

**Acúmulo de amido em lemnas (*Landoltia punctata*)
através do enriquecimento de CO₂, visando à
produção de bioetanol**

Ana Maria Beims Lopes

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA SANITÁRIA E
AMBIENTAL

Ana Maria Beims Lopes

**ACÚMULO DE AMIDO EM LEMNAS (*Landoltia punctata*)
ATRAVÉS DO ENRIQUECIMENTO DE CO₂, VISANDO À
PRODUÇÃO DE BIOETANOL**

FLORIANÓPOLIS
2017

ANA MARIA BEIMS LOPES

**ACÚMULO DE AMIDO EM LEMNAS (*Landoltia punctata*)
ATRAVÉS DO ENRIQUECIMENTO DE CO₂, VISANDO À
PRODUÇÃO DE BIOETANOL**

Trabalho de Conclusão de Curso
submetido ao Curso de Graduação em
Engenharia Sanitária e Ambiental da
Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do Grau de
Engenheira Sanitarista e Ambiental.
Orientador: Prof. Dr. Rodrigo de
Almeida Mohedano.

FLORIANÓPOLIS
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Lopes, Ana Maria Beims
ACÚMULO DE AMIDO EM LEMNAS (*Landoltia punctata*)
ATRAVÉS DO ENRIQUECIMENTO DE CO₂, VISANDO À PRODUÇÃO
DE BIOETANOL / Ana Maria Beims Lopes; orientador,
Prof. Dr. Rodrigo de Almeida Mohedano, 2017.
136 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro
Tecnológico, Graduação em Engenharia Sanitária e
Ambiental, Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

1. Engenharia Sanitária e Ambiental. 2. Etanol de
primeira geração. 3. Lagoas de lemnas. 4. Acúmulo de
amido. 5. Enriquecimento de CO₂. I. Mohedano, Prof.
Dr. Rodrigo de Almeida. II. Universidade Federal de
Santa Catarina. Graduação em Engenharia Sanitária e
Ambiental. III. Título.

ANA MARIA BEIMS LOPES

ACÚMULO DE AMIDO EM LEMNAS (*Landoltia punctata*) ATRAVÉS DO ENRIQUECIMENTO DE CO₂, VISANDO À PRODUÇÃO DE BIOETANOL

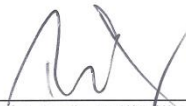
Trabalho julgado adequado pela banca examinadora como parte dos requisitos para Conclusão do Curso em Graduação em Engenharia Sanitária e Ambiental da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 11 de julho de 2017.

Banca Examinadora:



Prof. Rodrigo de Almeida Mohedano, Dr.
Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina



Prof. Paulo Belli Filho, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina



Lorena Bittencourt Guimarães, Dr.^a
Universidade Federal de Santa Catarina

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, quero agradecer a Deus e sua imensa bondade.

Ao ESDE, que contribuiu muito para me transformar todos os dias numa pessoa mais feliz, paciente e amorosa com o próximo.

Agradeço especialmente a minha MÃE, Maria Izabel Beims, cuja ajuda foi essencial neste TCC, e meu namorado Eduardo, que sempre me apoiaram muito e foram extremamente parceiros. A eles que passaram a maioria dos perrengues dessa jornada pacientemente ao meu lado, deixo o meu Muito Obrigada! Ao amor do meu querido pai, irmã, avós, tios e demais familiares Beims e Lopes.

Ao meu orientador e amigo Rodrigo Mohedano, que sempre estive ao meu lado auxiliando na prática e teoria do TCC e até mesmo na vida.

À professora Rejane Costa, mãe do Labeflu que ganhei desde a quarta fase da graduação. Muito obrigada por toda a ajuda que a senhora nos deu sempre!

Ao professor-amigo Paulo Belli, coordenador do projeto para desenvolver este TCC, obrigada pelo seu modo alegre, interessado e integrador de lidar com tudo.

A toda família LABEFLU! Em especial aos “FBRs” fornecidos pela Katiane, à parceria e risadas com a Bia-fofa, à amizade e prestatividade excepcional da Bruna e Lorena, e à ajuda da Alice. Agradeço a ótima convivência e amizade com esse pessoal... Jéssica, Jorge, Claudinha, Augusto, Maria Joana, Magnus, Cássio, Dayane, Laís, Eduardo, Tainara e Júlia... Todos fazem parte disso.

Obrigada aos ilustres patronesse e paraninfo... Professora Maria Eliza, por se mostrar solícita cedendo o local para realização do experimento, e professor Armando, por ser flexível e coerente na disciplina de TCC.

À professora-diva Silvia Nassar, que me auxiliou em estatística de forma muito querida e prestativa.

À doutoranda Flávia Nunes, que me ajudou muito ao me acompanhar no procedimento da análise de amido.

À turminha animada Gabriel, Sofia, Elaine e Gustavo, que renderam boas risadas no Lima, além de sempre estarem de prontidão para auxiliar.

A Cris Lalau, que forneceu a biomassa de lemnas inicial do experimento, e que me acolheu com muito carinho em seu lab, sendo sempre muito cuidadosa e prestativa. A toda paciência da Naiara em

ficar fornecendo seu excesso de lemnas e sua simpatia sem igual. Também à prestatividade dos demais frequentadores do Labtox.

Ao pessoal do Lareso, principalmente Jonathan e Lorena, que compartilharam de bom grado o equipamento GEM 5000, se dispondo atenciosamente a ajudar.

Ao pessoal do Lapoá, principalmente Fernando, professor Maurício, professor Ramon e Arthur, que acompanharam o desenrolar do TCC, me incentivando e sendo muito atenciosos.

À família Medeiros e Santos, pessoas maravilhosas que me acolheram e me deram força em todos os momentos.

A Todos os meus amigos queridos, sobretudo ao grupo “Fido”, cada um de vocês foram essenciais para que eu conseguisse estar aqui hoje. Vocês são super especiais! Gui, se não fosse você e sua ajuda estupenda em toda graduação, eu não sei o que seria de mim.

À turma 12.1, que marcou o ENS, assim como minha vida, principalmente ao me prestigiarem neste TCC.

Ao projeto referente à bolsa de IC (PIBIC/CNPq), bem como aos laboratórios LIMA e LABEFLU e suas instalações.

RESUMO

Lemnas são macrófitas aquáticas, comumente utilizadas no tratamento de efluentes, que apresentam uma biomassa passível de valorização. Isso ocorre devido a diversos motivos, tais como: presença na maior parte do globo terrestre; elevada velocidade de crescimento; remoção eficiente de nutrientes; possível teor elevado de proteínas, ou mesmo de amido através de processo indutivo; entre outros. Nesse contexto, as lemnas têm despertado interesse em particular para a produção de bioetanol de primeira geração, devido um possível enriquecimento de amido anterior à hidrólise e fermentação. Nesse ínterim, o objetivo deste estudo é avaliar o efeito de elevadas concentrações de CO₂ no acúmulo de amido em lemnas (*Landoltia punctata*), visando à produção de bioetanol. Para isso, foram disponibilizados às lemnas concentrações de CO₂ = 400 ppm (A) e ≥ 6.000 ppm (B) – em reatores de 3,1 L, com 0,5 L de meio de cultura, construídos em escala de bancada. A biomassa exposta a elevadas concentrações de CO₂ (situação B) obteve um teor de amido em média quatro vezes superior do que as expostas às condições atmosféricas (situação A) (10,2% e 2,6% p/p base seca, respectivamente). O valor máximo de amido foi de 14,9% (p/p base seca) para condições enriquecidas de CO₂. Além disso, essa biomassa (B) exibiu uma Velocidade de Crescimento Relativa (VCR), em média, três vezes superior do que A (9,0 g.m⁻².dia⁻¹ em relação a 3,0 g.m⁻².dia⁻¹), sendo 11,4 g.m⁻².dia⁻¹ o maior valor registrado. Ademais, a situação B promoveu certas alterações na morfologia das lemnas, aumentando três vezes o tamanho de suas raízes em relação à situação A. O destaque deste estudo foi o acúmulo de amido, realizado através da técnica de enriquecimento de CO₂ concomitante com uma velocidade de crescimento maior, favorecendo haver uma produtividade superior de bioetanol. A técnica igualmente contribuiu na valorização do tratamento de efluentes por lagoas de lemnas.

Palavras-chave: Etanol de primeira geração. Lagoas de lemnas. Acúmulo de amido. Enriquecimento de CO₂.

