresenta diversas vantagens nas quais destacam-se a existência de espécies com elevada concentração de lipídios (ANDRADE e FILHO, 2014) os cultivos não afetam a produção das agriculturas tradicionais (DEFANTI *et al.* 2010), as microalgas são organismos capazes de se adaptar e tolerar os mais variados ambientes (MATA *et al.* 2010; RICHMOND, 1990), os cultivos podem ser realizados em sistemas fechados sendo possível o controle de temperatura e luminosidade (FERRERO, 2011). Muitas espécies de microalgas crescem de forma mais acelerada quando comparadas com plantas terrestres proporcionando maior produtividade de biomassa (RICHMOND, 1990).

O desenvolvimento dos cultivos de microalga ocorre através da interação do organismo com as condições físicas, químicas e biológicas do meio (DERNER *et al.* 2006; RAVEN, 1988). As condições biológicas referem-se ao próprio metabolismo da espécie cultivada, além da possível interação de outros organismos com a microalga, quanto as condições físico-químicas destacam-se a luminosidade, salinidade, temperatura e concentração de nutrientes no meio (GUILLARD, 1975).

As condições ideais de cultivo variam muito devido a diversidade de espécies, de acordo com Borowitzka (1999), as microalgas podem ser cultivadas em variados sistemas de

produção sendo possível variar desde pequenos volumes até bilhões de litros. Os cultivos podem ser produzidos sob condições naturais de temperatura e luminosidade sendo denominado de sistema aberto, bem como podem ser realizados em sistemas fechados no qual é possível o controle das variáveis externas provocando elevada produtividade (TREDICI *et al.*, 2008).

Em busca da maior produtividade da microalga diferentes meios de cultivo têm sido desenvolvidos. Tanto em condições laboratoriais quanto sistemas abertos de grande produção as condições físico-químicas são de extrema importância para o metabolismo da microalga (LOURENÇO *et al.* 1996). Os meios de cultura convencionais, por exemplo, f/2 (GUILLARD e RYTHER, 1962) podem limitar a produção devido ao alto custo de nutrientes aplicados nos cultivos. Segundo Sipaúba-Tavares (1995), um dos maiores problemas na produção dos cultivos é o custo com os reagentes químicos necessários para o preparo dos meios de cultura. Tendo em vista as condições econômicas e as necessidades nutricionais das microalgas se faz necessária pesquisas que tornem os cultivos mais eficientes (SIPAÚBA-TAVARES e ROCHA, 2001).

O gênero *Tetraselmis* são microalgas algas verdes unicelulares marinhas pertencente ao filo Clhlophyta, amplamente encontradas em águas costeiras e ambientes de transição entre rio e mar (GUIRY M.D e GUIRY GM, 2017). Segundo Norris *et al.* (1980), as algas apresentam tamanho entre 10 e 20 μm , possuem forma elipsoide e ovoide, suas células são individuais e móveis. De acordo com Butcher (1959) esta microalga foi encontrada pela primeira vez em valas e poças em pântanos com salinidades que variavam de 12‰ à 25‰. Por décadas as microalgas do gênero *Tetraselmis* tem sido utilizada para alimentação na aquicultura devido à presença em quantidades significativas de ácidos graxos poli-insaturados e por possuírem a capacidade de se adaptar em diferentes meios de cultivo e condições ambientais (SELVAKUMAR e UMADEVI, 2014).

