



UNISUL

UNIVERSIDADE DO SUL DE SANTA CATARINA

LEANDRO DE SOUZA

**PRODUÇÃO SUSTENTÁVEL DE *SCENEDESMUS* sp. COM ÁGUA RESIDUAL E
USO DO PLASMA NÃO TÉRMICO**

PALHOÇA

2019

LEANDRO DE SOUZA

**PRODUÇÃO SUSTENTÁVEL DE *SCENEDESMUS* sp. COM ÁGUA RESIDUAL E
USO DO PLASMA NÃO TÉRMICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais da Universidade do Sul de Santa Catarina como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais

Orientadora: Prof^a Dra Elisa Helena Siegel Moecke

Palhoça

2019

LEANDRO DE SOUZA

**PRODUÇÃO SUSTENTÁVEL DE *SCENEDESMUS* sp. COM ÁGUA RESIDUAL E
USO DO PLASMA NÃO TÉRMICO**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado à obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais e aprovado em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais da Universidade do Sul de Santa Catarina.

Palhoça, 26 de julho de 2019.

Orientadora:

Prof.^a Dr^a Elisa Helena Siegel Moecke
UNISUL/PPGCA

Avaliadora Externa:

Prof.^a Dr^a Maria da Graça Nascimento
UFSC/PPGQ

Avaliadores internos:

Prof.^a Dr^a Anelise Leal Vieira Cubas
UNISUL/PPGCA

Prof. Dr. Jair Juarez João
UNISUL/PPGCA

Suplente:

Prof. Dr. Jonathan Alexander Bork
Eng. Química – Unisul



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS -
MESTRADO**



ATA Nº10/2019 DE DEFESA PÚBLICA DE DISSERTAÇÃO

No dia vinte e cinco de julho de dois mil de dezenove, às dez horas, na sala 120 - Bloco D, na Unidade Universitária Pedra Branca da Universidade do Sul de Santa Catarina, foi realizada a sessão pública de apresentação e defesa de Dissertação de Mestrado de **Leandro de Souza**, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais, de acordo com o Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais - PPGCA. A banca avaliadora foi composta pelos seguintes professores: - Dra. Elisa Helena Siegel Moecke, orientadora e presidente da banca; - Dra. Anelise Leal Vieira Cubas, avaliadora interna do PPGCA; - Dr. Jair Juarez João, avaliador interno do PPGCA; - Dra. Maria da Graça Nascimento, avaliadora externa da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). A dissertação tem como título: "**PRODUÇÃO SUSTENTÁVEL DE SCENEDESMUS SP. COM ÁGUA RESIDUAL E USO DO PLASMA NÃO TÉRMICO**". Área de concentração: Tecnologia, Ambiente e Sociedade e linha de pesquisa: Tecnologia & Sociedade. Após a apresentação, o mestrando foi arguido pelos professores da banca. Feitos os questionamentos e ouvidas as explicações, a banca avaliadora emitiu o seguinte parecer:

- Aprovado
 Aprovado condicionado
 Reprovado

Obs: Efetuar as sugestões efetuadas pelos
membros da banca.

Nada mais havendo a tratar, foram encerrados os trabalhos e, após lida, foi a presente ata assinada pelo Mestrando e pelos membros da Comissão Avaliadora.

Dra. Elisa Helena Siegel Moecke: [Assinatura]

Dra. Anelise Leal Vieira Cubas: [Assinatura]

Dr. Jair Juarez João: [Assinatura]

Dra. Maria da Graça Nascimento: M. Graça Nascimento

Discente Leandro de Souza: [Assinatura]

S71 Souza, Leandro de, 1984-
Produção sustentável de *scenedesmus* SP. com água residual e
uso do plasma não térmico / Leandro de Souza. – 2019.
70 f. : il. color. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Sul de Santa Catarina,
Pós-graduação em Ciências Ambientais, Palhoça, 2019.
Orientação: Profa. Dra. Elisa Helena Siegel Moecke.

1. *Scenedesmus* - Cultivo. 2. Águas residuais - Purificação. 3.
Algas - Cultivo. 4. Nutrientes de plantas. 5. Ácidos graxos. I. Moecke,
Elisa Helena Siegel. II. Título.

CDD (21. ed.) 579.83

“Dedico todo o esforço que depositei neste trabalho aos meus Pais, Juliana de Souza e Cecílio de Souza (*in memoriam*), que foram exemplos de caráter e dignidade”.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer minha orientadora professora Elisa Helena Siegel Moecke por toda dedicação, paciência e aprendizado ocorrido nesse período. A colega de laboratório Amanda Schueng Lima pela parceria que permitiu a implementação deste trabalho. Ao professor Ângelo Paggi Matos que mesmo a distância contribuiu com muitos esclarecimentos. Ao Dr. Américo Cruz Júnior e ao Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da UFSC pelas análises de MEV/EDS. Aos professores do PPGCA pelos conhecimentos adquiridos. Ao meu chefe Sôca da Silveira Moises pela compreensão e relevância dado ao estudo. Aos meus colegas de mestrado pela troca de experiências e os momentos alegres vividos. AGETEC - Agência de inovação e empreendedorismo da Unisul pelo incentivo a pesquisa. Aos meus amigos e familiares por não me deixarem desanimar nos momentos difíceis.

“Vivendo, se aprende; mas o que se aprende, mais, é só a fazer outras maiores perguntas” (João Guimarães Rosa, 1956).

RESUMO

As microalgas são organismos fotossintéticos aquáticos que apresentam taxas de crescimento mais altas que as plantas terrestres e não competem com culturas alimentares e terras agricultáveis. Com uma abordagem ambientalmente amigável, as microalgas têm aplicações na remoção de contaminantes das águas residuais e na redução da eutrofização em corpos d'água naturais. Além disso, as microalgas têm o potencial de acumular grandes quantidades de lipídios, que podem ser convertidos em biodiesel, bem como proteínas e carboidratos que encontram uma infinidade de aplicações. O presente trabalho foi desenvolvido com a microalga *Scenedesmus* sp. e está dividido em duas etapas: a primeira com uso de efluente de aterro sanitário (EAS) como alternativa para a água de cultivo, e a segunda foi utilizando o plasma não térmico (PNT), para indução do estresse celular e como pré tratamento para ruptura da parede celular.

A primeira etapa do trabalho teve como objetivo o cultivo da microalga *Scenedesmus* sp. com o EAS proveniente da última etapa do tratamento, antes de ser lançado ao corpo d'água. Os cultivos foram realizados com fotoperíodo de 24 h, mantido sob aeração durante 10 dias. Diferentes porcentagens de EAS foram usadas (0-, 20-, 40-, 60-, 80- e 100%) para a máxima produção de biomassa algal e lipídica. A concentração ideal para cultivos foi de 80% de EAS, com produtividade celular de 187,12 mg L⁻¹ d⁻¹ e lipídica de 33,82 mg L⁻¹ d⁻¹). O conteúdo de FAs na microalga foi maior em ácidos graxos poli-insaturados (AGPIs - 62.96%) quando os cultivos foram realizados sem a presença de EAS. Nos cultivos com 80% de EAS houve uma redução dos AGPIs (33,72%) e aumento dos monoinsaturados (AGMIs – 39,34%). A remoção dos nutrientes de nitrogênio e fósforo foi observada em todos os cultivos, a maior remoção de fósforo (PO₃⁻¹ - 87%) ocorreu no cultivo com 80% de EAS. Além disso, foi verificada a remoção de metais (Al, Fe, Ni, Cu, Cd e Rb) do meio de cultivo com 80% de EAS, indicando que a microalga é capaz de biorremediar uma água residual que apresenta elevada capacidade poluidora.

Na segunda etapa foi usado o PNT nos cultivos em meio Chu (padrão) da *Scenedesmus* sp. com o propósito de induzir o estresse oxidativo, a fim de aumentar a produtividade lipídica na biomassa algal. O PNT é considerado uma tecnologia em crescente expansão limpa e eficiente. Foram realizados dois tipos de estudo, no primeiro o cultivo da microalga foi submetido ao PNT por 3 minutos a cada dois dias,

durante 10 dias e com análises a cada 48 h pós PNT. E no outro foram realizados 5 cultivos diferentes e em cada um foi submetido o PNT em dias diferentes (2-, 4-, 6-, 8- e 10º dia), com análises após uma hora e seguido de novas análises a cada 48 h. No primeiro estudo foi verificado uma melhor produtividade lipídica quando o PNT foi aplicado no 2º dia e 4º dia de cultivo com aumentos de 20,67 mg L⁻¹ d⁻¹ e 18,25 mg L⁻¹ d⁻¹ respectivamente. No segundo estudo foi verificado a maior produtividade quando o PNT foi aplicado no 2º dia (21,83 mg L⁻¹ d⁻¹) e 6º dia (22,67 mg L⁻¹ d⁻¹) de cultivo. No lipídeo obtido após aplicação do plasma no 2º dia de cultivo foi observado um aumento nos teores de ácidos graxos monoinsaturados (C18:1), enquanto que no cultivo controle houve uma maior concentração de ácidos graxos poli-insaturados (C18:3). A presença de ácidos graxos poli-insaturados é menos favorável para a produção de biodiesel devido aos processos de degradação. Os resultados obtidos mostraram que o uso do plasma para induzir a produção de lipídeos, é uma tecnologia promissora para ser aplicada nos cultivos de biomassa, visando a produção de óleo para aplicações em biodiesel, uma vez que, com apenas 4 dias de cultivo foi obtido uma maior produtividade lipídica com menor tempo, o que impacta diretamente nos custos.

Palavras Chave: Microalgas, efluente de aterro sanitário, nutrientes, ácidos graxos, espécies reativas de oxigênio

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APHA – American Public Health Association

AGMs - ácidos graxos monoinsaturados

AGPIs - ácidos graxos poli-insaturados

Bp – produtividade de biomassa.

CE - Condutividade elétrica

Chu – meio de cultivo (água) sintético em condições padrão.

CU – unidades de cor

DBO – Demanda bioquímica de oxigênio

EAS – efluente de aterro sanitário.

ETAAS - Espectrofotômetro de Absorção Atômica de Forno de Grafite

FAO - Association of Official Analytical Chemists

Lp – produtividade lipídica.

mg L⁻¹ – mili gramas por litro

mg L⁻¹d⁻¹ – mili gramas por litro por dia.

MUFAs - monounsaturated fatty acids

PNT – plasma não térmico.

PUFAs - polyunsaturated fatty acids

ROS - espécies reativas de oxigênio.

SEM-EDS - Microscopia eletrônica de varredura com análise de espectroscopia de energia dispersiva.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. ESTRUTURA E OBJETIVOS DA DISSERTAÇÃO	16
2.1. Estrutura.....	16
2.2. Objetivos.....	16
3. CAPÍTULO 3 - Avaliação do desempenho da microalga <i>Scenedesmus</i> sp. para biorremediação de efluente e concomitante biossíntese de lipídeos	18
3.1. Introdução	20
3.2.1 Materiais e Métodos	22
3.2.1. Condições de crescimento dos organismos	22
3.2.2. Cultivo com Efluente de Aterro Sanitário – EAS	23
3.2.3. Determinação da biomassa de microalgas e produtividade lipídica.....	24
3.2.4. Extração de lipídios e análise de ácidos graxos.....	24
3.2.5. Concentração de nutrientes e ensaios físico-químicos	25
3.2.6. Análises usando a Microscopia eletrônica de varredura com análise de espectroscopia de energia dispersiva (SEM/EDS).....	25
3.2.7. Determinação de metais.....	26
3.2.8. Determinação da eficiência de recuperação de nutrientes.....	26
3.2.9. Análises Estatísticas	26
3.3. Resultados e Discussão.....	27
3.3.1. Efeito da concentração do EAS na produtividade de biomassa e lipídeos.....	28
3.3.2. Efeito do EAS na composição dos ácidos graxos.....	28
3.3.3. SEM / EDS – Composição elementar da biomassa.....	29
3.3.4. Metais nos meios de cultivo	31
3.3.5. Eficiência na recuperação de nutrientes do meio de cultura contendo EAS.....	31
3.3.6. Condutividade elétrica e turbidez.....	32
3.3.7. Variação no pH durante o cultivo de <i>Scenedesmus</i> sp. usando EAS.....	33
3.3.8. Vantagens do cultivo de microalgas usando EAS.....	34
3.4. Conclusão	36
Referências	37
4. CAPÍTULO 4 - Produção de biomassa de <i>Scenedesmus</i> sp. com o uso do plasma não térmico para geração de lipídeos com potencial para biodiesel	42

4.1. Introdução.....	44
4.2. Materiais e Métodos	47
4.2.1. Materiais	47
4.2.2. Microalga e condições de cultivo	48
4.2.3. Reator de plasma não térmico	49
4.2.4. Determinação da biomassa de microalga e produtividade de lipídeos.....	50
4.2.5. Análise de lipídeos e de ácidos graxos	50
4.2.6. Indução do estresse oxidativo durante os cultivos.....	51
4.2.7. Pré-extração de lipídios com PNT e ultrasonicação	51
4.2.8. Microscopia eletrônica de varredura com observação do espectrômetro de energia dispersiva (SEM-EDS)	52
4.2.9. Análises Estatísticas	52
4.3. Resultados e discussão.....	52
4.3.1. Produtividade de biomassa e de lipídeos no cultivo controle.....	52
4.3.2. Produtividade de biomassa e de lipídeos no cultivo com PNT	53
4.3.3. Efeito do PNT na composição dos ácidos graxos.....	58
4.3.4. Valores da pré-extração usando PNT e ultrasom	59
4.3.5. Comportamento do pH durante o cultivo com PNT.....	60
4.3.6. SEM / EDS – Composição elementar da biomassa.....	61
4.4. Conclusão	63
Referencias	64
5. CONSIDERAÇÕES GERAIS	68
APÊNDICES	69
APÊNDICE A - Cromatograma dos ácidos graxos da Scenedesmus cultivada com EAS	69
APÊNDICE B - Cromatograma dos ácidos graxos da Scenedesmus sp. cultivada em meio Chu (cultivo controle).....	69
APÊNDICE C - Cromatograma dos ácidos graxos da Scenedesmus com aplicação do plasma	70

1. INTRODUÇÃO

Dentro do contexto energético, a biomassa tem seu grande potencial para geração de energias para o desenvolvimento da matriz energética, uma vez que, o desenvolvimento de biocombustíveis como alternativa para diminuição no consumo de petróleo teve um grande crescimento nas últimas décadas. Com a criação de diversas políticas de incentivo à expansão da produção mundial de biocombustíveis, com subsídios, reduções de taxas, apoio à pesquisa, até a criação de leis de percentual mínimo obrigatório de mistura aos combustíveis convencionais.¹ Tendo em vista que o crescimento populacional demanda por novas áreas, para atender a necessidade de alimentos para uma população em crescimento. Muitos países não possuem áreas disponíveis para aumentar sua produção agrícola², o que torna a discussão sobre os biocombustíveis pertinente.

O aproveitamento de áreas pouco convencionais para produção de biomassa, com o uso de efluentes, pode apresentar-se como uma alternativa para a geração dos biocombustíveis, uma vez que, os espaços convencionais de produção de alimentos não serão prejudicados e o uso de água potável fica disponível para outras atividades. Assim criando-se alternativas sustentáveis para o equilíbrio do uso da terra na produção de alimentos e o consumo dos recursos hídricos juntamente com a geração de biocombustíveis, criando um processo de valorização dos efluentes que apresentam um potencial poluidor do meio ambiente e com aproveitamento dos nutrientes presentes no meio líquido a ser descartado.³

¹ Khiari, B., Jeguirim, M. 2019. Lionel Limousy, Simona Bennici, Biomass derived chars for energy applications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 108. 253-273. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.03.057>

² OECD-FAO. 2017. Food and Agriculture Organization of the United Nations Agricultural Outlook 2018-2027 <http://www.fao.org/3/I9166EN/i9166en.pdf>.

³ MAGNOTTI, C. et al. Using residual water from a marine shrimp farming BFT system. Part II: *Artemia franciscana* biomass production fed microalgae grown in reused BFT water. *Aquaculture Research*, [s.l.], v. 47, n. 9, p.2716-2722, 27 fev. 2015. Wiley- Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/are.12720>

O aproveitamento da energia solar nas suas mais variadas formas de conversão faz parte de uma eficiente maneira de gerar energia para atender as necessidades das pessoas em suas atividades cotidianas. Neste contexto, as microalgas constituem um eficiente sistema de aproveitamento da energia do sol visando o uso da sua biomassa para geração de energia, alimentos e produtos diversificados com muitas finalidades. As microalgas possuem a capacidade de converter a energia do sol, juntamente com o carbono presente no ar atmosférico e com os nutrientes presentes em efluentes, como o de aterro sanitário, para o desenvolvimento de cultivos e crescimento da biomassa que é rica em óleo. O aproveitamento dos nutrientes pelas microalgas presente nos efluentes possui duas funcionalidades, a primeira se relaciona a melhoria dado aos padrões de lançamento do efluente do aterro sanitário, e a segunda se relaciona com o aproveitamento dos nutrientes para a remoção de micropoluentes como metais. A diminuição dos nutrientes incorporada para o desenvolvimento dos cultivos se relacionam com a diminuição de custos e a possibilidade de processos mais sustentáveis, entre eles menores impactos aos recursos hídricos, caracterizando-se como de grande importância para se amenizar os impactos ambientais vividos na atualidade.

O aterro sanitário emite grande vazão de efluente no seu funcionamento, que mesmo dentro dos padrões de lançamentos possuem capacidade de poluição elevada aos recursos hídricos. Surgindo a necessidade da criação de soluções que visam à diminuição dos impactos causados pelo aterro, com bons resultados na geração de novos produtos, com potencial diminuição dos impactos as comunidades do entorno, e com geração de recursos financeiros e ambientais. As pesquisas atuais apontam para o aproveitamento da maior quantidade de energia possível processada no aterro, visando à inserção do tratamento dos resíduos sólidos ao ambiente das comunidades sem prejuízos ao meio ambiente, à biodiversidade, aos recursos hídricos e as pessoas. Tais processos mais inovadores e sustentáveis estão de acordo com tendências mundiais de preservação do meio ambiente sem prejuízo ao desenvolvimento da economia.

Sistemas integrados de produção de biomassa de microalgas podem ser considerados uma alternativa viável para produção de biocombustíveis, com o

aproveitamento dos nutrientes contidos nos efluentes e com a melhoria dos padrões de lançamentos do líquido clarificado, sem haver disputa de espaço com a produção de alimentos e terras férteis. A utilização de águas residuais como meio de cultura acarreta na redução imediata nos custos de produção e tratamento do efluente e geração de biomassa, ao mesmo tempo. Os processos de aproveitamento de efluente podem alcançar remoções de nutrientes como nitrogênio e fósforo em concentrações significativamente importantes.⁴

O trabalho desenvolvido tem como objetivo geral investigar o uso de efluente proveniente de aterro sanitário (EAS) para propagação da microalga *Scenedesmus* sp. visando a produção de lipídeos e a biorremediação do efluente. Outro objetivo é verificar a eficiência do PNT (plasma não térmico) na produção lipídica quando aplicado no cultivo da *Scenedesmus* sp.