ABSTRACT

Duckweeds are aquatic macrophytes, commonly used in the treatment of effluents, which have a biomass that can be recovered. This is due to several reasons, such as: being present on most of the Earth; having a high growth rate; being an efficient nutrient removal; having a possible high protein content, or even having a starch content, by way of an inductive process; among others. In this context, duckweeds have been of particular interest for the production of first-generation bioethanol, due to its low lignin content and possible starch enrichment prior to hydrolysis and fermentation. Among the techniques used for starch enrichment, this study looks at the exposure of duckweeds to high concentrations of carbon dioxide (CO₂) over seven days. During the interim period, the objective of this study is to evaluate the effect of CO₂ concentration on the starch enrichment content in duckweed (*Landoltia punctata*) for bioethanol production. To carry out this study, two concentration levels of CO₂ - 400 ppm (A) and 6,000 ppm or more (B) were made available for the duckweeds – in reagents of 3.1 L with 0.5 L of medium culture on a bench scale. The biomass exposed to high concentrations of CO₂ (situation B) had an average starch content four times higher than those exposed to atmospheric conditions (situation A) (10.2% and 2.6% w/w dry weight respectively). In addition to that, this biomass (B) exhibited an average Relative Growth Rate (RGR) three times higher than A (9.0 g.m⁻².day⁻¹ versus 3.0 g.m⁻².day⁻¹). The highest recorded RGR was 11.4 g.m⁻².day⁻¹. Furthermore, situation B promoted certain alterations to the morphology of the duckweeds, increasing three times the size of their roots in relation to situation A. The highlight of this study was the starch accumulation through the technique of CO₂ enrichment while simultaneously having a higher growth rate, favoring the higher productivity of bioethanol. The technique also contributed to improved effluent treatment in duckweeds ponds.

Keywords: First-generation ethanol. Duckweeds ponds. Starch accumulation. Carbon enrichment.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Distribuição geográfica das lemnáceas.	35
Figura 2 – Diagrama do comportamento do nitrogênio em lagoas de lemnas.	40
Figura 3 – Diagrama do comportamento do fósforo em lagoas de lemnas.	41
Figura 4 – Esquema da produção de etanol através da biomassa de lemnas.	43
Figura 5 – Lemnas da espécie <i>Landoltia punctata</i>	48
Figura 6 – Principais elementos presentes nas câmaras de crescimento.	49
Figura 7 – Detalhamento da tampa do FBR.	50
Figura 8 – Reatores fotossintéticos em bancada.	51
Figura 9 – Sistema de iluminação em perfil, com três lâmpadas de LED e uma fluorescente.	52
Figura 10 – Planta de localização do sistema de iluminação e fotobiorreatores.	52
Figura 11 – Classificação quanto à temperatura da cor.	53
Figura 12 – Esquema simplificado do ensaio.	58
Figura 13 – Cronologia do experimento desenvolvido em 2017.	58
Figura 14 – Esquema metodologia término ensaio.	68
Figura 15 – Coloração das lemnas consideradas como padrão de sanidade e morfologia.	70
Figura 16 – Cultura estoque, com iluminação natural, e pré-cultura, com iluminação artificial.	75
Figura 17 – Generalidades observadas da cultura estoque e pré-cultura.	76
Figura 18 – Gráfico produzido pelo equipamento da Testo, mostrando o decaimento de [CO ₂] e a temperatura no tempo, em testes preliminares.	77
Figura 19 – Valores das concentrações elevadas de CO ₂ ao longo do tempo no Experimento 1.	81
Figura 20 – Valores das concentrações elevadas de CO ₂ ao longo do tempo no Experimento 2.	82

Figura 21 – Valores das concentrações elevadas de CO ₂ ao longo do tempo no Experimento 3.	82
Figura 22 – Crescimento da biomassa.	85
Figura 23 – Valores médios das Velocidades de Crescimento Relativo.	86
Figura 24 – Taxa de remoção média de nitrogênio nos ensaios.....	91
Figura 25 – Taxa de remoção média de fósforo nos ensaios.	94
Figura 26 – Avaliação da sanidade vegetal de acordo com sua coloração.	99
Figura 27 – Necroses, cloroses e lesões em frondes do FBR6/E3.	100
Figura 28 – Amostras de indivíduos dos FBRs 4, 5 e 6, do E3, com destaque para as raízes.	104
Figura 29 – Valores médios do teor de amido nas lemnas para condições A e B.	105

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Fatores que influenciam no acúmulo de amido.	44
Tabela 2 – Composição do meio de cultura Swedish Standard Institute (SIS) alterado.	56
Tabela 3 – Volume referente a cada solução estoque adicionado no meio de cultura modificado.	56
Tabela 4 – Parâmetros para determinar detalhes do monitoramento da fase gasosa.	64
Tabela 5 – Divisão proposta dos aspectos morfológicos e de sanidade da lemna.	69
Tabela 6 – Escala de cores (RGB) ordenada numericamente de acordo com o estado de sanidade das lemnas.	71
Tabela 7 – Correlação entre estado de sanidade, numeração e cor.	71
Tabela 8 – Parâmetros e metodologia.	72
Tabela 9 – Luminosidade durante os três ensaios para cada FBR.	78
Tabela 10 – Médias diárias de temperatura para condições atmosféricas e elevadas de [CO ₂].	80
Tabela 11 – Resultado de crescimento das lemnas no Experimento 1. .	84
Tabela 12 – Resultado de crescimento das lemnas no Experimento 2. .	84
Tabela 13 – Resultado de crescimento das lemnas no Experimento 3. .	84
Tabela 14 – Velocidade de crescimento, em ordem crescente, encontradas em diferentes estudos.	88
Tabela 15 – Concentração inicial e final de nitrato nos ensaios.	91
Tabela 16 – Descrição estatística da remoção de nitrogênio em relação à adição ou não de CO ₂	92
Tabela 17 – Concentração inicial e final de fosfato nos ensaios.	93
Tabela 18 – Descrição estatística da remoção de fósforo em relação à adição ou não de CO ₂	94
Tabela 19 – Valores médios de pH.	96
Tabela 20 – Relação entre pH e concentração resultante de fosfato.	97
Tabela 21 – Médias dos aspectos morfológicos quantitativos.	103
Tabela 22 – Teor de amido na lemna por condição e ensaio.	106
Tabela 23 – Teores de amido e respectivas técnicas de seu acúmulo encontrados em bibliografias, organizados em ordem crescente.	107
Tabela 24 – Teor de amido na lemna por condição e ensaio.	109

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	– Àmpere
ABNT	– Associação Brasileira de Normas Técnicas
ANA	– Agência Nacional das Águas
APG	– <i>Angiosperm Phylogeny Group</i>
Atm	– atmosférico(a)
(aq)	– aquoso
BR	– Brasil
C	– Elemento Carbono
CaCl ₂	– Cloreto de Cálcio
CE	– Crescimento Específico
cm	– centímetro
cm ²	– centímetro quadrado
CH ₄	– Metano
CO ₂	– Dióxido de Carbono
CO ₂ D	– Dióxido de Carbono Dissolvido
CNUMAD	– Conferência das Nações Unidas sobre o Meio Ambiente e o Desenvolvimento
[]	– Concentração de determinada substância descrita entre colchetes
Co(NO ₃) ₂	– Nitrato de Cobalto
CuSO ₄	– Sulfato de Cobre
DIS	– <i>Draft International Standard</i>
DNA	– <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
EE	– Energia Elétrica
ENS	– Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental
EPA	– <i>Environmental Protection Agency</i>
ETE	– Estação de Tratamento de Esgoto
EUA	– Estados Unidos da América
FACE	– <i>Free Air Carbon Enrichment</i>
FBR	– Fotobiorreator
g	– grama
g.dia ⁻¹	– grama por dia
g.g ⁻¹ .dia ⁻¹	– grama por grama por dia
g.L ⁻¹	– grama por litro
g.m ⁻²	– grama por metro quadrado
g.m ⁻² .dia ⁻¹	– grama por metro quadrado por dia
GEE	– Gás de Efeito Estufa
h	– hora
H ⁺	– cátion de hidrogênio

H ₂ O	– Água
H ₃ BO ₃	– Ácido Bórico
IBGE	– Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IC	– Iniciação Científica
ISO	– <i>International Organization for Standardization</i>
kg	– quilograma
KH ₂ PO ₄	– Fosfato Monopotássico
L	– Litro
L/ha	– Litro por hectare
lm/W	– lúmen por watt
LABEFLU	– Laboratório de Efluentes Líquidos e Gasosos
LED	– <i>Light Emitter Diode</i>
LIMA	– Laboratório Integrado do Meio Ambiente
mm	– milímetro
mM	– milimol
m ²	– metro quadrado
m ³	– metro cúbico
m ³ .L ⁻¹	– metro cúbico por litro
m ³ .s ⁻¹	– metro cúbico por segundo
MDL	– Mecanismo de Desenvolvimento Limpo
mg.L ⁻¹	– miligrama por litro
mg.m ² .h ⁻¹	– miligrama por metro quadrado por hora
mgP.m ⁻² .dia ⁻¹	– miligrama de fósforo por metro quadrado por dia
mgNO ₃ .L ⁻¹	– miligrama de nitrato por litro
MgSO ₄	– Sulfato de Magnésio
mL	– mililitro
mL.m ⁻³	– mililitro por metro cúbico
MnCl ₂	– Cloreto de Manganês
n	– tamanho da amostra
N	– Elemento Nitrogênio
N ₂	– Gás nitrogênio
NaCl	– Cloreto de Sódio
Na ₂ CO ₃	– Carbonato de Sódio
Na ₂ MoO ₄	– Molibdato de Sódio
NaNO ₃	– Nitrato de Sódio
NH ₃	– Amônia livre ou amoníaco
NH ₃ -N	– Nitrogênio amoniacal
NH ₄ ⁺	– Amônio
nm	– nanômetro
NO ₂ ⁻	– Nitrito
NO ₃ ⁻	– Nitrato