A *Phaeodactylum tricornutum* é uma espécie de diatomácea pleomórfica encontrada principalmente em áreas costeiras com grandes oscilações de salinidade, pode apresentar três morfotipos que são estimulados pelos fatores ambientais no qual estão expostas (MARTINO, 2007). Segundo Cui *et al.* (2019), alguns fatores podem afetar crescimento e a composição lipídica da microalga, pode-se citar a salinidade do meio, pH, fotoperíodo e temperatura. De acordo com Krabs e Buchel (2011), a espécie é capaz de se desenvolver em ambientes hipo e hipersalinos, com salinidade do meio entre 5 ‰ à 70 ‰, além de apresentar crescimento acelerado em temperaturas entre 12 °C à 24°C. A sua aplicação na aquicultura e em produtos alimentícios é crescente devido à presença de gorduras poli- insaturadas, ômega 3 e carotenoides (RYCKEBOSCH *et al.*, 2011).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a produtividade das microalgas *Tetraselmis gracilis* e *Phaeodactylum tricornutum* frente a diferentes concentrações de sal nos meios de cultivo utilizados para essas espécies. Serão analisados o crescimento celular, a produção de biomassa e o teor de lipídios para as salinidades de 17 ‰, 26 ‰ e 35 ‰. Este estudo visa obter melhores rendimentos de biomassa e de lipídios para que possa ser utilizado na produção de biocombustíveis.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Microalgas e preparo dos meios de cultivo

A cepa das microalgas *Tetraselmis gracilis* e *Phaeodactylum tricornutum* foram cedidas pelo Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo - USP com origem no banco de microrganismos Aidar & Kutner. A fase experimental foi realizada no Laboratório de Engenharia Ambiental e Sanitária da Universidade do Sul de Santa Catarina - UNISUL.

Os experimentos foram desenvolvidos em laboratório com temperatura média de 30 ± 5 °C, com fotoperíodo de 16 h de luz e 8 h no escuro, a luminosidade foi fornecida por lâmpadas fluorescentes de 9W. Os cultivos foram realizados em frascos de coleta de água de um litro com aeração constante através de compressores. A razão volumétrica do meio de cultivo:inoculo utilizada foi de 1:10. Nos cultivos das microalgas *Tetraselmis gracilis* e *Phaeodactylum tricornutum* foram testadas três diferentes concentrações de sal, aplicadas no meio de cultivo proposto pela literatura para essas espécies. Por se tratar de espécies marinhas se utilizou o meio F/2 Guillard modificado (GUILLARD, 1975) com salinidade de 17 ‰, 26 ‰ e 35 ‰. A tabela 1 apresenta os nutrientes que compõe o meio estudo para o cultivo das microalgas.

Meio	Reagente	Solução estoque (g/L)	Quantidade para cultivo/L
Nitrato de sódio	NaNO ₃	75	1 mL
Hipofosfito de sódio	NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	5	1 mL
Silicato de sódio	Na ₂ SiO ₃ .9H ₂ O	30	1 mL
Solução traço de metal	*	*	1 mL
Solução de vitaminas	**	**	0,5 mL

Tabela 1 - Meio de cultivo utilizado para a cultura das microalgas *Tetraselmis gracilis* e *Phaeodactylum tricornutum*. Fonte: Guillard, 1975.

*Os reagentes para a solução traço de metal estão disponíveis na Tabela 2

** Os reagentes para a solução de vitaminas estão disponíveis na Tabela 3.

Reagente	Solução estoque primário (g/L)	Quantidade/L
FeCl ₃ .6H ₂ O	--	3,15 g
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	--	4,36 g
CuSO ₄ .5H ₂ O	9,8	1 mL
Na ₂ MoO ₄ .H ₂ O	6,3	1 mL
ZnSO ₄ .7H ₂ O	22,0	1 mL

CoCl ₂ .6H ₂ O	10,0	1 mL
MnCl ₂ .4H ₂ O	180,0	1 mL

Tabela 2 - Solução traço de metais. Fonte: Guillard, 1975.

Reagente	Solução estoque primário (g/L)	Quantidade/L
Tiamina HCl (Vit. B ₁)	--	0,2 g
Biotina (Vit. H)	1,0	1 mL
Cianocobalamina (vit. B ₁₂)	1,0	1 mL

Tabela 3 - Solução de vitaminas. Fonte: Guillard, 1975.