O Capítulo 1 tem como objetivos específicos: Estudar a concentração ideal do EAS em termos de porcentagem (0-, 20-, 40-, 60-, 80-, 100%) para a máxima produção de biomassa algal e lipídica, Caracterizar os ácidos graxos da biomassa algal após a porcentagem de EAS selecionada, Determinar a eficiência de remoção de nitrogênio e fósforo, bem como os metais (Al, Fe, Cu, Cd, Rb, Ni e Mg) presente no EAS.

O Capítulo 2 apresenta como objetivos específicos: Avaliar a produtividade lipídica pelas células da microalga a partir do estresse oxidativo provocado pelo PNT com a geração de ROS. Caracterizar o perfil dos ácidos graxos produzidos durante o cultivo com aplicação PNT e verificar se o óleo produzido tem potenciais para produção de biodiesel. Avaliar a capacidade do PNT melhorar a extração do óleo da biomassa algal e comparar com o processo de ultrassom já usado por outros pesquisadores.

⁴ Chang, H., Quan, X., Zhong, N., Zhang, Z., Lu, C. Li, G., Cheng, Z., Yang, L. 2018. High-efficiency nutrients reclamation from landfill leachate by microalgae *Chlorella vulgaris* in membrane photobioreactor for bio-lipid production. *Bioresource Technology*. 266. 374-381. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.06.077>.

2. ESTRUTURA E OBJETIVOS DA DISSERTAÇÃO

Esta dissertação é composta pelo trabalho original desenvolvido com microalgas *Scenedesmus* sp visando a biorremediação e a produtividade lipídica. A dissertação está dividida em dois capítulos, compostos na forma de artigos que serão submetidos a publicações em revistas.

2.1. Estrutura

O Capítulo 3, se refere aos resultados usados na preparação do artigo intitulado **Avaliação do desempenho da microalga *Scenedesmus* sp. para biorremediação de efluente e para biossíntese de lipídeos**, que será submetido à revista da área. O capítulo é composto pelo estudo com efluente de Aterro sanitário – EAS como uso alternativo a água de cultivo das microalgas *Scenedesmus* sp. com o objetivo de recuperar os nutrientes contidos no efluente avaliando a remoção de fósforo e nitrogênio bem como o processo de biorremediação ocorrido pela biossorção de metais na biomassa das microalgas, aferindo a produtividade de biomassa e lipídica dos cultivos juntamente com a composição dos ácidos graxos para uso na produção de biodiesel.

O Capítulo 4, é referente aos resultados obtidos e usados na preparação do artigo intitulado **Produção de biomassa de *Scenedesmus* sp. com o uso do plasma**. Neste capítulo, é apresentado o uso da tecnologia do plasma não térmico em um processo inovador de indução de estresse oxidativo durante o cultivo da microalga com o objetivo de aumentar a produtividade lipídica da microalga *Scenedesmus* sp.

2.2. Objetivos

O trabalho desenvolvido tem como objetivo geral investigar o uso de efluente proveniente de aterro sanitário (EAS) para propagação da microalga *Scenedesmus* sp. visando a produção de lipídeos e a biorremediação de efluente. Outro objetivo é

verificar a eficiência do PNT (plasma não térmico) na produção lipídica quando aplicado no cultivo da microalga *Scenedesmus* sp.

O Capítulo 1 tem como objetivos específicos:

- 1) Estudar a concentração ideal do EAS em termos de porcentagem (0-, 20-, 40-, 60-, 80-, 100%) para a máxima produção de biomassa algal e lipídica,
- 2) Caracterizar os ácidos graxos da biomassa algal após a porcentagem de EAS selecionada,
- 3) Determinar a eficiência de remoção de nitrogênio e fósforo, bem como os metais (Al, Fe, Cu, Cd, Rb, Ni e Mg) presente no EAS.

O Capítulo 2 apresenta como objetivos específicos:

- 4) Avaliar a produtividade lipídica pelas células da microalga a partir do estresse oxidativo provocado pelo PNT com a geração de ROS.
- 5) Caracterizar o perfil dos ácidos graxos produzidos durante o cultivo com aplicação PNT e verificar se o óleo produzido tem potenciais para produção de biodiesel.
- 6) Avaliar a capacidade do PNT melhorar a extração do óleo da biomassa algal e comparar com o processo de ultrassom já usado por outros pesquisadores para melhorar a extração de óleo.

CAPÍTULO 3

Avaliação do desempenho da microalga *Scenedesmus* sp. para biorremediação de efluente e concomitante biossíntese de lipídeos

Destaques

O efluente de aterro sanitário (EAS) como uma fonte de nutrientes para o cultivo de *Scenedesmus* sp.

Processo integrado para remediação de águas residuais e para produção de biomassa rica em lipídios.

Melhor produtividade de biomassa ($187,12 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) e lipídica ($33,82 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) com 80% de EAS.

Remoção de N, P e de metais (Al, Fe, Ni, Cu, Cd e Rb), indicando a biorremediação da microalga.

Resumo

Este estudo teve como objetivo investigar o uso de efluente de aterro sanitário (EAS) proveniente do tratamento antes de ser lançado no corpo hídrico para propagação da microalga *Scenedesmus* sp. Os cultivos foram realizados com fotoperíodo de 24 h luz, mantido sob aeração durante 10 dias. Diferentes porcentagens de EAS foram usadas (0-, 20-, 40-, 60-, 80-, 100%) para a máxima produção de biomassa algal e lipídica. A concentração ideal para cultivos foi de 80% de EAS, com produtividade celular de $187,12 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ e lipídica de $33,82 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. O conteúdo de AGs na microalga foi maior em ácidos graxos poli-insaturados (AGPIs - 62,96%) quando os cultivos foram realizados sem a presença de EAS. Nos cultivos com 80% de EAS houve uma redução dos AGPIs (33,72%) e aumento dos monoinsaturados (AGMIs - 39,34%). A remoção dos nutrientes de nitrogênio e fósforo foi observada em todos os cultivos, a maior remoção de fósforo (PO_3^{-1} - 87%) ocorreu no cultivo com 80% de EAS. Além disso, foi verificada a remoção de metais (Al, Fe, Ni, Cu, Cd e Rb) do meio de cultivo com 80% de EAS,

indicando que a microalga é capaz de biorremediar uma água residual que apresenta elevada capacidade poluidora.

Palavras chave: Microalgas, Efluente de aterro sanitário, Nutrientes, Biomassa, Metais pesados.

Abstract

The objective of this study was to investigate the use of residual water (Sanitary landfill effluent (SLE)) from the treatment before being launched in the water body for the propagation of the microalga *Scenedesmus* sp. Cultures were carried out for 24 h light photoperiod and kept under aeration for 10 days. Different percentages of SLE were used (0-, 20-, 40-, 60-, 80-, 100%) for the maximum production of algal and lipid biomass. The ideal concentration for cultures was 80% SLE, with cell productivity of $187.12 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ and lipid of $33.82 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. The content of FAs in the microalgae was higher in polyunsaturated fatty acids (PUFAs - 62.96%) when cultures were performed without the presence of SLE. In the cultures with 80% SLE, there was a reduction of the PUFAs (33.72%) and increase of the monounsaturated fatty acids (MUFAs - 39.34%). Nitrogen and phosphorus nutrient removal was observed in all cultures, the highest phosphorus removal (PO_3^{-1} - 87%) occurred in the 80% SLE culture. In addition, the removal of metals (Al, Fe, Ni, Cu, Cd and Rb) from the culture medium with 80% SLE was verified, indicating that the microalga is capable of wastewater bioremediation that has high polluting capacity.

Keywords: Microalgae, Sanitary landfill effluent, Nutrients, Biomass, Heavy metals.

3.1. Introdução

As microalgas constituem um eficiente sistema de aproveitamento da energia solar e carbono do ar atmosférico através da fotossíntese (Ho et al., 2014; Allil et al., 2018). São produtores primários responsáveis por 60% da conversão desta forma de energia, uma vez que a energia solar é a força motriz da biossíntese lipídica em células de microalgas (Metting e Pyne, 1986; Wang et al., 2011). As microalgas possuem a capacidade de biorremediação de nutrientes tais como nitrogênio e

fósforo, atuando no tratamento terciário de efluentes, e assim, promovem o melhoramento da qualidade ambiental (Mezzomo et al., 2010).

Vários fatores podem induzir a produção de lipídeos em microalgas, tais como elevadas concentrações de nutrientes (nitrogênio e/ou fósforo), estresse osmótico, variação do pH e temperatura, presença de metais pesados e outros produtos químicos (Matos et al., 2015; Ho et al., 2010). Os lipídeos são constituídos principalmente pelos ácidos graxos saturados como ácido palmítico (C16:0) e esteárico (C18:0) (Ho et al., 2010), amplamente utilizados na produção de biodiesel (Ho et al., 2010; Jena et al., 2012).

As atuais pressões ambientais exigem o desenvolvimento de estratégias para a reciclagem de águas residuais. O principal problema referente ao lançamento de efluentes e dos lixiviados de aterro sanitário tratado se relacionam com as elevadas concentrações de nitrogênio e fósforo, sob as suas diferentes formas iônicas. O lançamento inadequado destes nutrientes pode resultar na ocorrência de um fenômeno de difícil tratamento chamado de eutrofização, que prejudica a qualidade das águas nos corpos receptores e da vida aquática (Moal et al., 2019). Soluções a montante do ponto de lançamento como o tratamento biológico e a precipitação química são comumente usadas para remoção de nutrientes (Ma, et al., 2018).

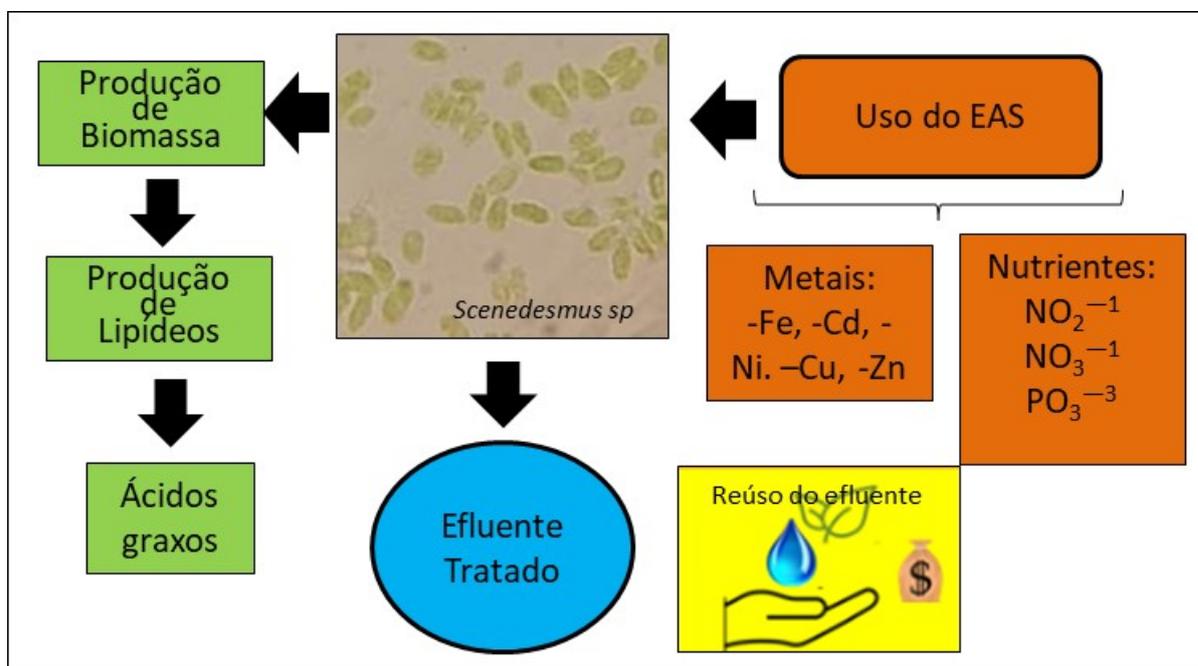
Os metais pesados também estão presentes nos efluentes de aterro sanitário podendo causar muitos problemas ambientais, são uma classe de poluentes que em concentrações acima do permitido gera a perda da qualidade dos corpos hídricos (Farnane et al., 2017). A contaminação por metais proporciona risco de bioacumulação na cadeia alimentar e sua remoção dos ecossistemas é de grande complexidade. Devido à alta capacidade de adsorção de metais pesados, algumas microalgas, incluindo as espécies do gênero *Chlorella*, *Scenedesmus*, *Spirulina*, entre outras, tem sido positivamente utilizadas para biossorção de metais (He; Chen, 2014) As microalgas são consideradas auto regenerantes do adsorvente com a possibilidade de seletividade aplicada para metais de interesse, com a remoção de metais pesados de efluentes em um baixo tempo de operação, isto é, em poucos dias (Jayakumar et al., 2015; Yi et al., 2016).

O efluente de aterro sanitário (EAS) usado neste trabalho é proveniente da estação de tratamento do percolado drenado da disposição final do lixo no aterro sanitário localizado na região da grande Florianópolis, SC. O tratamento adotado na estação é composto pelas seguintes etapas: i) pré-tratamento; ii) fase biológica composta por lagoa pulmão, lagoa de equalização, seguido por lagoa anóxica e sequencias de lagoas aeradas; iii) tratamento físico químico com uso de flotador, seguido de tanque de mistura lenta com uso de floculante, decantadores e filtros. Por fim, o líquido clarificado é desinfetado com hipoclorito de sódio ou cloro, para então, ser lançado no corpo de água. O EAS usado nesta pesquisa é o mesmo que é lançado no corpo da água após todos os tratamentos.

A microalga do gênero *Scenedesmus* pertencente ao grupo de algas verdes é um organismo unicelular com tamanho que varia de 15 a 30 μm , com rápido crescimento celular e alta adaptabilidade a condições estressantes do meio ambiente, o que as torna atraente micro-organismos para diversas aplicações industriais, incluindo a biorremediação de águas residuais (Ho et al. 2010; Yang e Gao 2003; Yoo et al. 2010).

No presente estudo foi investigado o uso de água residual (efluente de aterro sanitário para propagação da microalga *Scenedesmus* sp. (Figura 3.1) considerando os objetivos: i) estudar a concentração ideal do EAS em termos de porcentagem (0-, 20-, 40-, 60-, 80-, 100%) para a máxima produção de biomassa algal e lipídica, ii) caracterizar os ácidos graxos da biomassa algal após a concentração de EAS selecionada, iii) determinar a eficiência de remoção de nitrogênio e fósforo, bem como os metais presente no EAS, entre eles, cádmio, chumbo, níquel, cobre e zinco por meio de espectrometria de absorção atômica.

Figura 3.1. Diagrama de fluxo para os cultivos de *Scenedesmus sp.* com uso EAS e etapas subsequentes na biomassa e água de cultivo.



3.2. Materiais e Métodos

3.2.1. Condições de crescimento dos Organismos

A cepa de *Scenedesmus sp.* foi obtida do Laboratório de Engenharia Ambiental (LEA) - setor de Ecotoxicologia da Universidade do Sul de Santa Catarina, e mantida em meio de cultura Chu (Chu, 1942). Uma concentração inicial de aproximadamente 10^5 células mL⁻¹ foi utilizada para a preparação do inóculo. Os tratamentos foram realizados com um volume de 750 mL em frascos do tipo Erlenmeyer de 1000 mL, incubados em temperatura ambiente em sala com ar condicionado (25 ± 2 °C) e controlada com termômetro de máximas e mínimas. O sistema foi aerado com o auxílio de uma bomba de aquário acoplado com filtro de ar, tipo filtro para seringa CHROMAFIL XTRA em poliéster carcaça em PP (polipropileno), diâmetro de 25 mm e com poros de 0,20 µm, o fluxo de ar foi de 4,5 L min⁻¹. Foi empregado fotoperíodo de 24 horas luz, intensidade de fluxo de fótons de 80 µmol m⁻² s⁻¹, proporcionado por lâmpadas fluorescentes do tipo luz do dia com potência 20W.

3.2.2. Cultivo com efluente de Aterro Sanitário – EAS

O EAS utilizado foi obtido da estação de tratamento de efluentes do aterro sanitário localizado no município de Biguaçu, SC, Brasil. No ponto de lançamento após o tratamento, o efluente foi coletado em frascos de 5 litros mantidos a - 20 °C no Laboratório de Engenharia Ambiental da Universidade do Sul de Santa Catarina. A composição físico-química do EAS foi determinada de acordo com os padrões estabelecidos na Standard Method of Water and Wastewater (APHA, 2005). Na tabela 3.1 são apresentados os resultados da composição do meio Chu e do EAS usados no cultivo da *Scenedesmus* sp. O EAS foi misturado com meio de cultura Chu nas proporções de 20-, 40-, 60-, 80-, 100%. Todos os cultivos foram realizados com os meios de cultivos previamente esterilizados em autoclave a 121 °C (1 atm; pressão relativa) durante 15 minutos).

Tabela 3.1. Composição de meio Chu e efluente de aterro sanitário (EAS)

Meio Chu	Valor	EAS	Valor
NO ₂ ⁻¹ N (mg L ⁻¹)	0,09± 0,01	NO ₂ ⁻¹ (mg L ⁻¹)	5,1 ± 1,87
NO ₃ ⁻¹ N (mg L ⁻¹)	210 ± 2,0	NO ₃ ⁻¹ (mg L ⁻¹)	2150 ± 31,08
PO ₄ ⁻³ P (mg L ⁻¹)	25± 0,76	PO ₄ ⁻³ P (mg L ⁻¹)	30,00 ± 2,54
Condutividade (mS cm ⁻¹)	934 ± 10	Condutividade (mS cm ⁻¹)	19,78 ± 2,0
Turbidez (NTU)	0,00	Turbidez (NTU)	97,34 ± 1,0
Sólidos totais - ST (mg L ⁻¹)	0,88 ± 0,05	Sólidos Totais (g L ⁻¹)	8,56 ± 0,8
Cor (CU)	0,00	Cor (CU)	360 ± 20
pH	7,0 ± 0,1	pH	7,39 ± 0,4
NaNO ₃ (mg L ⁻¹)	25	NH ₃ (mg L ⁻¹)	4,0 ± 0,2
CaCl ₂ · 2H ₂ O (mg L ⁻¹)	2,5	CaCO ₃ (mg L ⁻¹)	1000 ± 22
MgSO ₄ · 7H ₂ O (mg L ⁻¹)	7,5	BOD (mg L ⁻¹)	1450 ± 18
K ₂ HPO ₄ (mg L ⁻¹)	7,5	Al (mg L ⁻¹)	2,64 ± 0,03
KH ₂ PO ₄ (mg L ⁻¹)	17,5	Cl (mg L ⁻¹)	0,19 ± 0,01
NaCl (mg L ⁻¹)	2,5		
C ₁₀ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈ 2H ₂ O (mg L ⁻¹)	50		
KOH (mg L ⁻¹)	31		
FeSO ₄ · 7H ₂ O (mg L ⁻¹)	4,98		
H ₃ BO ₄ (mg L ⁻¹)	11,42		
ZnSO ₄ · 7H ₂ O (mg L ⁻¹)	8,82		
MnCl ₂ · 4H ₂ O (mg L ⁻¹)	1,44		
MoO ₃ (mg L ⁻¹)	0,71		
CuSO ₄ · 5H ₂ O (mg L ⁻¹)	1,57		
Co(NO ₃) ₂ · 6H ₂ O (mg L ⁻¹)	0,49		

3.2.3. Determinação da biomassa de microalgas e produtividade lipídica

A separação da microalga do meio de cultura se deu por centrifugação a 2000 rpm por 20 min. A biomassa resultante foi seca em estufa a 50 °C por 24 horas, e então, mantida seca para análises posteriores.