NPK	– Fertilizante a base de Nitrogênio (N), Fósforo (P) e Potássio (K)
NTK/m ² /d	– Nitrogênio Total Kjeldahl por metro quadrado por dia
O ₂	– Gás oxigênio
OECD	– <i>Organization for Economic Co-operation and Development</i>
ONU	– Organização das Nações Unidas
P	– Elemento fósforo
p/p	– peso por peso
PAR	– <i>Photosynthetically Active Radiation</i>
pH	– Potencial hidrogeniônico
PNUMA	– Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente
PIBIC	– Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica
ppm	– partes por mil
PO ₄ ⁻³	– Fósforo em forma de fosfato ou ortofosfato
Pt	– Fósforo total
QAI	– Qualidade do Ar Interior
QL	– variável qualitativa
QT	– variável quantitativa
RFS	– <i>Renewable Fuel Standard Program</i>
RFS2	– <i>Renewable Fuel Standard Program Amendments</i>
RGB	– <i>Red, Green, Blue</i>
RIDESA	– Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroenergético
RNA	– <i>Ribonucleic Acid</i>
rpm	– rotações por minuto
SC	– Santa Catarina
SIS	– <i>Swedish Standard Institute</i>
SNIS	– Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento
T (°C)	– Temperatura em graus Celsius
T (K)	– Temperatura em Kelvin
tonCO ₂ /ha/ano	– tonelada de dióxido de carbono por hectare por ano
UASB	– <i>Upflow Anaerobic Sludge Blanket</i>
UFSC	– Universidade Federal de Santa Catarina
μE.m ⁻² .s ⁻¹	– microeinstein por segundo por metro quadrado
μmol.m ⁻² .s ⁻¹	– micromole por segundo por metro quadrado
VCE	– Velocidade de Crescimento Específico
VCR	– Velocidade de Crescimento Relativo
v/p	– volume sobre peso
W	– Watt
ZnSO ₄	– Sulfato de Zinco

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	23
2 OBJETIVOS.....	27
2.1 OBJETIVO GERAL	27
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	29
3.1 PROBLEMÁTICA AMBIENTAL	29
3.1.1 Poluição hídrica.....	29
3.1.2 Eutrofização.....	31
3.1.3 Poluição atmosférica	32
3.2 AS LEMNAS	34
3.2.1 Classificação taxonômica e filogenética.....	34
3.2.2 Biótipo lemnas.....	36
3.3 LAGOAS DE LEMNAS NO TRATAMENTO DE EFLUENTES .	37
3.3.1 Mecanismos de remoção de poluentes em lagoas de lemnas	39
3.3.1.1 Mecanismos de remoção de matéria orgânica	39
3.3.1.2 Mecanismos de remoção de nitrogênio.....	39
3.3.1.3 Mecanismos de remoção de fósforo	40
3.4 APLICAÇÕES DA BIOMASSA LEMNÁCEA.....	41
3.5 BIOETANOL.....	42
3.6 ACÚMULO DE AMIDO.....	44
4 METODOLOGIA	47
4.1 ESCOLHA DA ESPÉCIE UTILIZADA	47
4.2 LOCALIZAÇÃO E ESTRUTURA	48
4.2.1 Câmaras de crescimento	48
4.2.2 Sistema de iluminação.....	51
4.2.3 Fornecimento de CO ₂	53
4.2.4 Meio de cultura.....	54
4.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	57
4.4 PROCEDIMENTOS	59
4.4.1 Pré-cultura e testes preliminares.....	59

4.4.2	Partida do experimento e inoculação da biomassa	60
4.4.3	Avaliação da produtividade da biomassa de lemnas	61
4.4.4	Fotoperíodo	62
4.4.5	Temperatura	63
4.5	MONITORAMENTO	63
4.5.1	Fase gasosa.....	63
4.5.2	Fase aquosa	66
4.5.3	Biomassa	67
4.5.3.1	Avaliação dos aspectos morfológicos e de sanidade da lemna	68
4.5.3.1.1	Avaliação do aspecto geral da população de lemnas.....	69
4.5.3.1.2	Avaliação do aspecto de plantas individuais (clones)	71
4.6	EQUIPAMENTOS E MÉTODOS	72
4.7	ANÁLISE E TRATAMENTO DOS DADOS	73
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	75
5.1	MONITORAMENTO DA PRÉ-CULTURA	75
5.1.1	Testes preliminares de CO ₂ na pré-cultura.....	77
5.2	AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS	78
5.2.1	Luminosidade	78
5.2.2	Temperatura do ar	79
5.3	MONITORAMENTO DA FASE GASOSA DO EXPERIMENTO	80
5.3.1	Comportamento do CO ₂ nos fotobiorreatores	80
5.4	EFEITOS DE ELEVADAS CONCENTRAÇÕES DE CO₂ SOBRE AS LEMNAS	83
5.4.1	Efeitos sobre a velocidade de crescimento das lemnas	83
5.4.2	Efeito sobre a remoção de nutrientes do meio de cultura.....	90
5.4.2.1	Remoção de nitrato do meio de cultura	91
5.4.2.2	Remoções de fosfato do meio de cultura relacionadas ao crescimento da biomassa de lemnas	93
5.4.2.3	Efeito da concentração de CO ₂ no pH do meio de cultura	96
5.4.2.4	Balanco de massa dos nutrientes relacionada à velocidade de crescimento.....	97
5.4.3	Efeitos de elevadas concentrações de CO ₂ sobre a sanidade vegetal.....	98

5.4.3.1	Coloração das frondes expostas ao CO ₂ extra.....	101
5.4.4	Efeitos de elevadas concentrações de CO ₂ sobre os aspectos morfológicos vegetais.....	102
5.4.5	Efeitos de elevadas concentrações de CO ₂ sobre o acúmulo de amido na lemna.....	104
6	CONCLUSÃO.....	111
6.1	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	111
	REFERÊNCIAS	113
	APÊNDICES.....	129
	APÊNDICE A – TEMPERATURAS MÉDIAS DIÁRIAS	129
	APÊNDICE B – MONITORAMENTO pH.....	132
	APÊNDICE C – AVALIAÇÃO DA BIOMASSA	133
	ANEXOS	134

1 INTRODUÇÃO

A Assembleia Geral da Organização das Nações Unidas (ONU) cita que entre os direitos humanos, um dos mais essenciais é a disponibilidade de água limpa e segura à população, bem como acesso ao saneamento básico. Segundo o Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento (SNIS, 2017), apenas 43% do esgoto gerado é tratado no Brasil. Isso significa que aproximadamente 115 milhões de brasileiros despejam seus efluentes domésticos diretamente em corpos hídricos ou no solo a céu aberto. Desde o início século XX, houve um aumento no acesso à rede coletora de esgoto e uma ampliação no tratamento do mesmo, principalmente nas grandes cidades brasileiras.

Nas últimas décadas, diversas técnicas foram desenvolvidas para tratar águas residuárias. Mesmo assim, o tratamento atual geralmente atinge apenas o nível secundário, isto é, remove a carga carbonácea do efluente, deixando a desejar na remoção de nutrientes presentes. O aumento dos macronutrientes nos corpos da água, como nitrogênio (N) e fósforo (P), está diretamente relacionado com a eutrofização dos mesmos. Por isso, um efluente final deve possuir qualidade o suficiente para não promover poluição hídrica e outros impactos ambientais.

Para a remoção de nutrientes de águas residuárias com elevada eficiência, as lagoas de macrófitas aquáticas surgem como uma tecnologia promissora. Os sistemas de lagoas para tratamento de efluentes através de plantas superiores com adaptação para viver na água têm sido propostos e utilizados no tratamento terciário (polimento) dos efluentes, como de origem doméstica, industrial e de suinocultura. A configuração das lagoas é caracterizada pela presença de uma planta aquática que recobre totalmente a superfície da lagoa de forma coesa e uniforme, tendo como função: a absorção direta dos nutrientes, a redução de algas, a redução de odores, suporte para fixação de biofilme, redução de contaminação fecal por agentes patogênicos, entre outros.

O uso de lemnas¹ para o tratamento de efluentes domésticos tem sucesso em diversos países, como Estados Unidos da América (EUA), China e Índia, sendo difundido em todo planeta. Entretanto, ao utilizá-las associadas ao tratamento de efluentes, é indicado prever um aproveitamento posterior para sua biomassa, com intuito de não gerar

¹ Macrófitas aquáticas da subfamília botânica *Lemnoideae* e família *Araceae*. Também é o nome de um dos gêneros dessa família, porém, o mesmo é estendido para designar os gêneros restantes, sendo considerada uma nomenclatura popular.

subprodutos poluentes. Entre os possíveis aproveitamentos, estão seu uso para ração de animais e a produção de biocombustível. Sendo assim, neste trabalho, pretende-se valorizar o tratamento de efluentes por lagoas de lemnas através do reuso da biomassa com a finalidade de produzir bioetanol.