As espécies foram cultivadas em meio de Guillard F/2 modificado (GUILLARD, 1975) preparado com água do mar filtrada com salinidade natural de 17 ‰, que por sua vez foi coletada em um ponto na baía sul no bairro Ponta de Baixo em São José, SC. A água do mar e o material utilizado para o preparo do cultivo foram previamente esterilizados em autoclave (a 121°C e 1,1 atm) durante 15 minutos para garantir que não houvesse contaminação. O cultivo da microalga *Tetraselmis gracilis* teve duração de 11 dias e o cultivo da microalga *Phaeodactylum tricornutum* duração de 7 dias, quando o crescimento atingiu o estágio estacionário.

2.2. Densidade celular dos cultivos

A densidade celular dos cultivos foi monitorada pela contagem de células utilizando a Câmara Neubauer em microscópio óptico. As amostras foram retiradas com intervalo máximo de um dia de cultivo e foram fixadas com formaldeído 4%. A contagem foi realizada aplicando-se uma alíquota de 0,05 mL de amostra, sendo esse volume o suficiente para cobrir a câmara, a visualização ocorreu em aumento de 400x.

O melhor quadrante para se realizar a contagem foi determinado pelo tamanho das microalgas e por sua concentração celular, assim se optou pela leitura no maior quadrante (A) da câmara. Para obter a concentração de células foram realizadas diversas contagens em quatro quadrantes de mesmo tamanho e posteriormente calculou-se a média. Sendo o número de células e o número de quadrantes valores conhecidos, foi possível determinar a concentração celular em células por mililitro de cultivo (cél.mL⁻¹) através da equação (1).

Com dados experimentais foram elaboradas as curvas de crescimento das espécies para as diferentes salinidades do meio. Os gráficos foram gerados no Excel, aplicando no eixo da ordenada o número de células em cel.mL⁻¹ e no eixo da abscissa o tempo de cultivo em dia.

$$C = \frac{\text{Total de células}}{n^{\circ}} \times 10000 \quad (1)$$

Sendo:

C – concentração de células; n°- número de quadrantes

2.3. Biomassa algal

A separação das microalgas do meio de cultura ocorreu após o encerramento do cultivo, a espécie *Tetraselmis gracilis* foi encerrada no 11º dia e a *Phaeodactylum tricornutum* no 7º dia. O processo se deu por centrifugação a 3000 rpm, com temperatura de 20°C durante 15 minutos. O volume dos cultivos da espécie *Tetraselmis gracilis* foram centrifugados duas vezes devido a presença de coloração no primeiro sobrenadante.

Em seguida, as amostras foram lavadas com Formiato de Amônio para retirada do sal. A biomassa resultante foi seca em estufa à 60 °C durante 24 h. A concentração de biomassa das microalgas foi estimada gravimetricamente pela diferença de peso do cadinho pelo peso seco de biomassa.

2.4.Extração de lipídios

A determinação de lipídios presentes na biomassa seca ocorreu através do método Bligh e Dyer (1959) modificado, utilizando extração a frio com uma mistura de Clorofórmio e Metanol (2:1: v/v).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A curva de crescimento das microalgas foi expressa em concentração de células em função do tempo. Segundo Lourenço (2006), o aumento da biomassa durante o período de crescimento do cultivo sendo nesse estudo expresso em número de células, é equivalente à biomassa presente no cultivo indicando crescimento exponencial. A figura 1 e figura 2 apresentam a densidade celular dos cultivos das microalgas *Tetraselmis gracilis* e *Phaeodactylum tricornutum* respectivamente para os meios com salinidade de 17 ‰, 26 ‰ e 35 ‰.