A concentração de biomassa de *Scenedesmus* sp. foi estimada gravimetricamente pelo peso seco. A produtividade de biomassa (B_p , $g L^{-1} d^{-1}$) foi calculada de acordo com a Equação (1) (Matos et al., 2015).

$$B_p = \frac{(x_t - x_0)}{(t_x - t_0)} \quad (1)$$

onde, X_t é a produção de biomassa ($g L^{-1}$) ao final da fase exponencial de crescimento (t_x) e X_0 é a produção inicial de biomassa ($g L^{-1}$) em t_0 (dia).

A produtividade lipídica (LP , $mg L^{-1} d^{-1}$) da cultura de microalgas foi calculada conforme a Equação (2) (Sing et al., 2015).

$$LP = \frac{(B_p \cdot L_c)}{100}$$

onde, B_p ($mg L^{-1} d^{-1}$) é concentração de biomassa de microalgas e L_c (%) é concentração de lipídios da biomassa da microalga.

3.2.4. Extração de lipídios e análise de ácidos graxos

Os lipídeos presentes na biomassa seca foram quantificados pelo método de Bligh e Dyer (1959) modificado usando extração a frio com uma mistura de clorofórmio e metanol (2:1 v/v) e foram quantificados conforme a equação (2). Os ácidos graxos presentes nos lipídios foram quantificados por cromatografia gasosa usando um cromatógrafo a gás, modelo GC-2014 (Shimadzu, Kyoto, Japan), equipado com um detector de ionização de chama, uma coluna capilar de 105 m de comprimento (ID

= 0,25 mm) preenchida com 0,25 ml de 10% de cianopropilfenilo e 90% de biscanoano propilsiloxano. As temperaturas do injetor e do detector foram de 260 °C. A temperatura do forno foi inicialmente ajustada em 140 °C por 5 min e, em seguida, programada a 2,5 °C min⁻¹. A composição qualitativa foi determinada comparando os tempos de retenção dos picos com os respectivos padrões de ácidos graxos (Sigma, St. Louis, EUA). A composição quantitativa foi obtida por normalização da área e expressa em porcentagem de massa.

3.2.5. Concentração de nutrientes e ensaios físico-químicos

Os nutrientes fósforo e nitrogênio foram determinados (PO_4^{3-} , NO_2^- e NO_3^-) nos cultivos nas diferentes concentrações (20, 40, 60, 80 e 100% e no cultivo controle (0% EAS), utilizando método calorimétrico com equipamento Colorímetro da HACH DR 890, método com digestão de ácido persulfato - 8190 (PO_4^{3-}), método de salicilato - 8189 (NH_3), método de diazotização - 8507 (NO_2^-), e pelo método de redução de cádmio - 8292 (NO_3^-).

As medidas de condutividade elétrica foram obtidas com equipamento multiparâmetro HANNA 98196. Os sólidos totais foram determinados pelo método gravimétrico. O pH foi medido com pHmetro Sensorglass modelo SP 1800. A turbidez foi medida com turbidímetro Plus ALFAKIT. Para a medida de cor foi usado o disco Alpha Platinum Cobalto da HACH - USA. A alcalinidade total em mg L⁻¹ de CaCO_3 foi medida pelo método de titulação de ácido sulfúrico. O cloro residual foi determinado pelo método 53 da ALFAKIT. A análise de DBO foi determinada com equipamento da Velp Científica BOD SENSOR. Todos os parâmetros foram realizados de acordo com o Standard Method of Water and Wastewater (APHA, 2005).

3.2.6. Análises usando a Microscopia eletrônica de varredura com análise de espectroscopia de energia dispersiva (SEM/EDS)

A fim de determinar a composição de metais presente na biomassa algal, às amostras foram revestidas com uma fina película de ouro condutora elétrica, e examinadas por microscopia eletrônica de varredura de alta resolução equipada com espectrômetro de energia dispersiva (SEM-EDS). A análise SEM-EDS foi

realizada com o auxílio de um microscópio SEM model JSM-6390LV, Jeol (Peabody, Mass., USA), com potencial de aceleração de 15 kV.

3.2.7. Determinação de metais

As determinações dos metais presente na biomassa algal foram determinadas após a digestão ácida com ácido nítrico e peróxido de hidrogênio. Para a quantificação de Cd foi utilizado Espectrofotômetro de Absorção Atômica de Forno de Grafite (ETAAS) Varian, modelo 220 Zeeman, e para análises de Cu, Ni e Zn foi utilizado O espectrofotômetro de Absorção Atômica de Chama: Marca: Agilent Technologies Modelo: 240 FS AA com amostrador automático e bomba de introdução de amostras System SIPS.

3.2.8. Determinação da eficiência de recuperação de nutrientes

As concentrações dos nutrientes (PO_4^{-3} , NO_2^- e NO_3^-) foram analisadas conforme item 2.4. A eficiência de recuperação de nutrientes foi calculada de acordo com o balanço elementar seguindo a Equação (3) (Chang et al., 2018);

$$X = \frac{X_{\text{final}}C_{\text{final}}}{C_{\text{initial}}} 100 \quad (3)$$

onde X (% , w / w) é a eficiência de recuperação de nutrientes, X_{final} (g L^{-1}) e C_{final} (% , W / W) são a concentração de biomassa de microalgas e conteúdo do nutriente em biomassa de microalgas no tempo final, C_{initial} (g L^{-1}) é a concentração calculada do elemento específico no lixiviado do aterro no tempo inicial.

3.2.9. Análises Estatísticas

A análise estatística foi realizada aplicando análise de variância (ANOVA), utilizando o Software STATISTICA (versão 7.0) da StatSoft Inc. (2004). Quando foram observadas diferenças significativas, as médias de tratamento foram diferenciadas usando comparações pareadas aplicando o teste de Tukey, com $p < 0,05$.

3.2. Resultados e Discussão

3.3.1. Efeito da concentração do EAS na produtividade de biomassa e lipídeos

Para avaliar a aplicabilidade de EAS como meio de cultura, este foi misturado com o meio Chu antes do cultivo de microalgas. Diferentes concentrações de EAS foram testadas para determinar seu efeito no crescimento de microalgas, medido como produtividades de biomassa e lipídios. Os resultados de produtividade para cada concentração de EAS foram avaliados na fase log da cultura, isso é no décimo dia (Tabela 3.2).

Tabela 3.2. Efeito das concentrações de efluente de aterro sanitário (EAS) na produtividade de biomassa e lipídios de *Scenedesmus* sp.

EAS (%) v/v	Concentração de Biomassa (g L ⁻¹)	Conteúdo Lipídico (%)	Produtividade de Biomassa (mg L ⁻¹ d ⁻¹)	Produtividade Lipídica (mg L ⁻¹ d ⁻¹)
0	1,07 ± 0,02 ^a	9,21 ± 0,25 ^a	40,03 ± 0,02 ^a	3,68 ± 2,5 ^a
20	1,01 ± 0,02 ^a	10,79 ± 0,32 ^a	31,01 ± 0,02 ^a	3,34 ± 2,0 ^a
40	1,50 ± 0,02 ^a	18,76 ± 0,48 ^b	80, 00 ± 0,10 ^b	15,00 ± 3,0 ^{ab}
60	1,73 ± 0,04 ^a	23,69 ± 1,00 ^b	103,31 ± 0,07 ^b	24,40 ± 3,9 ^b
80	2,57 ± 0,05 ^b	18,09 ± 0,57 ^b	187,12 ± 0,17 ^c	33,82 ± 5,2 ^b
100	2,27 ± 0,03 ^b	5,79 ± 0,22 ^a	157,03 ± 0,14 ^c	9,09 ± 1,2 ^a

Os dados representam a média ± DP (n = 3). Os valores na mesma coluna com diferentes letras sobrescritas são significativamente diferentes (p < 0,05)

Nos cultivos foram observadas diferenças significativas (p < 0,05) na produtividade de biomassa e na produtividade lipídica. Os cultivos com 80% e 100% de EAS apresentaram uma maior produtividade de biomassa de 187 ± 0,17 mg L⁻¹ d⁻¹ e 157 ± 0,14 mg L⁻¹ d⁻¹ respectivamente e com uma produtividade lipídica de 33,82 ± 5,2 mg L⁻¹ d⁻¹ e ± 9,0 mg L⁻¹ d⁻¹ respectivamente. A redução na produtividade em biomassa, e em especial a lipídica, no cultivo com 100% de efluente, pode estar relacionada com o aumento da cor que atinge 360 ± 20 CU (Tabela 3.1), podendo dificultar a transferência da luz dentro da cultura de microalgas reduzindo assim, a disponibilidade de luz e conseqüentemente a diminuição da taxa de fotossíntese (Chang et al., 2018). Essa interferência da cor na concentração de 100% de efluente é observada quando a produtividade de biomassa atinge 187,12 mg L⁻¹ na concentração de 80% e cai para 157,03mg L⁻¹ para 100% EAS (Tabela 3.2). No trabalho de Mandotra et al. (2016) durante o cultivo da *Scenedesmus abundans* em

meio sintético a produtividade lipídica e da biomassa foram $39,16 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ e $119,5 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ usando uma intensidade luminosa de 6.000 Lux. Os mesmos autores verificaram também a influência da adição de 60 mg de fósforo no cultivo algal, ocorrendo um aumento na produtividade de biomassa ($134,0 \pm 1,4 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) e de lipídios ($30,78 \pm 0,5 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$). No estudo de McGinn (2012) as microalgas *Scenedesmus* sp. foram cultivadas em fotobiorreatores Brite-Box (PBR), com capacidade de 300 L usando como meio de cultivo um o efluente secundário da estação de tratamento de águas residuais e a produtividades máximas de biomassa observadas foram em torno de $130 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$.

3.3.2. Efeito da concentração EAS na composição dos ácidos graxos

A composição de ácidos graxos (AGs) de *Scenedesmus* sp. cultivados na concentração ótima de efluente (80% EAS) e com o controle (0 % EAS) está mostrada na Tabela 3.3. Os cromatogramas dos ácidos graxos de *Scenedesmus* sp. estão apresentados no Apêndice A e B.

Tabela 3.3. Composição de ácidos graxos (% AGs) de *Scenedesmus* sp. cultivada com 80% de EAS e controle (% EAS).

	Ácidos graxos (% AGs)							
	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C19:0	C20:0	C20:5
0%EAS	27,02	0,00	8,51	5,93	54,12	nd	nd	4,42
80 %EAS	17,55	2,57	39,34	nd	15,53	2,75	4,07	18,19

nd – não detectado.

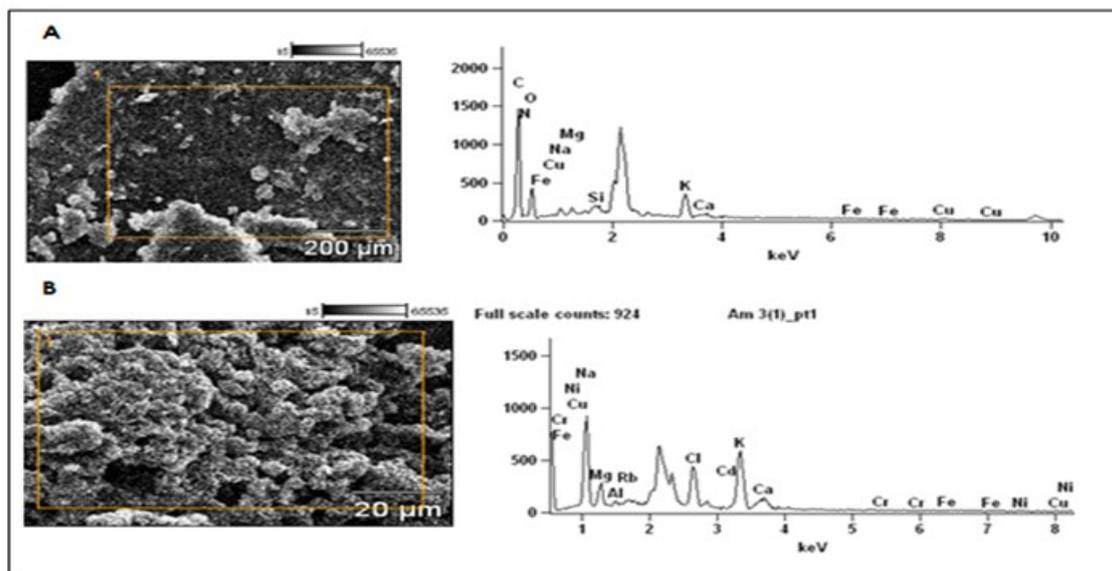
Nos cultivos 0% EAS, os AGs predominantes são os ácidos linolênico (C18:3 – 54,12%) e palmítico ácido (C16:0 – 27,02%), representando 81,14% do teor total de AGs. Enquanto no cultivo contendo 80% EAS os AGs predominantes são os ácidos oleico (C18:1 – 39,34%), palmítico (C16:0 – 17,55%), inolênico (C18:3 – 15,53%) e o eicosapentaenóico (C20:5 – 18,19) representando 90,61% do conteúdo total de ácidos graxos (%). O conteúdo de AGs na microalga foi maior em ácidos graxos poli-insaturados (AGPIs – 62,96%) quando os cultivos foram realizados na ausência de EAS. Nos cultivos com 80% EAS houve uma redução dos AGPIs (33,72 %) e aumento dos monoinsaturados (AGMI – 39,34 %),

havendo a predominância de ácidos graxos monoinsaturados e saturados (66.28 %), que é adequado para a produção de biodiesel (Arias-Peñarands et al., 2013, Wahlen et al. al., 2013, Chen et al., 2012).

3.3.3. SEM / EDS – Composição elementar da biomassa

As análises no SEM / EDS – espectrômetro de energia dispersiva (Espectrômetro de Raio-X) (Figura 3.2 e Tabela 3.4) permitem determinar a composição elementar da biomassa seca de microalgas. A análise EDS mostrou que a biomassa cultivada com 80% de EAS apresenta uma concentração mais elevada de metais (Al – 0,42%), Fe – 0,29%), Ni – 0,57%, Cu – 0,82%, Cd - 0,54% e Rb -1,61%) enquanto na biomassa cultivada sem EAS (0% EAS) foram identificados somente Fe (0,17%) e Cu (2,23%). O carbono foi o elemento encontrado em maior proporção em ambas biomassas. Na biomassa cultivada sem EAS observou-se uma maior concentração de carbono (69,24%) e no cultivo com 80% de EAS foi de apenas se 36,97%. No entanto, nesta biomassa foi observado uma maior quantidade de O (16,06% - 24,69%), N (10,88% - 11,64%), Na (1,20% - 6,68%), Mg (0,70% - 1,19%), Cl (0 - 5,18%) e K (5,69% - 8,04%).

Figura 3. 2. Resultados da avaliação das biomassas cultivadas em 0% de EAS (A) e 80% de EAS (B) usando a microscopia eletrônica de varredura (MEV / EDS).



SEM / EDS - Espectrômetro de energia dispersiva - X-ray Spectrometer LCME/UFSC

Tabela 3.4. Resultados para a análise de EDS da biomassa de *Scenedesmus* sp. cultivada em 0% EAS e 80 %EAS

Biomassa - 0% EAS			Biomassa – 80 % EAS		
Elemento	Elemento % (p/p)	% (p/p) Erro	Elemento	Elemento % (p/p)	% (p/p) Erro
C	60,24	+/-0,81	C	36,97	+/-0,68
N	10,88	+/-3,14	N	11,64	+/-1,62
O	16,06	+/-0,81	O	24,69	+/-0,37
Na	1,20	+/-0,08	Na	6,68	+/-0,15
Mg	0,70	+/-0,05	Mg	1,19	+/-0,05
Si	1,67	+/-0,13	Al	0,42	+/-0,06
K	5,69	+/-0,25	Cl	5,18	+/-0,09
Ca	1,15	+/-0,12	K	8,04	+/-0,24
Fe	0,17	+/-0,17	Ca	1,34	+/-0,20
Cu	2,23	+/-0,62	Fe	0,29	+/-0,17
			Ni	0,57	+/-0,25
			Cu	0,82	+/-0,34
			Rb	1,61	+/-0,16
			Cd	0,54	+/-0,28
Total	100,00		Total	100,00	

SEM / EDS - Espectrômetro de energia dispersiva - X-ray Spectrometer LCME/

3.3.4. Metais nos meios de cultivo

Os resultados dos metais Cd, Cu, Ni e Zn estão apresentados na Tabela 3.5. As análises foram realizadas somente no cultivo que mostrou melhor produtividade de biomassa e lipídica (80% EAS) e no líquido de cultivo sem a presença de EAS (0% EAS) para fins comparativos. O meio de cultivo sem EAS apresentou maiores concentrações de Cu, enquanto que no meio com 80% EAS houve a presença de maior concentração de Cd, Ni e Zn.

Tabela 3. 5. Concentrações de metais nos meios de cultivo controle (0% EAS) e 80% EAS antes de iniciar o crescimento da *Scenedesmus* sp.

Meio de cultivo	Cd (µg/L)	Ni (µg/L)	Cu (µg/L)	Zn (µg/L)
0% EAS	0,013	7,0	28,0	56,7
EAS 80%	0,039	160,0	18,0	70,8

Ao comparar os dados da tabela 3.4 com a tabela 3.5, observa-se que durante o cultivo com EAS ocorre um processo de bioissorção de metais pela biomassa de microalgas. As microalgas mostram a capacidade de remoção para todos de metais analisados, com exceção ao Zn que não foi observado na biomassa após 10 dias de cultivo (Tabela 3.4). A disponibilidade dos metais na água de cultivo possibilita a remoção seletiva destes metais pela microalga.

3.3.5. Eficiência na recuperação de nutrientes do meio de cultura contendo EAS

O EAS contém componentes valiosos que podem ser usados pelas células das microalgas como nutrientes: ($4,0 \pm 0,2 \text{ mg L}^{-1}$), NO_2^- ($5,1 \pm 1,87 \text{ mg L}^{-1}$), NO_3^- ($2,15 \pm 31,08 \text{ mg L}^{-1}$) e PO_4^{3-} ($30,0 \pm 2,54 \text{ mg L}^{-1}$). A utilização destes nutrientes pela microalga *Scenedesmus* sp., é mostrado na Tabela 3. 6. As análises de caracterização do efluente mostram os nutrientes que possibilitam o crescimento da biomassa sem a necessidade de incorporação de outros nutrientes,

proporcionando diminuição dos custos e aproveitamentos dos nutrientes lançados nos corpos hídricos.