A produção de bioetanol a partir da cana-de-açúcar, milho, beterraba e soja (alimentos), geralmente implica na utilização de extensas áreas de plantio de matéria-prima, apenas para produzir energia (biocombustível). Em contrapartida, essas mesmas áreas poderiam ser úteis para produzir alimentos para a população. Logo, comumente os biocombustíveis são produzidos de forma a não garantir a segurança alimentar. Nesse ínterim, surgem alternativas capazes de produzir bioetanol a partir da utilização de subprodutos de outros processos como matéria-prima. Um destes subprodutos são as lemnas, as quais, por serem utilizadas no processo de tratamento de esgoto, não competem com áreas de plantio para produção de alimento.

Uma economia circular justamente significa utilizar resíduos de produção como novos insumos de outros processos, mantendo o ciclo produtivo de forma a não interferir nas reservas naturais. Tal economia promove uma sustentabilidade do processo como um todo, enquanto que modos de produção lineares exaurem e deixam sobrecarregados os ciclos biogeoquímicos. A inclusão das lemnas em uma economia circular se torna mais importante pelo fato dessas possuírem uma elevada velocidade de crescimento dentre as plantas superiores. Dessa forma, pode-se gerar toneladas de biomassa com valor agregado por ano, ao invés de gerar toneladas de resíduo.

Um pré-requisito procurado nos insumos utilizados na produção de bioetanol é a quantidade significativa de amido. Porém, as lemnas apresentam uma composição nutricional variável. Por isso, pesquisas recentes estudam formas de promover um incremento de amido na biomassa lemnácea. Do mesmo modo, este estudo pretende maximizar a quantidade de amido presente na composição das lemnas, uma vez que esta é a estrutura orgânica cuja transformação resulta em álcool (bioetanol). No presente caso, foi estudada a exposição das lemnas a elevadas concentrações de gás carbônico (superiores à concentração comum da atmosfera), baseado nos estudos que mostram a fixação de CO₂ na forma de amido nas plantas.

O experimento foi realizado nas dependências da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), no Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental (ENS). O mesmo foi subsidiado pelo projeto do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC),

chamado “Desenvolvimento de Soluções Tecnológicas a partir do Biogás produzido em Sistemas de Tratamento de Esgotos e Aterros Sanitários para geração de EE” (F0061/2017), referente à Bolsa de Iniciação Científica (IC) do Laboratório de Efluentes Líquidos e Gasosos (LABEFLU).

Vários trabalhos relacionados aos sistemas de lagoas de lemnas foram desenvolvidos pelo grupo do Labeflu, os quais foram determinantes na escolha da espécie de macrófitas do projeto. Os primeiros trabalhos relacionados foram a dissertação (2004) e a tese (2010) de Mohedano, seguidos de Bach (2013), Vieira (2013), Barão (2014), Brugnago (2014), Teles (2016) e Tonon (2016). Esses trabalhos nortearam temas sobre o tratamento de efluentes domésticos e agroindustriais utilizando esse sistema.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem como objetivo avaliar o efeito de elevadas concentrações de CO₂ no acúmulo de amido em lemnas (*Landoltia punctata*) com vista à produção de bioetanol.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para atender o escopo da avaliação, são apontados os seguintes objetivos específicos:

- a) avaliar o efeito de concentrações de CO₂ acima de 6.000 ppm sobre o teor de amido nas lemnas;
- b) avaliar o efeito de elevadas concentrações de CO₂ sobre a velocidade de crescimento/inibição das lemnas;
- c) avaliar possíveis alterações morfológicas e fitossanitárias nas lemnas após a exposição de elevadas concentrações de CO₂.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 PROBLEMÁTICA AMBIENTAL

3.1.1 Poluição hídrica

A água é fonte de vida para todos os ecossistemas e sociedade humana, indispensável para a manutenção de suas dinâmicas. Para a Constituição Federal Brasileira (1988), é definida como um bem público e de uso comum do povo, imprescindível à sadia qualidade de vida. Assim como, a Assembleia Geral da ONU corrobora ao mostrar na Resolução nº 64/292, de 28 de julho de 2010, que a água limpa e segura e o saneamento são direitos humanos essenciais. Com isso, pode-se afirmar que a água é considerada um patrimônio da humanidade, devendo ser compartilhada com as gerações atuais e futuras que habitam as bacias hidrográficas e suas fronteiras.

Os cursos d'água são um meio conveniente para disposição de resíduos desde a antiguidade. Neste contexto, a ação de despejar o resíduo gerado diretamente sobre as fontes de água foi denominada de poluição JORDÃO; PESSÔA, 1995; SMITH; TILMAN; NEKOLA, 1999). A poluição das águas superficiais e subterrâneas agravou-se no último século, principalmente devido ao crescimento populacional e a industrialização, no qual o crescimento econômico e o desenvolvimento sustentável seguiam caminhos opostos.

Segundo a Agência Nacional das Águas (ANA, 2011), existem várias atividades humanas que desequilibram o ecossistema aquático e afetam a qualidade dos corpos hídricos, entre elas: agrícola, industrial, mineradora, obras hidráulicas e lançamento de efluentes domésticos não ou parcialmente tratados. É comum, por exemplo, o despejo de esgoto bruto em corpos d'água ou no solo em áreas rurais e nas periferias das grandes cidades, comprometendo significativamente esses corpos hídricos e, conseqüentemente, o seu uso para fins mais nobres.

Os impactos ambientais, sociais e econômicos da degradação da qualidade das águas se traduzem, entre outros: na perda da biodiversidade; no aumento da mortalidade do local e das doenças de veiculação hídrica; no aumento do custo de tratamento das águas destinadas ao abastecimento público; na perda de produtividade na indústria, na agricultura e na pecuária; na redução da pesca; e na perda de valores turísticos, culturais e paisagísticos (ANA, 2012).

Para o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2016), a principal fonte de poluição ou contaminação na captação de água para abastecimento nos municípios brasileiros é o esgoto sanitário, superando fontes poluidoras como: despejos industriais, destinação inadequada de resíduos sólidos, atividade mineradora e contaminação por agrotóxicos. O esgoto sanitário é causador de graves prejuízos ambientais nos corpos d'água através de nutrientes, como nitrogênio e fósforo, tidos como limitantes do crescimento biológico e responsáveis pelo processo de eutrofização (ESTEVES, 2011). Assim como, é responsável por graves prejuízos na saúde, visto que uma parcela significativa das doenças frequentes de países em desenvolvimento é ocasionada pela defasagem em serviços de saneamento básico, havendo mortes devido à falta de qualidade da água consumida (IBGE, 2016).

No Brasil, o déficit de serviços de esgotamento sanitário ainda é pertinente, devido ao crescimento desordenado dos centros urbanos. Estatisticamente, somente 50,3% dos municípios brasileiros possuem coleta de esgoto, destes, 74,0% tem algum tipo de tratamento, sendo que, em relação ao total de esgoto gerado no país, apenas 42,7% é tratado (SNIS, 2017). Esta carência no tratamento de esgoto no país exige esforço conjunto dos governos; das universidades e suas pesquisas; e da sociedade, para a superação deste quadro de sérios danos ambientais e riscos à saúde da população. Devido a enorme heterogeneidade da sociedade brasileira, são necessárias tecnologias sustentáveis como um todo, de manejo simplificado, além de baixo custo de implantação e operação (BASTOS, 2003; SOUSA, CHERNICHARO, 2005).

Mais do que nunca, é preciso garantir que haja uma erradicação do pensamento que apresenta os recursos hídricos como detentores de uma renovação natural (capacidade de autodepuração) infinita. A educação e a participação da população são fundamentais, já que devem aumentar o senso de responsabilidade das pessoas para com o estado do meio ambiente e lhes ensinam a controlá-lo, protegê-lo e melhorá-lo (CMMAD, 1987, p. 124). Logo, devem ser satisfeitas as necessidades hídricas para que o país alcance um desenvolvimento sustentável e, ao mesmo tempo, devem ser preservadas as funções hidrológicas, biológicas e químicas dos ecossistemas, adaptando as atividades humanas aos limites da capacidade de absorção de seus impactos pela natureza.

3.1.2 Eutrofização

A comunidade científica explica que a eutrofização é decorrente do enriquecimento natural ou artificial de corpos hídricos com pouca movimentação, através de nutrientes, principalmente fósforo e nitrogênio. O lançamento de efluentes não tratados no ambiente aquático é um dos principais agravantes desse processo, cuja aceleração do acúmulo crônico dos nutrientes é conhecida como eutrofização artificial, antrópica ou cultural (ZHANG et al., 2006). Essa e outras formas diversas de poluição hídrica superficial ocasionam graves desequilíbrios nos ciclos biogeoquímicos das comunidades aquáticas, com mudanças significativas na qualidade e quantidade das mesmas (MILLER, 2008).

Algumas consequências da eutrofização no corpo hídrico são: o aumento da matéria orgânica; redução da transparência da água; mudança na concentração do oxigênio dissolvido; incremento do nível de produção primária (algas e plantas aquáticas); mortalidade de peixes; toxicidade de algas; alteração da cadeia trófica; condições anaeróbias no fundo ou em toda coluna d'água; aumento de custos e complexidade do tratamento de água; doença e morte de pessoas, aves e mamíferos marinhos; e problemas recreacionais, estéticos e de navegabilidade (VON SPERLING, 2005; TUNDISI, TUNDISI, 2008; ANDERSON, GLIBERT, BURKHOLDER, 2008; MOTA, VON SPERLING, 2009).