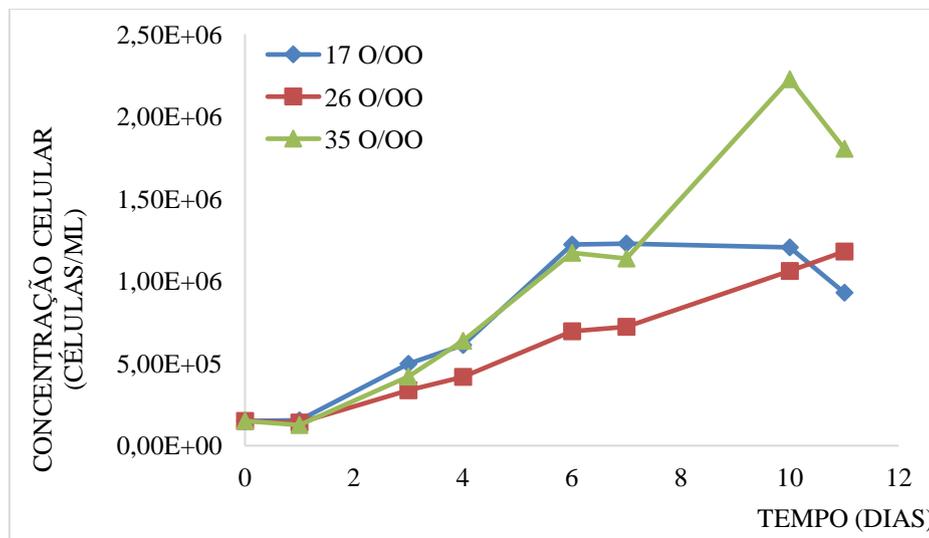


Figura 1 - Concentração de células da microalga *Tetraselmis gracilis* em função do tempo de cultivo para três diferentes salinidades. Fonte: Elaborado pelos autores.

Até o segundo dia de cultivo pode-se observar a fase de adaptação das células ao meio de cultivo, sendo o aumento no crescimento celular muito sutil e semelhante para os diferentes meios. A partir do terceiro dia de cultivo é possível observar o aumento na concentração celular, porém o meio com salinidade de 35 ‰ apresentou melhor produtividade seguido do meio com salinidade de 17 ‰ até o 10º dia de cultivo quando se iniciou a diminuição no crescimento celular. No cultivo com salinidade de 26 ‰ a concentração celular se manteve estável a partir do 6º até 10º dia, sendo que no 11º dia foi observado uma diminuição no crescimento celular, mostrando menor produtividade de biomassa.

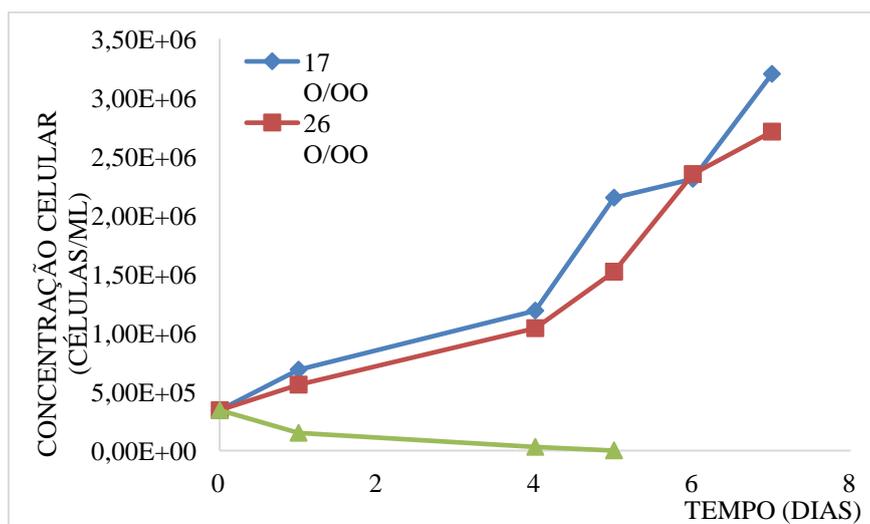


Figura 2 - Concentração de células da microalga *Phaeodactylum tricornutum* em função do tempo de cultivo para três diferentes salinidades. Fonte: Elaborado pelos autores.