Tabela 3. 6. Remoção de nutrientes pela *Scenedesmus* sp. cultivadas em diferentes concentrações de efluente de aterro sanitário (EAS).

EAS (%)	NO ₂ ⁻ (%)	NO ₃ ⁻ (%)	PO ₄ ³⁻ (%)
V/V			
0	70,88 ± 3,88 ^a	57,85 ± 13,10 ^a	61,55 ± 2,40 ^a
20	51,82 ± 0,92 ^a	39,70 ± 5,25 ^{ab}	72,57 ± 1,22 ^a
40	38,82 ± 1,08 ^{ab}	54,12 ± 2,03 ^a	67,87 ± 0,64 ^a
60	42,80 ± 8,34 ^{ab}	52,02 ± 0,94 ^a	92,02 ± 3,83 ^b
80	26,78 ± 4,35 ^b	68,99 ± 2,81 ^a	87,00 ± 7,95 ^b
100	65,42 ± 1,65 ^a	24,01 ± 1,25 ^b	87,49 ± 0,61 ^b

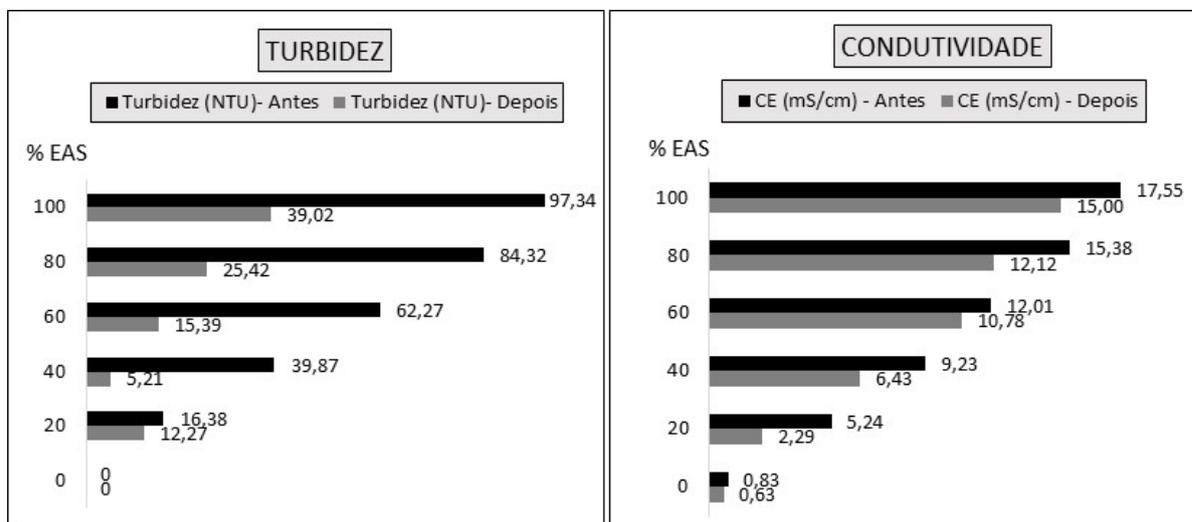
Os dados representam a média ± DP (n = 3). Os valores na mesma coluna com diferentes letras sobrescritas são significativamente diferentes (p <0,05).

Quando foi usado o meio de cultivo contendo 20-, 40-, 60- e 100% de efluente não foram observadas diferenças significativas para os resultados de NO₂⁻ quando comparado com o meio sem EAS. Para os resultados de NO₃⁻ foi observado diferenças significativas no cultivo contendo 100% de EAS, e para o nutriente PO₄³⁻ foi verificado um aumento na remoção nos cultivos contendo 60%, 80% e 100%. Estas remoções demonstram a capacidade das microalgas de aproveitar os nutrientes para o crescimento da sua biomassa e produtividade lipídica. O fósforo apresenta valores altos de recuperação para quase todos os percentuais de EAS, pelo fato de ser um nutriente essencial para o crescimento das células de microalgas e para os processos celulares envolvidos, como por exemplo, divisão celular (Chang et al, 2018).

3.3.6. Condutividade elétrica e turbidez

O acompanhamento da condutividade elétrica e turbidez durante o cultivo (Figura 3.3) demonstra que as microalgas possuem a capacidade de reduzir esses parâmetros, melhorando a qualidade do efluente.

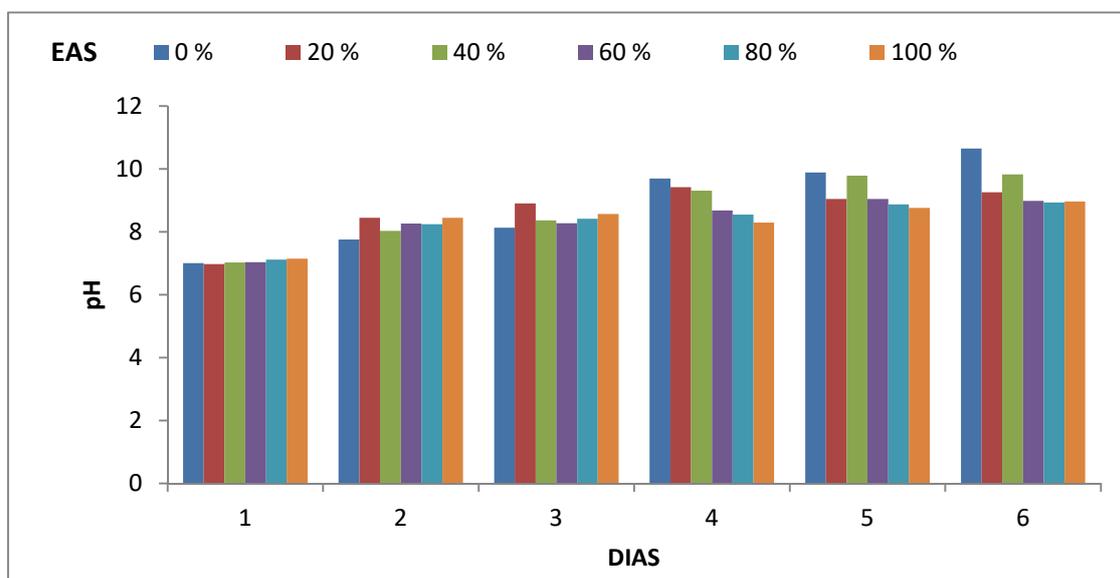
Figura 3. 3. Condutividade elétrica (CE) e turbidez na água de cultivo antes e após a realização dos cultivos de *Scenedesmus* sp. em diferentes concentrações de EAS



3.3.7. Variação no pH durante o cultivo de *Scenedesmus* sp. usando EAS

Para iniciar os cultivos da *Scenedesmus* sp. o pH foi ajustado em todos meios de cultivos para a faixa de 6,5 a 7,5. No decorrer do cultivo sem fazer novos ajustes foi observado um aumento crescente de pH em todos os cultivos, chegando a 10,65 no cultivo com meio Chu (0% EAS) no 10º dia, conforme mostrado na Figura 3. 4. A diminuição da turbidez relaciona-se ao processo de redução de sólidos em suspensão, de tamanhos microscópicos, como os coloides e argilas. Sua remoção pode estar relacionada ao processo de floculação das microalgas ou adsorção na biomassa (Castaño; Higueta, 2016; Girish et al., 2017).

Figura 3. 4. Variação do pH durante o cultivo de *Scenedesmus* sp. usando diferentes concentrações de EAS.



O aumento do pH pode estar relacionado com o crescimento da biomassa, enquanto que o crescimento da microalga está relacionado ao consumo do CO_2 que está dissolvido no meio, causando a elevação do pH. Assim o aumento da disponibilidade de CO_2 pode reduzir o pH. Meios de cultura ricos em carbono inorgânico dissolvido contêm CO_2 livre em concentrações elevadas a de equilíbrio com a atmosfera. Ocorrendo um fluxo de CO_2 do meio de cultivo para a atmosfera. A reposição do CO_2 , gera consumo de H^+ , que provoca o aumento do pH do meio até que a concentração de CO_2 dissolvido no meio líquido esteja em equilíbrio com a concentração de CO_2 na atmosfera. Elevações do pH podem ocorrer em função do metabolismo autotrófico, onde o íon bicarbonato do meio se dissocia formando CO_2 , para a fotossíntese, e a hidroxila (OH^-). (Andrade et al.,2008; Chi et al.,2011).

3.3.8. Vantagens do cultivo de microalgas usando EAS

O uso de microalgas para remoção de metais é uma alternativa de remediação promissora visto que sua versatilidade tem como vantagens o metabolismo cosmopolita, o crescimento celular acelerado, boa produtividade e boa adaptabilidade. Trabalhos envolvendo a remoção de metais por microalgas apontam vantagens no uso de microalgas, como baixo custo (Flores-Chaparro et al, 2017), a alta capacidade de adsorção, e reuso do meio de cultivo (He; Chen,

2014). Além da possibilidade de aproveitar a biomassa para geração de produtos com valor agregado (Yi et al., 2016).

O aproveitamento dos nutrientes presentes no EAS e a remoção de metais demonstra que os cultivos realizados com EAS é uma forma eficiente de gerar processos sustentáveis para o aproveitamento dos efluentes, que normalmente são descartados inadequadamente. Obtém-se assim, alternativas para produção de biomassa com produção concomitante de lipídeos que podem eventualmente ser convertidos em biodiesel, ou então destinados para a incorporação em fertilizantes agrícolas.

Os efluentes liberados no meio ambiente mesmo sob parâmetros de lançamentos adequados, representa um risco aos recursos hídricos. Sua liberação está atrelada a contaminação dos ecossistemas naturais devido à perda de qualidade nos parâmetros dos ambientes naturais, provocado por substâncias que não foram retiradas durante o tratamento, por falhas nos processos e excesso de efluente gerado em períodos chuvosos, entre outros. O ritmo de exploração dos recursos naturais exige nos dias atuais um uso cada vez mais efetivo, evitando-se processos insustentáveis que exigem tratamentos posteriores.

3.4. Conclusão

Os resultados indicaram que a microalga *Scenedemus* sp. foi capaz de se propagar em todos os meios de cultivo contendo EAS. No entanto, a concentração de 80%, permitiu obter um maior rendimento celular com produtividade de biomassa atingindo ($187,12 \pm 0,17 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) e produtividade lipídica ($33,82 \pm 5,2 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$). O conteúdo de AGs na microalga foi maior em ácidos graxos poli-insaturados (AGPIs – 62,96%) quando os cultivos foram realizados na ausência de EAS. Nos cultivos com 80% EAS houve uma redução dos AGPIs (33,72 %) e aumento dos monoinsaturados (AGMIs – 39,34 %). Nesta concentração ótima, a microalga foi capaz de recuperar os nutrientes contidos no efluente obtendo porcentagem elevadas para, nitrito (NO_2^- - $26,78 \pm 4,35\%$), nitrato (NO_3^- - $68,99 \pm 2,81\%$) e fósforo (PO_4^{3-} – $87,00 \pm 7,95\%$) em relação ao tratamento controle, bem como a

biossorção de metais observados na biomassa seca (Al, Fe, Ni, Cu, Cd e Rb). Os metais adsorvidos representam suplementação inorgânica para o desenvolvimento do cultivo e o tratamento de polimento no efluente quando elevado número atômico, evitando processo de bioacumulação.

A diminuição dos nutrientes incorporada e a remoção dos metais durante os cultivos se relacionam com a diminuição de custos e a possibilidade de processos mais sustentáveis, entre eles com menores impactos aos recursos hídricos, caracterizando-se como de grande importância para se amenizar os impactos ambientais vividos na atualidade. Além da geração de biomassa rica em lipídeos que podem ser convertidos em biodiesel, acarretando na redução imediata nos custos de produção e tratamento do efluente ao mesmo tempo.

Referências

Allil, R. C., Alfredo, M., Allil, A. Rodrigues, I., Werneck, A., Diaz, G. C., Dino, F. T., Reyes, Y., Werneck, M. 2018. Solar tracker development based on a POF bundle and Fresnel lens applied to environment illumination and microalgae cultivation. *Sol. Energy*.174, 648-659. <https://doi.org/10.1016/j.solener.2018.09.061>.

Arias-Peñarands, M.T., Cristiani-Urbina, E., MontesHorcasitas, Esparza, C.M., García, F., Torzillo, G., Cañizares-Villanueva, R.O. 2013. *Scenedesmus incrassatulus* CLHE-Si01: A potential source of renewable lipid for high quality biodiesel production. *Bioresour. Technol.* 140. 158-164. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.04.080>

APHA - American Public Health Association. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, Washington, DC, 21st ed., 2005.

Bligh, E.G., and Dyer, W.J. 1959. A rapid method of total lipid extraction purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 37(8), 911-917.

Castaño, J.A., J.C. Higueta. 2016. Using turbidity for designing water networks. *J. Environ. Manage.* <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.02.027>

Chang, H., Quan, X., Zhong, N., Zhang, Z., Lu, C., Li, G., Cheng, Z., Yang, L. 2018. High efficiency nutrients reclamation from landfill leachate by microalgae *Chlorella vulgaris* in membrane photobioreactor for bio-lipid production. *Bioresour. Technol.* <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.06.077>.

Chen, C. Y. Zhao, X.Q., Yen, H.W., Ho, S., Cheng, C.L., Lee, D.J. Bai, F.W., Chang, J.S. 2013. Microalgae-based carbohydrates for biofuel production. *Biochem. Eng. J.* 78, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2013.03.006>.

Chen, L., Liu, T., Zhang, W., Chen, X., Wang, J. 2012. Biodiesel production from algae oil high in free fatty acids by two-step catalytic conversion. *Bioresour. Technol.* 111, 208-214. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.02.033>.

Chi, Z., James, V. O'F., Chen, S. 2011. Bicarbonate produced from carbon capture for algae culture. *Trends Biotechnol.* 29, 0167-7799.

<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.06.006>

Chisti, Y. 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnol. Adv.* 25, 294-306.

<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.02.001>.

Chu, S. P. 1942. The influence of the mineral composition of the medium on the growth of planktonic algae. *J. Ecol.* 30, 284-325.

Costa, A. M., Alfaia, R. G. de S. M., Campos, J. C. 2019. Landfill leachate treatment in Brazil – An overview. *J. Environ. Manag.* 232, 110-116.

<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.11.006>.

Farnane, M., Tounsadi, H., Elmoubarki, R., Mahjoubi, F.Z., Elhalil, A., Saqrane, S., Abdennouri, M., Qourzal, S., Barka, N. 2017. Alkaline treated carob shells as sustainable biosorbent for clean recovery of heavy metals : Kinetics, equilibrium, ions interference and process optimisation. *Ecol. Eng.* 101, 9-20.

<https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2017.01.012>

Flores-Chaparro, C. E., Rodriguez-Hernandez, M. C., Chazaro-Ruiz, L. F., Torre, Ma. C. A.-D., Huerta-Diaz, I. M. A., Rangel-Mendez, J. R. 2018. Chitosan-macroalgae biocomposites as potential adsorbents of water-soluble hydrocarbons: Organic matter and ionic strength effects. *J. Clean. Prod.* 197. 633-642.

<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.06.200>.

Girish, C. R., Singh, S. K., Shenoy, S. 2017. Removal of suspended solids from dairy wastewater using flocculation. *Int. J. Mech. Eng. and Technol.*, 8(11), 99-105.

He, J., Chen, J. P. 2014. A comprehensive review on biosorption of heavy metals by algal biomass: Materials, performances, chemistry, and modeling simulation tools. *Bioresour. Technol.* 160, 67-78.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.01.068>.

Ho S-H., Chen, W-M., Chang J-S, 2010. *Scenedesmus obliquus* CNW-N as a potential candidate for CO₂ mitigation and biodiesel production. *Bioresour. Technol.* 101, 8725-8730. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.112>

Ho, S. H. Chang, J. S., Lai, Y. Y., Chen, C. N. N. 2014. Achieving high lipid productivity of a thermotolerant microalga *Desmodesmus* sp. F2 by optimizing environmental factors and nutrient conditions. *Bioresour. Technol.* 156, 108-116. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.01.017>.

Jayakumar, R., Rajasimman, M., Karthikeyan, C. 2014. Sorption of hexavalent chromium from aqueous solution using marine green algae *Halimeda gracilis*: Optimization, equilibrium, kinetic, thermodynamic and desorption studies. *J. Environ. Chem. Eng.* 3, 1261–1274. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2014.05.007>

Jena, J., Nayak, M., Panda, H.S., Pradhan, N., Sarika, C., Panda, P.K., Rao, B.i V. S. K., Prasad, R.B.N., Sukla, L.B. 2012. Microalgae of Odisha Coast as a Potential Source for Biodiesel Production. *World Environ.* 2, 11-16.

Kantarli, I. C., Arzu, K., Suat, U., Yanik, J. 2016. Conversion of poultry wastes into energy feedstocks. *Waste Management.* 56, 530-539. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2016.07.019>.

Liang, Z. et al. 2017. The retained templates as “helpers” for the spherical meso-silica in adsorption of heavy metals and impacts of solution chemistry. *J. Coll. Interf. Sci. China.* 496, 382-390. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2017.02.024>.

Ma, H., Guo, Y., Qin, Y., Li, Y-Y. 2018. Nutrient recovery technologies integrated with energy recovery by waste biomass anaerobic digestion. *Bioresour. Technol.* 269, 520-531. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.08.114>.

Mandotra, S.K., Kumar, P., Suseela, M.R., Nayaka, S. Ramteke, P.W. 2016. Evaluation of fatty acid profile and biodiesel properties of microalga *Scenedesmus abundans* under the influence of phosphorus, pH and light intensities. *Bioresour. Technol.* 201. 222-229. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.11.042>.

McGinn, P.J., Dickinson, K. E., Park, K.C., Whitney, C. G., MacQuarrie, S. P., Black, F. J., Frigon, J.-C., Guiot, S. R., Stephen, J.B. O'Leary, 2012. Assessment of the bioenergy and bioremediation potentials of the microalga *Scenedesmus* sp. AMDD cultivated in municipal wastewater effluent in batch and continuous mode. *Algal Research*. 1. 155-165. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2012.05.001>.

Matos, Â. P., Feller, R., Moecke, E. H. S., Sant'Anna, E. S. 2015. Biomass, lipid productivities and fatty acids composition of marine *Nannochloropsis gaditana* cultured in desalination concentrate. *Bioresour. Technol.* 197, 48-55. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.041>.

Metting, B., Pyne, John W. 1986. Biologically active compounds from microalgae. *Enzyme Microb. Technol.* 7, 386-394. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(86\)90144-4](https://doi.org/10.1016/0141-0229(86)90144-4).

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^o.1 Campinas. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612010000100026>.

Moal, O. Le., Chantal, G-O., Ménesguen, A., Souchon, Y. Étrillard, C., Levain, A., Moatar, F. Pannard, A. Souchu, P., Lefebvre, A. Pinay, G. 2019. Eutrophication: A new wine in an old bottle? *Sci. Total Environ.* 651, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.09.139>.