As fontes de nitrogênio (N) e fósforo (P) na água são nutrientes limitantes para o crescimento da maioria das plantas aquáticas, sendo utilizadas para síntese proteica, DNA, RNA e transferência de energia (CONLEY et. al, 2009). Assim, a fertilização contínua do ambiente aquático provoca a multiplicação de organismos como algas e macrófitas e, conseqüentemente, do zooplâncton na superfície líquida. Tal crescimento exagerado forma uma densa camada que impede a passagem de luz e a realização de fotossíntese por seres que estão abaixo dessa. Desse modo, o oxigênio dissolvido não consegue mais suprir a demanda dos organismos aeróbios, geralmente ocasionando a dominância de uma só espécie de produtor primário.

O incremento de nutrientes também induz o aumento da produção de cianobactérias, onde muitos gêneros podem produzir toxinas em determinadas condições que chegam a ser fatais aos animais e aos seres humanos, se consumidas junto com a água (FIGUEIRÊDO et. al., 2007).

Com o intuito de minimizar os danos aos corpos receptores provocados por esse processo, os sistemas de esgotos domésticos e industriais estão apostando no tratamento terciário, como uma forma de dar um refinamento no efluente final e quando não há essa

possibilidade, optando por processos biológicos eficientes na remoção de nitrogênio e fósforo (JORDÃO; PESSÔA, 1995).

Mesmo que os efluentes produzidos por atividades antrópicas, por vezes, apresentem altas concentrações de nutrientes, comumente, as tecnologias projetadas e operadas para o tratamento de esgotos não removem nutrientes de modo satisfatório. Nesse contexto, o sistema de lagoas de lemnas se mostra um mecanismo simples e econômico para o polimento dos efluentes, removendo eficientemente nutrientes. Além da alta eficiência, estes sistemas produzem uma quantidade significativa de biomassa passível de valorização, tanto para fins nutricionais como para produção de biocombustíveis.

3.1.3 Poluição atmosférica

Além da situação precária do saneamento pertinente no Brasil, ainda são fortemente presentes outras problemáticas na sociedade, como: o efeito estufa, com a acentuação através de Gases de Efeito Estufa (GEEs); e a insustentabilidade da matriz energética, inerente das matérias primas para produção de combustível fóssil e até biocombustível.

A poluição atmosférica aumentou drasticamente após a Revolução Industrial, nos séculos XVIII e XIX. Desde então, a sociedade começou a se preocupar com esta poluição somente em 1972, com a criação do Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente (PNUMA), no qual houve a descoberta do buraco da camada de ozônio. Posteriormente, em 1987, acontece a Convenção de Viena, na qual surge a preocupação com a proteção da camada de ozônio e se cria o Relatório Brundtland, para haver um desenvolvimento sustentável. Já em 1992, no Rio de Janeiro/BR, ocorre a Eco-92 e é criada a Conferência das Nações Unidas sobre o Meio Ambiente e o Desenvolvimento (CNUMAD), cujo foco era as mudanças climáticas e a cooperação entre os países. Para auxiliar esse processo, foi elaborada a Agenda 21. Em 1997, surge finalmente o Protocolo de Kyoto, com uma limitação na produção de GEEs pela primeira vez. Nesse evento, fez-se uma revisão e discussão sobre o aquecimento global e a redução na emissão de gases causadores do efeito estufa.

O sequestro de carbono é uma ação que objetiva mitigar o efeito estufa, tendo por finalidade aprisionar o carbono por certo tempo em algum organismo. Para que os mecanismos desse processo sejam significativos, é necessário que o carbono fique armazenado por um

período longo o suficiente para que a sua emissão na atmosfera diminua, evitando o aumento da temperatura no planeta e o aquecimento global (BARRETO, FREITAS, PAIVA, 2009).

A partir do protocolo de Kyoto, foi assumido o compromisso de redução dos GEEs, interferindo assim, na intensificação de efeitos adversos sobre os ecossistemas. O sequestro de carbono, sendo uma modalidade do Mecanismo de Desenvolvimento Limpo (MDL), pode ser utilizado por países desenvolvidos através de projetos em outros países, como uma forma de créditos de carbono (BARRETO, FREITAS, PAIVA, 2009).

Maiores gerações de gases estufas são decorrentes de processos de produção lineares, os quais promovem uma insustentabilidade da matriz energética. Essa insustentabilidade também é visível nos processos lineares utilizados para produção de biocombustível. Nesse contexto, devem-se buscar fontes que não concorram com alimentos, descentralizar a produção de biocombustível e, ao mesmo tempo, promover uma segurança alimentar. Essas proposições podem ser garantidas pelo uso da lemna como matéria-prima, de modo a gerar uma economia circular ao transformar subprodutos do tratamento de efluentes em insumos para a produção de biocombustível.

Segundo Brugnago (2014), as lagoas de lemnas se mostram eficientes na remoção de gases de efeito estufa, podendo ser uma alternativa na melhora da qualidade do ar pela redução de gás carbônico. Assim, devido ao potencial de fixação de gás carbônico, as lemnas podem neutralizar as emissões de GEEs nas próprias Estações de Tratamento de Esgoto (ETEs), enquadrando-se como um MDL.

Eshel e Beer (1986) afirmam que a o carbono proveniente do meio aquoso, fixado pelas lemnas da espécie *Spirodela polyrrhiza* representa apenas 5% do carbono assimilado presente na atmosfera. Esse fato corrobora com o estudado por outros autores, o que permite considerar desprezível a fixação de gás carbônico dissolvido (CO₂D) quando comparado com o sequestro de carbono da atmosfera.

No trabalho de Mohedano (2010), as lemnas foram expostas até 100.000 ppm (10%) de CO₂, constatando que tal concentração não foi tóxica às lemnas. Em outras bibliografias, a concentração de CO₂ mais elevada aplicada em lemnas, foi de 5% (50.000 ppm). Em contrapartida, Muller (1977) alega que lemnas não sobrevivem com menos de 0,004% (40 ppm), no seu estudo com Lemna minor.

3.2 AS LEMNAS

3.2.1 Classificação taxonômica e filogenética

A classificação sistemática biológica foi revolucionada pelo botânico sueco Carl Linneus, cujas obras culminaram em uma nova era taxonômica a partir de 1753, com a implantação do sistema de nomenclatura binominal (PRESTES; OLIVEIRA; JENSEN, 2009). A partir de então, a taxonomia manteve-se praticamente inalterada. Entretanto, a definição dos grupos de organismos dentro de cada táxon foi modificada definitivamente nas últimas décadas, após surgirem tecnologias mais precisas de analisar inter-relações.

A filogenética é uma dessas tecnologias, que sequencia o DNA dos seres vivos a fim de esclarecer relações ancestrais entre espécies, rearranjando determinadas classificações taxonômicas. A moderna forma de identificação molecular auxilia na elucidação do modo mais correto para posicionar as espécies e gêneros, cuja morfologia dificultava a decisão sobre a melhor classificação (SOUZA, ROCHA, 2015).

As lemnáceas, por serem organismos muito pequenos – consideradas as menores plantas vasculares conhecidas no mundo (ENGLER, 1877; HILLMAN, 1961; MELCHIOR, WERDERMANN 1964; LANDOLT, 1981; LANDOLT, KANDELER, 1986; COOK, 1990; POTT, CERVI, 1999) – possuem difícil classificação morfológica, por isso, algumas mudanças classificatórias ocorreram. O Grupo de Filogenia das Angiospermas (*Angiosperm Phylogeny Group – APG*) é destinado à classificação filogenética das Angiospermas, compilando informações produzidas por diferentes autores, com o objetivo de organizar em ordem filogenética, de maneira mais natural e parcimoniosa possível.

Conforme APGII (2003), a família Lemnaceae foi rebaixada a uma subfamília posicionada dentro da família Araceae, sendo chamada de Lemnoideae. Isso ocorreu, pois a antiga família Lemnaceae tinha um sequenciamento biológico muito semelhante ao do gênero *Pistia*, o qual pertence justamente à família Araceae (CHASE et al., 1993). A subfamília Lemnoideae, por sua vez, possui cinco gêneros, são eles: *Lemna*, *Landoltia*, *Spirodela*, *Wolffiella* e *Wolffia* (LANDOLT, KANDELER, 1987; DALU, NDAMBA, 2003). A leitura do DNA também contribuiu para o surgimento do gênero *Landoltia*, criado por Les e Crawford (1999) em homenagem a Elias Landolt. As diferenças entre as características desse gênero e os outros gêneros mais similares,

como Lemna e Spirodela, foram detectadas pela biologia molecular (MOHEDANO, 2010). A classificação taxonômica mais recente da lemna utilizada é:

Reino: Plantae

Divisão: Angiospermae

Classe: Monocotyledoneae

Ordem: Arales (Alismatales)

Família: Araceae

Subfamília: Lemnoideae

Gênero: Landoltia

Espécie: *Landoltia punctata*

A família Araceae geralmente se desenvolve em ambientes tropicais, apresentando oito subfamílias classificadas pelo APGIII (2009). A subfamília Lemnoideae é denotada por apresentar ervas aquáticas flutuantes de água doce, isto é, que ficam livres na superfície líquida. A distribuição das mais de 40 espécies existentes e dos cinco gêneros que compõem a subfamília Lemnoideae ocorre em zonas tropicais, subtropicais e temperadas, restringindo-se apenas a regiões desérticas, de pluviosidade e frio intensos (SKILLICORN, SPIRA, JOURNEY, 1993; MOHEDANO, 2010). Na Figura 1, pode-se observar o mapa da disposição dessas plantas em todos os continentes.