Para a espécie *Phaeodactylum tricornutum* (figura 2) observa-se que a fase de adaptação teve duração de aproximadamente um dia, ocorrendo a partir deste momento a fase de aceleração de crescimento no qual as células já se encontram adaptadas às diferentes condições de cultivos e começam a se reproduzir. Os cultivos com salinidade de 17 ‰ e 26 ‰ apresentaram crescimento semelhante até o 4º dia de cultivo, sendo a partir deste momento diferenciados na aceleração de crescimento. O cultivo com salinidade de 17 ‰ apresentou melhor produtividade comparado com os outros meios. O meio com salinidade de 35 ‰ é o que mais se difere, apresentando desde o primeiro dia de cultivo declínio celular, a diminuição gradativa na concentração de células até a morte do cultivo observada no 5º dia. Durante o cultivo se observou a diminuição na pigmentação do meio com salinidade de 35 ‰ no qual segundo Krabs e Buchel (2011), isso ocorre sob condições hipo e hipersalinas com o decréscimo celular.

A biomassa produzida foi determinada após o 11º dia de cultivo para a espécie *Tetraselmis gracilis* e no 7º para a espécie *Phaeodactylum tricornutum*, consecutivamente determinou-se o teor de lipídios na biomassa seca sendo os resultados apresentados na tabela 4 e tabela 5 respectivamente.

Salinidade	Biomassa (g/L)	Lipídios (%)
17 ‰	0,35	27,88
26 ‰	0,34	15,36
35 ‰	0,62	8,72

Tabela 4 – Biomassa e teor de lipídios da espécie *Tetraselmis gracilis* para diferentes salinidades. Fonte: Elaborado pelos autores.

A quantidade de biomassa para as diferentes salinidades está de acordo com a concentração celular mostrado na figura 1. Sendo a maior produtividade obtida para a salinidade de 35 ‰ (0,62 g/L), seguida pelo meio com salinidade de 17 ‰ e por último 26 ‰. O cultivo com a maior produção de biomassa foi o que apresentou o menor teor de lipídios sendo 8,72 % para o meio com salinidade de 35 ‰, o maior teor de lipídios foi observado no cultivo com salinidade de 17 ‰ sendo 27,88%.

O teor de lipídios obtido é superior ao encontrado no estudo feito por Soares (2010) no qual foi de 6,13%. O método para a extração de lipídios e o meio de cultivo utilizado foram os mesmos, porém, há diferença no fotoperíodo, lâmpadas utilizadas, temperatura e tempo de cultivo aplicados.

Salinidade	Biomassa (g/L)	Lipídios (%)
17 ‰	0,54	12,05
26 ‰	0,48	12,26
35 ‰	-	-

Tabela 5 - Biomassa e teor de lipídios da espécie *Phaeodactylum tricornutum* para diferentes salinidades. Fonte: Elaborado pelos autores.

A quantidade de biomassa obtida para a espécie *Phaeodactylum tricornutum* está de acordo com a concentração celular apresentada na figura 2, sendo o meio com salinidade de 17 ‰ o mais produtivo com 0,54 g/L, seguido pelo meio de salinidade 26 ‰ com 0,48 g/L. Para a salinidade de 35 ‰ não foram realizados os ensaios para a obtenção de biomassa

e teor de lipídios devido a morte celular do cultivo. O teor de lipídios para a espécie *Phaeodactylum tricornutum* apresentou desempenho semelhante aos valores encontrados para a espécie *Tetraselmis gracilis*, no qual o cultivo com maior produtividade (17 ‰) de biomassa apresentou menor teor de lipídios na biomassa seca de 12,05%. O cultivo com salinidade de 26 ‰ apresentou maior teor de lipídios na biomassa seca no qual se obteve 12,26%.