Sun, Dongya. Gao, Y., Hou, D., Zuo, K., Chen, X., Liang, P., Zhang, X., Zhiyong, J. R., Huang, Xia. 2018. Energy-neutral sustainable nutrient recovery incorporated with the wastewater purification process in an enlarged microbial nutrient recovery cell. *J. Power Sources*. <https://doi.org/10.1039/c8ew00306h>

Wahlen, B.D., Morgan, M.R. McCurdy, A.T., Willis, R.M., Morgan, M.D., Dey, D.J., Bugbee, B., Wood, B.D., L.C. Seefeldt. 2013. Biodiesel from microalgae, Yeast, and bacteria: engine performance and exhaust emissions. *Energ. Fuel.* 27, 220-228. <https://doi.org/10.1021/ef3012382>

Wang, S.T., Pan, Y.Y., Liu, C.C., Chuang, L.T., Chen, C.N., 2011. Characterization of a green microalga UTEX 2219-4: effects of photosynthesis and osmotic stress on oil body formation. *Botanical Studies*. 52, 305-312. https://doi.org/10.1007/978-3-319-22813-6_5

Yang, Y. and K., Gao. 2003. Effects of CO₂ Concentrations on the Freshwater Microalgae, *Chlamydomonas Reinhardtii*, *Chlorella Pyrenoidosa* and *Scenedesmus Obliquus* (Chlorophyta). *J. Appl. Phycol.* 5, 379-389. <https://doi.org/10.1023/A:1026021021774>.

Yi, Z. et al. 2016. Uranium biosorption from aqueous solution onto *Eichhornia crassipes*. *J. Environ. Radioactiv.* 154, p. 43–51. <https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2016.01.012>

Yoo, C. So-Young, J., Jae-Yon, L. Chi-Yong, A. Hee-Mock, O. 2010. Selection of microalgae for lipid production under high levels carbon dioxide. *Bioresour. Technol.* 101, S71-S74. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.03.030>.

CAPÍTULO 4

PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE *SCENEDESMUS* sp. COM O USO DO PLASMA NÃO TÉRMICO PARA GERAÇÃO DE LIPÍDEOS COM POTENCIAL PARA BIODIESEL

Destaques

Plasma não térmico (PNT) usado em cultivos de *Scenedesmus* sp.;

Plasma não térmico aumenta a produtividade lipídica e de biomassa da microalga;

PNT afeta a composição dos ácidos graxos;

Aplicação do PNT no 2º dia aumente a produtividade lipídica da microalga.

Resumo

O plasma não térmico (PNT) em crescente expansão é considerado uma tecnologia limpa e eficiente. No presente estudo foi usado nos cultivos da *Scenedesmus* sp com o propósito de induzir o estresse oxidativo a fim de aumentar a produtividade lipídica na biomassa algal. Foram realizados dois tipos de estudo, no primeiro, o cultivo da microalga foi submetido ao PNT por 3 minutos a cada dois dias durante 10 dias e com análises a cada 48 h pós PNT. No outro estudo foram realizados 5 cultivos diferentes e em cada um foi submetido ao PNT em dias diferentes (2-, 4-, 6-, 8-, 10º dia), com análises após uma hora e seguido de novas análises a cada 48 h. No primeiro estudo verificou-se uma melhor produtividade lipídica quando o PNT foi aplicado 2º dia e no 4º dia de cultivo com aumentos de 20,67 mgL⁻¹d⁻¹ e 18,25 mg L⁻¹d⁻¹, respectivamente. E no segundo estudo, foi verificado a maior produtividade quando o PNT foi aplicado no 2º dia (21,83 mg L⁻¹d⁻¹) e 6º dia (22,67 mg L⁻¹d⁻¹) de cultivo. Na biomassa obtida após aplicação do plasma no 2º dia de cultivo foi observado um aumento nos teores de ácidos graxos monoinsaturados (C18:1), enquanto no cultivo controle houve uma maior concentração de ácidos graxos poli-insaturados (C18:3). A presença de ácidos

graxos poli-insaturados é menos favorável para a produção de biodiesel devido aos processos de degradação. A aplicação do plasma como método de pré-tratamento na ruptura da parede celular das microalgas se mostrou eficiente para aumentar a extração lipídica. Os resultados foram próximos aos obtidos com o método de ultrassom já estabelecido na literatura. Os resultados obtidos mostram que o uso do plasma para induzir a produção de lipídeos é uma tecnologia promissora para ser aplicada nos cultivos de biomassa visando à produção de biodiesel, uma vez que, com apenas 4 dias de cultivo obtém - se uma maior produtividade lipídica com menos tempo o que impacta diretamente nos custos.

Palavras-chaves: Biomassa algal, estresse oxidativo, ácidos graxos, espécies reativas de oxigênio

Increasing non-thermal plasma (NTP) is considered a clean and efficient technology in the present study was used in the cultures of *Scenedesmus* sp. with the purpose of inducing oxidative stress in order to increase lipid productivity in algal biomass. Two types of study were carried out; in the first, the microalgae culture was submitted to NTP for 3 minutes every two days for 10 days and with analyzes every 48 hours after NTP. In the other study 5 different cultures were performed and each was submitted to NTP on different days (2-, 4-, 6-, 8-, 10th day). With analyzes after one hour and followed by new analyzes every 48 h. In the first study, a better lipid yield was observed when NTP was applied on day 2 and on day 4 of cultivation with increases of 20.67 mgL⁻¹d⁻¹) and 18.25 mg L⁻¹d⁻¹ respectively. In the second study, higher productivity was observed when NTP was applied in the second day (21.83 mg L⁻¹d⁻¹) and in the 6th day (22.67 mg L⁻¹d⁻¹). A higher concentration of monounsaturated fatty acids (C18:1) was observed in the biomass obtained after application of plasma on the second day of culture, whereas in the control culture there was a higher concentration of polyunsaturated fatty acids (C18:3). The presence of polyunsaturated fatty acids is less favorable for the production of biodiesel due to the degradation processes. The application of plasma as a pretreatment method in the microalgae cell wall rupture proved efficient in increasing lipid extraction. It showed results close to those obtained with the ultrasound method already established in the literature. The results obtained show that the use of plasma to induce lipid production is a promising technology to be

applied to biomass crops for the production of biodiesel, since with only 4 days of cultivation a higher lipid yield is obtained with less which directly impacts costs.

Keywords: Algal biomass, oxidative stress, fatty acids, reactive oxygen species

4.1. Introdução

As tecnologias impulsionadas por uma frequente demanda que envolve questões de eficiência, espaço nos grandes centros, respeito ao meio ambiente e a não geração de subprodutos, que exigem um novo tratamento estão em constante crescimento. O plasma não térmico (PNT) em crescente expansão é considerada uma tecnologia limpa e eficiente com muitas aplicações e ambientalmente correta por evitar uso de compostos químicos complexos (Mitrović et al., 2019; Kulawik et al., 2018).

O PNT também conhecido como plasma frio é formado a partir de um gás parcialmente ionizado composto por várias espécies atômicas, moleculares e iônicas, coexistindo com numerosas espécies reativas, incluindo elétrons, íons positivos e negativos, radicais livres, átomos e moléculas, e radiação eletromagnética (fótons UV e luz visível) (Bourke et al., 2018), onde a energia média dos elétrons é mais elevada que a dos íons e das moléculas de gás. A energia produzida para gerar o plasma não térmico é muito pequena sendo proporcional ao aumento da temperatura em torno de 25 °C. A descarga é produzida a partir da aplicação de um campo elétrico intenso, o que gera a formação de auto-propagação eletrônica dentro do volume de gás. Assim, no gás ionizado gerado, os elétrons colidem com as moléculas, criando espécies quimicamente ativas conhecidas como radicais (Ragazzi et. al., 2017).

O PNT é um meio quimicamente ativo formado por descargas elétricas de alta tensão, condições químicas que ocorrem em descargas elétricas na água que incluem a formação direta de espécies reativas de oxigênio (ROS) como peróxido de hidrogênio ($\cdot\text{H}_2\text{O}_2$), superóxido ($\cdot\text{O}_2$), hidroxila ($\cdot\text{OH}$) e ozônio (O_3), moléculas oxidantes, radiação ultravioleta (UV) e elétrons de alta energia. (Puač et al., 2018)

O plasma é utilizado para uma variedade de aplicações como no tratamento de resíduos tóxicos, no tratamento de água e efluentes tanto para a remoção de contaminantes químicos, (Magureanu et al., 2015) como para os microbiológicos (Chandana et al, 2018). Os mecanismos pelos quais o plasma inativa os microrganismos é causando danos às membranas celulares por radiação ultravioleta (UV) (Krewing et al., 2018). As espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, incluindo oxigênio atômico, ozônio, óxido nítrico e dióxido de nitrogênio são também mecanismos importantes de inibição microbiana mediada pelo PNT (Laroussi e Leipold, 2004). Novas aplicação do PNT, como uma rota promissora para a síntese de biocombustíveis, o bioetanol (Chernyak et al., 2011) e o biodiesel (Cubas et al., 2016).

As microalgas são microrganismos fotossintéticos com milhares de espécies existentes, com muito potencial e conteúdo químico a serem explorados em diversas áreas. Poucas são as variedades produzidas industrialmente (Salian, et al. 2017). Possuem um grande campo para o aproveitamento que envolve sua importância ecológica, biológica e econômica, possuindo uma capacidade de produção superior as das plantas (Breuer et al., 2015). Sua produtividade pode passar de 20 vezes a de óleo por hectare da oleaginosa de maior produtividade entre as plantas, a palmeira-de-dendê (*Elaeis guineensis* Jacq.) (Chisti, 2007), podendo ser produzidas em locais alternativos, não necessitando de terras férteis e água potável para seus cultivos (Breuer et al., 2015). Estes microrganismos não geram efluentes e ou resíduos, possibilita a existência de um processo de produção sustentável com o reaproveitamento de água, nutrientes, resíduos e gases (Chisti, 2019).

O cultivo de microalgas é promissor para a produção de biomassa em grandes quantidades. Sua biomassa é rica em subprodutos valiosos com aplicações para alimentação humana e animal, com grande produção de proteína e carboidratos, uso como alimentos bioativos e funcionais, produção de metabólitos secundários valiosos que envolvem: ácidos graxos poli-insaturados, aminoácidos e peptídeos, vitaminas, substâncias de crescimento, antibióticos e enzimas (Chisti, 2013; Sathasivam et al., 2017). Possui uso na indústria (cosmética, química, farmacêutica e geral) e na aquicultura. Pode ser usado para produção de

fertilizantes e tratamento de efluentes líquidos e gases (Batello et al., 2004), quando usado para produção de biocombustíveis, a produção precisa ser feita em larga escala para ser rentável. Para isso, é essencial que o processo se baseie em meios de cultura de baixo custo que diferem significativamente dos meios de cultura usados no laboratório (Chisti, 2019).

O investimento em pesquisa com biocombustíveis a partir de microalgas é visto com muitas vantagens ambientais, em função de ser uma alternativa ao uso de petróleo, as microalgas são fontes renováveis de produção de biocombustíveis. Proporcionando o crescimento de uma nova indústria de produção de biocombustíveis baseada na biorrefinação de substâncias extraídas da biomassa de microalga (Singh e Gu, 2010). O biometano (Lu et al., 2019), etanol (Lee et al., 2013), biodiesel (Akubude et al., 2019) são os combustíveis que podem ser obtidos a partir da biomassa de microalgas.

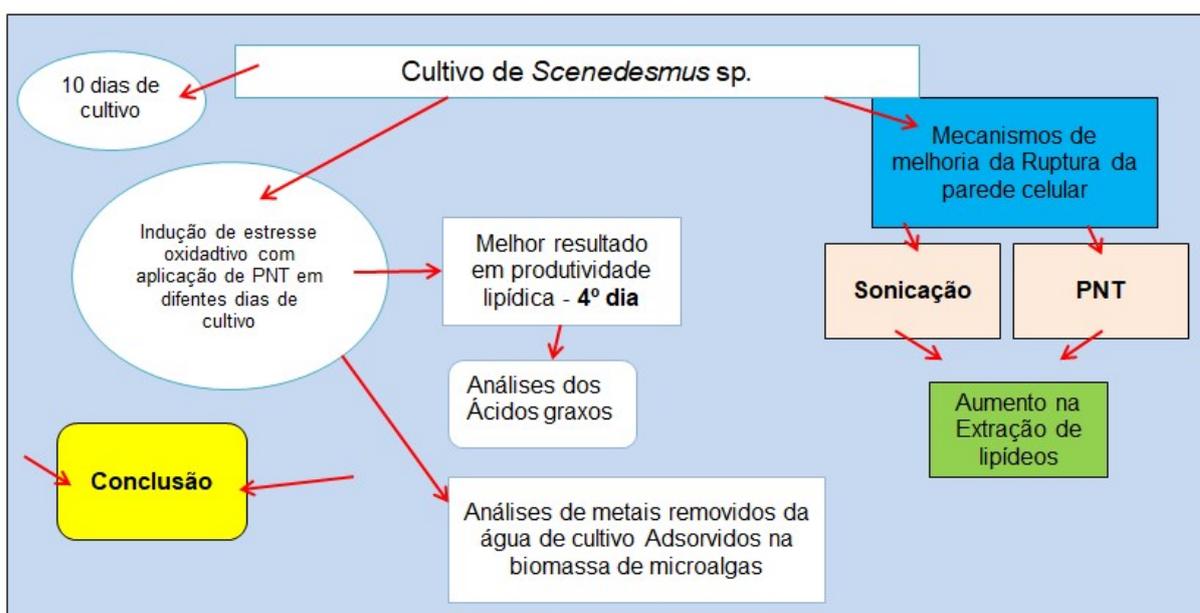
O cultivo de microalgas para uso em biocombustíveis é muito promissor e discutido atualmente, devido sua chamada sustentável. Não compete com agricultura e pode ser cultivada em espaços alternativos. Sua água de cultivo não precisa ser potável, podendo usar efluentes, águas salobras e salinas. Não gera subprodutos que necessita de pós-tratamento específico, possui um índice de reaproveitamento e ciclagem elevado dentro do próprio cultivo, com o aproveitamento da biomassa e da água de cultivo sem gerar efluentes e lodo com tratamentos específicos. (Borowitzka e Moheimani, 2013; Pandey et al., 2014; Chisti, 2018)

O aumento na concentração lipídica nas microalgas está relacionado com as condições que geram o estresse oxidativo nas células, que reagem na forma de mecanismo de defesa sintetizando lipídeos. Muitos estudos demonstram a eficiência do uso do estresse celular no aumento da concentração de lipídeos nas cepas de microalgas, tais como nutrientes, alta concentração de sais, condição de alta temperatura e mudança de pH. Ainda pode ser utilizado o efeito sinérgico de várias condições de estresse na produtividade lipídica. (Kwak et al., 2016). Em função do estresse oxidativo, reações redox de espécies reativas de oxigênio (ROS) são geradas nas células das microalgas, uma vez acumuladas, são neutralizadas por um mecanismo de defesa das células induzindo o acúmulo de

lipídeos e carboidratos, que elimina o excesso de oxidantes e evita os efeitos nocivos dos ROS. (Chokshi et al., 2017; Puač et al., 2018)

No presente estudo com aplicação do PNT nos cultivos da *Scenedesmus* sp. foi avaliado: (i) a produtividade lipídica pelas células da microalga a partir do estresse oxidativo provocado pelo PNT com a geração de ROS; (ii) o perfil dos ácidos graxos produzidos durante o cultivo com aplicação PNT e verificar se o óleo produzido tem potenciais para produção de biodiesel; (iii) a capacidade do PNT melhorar a extração do óleo da biomassa algal e comparar com o processo de sonificação já usado por outros pesquisadores. Na Figura 4. 1, é apresentado o esquema com a explicação do estudo desenvolvido.

Figura 4.1. Esquema explicativo do estudo de *Scenedesmus* sp. com PNT



4.2. Materiais e Métodos

4.2.1. Materiais

Todos os reagentes usados foram de grau analítico (Anidrol, Dinâmica, Sinteh e Neon) a água usada no preparo das soluções e nos meios de cultivo foi destilada.

Os gases usados como plasmogênicos foram gás argônio comercial e ar atmosférico e ambos usados sem tratamento prévio.

4.2.2. Microalga e condições de cultivo

A espécie de microalga utilizada nos experimentos foi *Scenedesmus* sp., microalga de água doce, foi obtida do setor de Ecotoxicologia do Laboratório de Engenharia Ambiental (LEA) da Universidade do Sul de Santa Catarina. Uma concentração inicial de aproximadamente 10^5 células mL^{-1} em meio de cultivo padrão Chu (Chu, 1942) foi utilizada para a preparação do inóculo e na Tabela 4.1 é apresentada a composição química do meio. Os cultivos foram realizados com um volume de 1700 mL em frascos do tipo Erlenmeyer de 2000 mL, mantidos em temperatura ambiente (25 ± 2 °C). As culturas foram mantidas sob aeração constante com a bomba Big Air (modelo A 420), com um fluxo de ar de aproximadamente $4,5 \text{ L min}^{-1}$ e fotoperíodo integral, proporcionado por lâmpadas fluorescentes do tipo luz do dia, com intensidade luminosa de $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. A temperatura foi mantida em 25 ± 2 °C. Todos os cultivos foram realizados em triplicata. No início do cultivo o meio foi mantido em pH $7,0 \pm 1$ e a condutividade elétrica (CE) $635 \mu\text{Scm}^{-1}$.

Tabela 4. 1. Composição do meio de cultivo Chu padrão (Chu, 1942).