Figura 1 – Distribuição geográfica das lemnáceas.



Fonte: Angiosperm Phylogeny Group Website (2009).

Segundo Mohedano (2010), o termo “lemna” é uma nomenclatura popular incentivada por alguns pesquisadores brasileiros, que deve ser utilizada mesmo quando se referir a outros gêneros da subfamília Lemnoideae que não sejam o gênero Lemna. Seguindo essa

tendência, os termos “*lemna*” e “*lemnácea*” foram aplicados neste trabalho para denotar qualquer gênero dessa subfamília, inclusive a espécie empregada no trabalho. As *lemnas* são conhecidas na língua inglesa pelo nome *duckweed*, cuja tradução literal é “erva de pato” mas, na realidade, significa “lentilhas d’água”. A denominação em inglês deveu-se ao fato de essas plantas desempenharem a função de alimento para patos e marrecos selvagens; esse também é o provável motivo de serem conhecidas como “marrequinhas” no Brasil (BRUGNAGO, 2014).

3.2.2 Biótipo *lemnas*

As *lemnáceas* são vegetais superiores, da linha de angiospermas e monocotiledôneas, sendo macrófitas de hábito aquático com um sistema vascular e o desenvolvimento de flores e frutos.

O tamanho das *lemnas* as classifica como as menores vasculares do mundo, porém o mesmo depende do gênero da subfamília, variando de uma escala submicroscópica nas *Wolffiella* até cerca de 20 mm para *Spirodela* e *Lemna* (BACH, 2013). O tamanho diminuto da planta faz com que suas partes sejam igualmente pequenas. Por isso, existe uma divergência de classificação taxonômica entre os autores, principalmente devido suas flores serem reduzidas e a estrutura ser simplificada. Assim, popularmente e regularmente são confundidas com as algas (SKILLICORN, SPIRA, JOURNEY, 1993).

Uma das características morfológicas botânicas de maior destaque relativa às *lemnas* é a presença de um taloide reduzido, composto pelas unidades de caule e folha acoplados, ou seja, é imperceptível a diferença entre ambos nessas plantas. Essa união entre caule e folha é chamada de “fronde” (APG III, 2009). Os nutrientes são diretamente absorvidos pela fronde, diferentemente da maioria das macrófitas que utilizam o sistema radicular de via central (MOHEDANO, 2004).

As *lemnas* são exigentes nutricionalmente para garantia do seu crescimento e desenvolvimento, sendo que assimilam fósforo e nitrogênio, principalmente. A taxa de assimilação desses nutrientes é elevada devido ao seu desenvolvimento acelerado, atingindo uma velocidade de crescimento no verão de até $0,35 \text{ g.dia}^{-1}$ (BACH, 2013). Dessa forma, sua reprodução é de caráter exponencial em grande parte do tempo, onde há possibilidade de a biomassa de *lemnas* dobrar em

apenas 48 h quando em condições físico-químicas favoráveis (HILLMAN 1961; FRANÇA et al., 2002, LALAU, 2010).

As lemnas são plantas monoicas, isto é, cada indivíduo é detentor dos dois sexos. Sua fronde que é a parte fértil, formada a partir de uma única célula epidérmica e capaz de gerar frondes “filhas”. A sua reprodução pode ser tanto assexuada como sexuada, porém a forma mais efetiva, rápida e comum é a assexuada (CROSS, 2006). Este fato explica a capacidade excepcional das lemnas em assimilar nutrientes em um pequeno espaço de tempo, pois como se multiplicam rápido, precisam de alimento a todo o momento, tornando-as potenciais despoluidoras de efluentes ricos em nutrientes.

Durante o ciclo de vida de uma única lemna, a mesma é capaz de se reproduzir pelo menos 10 a 20 vezes (GIJZEN, 1997). Quando atinge período de senescência, há um envelhecimento a nível celular das lemnas, o que faz com que essas diminuam o crescimento e, assim, percam o ritmo exponencial de reprodução. Já mortas, cessam as características que permitem a sua flutuação, como os aerênquimas, logo ficam mais densas que a água e afundam, contribuindo para a formação de um lodo em camadas inferiores da coluna líquida.

Por serem cosmopolitas, em poucos dias, as lemnas se alastram e conseguem fechar superfícies de grandes áreas, formando uma camada espessa e coesa, que geralmente bloqueia a passagem de luz, se for uniformemente distribuída. A ausência de luz abaixo dessa camada na coluna líquida ocasiona a morte de outros seres fotossintetizantes e autotróficos, principalmente de algas (SKILLICORN, SPIRA, JOURNEY, 1993). Dessa forma, a turbidez ocasionada por algas é consideravelmente reduzida, com constância nos níveis de oxigênio (MOHEDANO, 2010).

3.3 LAGOAS DE LEMNAS NO TRATAMENTO DE EFLUENTES

Os sistemas de lagoas de estabilização estão entre as formas mais simples de tratamento de efluentes. Possuem diferentes composições, com variada simplicidade operacional e de requisitos de área (VON SPERLING, 1996). O uso de macrófitas aquáticas atua no tratamento de águas residuárias através de processos bioquímicos. A mesma tem aplicação no tratamento de efluentes de laticínios, esgoto doméstico bruto e diluído, efluente secundário e viveiros de cultivos de peixes (SKILLICORN, SPIRA, JOURNEY, 1993; LENG; STAMBOLIE;

BELL, 1995; MOHEDANO, 2010; PRIYA; AVISHEK; PATHAK, 2012).

Os ecossistemas aquáticos continentais brasileiros, em sua maioria com extensas regiões litorâneas, são propícios à ocorrência de macrófitas aquáticas. Um desses sistemas, cada vez mais abordado e aplicado, é o chamado *wetland*, que consiste em um ecossistema artificial inundado, construído com macrófitas flutuantes ou enraizadas, também sendo aplicado em lagoas de estabilização (MOHEDANO, 2010).

As lagoas de lemnas utilizam as plantas como tecnologia de absorção de nutrientes de efluentes (fósforo e nitrogênio). Um composto importante nitrogenado é a amônia que é assimilada na sua forma ionizada (NH_4^+) para a produção de uma biomassa rica em proteína (EL-SHAFAI et al., 2007; IQBAL, 1999; SKILLICORN, SPIRA, JOURNEY, 1993). Portanto, é essencial a presença de elevada taxa de nutrientes na coluna líquida.

Além das lemnas, há outros organismos presentes nessas lagoas, que competem por esses nutrientes, como as algas unicelulares, fungos. A forma de impedir sua proliferação é evitando a entrada de luz solar na coluna de água pela manutenção de uma camada densa de biomassa lemnácea. A dominância das algas nesse meio poderia ocasionar no aumento do pH pela fixação do CO_2 e consequente produção de amônia livre (NH_3), forma tóxica para a maioria das plantas e lemnas (BARÉA, ALEM SOBRINHO, 2006; IQBAL, 1999; SKILLICORN, SPIRA, JOURNEY, 1993; KORNER; VERMAAT; VEENSTRA, 2001).

No tratamento de efluentes com lemnas, a correta manutenção da biomassa garante a eficiência do sistema, pois a velocidade de crescimento está diretamente relacionada à taxa de remoção de nutrientes. Quando é feita a colheita das lemnas, deve-se estabelecer uma dinâmica de retirada de minerais e nutrientes, garantindo um sistema de tratamento eficaz (SKILLICORN, SPIRA, JOURNEY, 1993).

O manejo de lagoas de lemnas está intimamente relacionado com os aspectos gerais da população lemnácea. A retirada da quantidade correta do excesso de biomassa com uma frequência adequada, evita, por exemplo, uma superdensidade de lemnas, assim como, o aparecimento de clareiras na superfície líquida. Essas ocorrências ainda podem afetar na pigmentação das lemnas, com áreas manchadas destoando do resto da população como, por exemplo, as machas de pigmentação amarelada (clorose) e as machas com pigmentação esbranquiçada ou amarronzada (necrose).

3.3.1 Mecanismos de remoção de poluentes em lagoas de lemnas

3.3.1.1 Mecanismos de remoção de matéria orgânica

A remoção de matéria orgânica presente nos efluentes domésticos é efetuada principalmente por microrganismos heterotróficos aeróbios e anaeróbios, que se alimentam desses compostos orgânicos biodegradáveis. Essa microbiota presente nas lagoas de lemnas auxilia no tratamento biológico do esgoto, mas, para tanto, é interessante haver superfícies disponíveis à fixação desses organismos decompositores. No caso das lagoas de lemnas, a fixação desses pode ocorrer especialmente no lodo presente no fundo e nas raízes com biofilme (CROSS, 2006). As raízes das lemnas apresentam um importante papel no suporte de tais organismos, pois na proximidade dessas existe uma camada aeróbia, que em conjunto com o biofilme de lodo, pode ser uma zona ideal de remoção de matéria orgânica.