O teor de lipídios obtido para a espécie *Phaeodactylum tricornutum* é inferior ao encontrado no estudo feito por Rodolfi *et al.* (2008) no qual se obteve 18,7 %. O método utilizado para a extração de lipídios foi diferente, no qual de acordo com estudos é possível obter diferentes resultados para uma mesma amostra utilizando métodos de extração distintos. O meio de cultivo utilizado foi o mesmo, porém há diferença na temperatura aplicada (25°C), na salinidade (30 ‰), além de iluminação constante.

Os resultados obtidos nesse estudo para as espécies *Tetraselmis gracilis* e *Phaeodactylum tricornutum* se diferem de outros já feitos, desta forma é possível verificar como as variáveis influenciam no comportamento e na produtividade do cultivo, devendo sempre buscar as condições que tornem a produção mais eficiente.

4. CONCLUSÕES

O desenvolvimento dos cultivos e a composição química das microalgas variam muito de acordo com o meio de cultura e as variáveis aplicadas. Quando submetidas à diferentes condições de cultivo as microalgas apresentam resultados distintos na produção de biomassa e teor de lipídios.

A espécie *Tetraselmis gracilis* apresentou maior quantidade de biomassa no meio com salinidade de 35 ‰ sendo quase o dobro produzido nos outros cultivos, porém o teor de lipídios presente na biomassa ficou abaixo dos outros meios. O mesmo ocorreu para a espécie *Phaeodactylum tricornutum* no qual o meio que apresentou maior produtividade de biomassa apontou menor teor de lipídios.

Desta forma, visando a produção de lipídios, o meio de cultivo ideal para a espécie *Tetraselmis gracilis* e para *Phaeodactylum tricornutum* é a aplicação do meio F/2 Guillard modificado (GUILLARD, 1975) diluído em água do mar com salinidade natural de 17 ‰ e salinidade de 26 ‰ respectivamente, no qual o teor de lipídios foi de 27,88% na biomassa seca para *T. gracilis* e 12,26% para *P. tricornutum*.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Dra. Flávia Marisa Prado Saldanha-Corrêa, da Universidade de São Paulo, por fornecer estirpes de algas marinhas, e a Unisul pela concessão de Bolsa pelo Programa Unisul de Iniciação Científica (PUIC).

REFERÊNCIAS

AHMAD, A. L. Y., DEREK, C. J. C et al.; Microalgae as a sustainable energy source for biodiesel production: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Nibong Tebal, Malásia; v. 15, n. 1, p. 584-593, 2011.