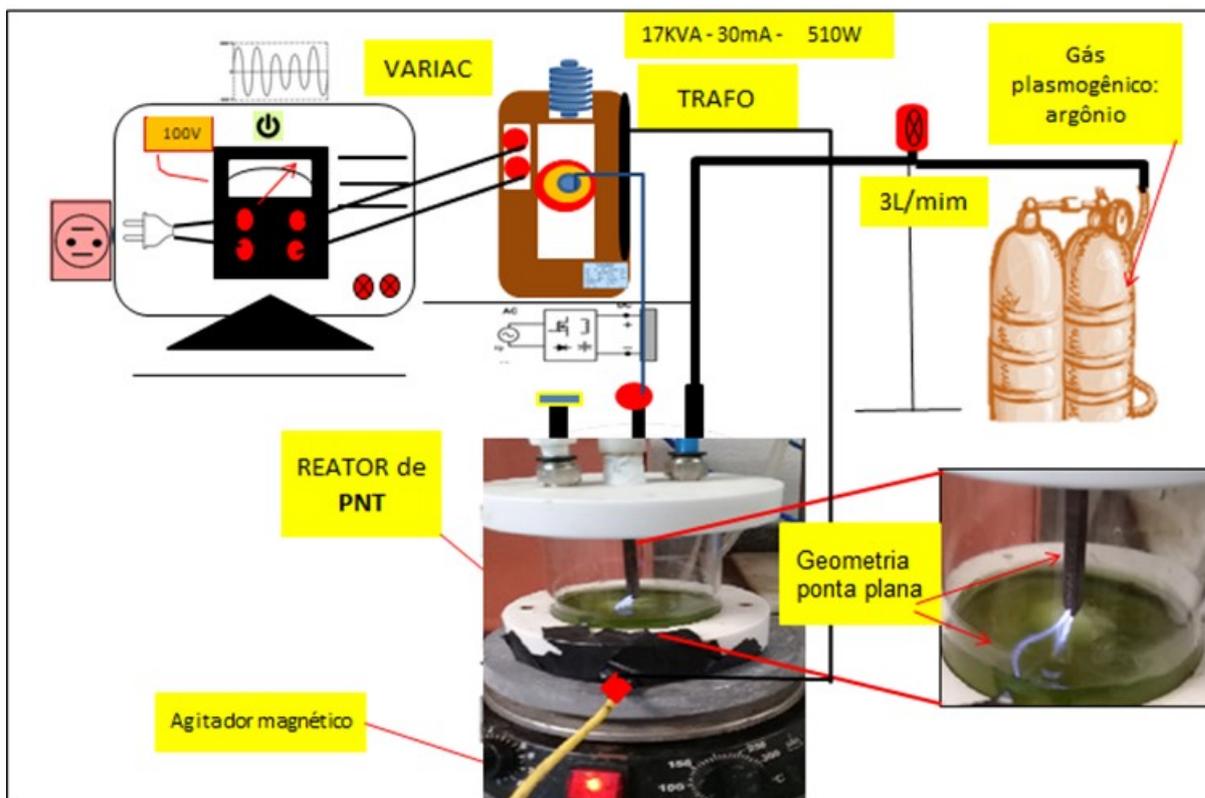
Meio Chu	Valor
$\text{NO}_2 \text{ N (mg L}^{-1}\text{)}$	$0,09 \pm 0,01$
$\text{NO}_3 \text{ N (mg L}^{-1}\text{)}$	$210 \pm 2,0$
$\text{PO}_4^{-3} \text{ P (mg L}^{-1}\text{)}$	$25 \pm 0,76$
Condutividade (mS cm^{-1})	934 ± 10
Turbidez (NTU)	0,00
Sólidos Totais - ST (mg L^{-1})	$0,88 \pm 0,05$
Cor (CU)	0,00
pH	$7,0 \pm 0,1$
$\text{NaNO}_3 \text{ (mg L}^{-1}\text{)}$	25,00
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O (mg L}^{-1}\text{)}$	2,50
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O (mg L}^{-1}\text{)}$	7,50
$\text{K}_2\text{HPO}_4 \text{ (mg L}^{-1}\text{)}$	7,50
$\text{KH}_2\text{PO}_4 \text{ (mg L}^{-1}\text{)}$	17,50
$\text{NaCl (mg L}^{-1}\text{)}$	2,50
$\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8\text{2H}_2\text{O (mg L}^{-1}\text{)}$	50,00
$\text{KOH (mg L}^{-1}\text{)}$	31,00
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O (mg L}^{-1}\text{)}$	4,98
$\text{H}_3\text{BO}_4 \text{ (mg L}^{-1}\text{)}$	11,42
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O (mg L}^{-1}\text{)}$	8,82

MnCL ₂ .4H ₂ O (mg L ⁻¹)	1,44
MoO ₃ (mg L ⁻¹)	0,71
CuSO ₄ .5H ₂ O (mg L ⁻¹)	1,57
Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O (mg L ⁻¹)	0,49

4.2.3. Reator de plasma não térmico

O plasma frio gerado no reator utilizado neste estudo é apresentado no esquema explicativo da Figura 4.1, operada à pressão atmosférica. O Plasma não térmico foi gerado usando uma fonte alternada de alta tensão (± 17 kV) e corrente 30 mA ligada a um transformador Variac ATV-215-MP (220-240 V; 60 Hz; 6,3 A; 1-1,5 kVA) usado para controlar a tensão elétrica de entrada com uma potência de saída de 510 W. Fluxo de gás plasmogênico (Argônio) comercial de 3 L min⁻¹. A geometria de operação empregada é do tipo ponta-plano em função dos eletrodos (Figura 2) com distância de 10 mm entre os dois eletrodos, um na fase gasosa e outro na fase líquida sendo que a descarga de plasma ocorre na fase gasosa.

Figura 4. 2. Esquema de funcionamento do reator de PNT para indução de estresse celular e para a ruptura da parede celular da *Scenedesmus* sp.



4.2.4. Determinação da biomassa de microalga e produtividade de lipídeos

A separação da microalga do meio de cultura ocorreu por centrifugação a 2000 rpm por 20 minutos e suspendida com água destilada. A biomassa resultante foi mantida em estufa de secagem a 50 °C por 24 horas e utilizada para análises posteriores.

A concentração de biomassa de *Scenedesmus* sp., desenvolvida no cultivo, foi estimada gravimetricamente pelo peso seco com desconto dos valores de cinzas. A produtividade de biomassa (B_p , $g L^{-1} d^{-1}$) foi calculado pela equação (1);

$$B_p = \frac{(x_t - x_0)}{(t_x - t_0)} \quad (1)$$

onde, X_t é a produção de biomassa (g L^{-1}) ao final da fase exponencial de crescimento (t_x) e X_0 é a produção inicial de biomassa (g L^{-1}) em t_0 (dia).

A produtividade lipídica (LP, $\text{mg L}^{-1}\text{d}^{-1}$) da cultura de microalgas foi calculada conforme a Equação (2) (Sing et al., 2015);

$$LP = \frac{(B_p \cdot LC)}{100} \quad (2)$$

Onde, B_p ($\text{mg L}^{-1}\text{d}^{-1}$) é a concentração de biomassa de microalgas e LC (%) é a concentração de lipídios da biomassa da microalga.

4.2.5. Análise de lipídeos e de ácidos graxos

Os lipídeos presentes na biomassa seca foram quantificados pelo método de Bligh e Dyer (1959) modificado, usando extração a frio com uma mistura de clorofórmio e metanol (2:1v/v), foram quantificados conforme a equação (2). A composição dos ácidos graxos presentes nos lipídeos foi realizada por cromatografia gasosa usando o cromatógrafo a gás, modelo 201 GC-2014 (Shimadzu, Kyoto, Japan), equipado com um detector de ionização de chama, uma coluna capilar de 105 m de comprimento (ID = 0,25 mm) preenchida com 0,25 mL de 10% de cianopropilfenilo e 90% de biscoano propilsiloxano. As temperaturas do injetor e do detector foram de 260 °C. A temperatura do forno foi inicialmente ajustada em 140 °C por 5 min e, em seguida, programada a 2,5 °C min^{-1} . A composição qualitativa foi determinada comparando os tempos de retenção dos picos com os respectivos padrões de ácidos graxos (Sigma, St. Louis, EUA). A composição quantitativa foi obtida por normalização da área e expressa em porcentagem de massa.

4.2.6. Indução do estresse oxidativo durante os cultivos

O PNT foi aplicado nos cultivos das microalgas *Scenedesmus* sp. para induzir o estresse oxidativo de duas formas distintas. A) O plasma foi aplicado no mesmo cultivo a cada dois dias, durante 3 minutos com uma tensão de 100 V com 3 L s^{-1} de gás argônio (Ar) e em agitação constante. O plasma foi aplicado em todo o volume do cultivo (1700m L). A produtividade de biomassa e de lipídeos foi

avaliada a cada dois dias após passar pelo plasma. B) Foram preparados cinco cultivos com aplicação do plasma em diferentes dias (2º, 4º, 6º, 8º e 10º) durante 3 minutos. A aplicação do plasma seguiu as mesmas condições do experimento (A), exceto pelo dia de aplicação do plasma e por se tratar de cultivos diferentes. A avaliação da biomassa e as extrações de lipídeos foram realizadas logo após a aplicação do plasma (1 hora) e a cada dois dias para verificar a eficiência do estresse. Totalizando 5 aplicações de plasma nos 10 dias.

4.2.7. Pré-extração de lipídios com PNT e ultrasonicação

O PNT e a sonicação foram usados como pré-tratamento para aumentar a eficiência no processo de extração dos lipídeos. Os experimentos foram realizados nos cultivos controle e nos cultivos com indução do estresse oxidativo no 2º dia e submetidos ao processo de ruptura da parede celular no 4º dia de cultivo. Tanto o processo de PNT como de sonicação foram realizados usando 100mL dos cultivos durante 15 minutos. As condições do PNT foram usadas nas mesmas condições usadas para o estresse. Para o processo de sonicação foi usado o banho de ultrassom, modelo Thornton – T 14, potência de 60 W e com uma frequência de 40KHZ. Após o pré-tratamento, os lipídeos foram quantificados de acordo com a metodologia de Bligh e Dyer (1959) modificado.

4.2.8. Microscopia eletrônica de varredura com observação do espectrômetro de energia dispersiva (SEM-EDS)

A fim de observar a microestrutura da biomassa seca e para caracterizar a distribuição dos elementos químicos na biomassa de *Scenedesmus* sp. cultivada nos diferentes cultivos, essas amostras foram examinadas por microscopia eletrônica de varredura de alta resolução equipada com espectrômetro de energia dispersiva. (SEM-EDS). A análise SEM-EDS foi realizada com o SEM model JSM-6390LV, Jeol (Peabody, Mass. USA) que foi operado com um potencial de aceleração de 15 kV. Antes da observação no SEM-EDS, a superfície da amostra foi revestida com uma fina película de ouro condutora elétrica.

4.2.9. Análises Estatísticas

A análise estatística foi realizada aplicando análise de variância de uma via (ANOVA), utilizando o Software STATISTICA (vers 7.0) da StatSoft Inc. (2004). Quando foram observadas diferenças significativas, as médias de tratamento foram diferenciadas usando comparações pareadas aplicando o teste de Tukey, com $p < 0,05$.

4.3. Resultados e Discussão

4.3.1. Produtividade de biomassa e de lipídeos no cultivo controle

No cultivo controle (Tabela 4.2) da *Scenedesmus* sp. observa - se um aumento da biomassa (g L^{-1}) durante o período de 10 dias. Resultados semelhantes foram obtidos no trabalho de Rai e Gupta (2017) no cultivo da *Scenedesmus abundans*, utilizando meio Chu e sem fotoperíodo.

Tabela 4. 2. Valores de produtividade de biomassa e lipídica no cultivo controle de *Scenedesmus* sp.

Tempo (dias)	Biomassa (g L ⁻¹)	Lipídeos (%)	Biomassa Produtividade (mg.L ⁻¹ .d ⁻¹)	Produtividade Lipídica (mg.L ⁻¹ .d ⁻¹)
2	0.86±0,02 ^a	12.21±0,55 ^c	77.5±10.61 ^a	9.46±0,06 ^b
4	1.06±0,06 ^{ab}	16.96±0,92 ^{bc}	88.75±15.91 ^a	15.05±0,06 ^a
6	1.16±0,02 ^{ab}	15.21±0,05 ^c	76.65±4.74 ^a	11.66±0,01 ^b
8	1.27±0,04 ^b	6.26±0,05 ^a	71,25±5.30 ^a	4.46±0,01 ^c
10	1.32±0,27 ^b	9.15±0,31 ^b	67.00±5.66 ^a	6.13±0,02 ^c

Os dados representam a média ± DP (n = 3). Os valores na mesma coluna com diferentes letras sobrescritas são significativamente diferentes (p <0,05).

Os resultados da produtividade de biomassa (mg L⁻¹d⁻¹) e de lipídeos (mg L⁻¹.d⁻¹) são mais expressivos quando o plasma foi aplicado no 4º e 6º dia de cultivo. O que demonstra que manter os 10 dias de cultivo não proporciona uma maior produtividade de biomassa e lipídica. Os valores para biomassa no 4º e 6º dia não são significativamente diferentes, porém para a produtividade lipídica no 4º dia é significativamente maior que a do 6º dia.

4.3.2. Produtividade de biomassa e de lipídeos no cultivo com PNT

Para avaliar o efeito do PNT durante o cultivo da *Scenedesmus* sp. foi aplicado o plasma a cada dois dias até o 8º dia. Os resultados de produtividade foram obtidos após o 2º dia de aplicação do plasma (Tabela 4.3).

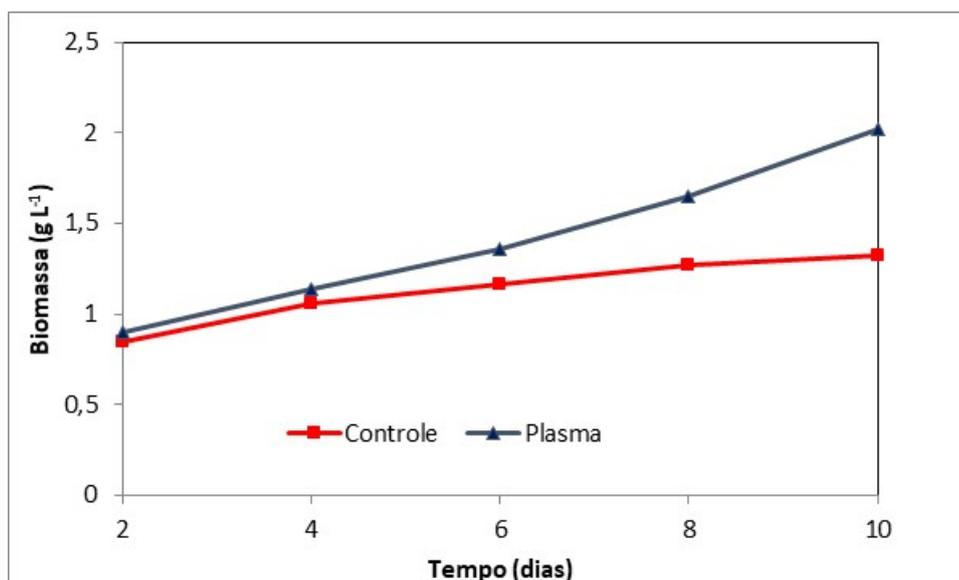
Tabela 4. 3. Valores de produtividade de biomassa e de lipídeos no cultivo de *Scenedesmus* sp. com aplicação do PNT a cada 2 dias.

Tempo* (dias)	Biomassa (g/L)	Lipídeos (%)	Biomassa Produtividade (mg L ⁻¹ d ⁻¹)	Produtividade Lipídica (mg L ⁻¹ d ⁻¹)
2	0,90 ± 0,05 ^a	11,70 ± 0,18 ^c	100,83 ± 28,76 ^a	11,76 ± 0,05 ^b
4	1,14 ± 0,06 ^{ab}	18,96 ± 1,66 ^{bc}	109,17 ± 15,07 ^a	20,67 ± 0,1 ^{7b}
6	1,36 ± 0,25 ^b	14,58 ± 0,6 ^c	113,33 ± 28,04 ^a	16,06 ± 0,17 ^b
8	1,65 ± 0,54 ^a	15,44 ± 0,09 ^a	118,92 ± 30,66 ^a	18,25 ± 0,02 ^c
10	2,02 ± 0,56 ^a	8,0 ± 0,15 ^b	131,67 ± 36,30 ^a	10,49 ± 0,05 ^c

*As avaliações foram feitas 48 h após a aplicação do plasma. Os dados representam a média ± DP (n = 3). Os valores na mesma coluna com diferentes letras sobrescritas são significativamente diferentes (p <0,05).

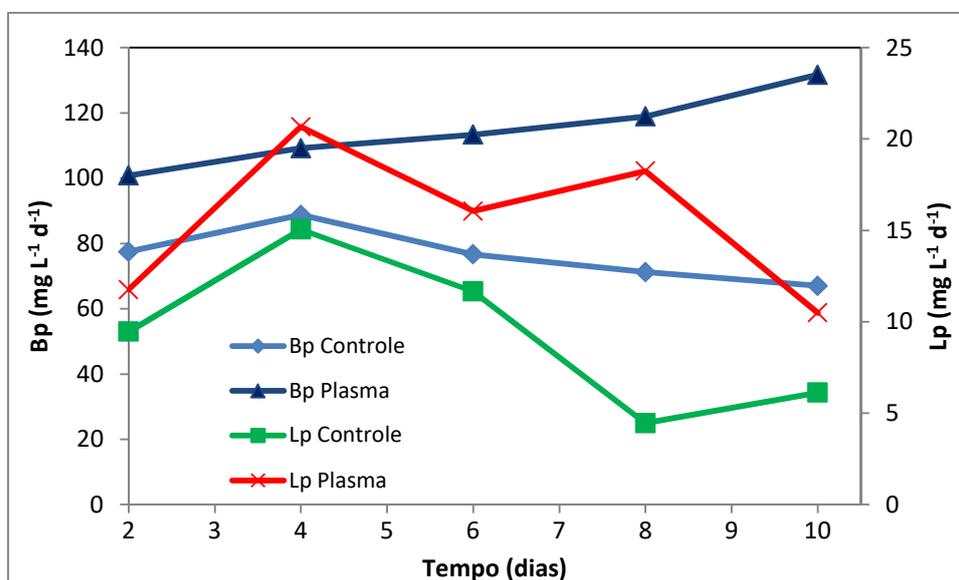
Com a aplicação do plasma se verificou o mesmo comportamento no crescimento da biomassa observado no cultivo controle (Figura 4.3), porém com um aumento nas concentrações.

Figura 4. 3. Perfil de crescimento de microalgas *Scenedesmus* sp em meio Chu com aplicação de PNT a cada dois dias e sem aplicação (controle)



A produtividade lipídica (L_p) durante os cultivos apresentou maiores valores no 4^o e no 8^o dia de cultivo, quando a aplicação do plasma ocorreu nos dias 2^o e 6^o respectivamente (Figura 4.4). A produtividade de biomassa (B_p) aumentou ao longo dos 10 dias (de 100,83 mg L⁻¹d⁻¹ a 131,67 mg L⁻¹d⁻¹) com a aplicação do PNT. Enquanto no cultivo controle a B_p aumentou até o 4^o dia e nos demais dias verificou - se uma diminuição na B_p .

Figura 4. 4. Produtividade de biomassa (Bp) e produtividade lipídica (Lp) durante o cultivo de *Scenedesmus* sp. em meio Chu com aplicação de PNT a cada dois dias e sem aplicação (controle).



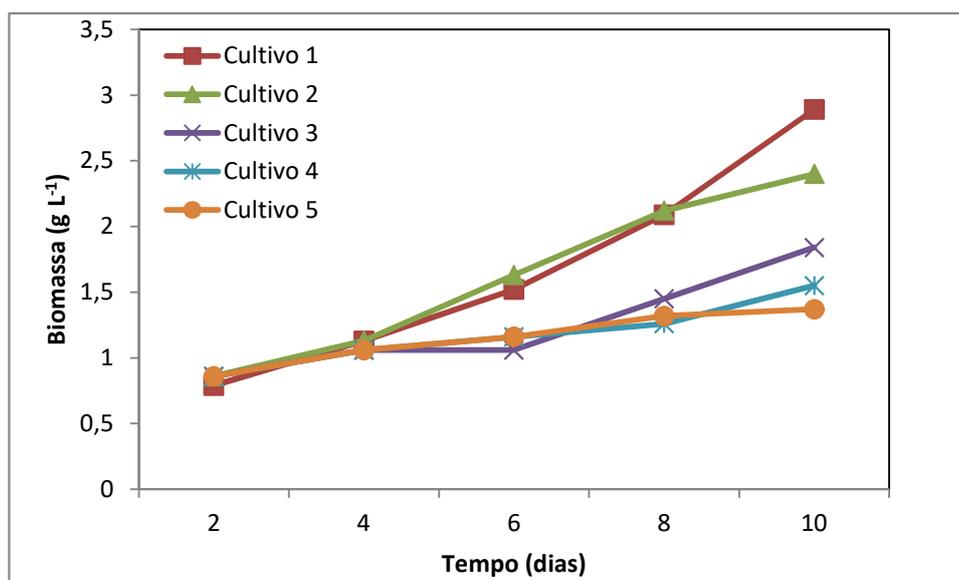
A Figura 4.4 mostra que a aplicação do PNT durante o cultivo aumentou a Bp e de Lp. Aproximadamente 27,2% foi o aumento da Lp no 4º dia de cultivo após submeter ao PNT no 2º dia. Estes resultados evidenciam a interferência do plasma na indução do estresse oxidativo provocado pelas espécies oxidativas de oxigênio (ROS). Os resultados observados mostram que aplicar o plasma no início do cultivo é mais eficiente para obtenção de melhores resultados em Lp.