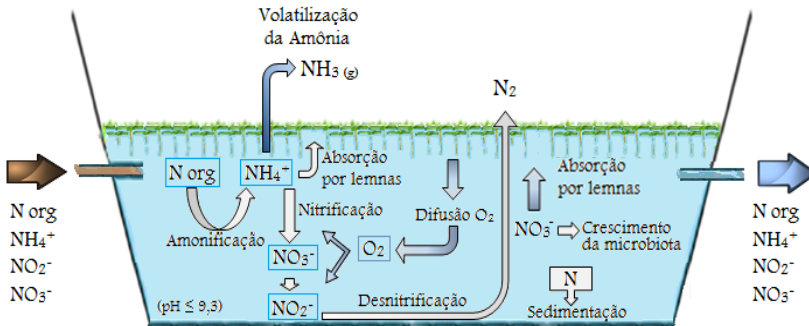
3.3.1.2 Mecanismos de remoção de nitrogênio

Apesar de abundante na atmosfera, o nitrogênio é um dos elementos limitantes ao crescimento das lemnas, pois estas conseguem apenas assimilá-lo sob duas formas: íon de amônio (NH_4^+) e íon de nitrato (NO_3^-); sendo que há preferência na absorção de NH_4^+ pelas lemnas, diferentemente de muitas plantas (BACH, 2013).

A absorção de moléculas orgânicas, como aminoácidos permite a formação de proteínas (PORATH, POLLOCK, 1982). As lemnas ao invés de liberarem gás nitrogênio (N_2) para a atmosfera o transformam grande parte em proteína, justificando, assim, o elevado teor proteico da biomassa. Assim, os nutrientes ficam retidos no meio sólido (lemnas) sem voltar para o ecossistema atmosférico ou aquático (ABUAKU et al., 2006). Os reusos dessa biomassa são variados, como na ração de animais e como matéria-prima para biocombustíveis.

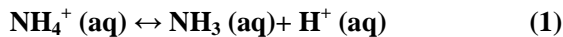
A presença de nitrato de amônio nos corpos hídricos naturalmente deve-se aos processos de fixação de amônia e nitrificação. A humanidade é responsável por contribuir com níveis de nitrato no meio aquático através de fertilizantes e efluentes. O ciclo do nitrogênio presente em sistemas de lagoas e em outros corpos d'água pode ser entendido através da Figura 2.

Figura 2 – Diagrama do comportamento do nitrogênio em lagoas de lençóis.



Fonte: Adaptado Caicedo (2005).

Em pH mais básicos (acima de 9,25) há a predominância da amônia livre, forma tóxica às plantas, devido sua permeabilidade através da membrana celular e solubilidade em lipídeos (CERNA, 2000). Enquanto que em pHs ácidos, há a presença majoritária do íon amônio, forma mais assimilável as lençóis. A Equação 1 demonstra o equilíbrio entre essas duas formas da amônia no pH citado.

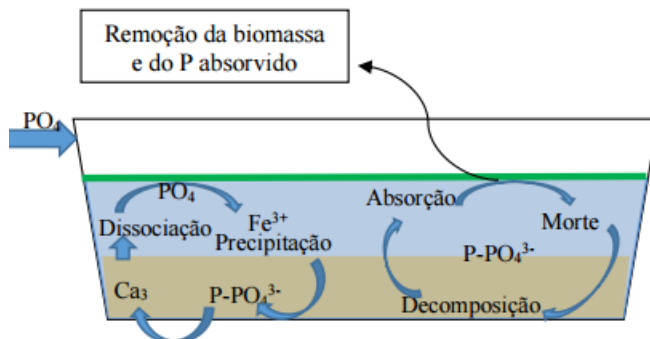


3.3.1.3 Mecanismos de remoção de fósforo

O ciclo do fósforo não apresenta fases do elemento na atmosfera, sendo perdido em sedimentos no fundo de corpos d'água (ciclo biogeoquímico sedimentar). Como é depositado com a matéria orgânica e com o lodo no fundo de lagoas de lençóis, há seu acúmulo em sistemas, onde a redução deve ser realizada com a retirada de biomassa ou dragagem do solo (IQBAL, 1999). Devido ao fósforo ficar incorporado na estrutura da biomassa de lençóis, a eficiência de sua remoção é proporcional ao crescimento dessas plantas, devendo haver a sua posterior retirada.

A forma de fósforo mais assimilável às lençóis é a de ortofosfato (PO_4^{-3}), presente nas águas residuárias (MOHEDANO, 2010). As lagoas de lençóis são eficientes na remoção desse elemento, com resultados de até 98,8%, obtidos por Mohedano e colaboradores (2012), utilizando a espécie *Landoltia punctata*. O ciclo do fósforo em lagoas de lençóis pode ser entendido através da Figura 3.

Figura 3 – Diagrama do comportamento do fósforo em lagoas de lemnas.



Fonte: Tonon (2016).

3.4 APLICAÇÕES DA BIOMASSA LEMNÁCEA

As lemnas são aplicadas no tratamento secundário e terciário de esgoto desde a década de 80 nos EUA, demonstrando ser um sistema rústico e eficiente na remoção de nutrientes. As aplicações possíveis da biomassa de lemnas são variadas, mesmo após sua utilização para o tratamento de efluentes (livres de compostos tóxicos e metais pesados).

A velocidade de crescimento elevada desses vegetais faz com que exista uma necessidade superior, quando comparado com outras macrófitas, por nitrogênio e fósforo. O nitrogênio da lemna é convertido em aminoácidos e proteínas, o que torna a planta em uma fonte de alimento com elevada qualidade nutricional para peixes, aves, anfíbios, crustáceos, insetos e moluscos. Por isso, possui papel fundamental na cadeia trófica (LALAU, 2010). Assim, o alto teor proteico da biomassa, descrito por Skillicorn, Spira e Journey (1993), permite a sua transformação em um componente de excelência para rações de animais (TAVARES, 2008; MOHEDANO, 2010).

Outra aplicação possível das lemnas é seu uso como adubo e compostos de elevada qualidade na agricultura, com a fertilização do solo. Estudos recentes mostram o potencial das lemnas para conversão em biocombustível. Nos EUA, sua biomassa já é usada para complementar a produção de etanol à base de milho (CHENG, 2009). A China também norteia projetos para usar a biomassa de lemnas como matéria-prima de biocombustíveis (TAO et al, 2013).

3.5 BIOETANOL

O bioetanol pode ser produzido a partir de uma fonte orgânica que contenha monossacarídeos (glicose), dissacarídeos (sacarose/maltose) e polissacarídeos (amido). Para fontes orgânicas ricas em amido, deve-se realizar primeiro a sacarificação do mesmo, através da hidrólise, transformando-o em açúcares fermentescíveis, isto é, em sacarose e glicose. Assim, esse açúcar passa pelo processo de fermentação por intermédio da ação de leveduras, sendo posteriormente destilado, desidratado e desnaturado para ser utilizado como biocombustível.

A biomassa com maior disponibilidade de amido ou açúcar fermentescível confere ao etanol uma classificação de primeira geração, devido ao processo de produção ser mais simplificado e direto do que os de segunda geração, cuja origem é lignocelulósica e de processo mais complexo.

A cana-de-açúcar, a beterraba, o milho, e as lemnas enriquecidas com amido são exemplos de etanóis de primeira geração, uma vez que dispõem em suas estruturas, maior concentração de amido e açúcares, fáceis de sofrer a ação enzimática e de fermentarem para formar um álcool. Já os resíduos celulósicos como, por exemplo, o bagaço da cana-de-açúcar e a palha do milho, são chamados de biocombustíveis de 2ª geração.

De acordo com a Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroenergético (RIDESA, 2017), o etanol brasileiro produzido a partir da cana-de-açúcar é o único que atende à exigência do *Renewable Fuel Standard Program (RFS)* da *Environmental Protection Agency (EPA)*, pois foi designado por essa agência como um biocombustível avançado, devido a sua capacidade de reduzir emissões de gases causadores de efeito estufa em pelo menos 50%, em comparação à gasolina. Durante o evento londrino, Kutas lembrou que segundo a avaliação da EPA, o etanol de cana emite até 90% menos GEEs em relação ao combustível fóssil; uma grande vantagem sobre o etanol de milho produzido nos EUA, que reduz as emissões desses gases em apenas 38%, o que não se enquadra nas exigências da 2ª fase do *Renewable Fuel Standard Program Amendments (RFS2)* para qualificá-lo como biocombustível avançado.

O uso das lemnas como matéria-prima para produção de etanol vem sendo cada vez mais estudado na atualidade, indicando um potencial promissor. Sua biomassa apresenta baixa quantidade de lignina e hemicelulose o que facilita sua conversão em etanol

(ADERSON, 2008). Estudos também apontam que a lemna pode armazenar quantidades significativas de amido, o que é essencial para também favorecer sua transformação em etanol. Um fator vantajoso ao uso dessa matéria-prima na produção de bioetanol é sua adaptação a diferentes condições climáticas, estando presente em todos continentes do planeta (exceto Antártida). Além de estar disponível em quantidade, devido sua elevada velocidade de crescimento. Outra vantagem é o fato de tal insumo não competir com culturas alimentícias, como as matérias-primas anteriormente citadas.