- ALSTERBERG C, EKLÖF JS, GAMFELDT L, HAVENHAND JN, SUNDBÄCK K. Consumers mediate the effects of experimental ocean acidification and warming on primary producers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 110, p. 8603–8608, 2013.
- BOROWITZKA, M.A. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. **Journal of Biotechnology**, v.70, p.313-321, 1999.
- BUTCHER, R.W. **An introductory account of the smaller algae of British coastal waters**. Part I: Introduction and Chlorophyceae. Fisheries Investigations, London, series IV 1: 1-74, p. 67, 1959.
- CHISTI, Y. **Biodiesel from microalgae**. *Biotechnology Advances*, v. 25, p. 294-306, 2007.
- CHISTI, Y. Constraints to commercialization of algal fuels. **Journal of Biotechnology**. v. 167, p. 201–214. 2013.
- CUI, Y., THOMAS-HALL, S. R., e SCHENK, P. M. *Phaeodactylum tricornutum* microalgae as a rich source of omega-3 rich oil: Progress in lipid induction techniques towards industry adoption. **Food Chemistry**. v. 297, n. 1, p. 1-9, 2019.
- DERNER, R. B.; S. OHSE, M. VILLELA; S. M.D. CARVALHO; R. FETT. Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural**, v. 36, p. 1959-1967.
- DIVA SOUZA ANDRADE (Ed.). **Microalgas de águas continentais**. Londrina: Midiograf, 2014.
- FERRERO, I. **Produção de biodiesel a partir de microalgas como alternativa aos cultivos clássicos**. Monografia – Licenciatura em Biotecnologia, Universidade Nacional Del Litoral, Santa fé, 2011.
- GUILLARD, R.R.L. **Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates**. Culture of marine invertebrate animals. New York: Plenum, 1975. p.29-60.
- KRABS, G., e BUCHEL, C. Temperature and salinity tolerances of geographically separated *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin stains: Maximum quantum yield of primary photochemistry pigmentation proline content and growth. **Botanica Marina**, v. 54, n. 3, p. 231-241, 2011.
- LOURENÇO, S. O. **Cultivo de microalgas marinhas- princípios e aplicações**. Ed. RiMa. São Carlos, 2006.
- GUIRY, M.D; Guiry G. M. *Tetraselmis gracilis*. AlgaeBase, 2017. Disponível: <<https://www.algaebase.org>>. Acesso em: 22 jan. 2020.
- LOURENÇO, S. O., MARQUEZ, U. M. L., MANCINI-FILHO, J., BARBARINO, E., & AIDAR, E. Changes in biochemical profile of *Tetraselmis gracilis* I. Comparison of two culture media. **Aquaculture**, São Paulo, v. 148, n. 2-3, p. 153–168, 1997.
- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brok**. 10 ed. São Paulo; p. 608, 2004.
- MATA, T. M.; A. A. MARTINS; N. S. CAETANO. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14:, p. 217-232, 2010.
- NORRIS, RE, HARI t. Floyd LG. **Revision of the genus *Tetraselmis*** (class Prasinophyceae). 1980.
- ODOLFI, L., ZITTELLI, G. C., BASSI, N., PADOVANI, G., BIONDI, N., BONINI, G. TREDICI, M. R. 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**, Firenzi, Itália; v. 102, n. 1, 2008.
- OLAIZOLA, M. Commercial development of microalgal biotechnology: from the test

- tube to the marketplace. **Biomolecular Engineering**, v. 20. P. 459-466, 2003.
- PERIN G., MOROSINOTTO T. Optimization of Microalgae Photosynthetic Metabolism to Close the Gap with Potential Productivity. **Grand Challenges in Algae Biotechnology**, p. 223-248, 2020.
- RAVEN, J.A. Limits to growth. In: BOROWITZKA, M.A.: BOROWITZKA, L.J. (Eds). **Micro-algal biotechnology**. Cambridge: Cambridge University, 1988. p.331-356
- RICHMOND, A. (Ed). **CRC Handbook of microalgal mass culture**. Florida: CRC, 1990. 528p.
- RODOLFI, L., CHINI ZITTELLI, G., BASSI, N., PADOVANI, G., BIONDI, N., BONINI, G., e TREDICI, M. R. 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. 100–112, 2009.
- SELVAKUMAR, P., UMADEVI, K. Enhanced lipid and fatty acid content under photoheterotrophic condition in the mass cultures of *Tetraselmis gracilis* and *Platymonas convolutae*. **Algal Research**, v. 6, p. 180–185. 2014.
- SIPAÚBA-TAVARES, L. H., ROCHA, 2001. **Produção de Plâncton (Fitoplâncton e Zooplâncton) para Alimentação de Organismos Aquáticos**. São Carlos: Editora RiMa. 106 p.
- SIPAÚBA-TAVARES, L.H.S. **Limnologia aplicada à aquicultura**. Jaboticabal: Funep. 72 p., 1995.
- SOARES, Lucas Ferrari Granado. **Microalgas na Produção de Biodiesel: Extração e Composição Lipídica**. 2010. 1 CD-ROM. Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2010.
- TREDICI, M.R. Mass production of microalgae: photobioreactors. In: RICHMOND, A. (Ed). **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. Oxford: **Blackwell Science**, 2004. p.178-214.