O estresse oxidativo gera um desequilíbrio entre compostos oxidantes e antioxidantes, em favor da geração excessiva de radicais livres ou em detrimento de sua remoção. O estresse oxidativo pode provocar alterações em macromoléculas biológicas, incluindo proteínas e lipídios. Os radicais livres produzidos são considerados reativos com proteínas, lipídios e DNA. Portanto os ROS podem atuar como um mecanismo de estresse celular efetivo nas células de microalgas (Guo e Kong, 2012; Pisoschi e Pop, 2015).

Na Figura 4.5 observa-se a variação da concentração biomassa dos cinco cultivos com aplicação de PNT em dias diferentes (2-, 4-, 6-, 8- e 10º dia). Em cada cultivo foi aplicado o plasma apenas uma vez, e as análises foram realizadas após

a primeira hora de aplicação do PNT seguida de análises a cada 48 horas até o 10º dia no fim do cultivo.

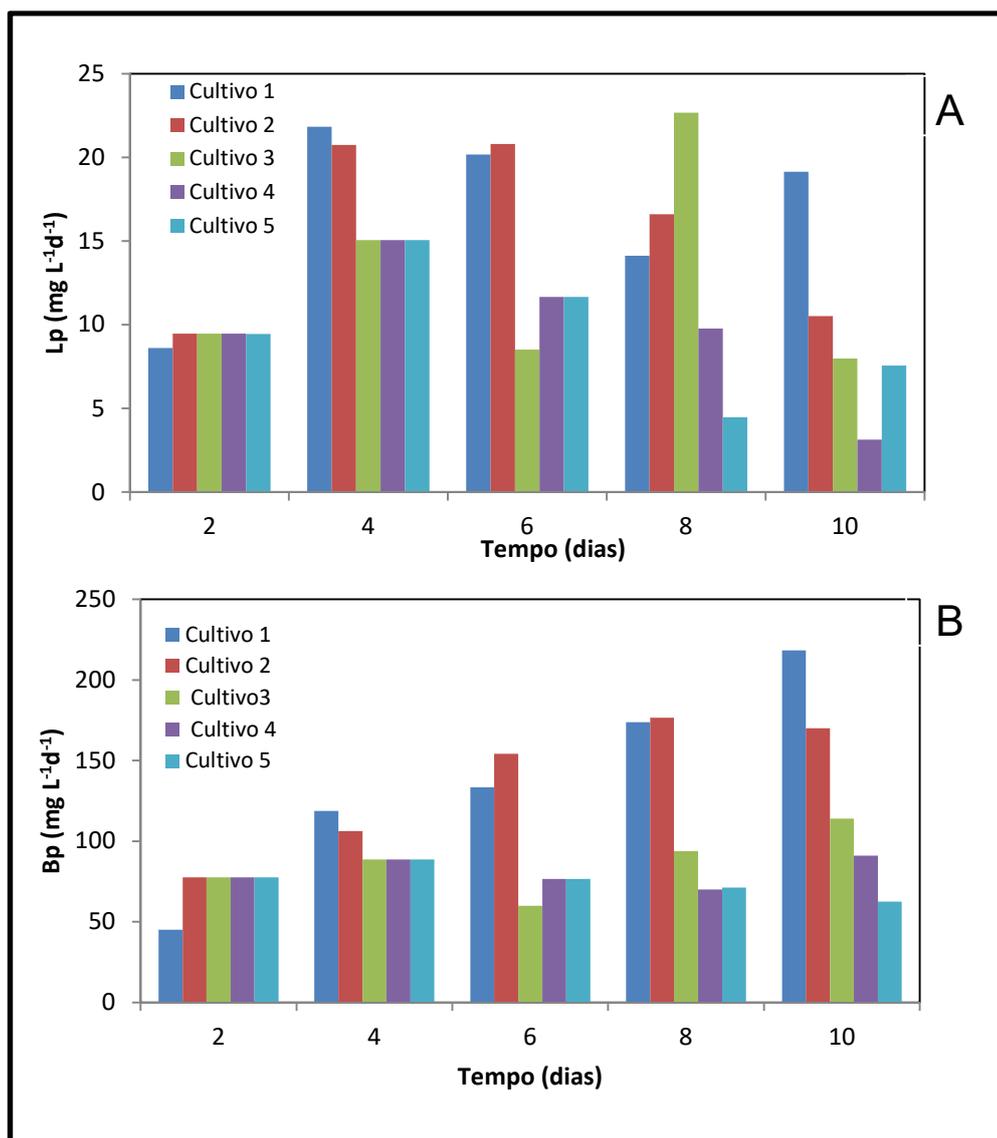
Figura 4. 5. Perfil de crescimento de microalgas *Scenedesmus* sp. em meio Chu nos cinco cultivos (cultivo 1 - aplicação do PNT no 2º dia; cultivo 2 - aplicação do PNT no 4º dia; cultivo 3 - aplicação do PNT no 6º dia; cultivo 4 - aplicação do PNT no 8º dia e cultivo 5 - aplicação do PNT no 10º dia).



O PNT quando aplicado nos primeiros dias de cultivo foi mais eficiente na produção de biomassa. Quando o plasma foi usado no final do cultivo verificou-se uma redução na quantidade de biomassa produzida. A produção de biomassa pode resultar em valores mais elevados sempre que a indução do estresse for provocada pelo plasma no início do cultivo. O gráfico da Figura 4.5 apresenta diferenças entre os dias de aplicação, sendo que, no segundo dia os valores são bem superiores. O cultivo 5, com aplicação do plasma no 10º dia, se torna o controle para todos os outros dias de aplicação, mostrando a interferência do plasma na produção de biomassa.

Na Figura 4.6 estão apresentados os valores da produtividade de biomassa e produtividade lipídica nos cinco cultivos com aplicação de PNT em dias diferentes.

Figura 4. 6. Produtividade Lipídica – Lp (A) e produtividade de biomassa - Bp (B) em $\text{mg L}^{-1}\text{d}^{-1}$ nos cinco cultivos (cultivo 1 - aplicação do PNT no 2º dia; cultivo 2 - aplicação do PNT no 4º dia; cultivo 3 - aplicação do PNT no 6º; cultivo 4 – aplicação do PNT no 8º e cultivo 5 - aplicação do PNT no 10º dia).



A aplicação do plasma nos cultivos mostra que após 1 hora de aplicação do plasma ocorreu uma diminuição na produtividade de biomassa nos 5 cultivos, porém na produção lipídica houve a diminuição em 4 cultivos, sendo que no cultivo 2 esta diminuição não foi observada. Quando a avaliação da concentração de lipídeos foi realizada 48 h pós aplicação do plasma foi verificado um aumento na

produtividade nos cultivos 1, 2 e 3. Nos cultivos (4 e 5) quando o PNT foi aplicado no 8º e 10º dia a Bp e Lp continuaram baixas.

4.3.3. Efeito do PNT na composição dos ácidos graxos

A Tabela 4.4 mostra a composição dos ácidos graxos presente nos lipídeos da microalga *Scenedesmus* sp. cultivada com meio de cultivo Chu (controle) e meio de cultivo Chu com aplicação do plasma para induzir o estresse. Os cromatogramas dos ácidos graxos dos lipídeos produzidos pela *Scenedesmus* sp. no cultivo controle e com aplicação do plasma estão apresentados no Apêndice B e C respectivamente.

Tabela 4. 4. Composição de ácidos graxos (TFAs, %) de *Scenedesmus* sp. com 4 dias de cultivo com aplicação de PNT no 2º dia.

	Ácidos graxos (TFAs, %)					
	C16:0	C18:1	C18:2	C18:3	C19:0	C20:5
*Controle	27,02	8,51	5,93	54,12	nd	4,42
**P 2/4	15,84	33,57	4,04	33,16	4,49	8,90

*10 dias de cultivo; **Aplicação de plasma do 2º dia e cultivado até o 4º dia

A composição dos ácidos graxos presentes na fração lipídica no cultivo controle e com aplicação do plasma é apresentado na Tabela 4.4. Na biomassa do cultivo controle foi verificado uma maior concentração ácido linolênico (C18:3 – 54,12%) e de ácido palmítico (C16:0 – 27,02%), ácidos graxos poli-insaturado e saturado, respectivamente. No cultivo com aplicação de PNT a composição de ácidos graxos houve uma redução 39 % em ácido linolênico (C18:3 – 33,16%) e de 41% em ácido palmítico (C16:0 – 15,84%) e um aumento de 75% em ácido oleico (C18:1 – 33,57 %). Na biomassa tratada com PNT se encontra uma maior porcentagem de ácidos graxos monoinsaturados e saturados, totalizando 53,9% enquanto na biomassa controle se encontra uma maior percentual d poli-insaturados (64,47%). O conteúdo de ácido linolênico (C18:3) é um parâmetro importante na produção de biodiesel, pois concentrações elevadas de C18:3 afeta a qualidade do biodiesel quanto a degradação (Chan et al., 2018).

4.3.4. Valores da pré-extração usando PNT e ultrassom

As biomassas do cultivo controle e com aplicação de plasma no segundo dia foram submetidas a um pré-tratamento com o objetivo de aumentar a extração dos lipídeos presentes na biomassa (Tabela 4.5).

Tabela 4. 5. Concentração de lipídeos da biomassa algal após o pré-tratamento com ultrassom e PNT e sem pré-tratamento

Processo de pré-tratamento	Lipídeos (%)	
	Biomassa controle	Biomassa com NTP
NTP	16.96 ± 0.9 ^a	24.12 ± 0.65 ^b
Ultrasonicação	16.42 ± 1.73 ^a	26.1 ± 1.13 ^b
Sem pré-tratamento	9.15 ± 0.3 ^a	18.96 ± 1.66 ^b

Os dados representam a média ± DP (n = 3). Os valores na mesma coluna com diferentes letras sobrescritas são significativamente diferentes (p <0,05).

O pré-tratamento possibilitou obter uma melhor extração dos lipídeos da biomassa algal. A sonicação é um processo bastante utilizado para ruptura da parede celular de microalgas, Halim et al. (2013) aplicaram ultrassom em duas espécies de microalgas (*Tetraselmis suecica* e *Chlorococcum* sp.) e Araujo et. al (2014) usaram a ultrasonicação na microalga *Chlorella vulgaris* com aumento no teor de lipídeos extraídos. No mecanismo da sonicação atuam várias forças no processo de ruptura. As vibrações da sonicação resultam em cavitação acústica que pode perturbar as células, mas a cavitação também resulta em água de termólise ao redor das bolhas formando radicais livres (H•, OH•, HOO•) altamente reativos que reagem com as substâncias na água. A implosão e fragmentação das bolhas durante a cavitação acústica produzem microrregiões com temperaturas extremas de até 5000 °C e pressões de até 100 MPa (Günerken et al. 2015). Similarmente, hipotetizando que o PNT promove uma ruptura da parede celular com a liberação dos lipídios intracelular para a matriz extracelular. Nas bases de pesquisas consultadas não foi encontrado nenhum estudo sobre PNT no processo de extração de lipídeos de microalgas. O PNT mostrou ser eficiente pré-tratamento na extração dos lipídeos com aumento de 44% no cultivo controle e no cultivo com plasma foi de 21%. Usando o ultrassom foram obtidos valores de lipídeos semelhantes para o cultivo controle e 27% para o cultivo com plasma.

4.3.5. Comportamento do pH durante o cultivo com PNT

Nos cultivos com meio Chu e aplicação de PNT apresentaram um aumento no pH acompanhado a cada dois dias com correção inicial para faixa neutra entre 6,5 a 7,5 (Tabela 4.6).

Tabela 4. 6. Variação do pH durante os 10 dias de cultivo com a aplicação de plasma a cada 2 dias.

Dias	Variação do pH					
	0°	2°	4°	6°	8°	10°
pH	7,0 ± 0,1	7,73 ± 0,1	8,95 ± 0,3	9,44 ± 0,3	9,55 ± 0,2	9,45 ± 0,3

Os dados representam a média ± DP (n = 3).

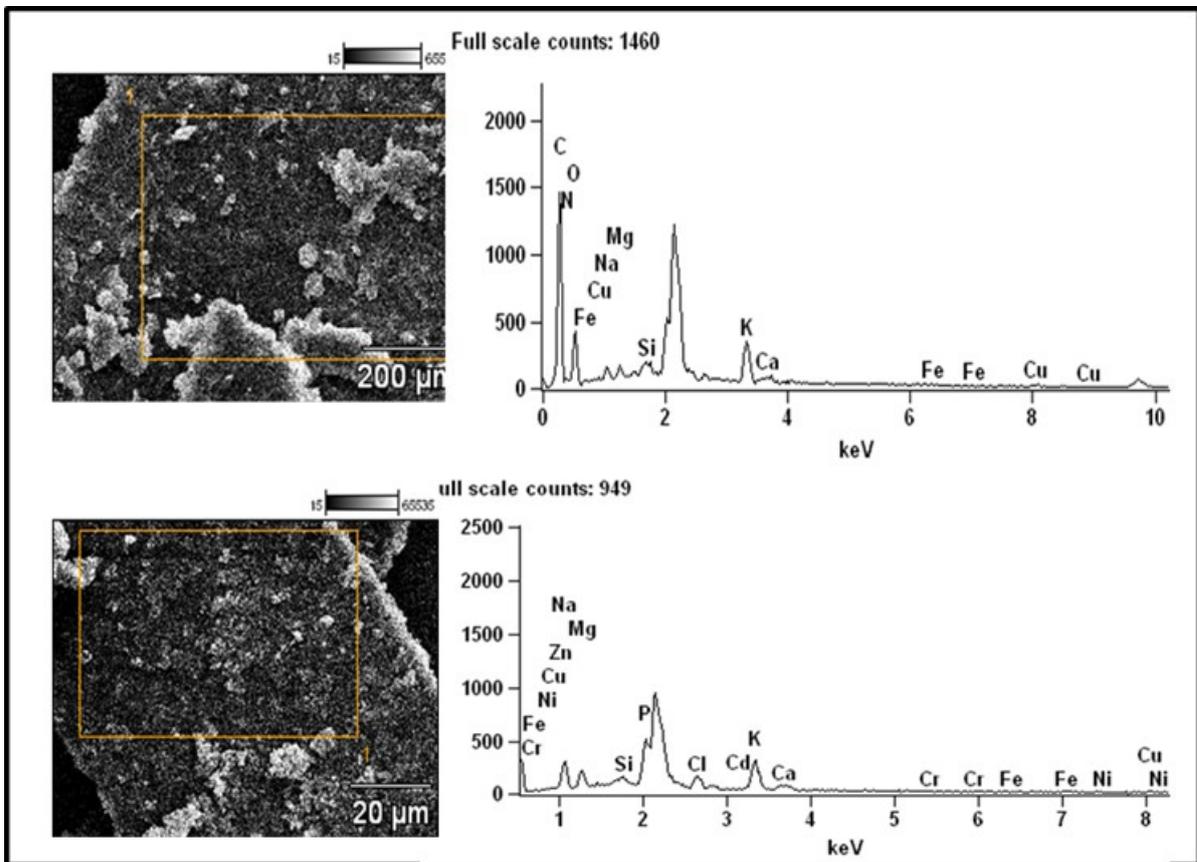
A elevação do pH tem forte relação com o consumo de carbono no cultivo de microalgas principalmente na forma de CO₂. A biomassa da microalga apresenta cerca de 50% de carbono na sua composição, e pode representar um custo quando este nutriente se apresenta em desequilíbrio nos cultivos, o que representa um importante componente nos custos de produção. O CO₂ é a espécie química de carbono inorgânico preferencialmente consumido pelas microalgas. (Chi et al., 2011; Vonshak et al., 1997).

Quando o CO₂ é consumido, ou seja, baixa sua concentração no meio de cultivo, o sistema em equilíbrio CO₂(aq) ↔ H₂CO₃ ↔ HCO₃⁻ ↔ CO₃²⁻ pode reagir no sentido de formação de CO₂, consumindo H⁺ do meio. Já com a concentração de HCO₃⁻ alta, pode ainda haver sua conversão a CO₂ pela enzima anidrase carbônica. Em qualquer circunstância de consumo de CO₂ ou HCO₃⁻ pelas microalgas para o crescimento celular resulta em aumento do pH do meio de cultivo. (Andrade et al., 2008).

4.3.6. SEM / EDS – Composição elementar da biomassa

Na Figura 4.7 são mostradas as imagens e os elementos químicos presentes na biomassa seca obtida durante o cultivo da *Scenedesmus* sp. sem aplicação de PNT - controle (A) e com aplicação do PNT no 2° dia (B). As imagens foram obtidas usando o microscópio eletrônico de varredura de alta resolução, equipada com espectrômetro de energia dispersiva. (SEM-EDS).

Figura 4. 7. Imagens e elementos químicos obtidos com o cultivo controle (A) e o cultivo com uso de PNT no 2º dia (B) usando o SEM/EDS.



SEM / EDS - Espectrômetro de energia dispersiva - X-ray Spectrometer LCME/UFSC

A Tabela 4.8 mostra a composição dos elementos químicos presentes na biomassa seca das microalgas no cultivo controle e no cultivo com aplicação de PNT no 2º dia.

Tabela 4. 8. Composição química da biomassa produzida no cultivo controle e com aplicação de PNT no 2º dia para a indução do estresse oxidativo.

Cultivo controle			Cultivo com PNT no 2º dia		
Elemento	Elemento % (p/p)	% (p/p) Erro	Elemento	Elemento % (p/p)	% (p/p) Erro
C	60,24	+/-0,81	C	60,17	+/-0,81
N	10,88	+/-3,14	N	10,86	+/-3,13
O	16,06	+/-0,81	O	16,05	+/-0,81
Na	1,20	+/-0,08	Na	1,20	+/-0,08
Mg	0,70	+/-0,05	Mg	0,70	+/-0,05
Si	1,67	+/-0,13	Si	1,67	+/-0,13
K	5,69	+/-0,25	K	5,71	+/-0,30
Ca	1,15	+/-0,12	Ca	1,15	+/-0,12
Fe	0,17	+/-0,17	Fe	0,17	+/-0,17
Cu	2,23	+/-0,62	Cd	0,08	+/-0,08
	-----		Cu	2,23	+/-0,62

Total	100,00		Total	100,00	

EDS -Espectrômetro de energia dispersiva - X-ray Spectrometer, LCME / UFSC.

As análises no SEM / EDS (Figura 4.8 e Tabela 4.8) permitem determinar a composição elementar da biomassa seca de microalgas. A análise EDS da biomassa do cultivo controle e do cultivo com aplicação do plasma no 2º dia mostrou valores muito semelhantes, tanto na concentração como no tipo de elementos presentes. No cultivo com PNT foi verificada a presença de Cd (0,08 %).

4.4. Conclusão

Neste trabalho foi investigado o uso do PNT na produção lipídica durante o cultivo da *Scenedesmus* sp. e como método de pré-tratamento para a ruptura da parede celular das microalgas. A aplicação do PNT não interfere na curva de crescimento da *Scenedesmus* sp. No estudo aplicando plasma a cada 2 dias por 3 min. se verificou um aumento da produtividade lipídica em 27%, quando o PNT foi aplicado no segundo dia de cultivo, com avaliação após 48 h da aplicação. Nos cultivos nos quais o PNT foi aplicado somente uma vez, se verificou uma maior produtividade no 6º dia de cultivo (34%) após 48 h da aplicação. O PNT quando

aplicado somente uma vez no cultivo se mostra mais eficiente para produtividade lipídica. O perfil de ácidos graxos foi influenciado com a aplicação do PNT, os cultivos com plasma apresentam um aumento na concentração de ácidos graxos monoinsaturados (C18:1 – 33,57 %), enquanto a biomassa do controle produziu maiores concentrações de ácido linolênico (C18:3 – 54,12 %). A aplicação do plasma como método de pré-tratamento na ruptura da parede celular das microalgas se mostrou eficiente para aumentar a extração lipídica. Os resultados foram próximos aos obtidos com o método de ultrassom já estabelecido na literatura.

Referências

Akubude, V.C., Nwaigwe, K.N., Dintwa, E. 2019. Production of biodiesel from microalgae via nanocatalyzed transesterification process: A review. *Mater. Sci. Energy Technol.* 2, 216-225. <https://doi.org/10.1016/j.mset.2018.12.006>.

Andrade, M.R., Camerini, F. V., Costa, J.A.V. 2008. Perda química de carbono e cinética do crescimento celular em cultivos de spirulina. *Quim. Nova.* 31, 8, 2031-2034.

Araujo, G.S.; Matos, L.J.B.L.; Fernandes, J.O., Cartaxo, S.J.M.; Gonçalves, L.R. B; Fernandes, F.A.N.; Farias, W.R.L. 2013.Extraction of lipids from microalgae by ultrasound application: prospection of the optimal extraction method. *Ultrason. Sonochem.* 20, 95-98. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2012.07.027>

Borowitzka, M.A., Moheimani, N.R. 2013. *Algae for Biofuels and Energy*. Springer, Dordrecht, The Netherlands.

Batello, C., Marzot, M., Touré, A.H. 2004. *The Future Is an Ancient Lake – Traditional Knowledge, Biodiversity and Genetic Resources for Food and Agriculture in Lake Chad Basin Ecosystems*. FAO, Rome.

Bourke, L., Homer, K.E., Thaha, M.A., Steed, L. Rosario, D.J., Robb, K.A. Saxton, J.M., Taylor, S.J.C. 2014. Interventions to improve exercise behaviour in sedentary people living with and beyond cancer: a systematic review. *Br. J. Cancer.* 110, 831–841.

Breuer, G., Lamers, P. P., Janssen, M., Wijffels, R. H., Martens, D. E. 2015. Opportunities to improve the areal oil productivity of microalgae. *Bioresour. Technol.* 186. 294-302. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.03.085>.

Chandana, L., Sangeetha, C. J., Shashidhar, T., Subrahmanyam, Ch. 2018. Non-thermal atmospheric pressure plasma jet for the bacterial inactivation in an aqueous medium. *Science of the Total Environment* ,640–641, 493–500. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.05.342>

Chang, H., Quan, X., Zhong, N., Zhang, Z., Lu, C. Li, G., Cheng, Z., Yang, L. 2018. High-efficiency nutrients reclamation from landfill leachate by microalgae *Chlorella vulgaris* in membrane photobioreactor for bio-lipid production. *Bioresour. Technol.* 266. 374-381. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.06.077>.

Chernyak, V., Olszewskii, S., Nedybaliuk, O., Sydoruk, S., Yukhymenko, V., Prysiashnevych, I., Martysh, E., Shchedrin, A. Levko, D., Naumov, V., Demchina, V., Kudryavzev, V. 2011. Non-Thermal Plasma Assisted Reforming of Ethanol in Dynamic Plasma-Liquid Systems. *J. Energy Power Eng.* 5, 403-410.

Chi, Z., O'Fallon, J., V., Chen, S. 2011. Bicarbonate produced from carbon capture for algae culture. *Trends Biotechnol.* 29, 0167-7799. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.06.006>.

Chisti, Y. (2019). Chapter 1- Introduction to Algae Biofuels. *Biofuels from Algae - Selecting Algae Species, Algae Production Issues, Harvesting Algae and Extracting Oil, and Converting Algae Oil to Biofuels (Second ed.)*, in: Ashok Pandey, Jo-Shu Chang, Carlos Ricardo Soccol, Duu-Jong Lee, Yusuf Chisti (Eds.), Elsevier B.V., pp. 1-31. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64192-2.00001-9>

Cubas, A.L.V., Machado, M.M., Pinto, C.R.S.C., Moecke, E.H.S., Dutra, A.R.A. 2016. Biodiesel production using fatty acids from food industry waste using corona discharge plasma technology. *Waste Manage.* <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2015.05.040>.

Chisti, Y., 2013. Constraints to commercialization of algal fuels. *J. Biotechnol.* 167, 201–214.

Chisti, Y. 2018. Chapter 2 - Society and Microalgae: Understanding the Past and Present, in: Ira A. Levine, Joël Fleurence (Eds.), *Microalgae in Health and Disease Prevention*, Academic Press, pp. 11-21.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811405-6.00002-5>.

Chokshi, K., Pancha, I., Ghosh, A., Mishra, S. 2017. Nitrogen starvation-induced cellular crosstalk of ROS-scavenging antioxidants and phytohormone enhanced the biofuel potential of green microalga *Acutodesmus dimorphus*. *Biotechnol Biofuels*.

10, 60. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0747-7>

Chu, S. P. 1942. The influence of the mineral composition of the medium on the growth of planktonic algae. *J. Ecol.* 30, 284-325.

Günerken, E., D'Hondt E., Eppink M.H.M., Garcia-Gonzalez L., Elst K., Wijffels R.H. 2015 Cell disruption for microalgae biorefineries. *Biotechnol. Adv.* 33, 243–260. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.01.008>.

Guo, C., kong, J. Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Neural Regen. Res.* 5, 376–385, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2018.10.061>

Halim, R., Rupasinghe, T.W.T., Tull, D.L. 2008. Non-thermal plasma technologies: new tools for bio-decontamination. *Biotechnol. Adv.* 6 610-617.

<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.08.001>.

Kulawik, Piotr Carlos Alvarez, Patrick J. Cullen, Ramon Aznar-Roca, Anne Maria Mullen, Brijesh Tiwari, 2018. The effect of non-thermal plasma on the lipid oxidation and microbiological quality of sushi. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, 45, 412-417.

<https://doi.org/10.1016/j.ifset.2017.12.011>

Kwak, H. S., Kim, J. Y. H., Woo, H. M., Jin, E. S., Min, B. K., Sim, S. J. 2016. Synergistic effect of multiple stress conditions for improving microalgal lipid production, *Algal Res.* 19, 215-224. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.09.003>.

Laroussi, M, Leipold, F. 2004. Evaluation of the roles of reactive species, heat, and UV radiation in the inactivation of bacterial cells by air plasmas at atmospheric

pressure. Int. J. Mass spectrom. 233, 81-86.

<https://doi.org/10.1016/j.ijms.2003.11.016>.

Lee, O. K.; Kim, A. L.; Seong, D. H.; Lee, C. G.; Jung, Y. T.; Lee, J. W.; Lee, E. Y. 2013. Chemo-enzymatic saccharification and bioethanol fermentation of lipid-extracted residual biomass of the microalga, *Dunaliella tertiolecta*. Bioresour. Technol. 132, 197–201. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.01.007>.

Lu, D., Liu, X., Apul, O. G., Zhang, L., Ryan, D. K., Zhang, X. 2019. Optimization of biomethane production from anaerobic Co-digestion of microalgae and septic tank sludge. Biomass Bioenergy. 127, 9 pp.

<https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2019.105266>.

Magureanu, M., Mandache, N. B., Parvulescu, V. I. 2015. Degradation of pharmaceutical compounds in water by non-thermal plasma treatment. Water Res. 81, 124-136. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.05.037>

Mitrović, T., Lazović, S., Nastasijević, B., Pašt, I. A., Vasić, V., Lazarević-Pašti T., 2019. Non-thermal plasma needle as an effective tool in dimethoate removal from water. Environ. Manage. 246, 63-70. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.05.143>

Pandey, A, Lee, D.-J., Chisti, Y., C.R. Soccol, C. R. 2014. **Biofuels from Algae**. Elsevier, USA.

Pisoschi, A. M., Pop, A. 2015. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: a Review. European journal of medicinal chemistry. 97, 55-74.

<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.04.040>

Puač, N., Gherardi, M. Shiratani, M. 2018. Plasma agriculture: A rapidly emerging field. Plasma Process. Polym. <https://doi.org/10.1002/ppap.201700174>.

Rewing, M., Jarzina F., Dirks T., Schubert B., Benedikt I., Lackmann J. W., Bandow J. 2019. Plasma-sensitive Escherichia Coli mutants reveal plasma resistance mechanisms. J. Royal Soc. Interface. 16. <https://doi.org/10.1098/rsif.2018.0846>

Riesz, P., Berdahl, D., Christman, L. 1985. Free radical generation by ultrasound in aqueous and nonaqueous solutions. *Environ. Health Perspect.* 64, 233–252.
<https://doi.org/10.1289/ehp.8564233>

Salian, K., Strezov, V. 2017. Biofuels From microalgae, in: Martin, A., Abraham, A. (Eds.), *Encyclopedia of Sustainable Technologies*, Elsevier, Oxford, 107-120.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409548-9.10114-9>

Sathasivam, R. R., Radhakrishnan, A., Hashem, E. F., Abd, A. 2017. Microalgae metabolites: A rich source for food and medicine, *Saudi J. Biol. Sci.*
<https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.11.003>

Schiavon, M., Torretta, V. Casazza, A. Ragazzi. M. 2017. Non-thermal Plasma as an Innovative Option for the Abatement of Volatile Organic Compounds: a Review. *Water Air Soil Pollut.* 228. <https://doi.org/10.1007/s11270-017-35743>

Singh, J., Gu, S. 2010. Commercialization potential of microalgae for biofuels production. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 14, 9.
<https://doi.org/10.1016/j.rser.2010.06.014>.

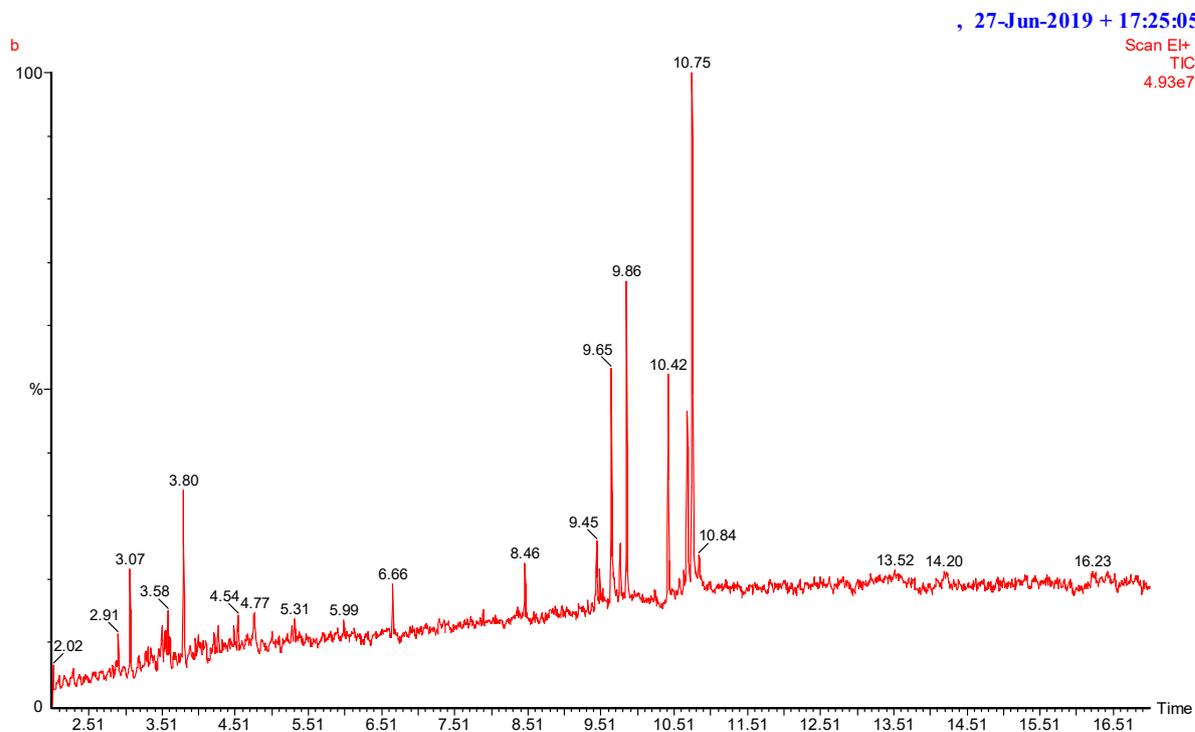
Vonshak, A. 1997. *Em Spirulina platensis (Arthrospira) Physiology, cell-biology and biotechnology*; Vonshak, A. Taylor & Francis: London.

5 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Os impactos ambientais ocorridos nas últimas décadas exigem a implementação de tecnologias que possam atender as necessidades de uma população que está próximo de 10 bilhões nas próximas décadas. Tecnologias que visam o aproveitamento de efluentes para recuperação de nutrientes transformando em biomassa se torna cada vez mais uma necessidade a ser considerada. Permitindo o controle da poluição, o reuso e o consumo consciente da água, juntamente com os benefícios financeiros resultantes do processamento da biomassa gerada. Os meios tradicionais de obtenção de energia como o proveniente do petróleo, tornam-se cada vez mais problemáticos para o meio ambiente, necessitando-se de incentivos maiores em energias alternativas provenientes do sol, do vento e dos oceanos, para atender à crescente demanda causando menos impactos ambientais. As inovações tecnológicas que geram menos impactos ambientais e trabalham com eficiência em pouco espaço e não geram resíduos, efluentes ou gases em grandes quantidades, tem espaço para seu desenvolvimento. A biomassa gerada pelas microalgas é uma grande fonte de conhecimento a ser explorada com benefícios a ser adquiridos por diversas áreas das atividades humanas. Os estudos realizados com a microalga *Scenedesmus* sp utilizando do efluente proveniente do aterro sanitário, após passar pelo tratamento convencional, demonstrou ser eficiente para a produção de biomassa com alta produtividade lipídica e para remoção e aproveitamento dos nutrientes e metais presentes no efluente. O PNT usado durante o cultivo da microalga mostrou ser uma tecnologia inovadora para aumentar a produtividade lipídica a partir do estresse oxidativo causado nas células da microalga. A aplicação de plasma não térmico (PNT) para a produção de biomassa algal rica em lipídeos e como pré-tratamento foi a principal novidade desta dissertação. Não há trabalho semelhante nos dados da literatura, abrindo uma nova área de pesquisa. Várias dúvidas sobre o mecanismo de atuação do PNT nas células ainda precisam ser mais investigadas.

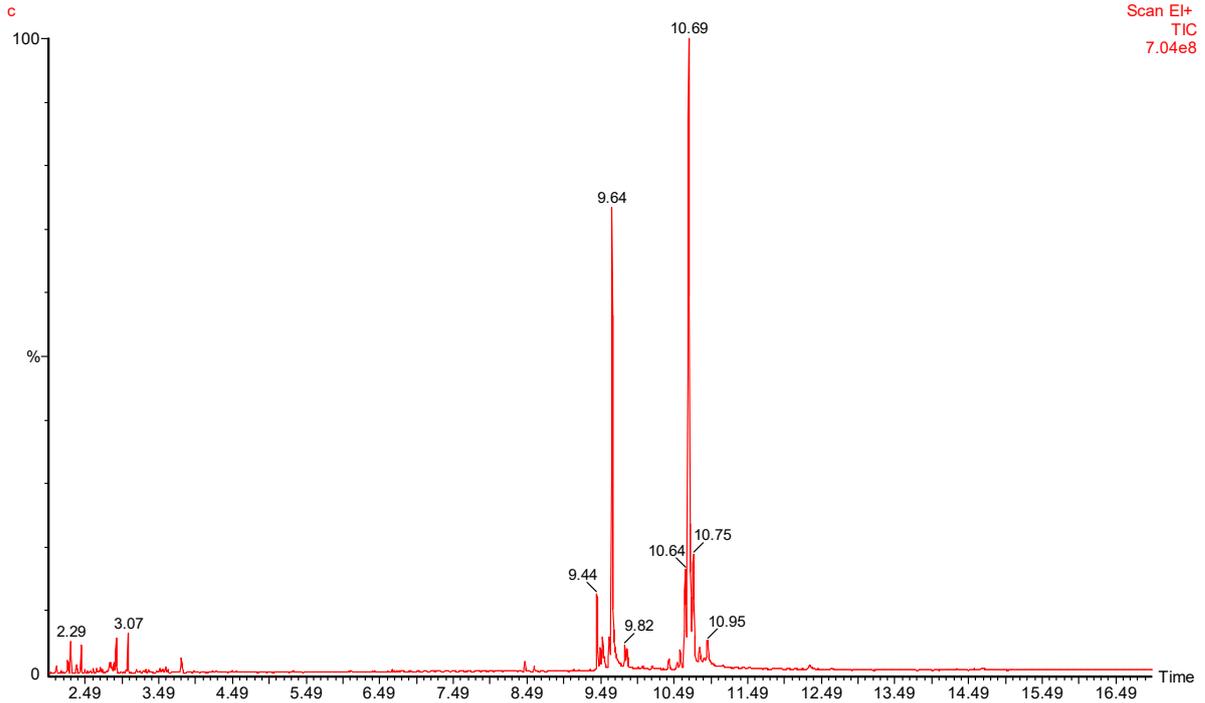
APÊNDICES

APÊNDICE A - Cromatograma dos ácidos graxos da *Scenedesmus* cultivada com EAS



APÊNDICE B - Cromatograma dos ácidos graxos da *Scenedesmus* sp. cultivada em meio Chu (cultivo controle).

, 27-Jun-2019 + 17:52:37



APÊNDICE C - Cromatograma dos ácidos graxos da *Scenedesmus* com aplicação do plasma

, 27-Jun-2019 + 16:58:04