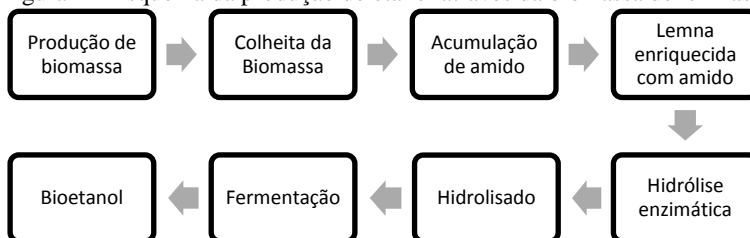
O enriquecimento de amido significa maximizar a quantidade de amido na composição nutricional da lemna, para então poder elevar a produção de bioetanol. Existe uma proporção nessa composição, com uma relação inversamente proporcional entre amido e proteína. O amido é o componente a ser transformado em álcool (etanol), por isso pretende-se maximizá-lo.

A conversão de lemnas em etanol já é uma tecnologia utilizada para complementar a produção de etanol à base de milho. O rendimento anual de bioetanol a base de lemnas pode chegar a 6.420 L/ha, 50% acima do obtido para o etanol à base de milho (CHENG, STOMP, 2009; XU et al., 2011). Por isso, a lemna se mostra como uma matéria prima promissora para produzir bioetanol individualmente.

Xu et al. (2012) também afirma uma superioridade no rendimento da lemna para a produção de etanol, pode ser cinco vezes superior quando comparado em mesma área com o milho. Os autores também citam que 94,7% do amido poderia ser convertido em etanol usando as tecnologias existentes para a conversão de amido de milho

A Figura 4 apresenta um esquema da produção de etanol a partir da biomassa de lemnas.

Figura 4 – Esquema da produção de etanol através da biomassa de lemnas.



Fonte: Bartošová, Soldán, Blinová (2012, tradução).

Diversos autores já vêm estudando a transformação das lemnas em bioetanol, obtendo resultados significativos para a valorização dessa

matéria-prima. Muradov (2014), por exemplo, transformou 40% do peso seco das lemnas em bio-óleos com o processo da pirólise a 500 °C.

Ademais, Cheng e Stomp (2009) produziram aproximadamente 26% de etanol em relação ao peso seco após a hidrólise enzimática do amido, utilizando *Lemna Spirodela*.

Souto (2016) obteve eficiência de 82% na sacarificação do amido e celulose simultaneamente, em 4 h (pH 5; 45 °C), mostrando que as frações de amido e celulose da biomassa são de fácil hidrólise enzimática. A maior eficiência da sacarificação apenas do amido foi de 98,99% em 8 h. A autora concluiu que a produção de açúcares fermentescíveis a partir da biomassa de lemna se mostrou vantajosa.

3.6 ACÚMULO DE AMIDO

O amido, produzido através da fotossíntese (Equação 2), é um polissacarídeo de reserva nos vegetais. Parte dessa produção é utilizada no metabolismo celular e o restante é armazenado temporariamente nas folhas, sob a forma de grânulos de amido; para posteriormente atingir outras partes da planta.

O amido que não é utilizado na atividade metabólica celular pode ser estocado na forma de grânulos semicristalinos nos cloroplastos (CUI, CHENG, 2015). À noite, esse amido é consumido com mais velocidade devido à presença apenas da respiração no escuro. Dessa maneira, o amido é degradado e exportado a partir dos cloroplastos para alimentar o sistema heterotrófico.

Os fatores que influenciam no acúmulo de amido basicamente são os mesmos que interferem na fotossíntese, visto que o produto dessa reação é a glicose, a qual forma o amido. Todavia, estuda-se a introdução de fatores limitantes no meio de cultura para ocasionar um estresse abiótico, o qual promove o estoque de amido. As relações desses fatores encontradas nas literaturas são descritas na Tabela 1.

Tabela 1 – Fatores que influenciam no acúmulo de amido.

Fator ambiental	Relação com o acúmulo de amido
Período luminoso	Diretamente proporcional
Intensidade de luz	Diretamente proporcional*
Temperatura	Inversamente proporcional*
Escassez de nutrientes	Diretamente proporcional
Adição de NaCl e metais pesados	Diretamente proporcional*
Enriquecimento de gás carbônico	Diretamente proporcional

*Dentro de uma faixa ideal de valores de cada parâmetro

Atualmente, existem duas vertentes para aumentar a presença de amido nas lemnas: estimulando a fotossíntese ou diminuindo a decomposição do amido armazenado (CUI, CHENG, 2015). A vertente mais estudada é a de evitar a degradação de amido. Esses estudos manipulam condições de cultivo diferenciadas, dentre elas, a escassez de nutrientes e a concentração de sais e inibidores no meio aquoso.

Sree e Appenroth (2014) promoveram estresse abiótico nas lemnas por meio dessas condições de cultivo: inanição de nutrientes, aplicação de NaCl e de metais pesados; sendo essas avaliadas em separado. Ele apresentou acúmulo de amido maior com: íons de Cádmio em quatro dias de cultivo, concentração de 150 mM de NaCl em 7 dias de cultivo e inanição de fosfato em 14 dias. Os melhores resultados obtiveram um teor de amido nas lemnas de 50% p/p base seca.

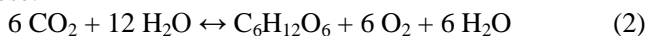
Seguindo a primeira vertente, os estudos quanto à fotossíntese variam os fatores que estimulam esse processo, como luminosidade, temperatura e fornecimento de gás carbônico. Trabalhos mais recentes vêm estudando variados fotoperíodos, intensidades luminosas e até mesmo temperatura, porém há poucos sobre o enriquecimento de CO₂.

No trabalho de Yin et al (2015), foram testados os fotoperíodos de 12h/12h, 16h/8h, 24h/0h (claro/escuro) e as intensidade luminosas de 20, 50, 80, 110, 200 e 400 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, resultando em um acúmulo de amido proporcional ao aumento de ambos os parâmetros, com exceção das intensidades de luz 200 e 400 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. O valor máximo alcançado foi de 62,7 % de amido.

Li e colaboradores (2016) avaliaram o acúmulo de amido para três temperaturas de cultivo: 20, 25 e 30 °C, resultando em valores mais positivos para a temperatura menor. Xiao et al (2013) também já haviam concluído que as temperaturas baixas favorecem o enriquecimento de amido, assim como reduzem a velocidade de crescimento da planta. Além disso, processos que visam modificar a temperatura e a luminosidade geralmente são mais custosos e relativamente difíceis em escala real (CUI, CHENG, 2015).

Mohedano et al (2016) aplicaram diferentes concentrações de gás carbônico em câmaras fechadas para o cultivo das lemnas: 380, 1.500, 6.000 e 100.000 ppm, obtendo maior acúmulo de amido para a maior concentração de gás (24,7% de amido).

O acúmulo de amido por meio do enriquecimento de CO₂ é explicado pelo aumento de um insumo para realização da fotossíntese, cujo produto é um precursor do amido, glicose, como mostra a Equação 2, da fotossíntese.



4 METODOLOGIA

Para avaliar o efeito de elevadas concentrações de CO₂ sobre o teor de amido na biomassa de lemnas, estruturou-se um sistema experimental em escala de bancada. Tal experimento consiste em uma análise exploratória, para comprovação da hipótese do trabalho, no caso, se o aumento da concentração de CO₂ terá efeito sobre o teor de amido nas lemnas expostas.

4.1 ESCOLHA DA ESPÉCIE UTILIZADA

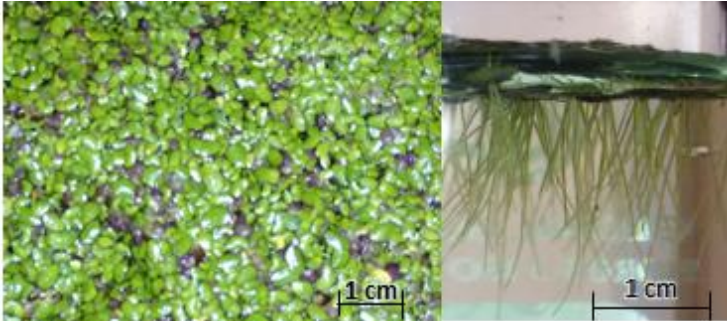
Segundo Matos e colaboradores (2010), a seleção da espécie vegetal é de fundamental importância para o sucesso do tratamento de efluentes. Como a proposta do presente trabalho também é valorizar o tratamento de efluentes por lagoas de lemnas, sugere-se aplicar a biomassa oriunda desse processo à tecnologia de enriquecimento de amido. Nesse contexto, a espécie ideal para este trabalho deve:

- a) apresentar elevada eficiência de remoção de nutrientes;
- b) suportar variações na operação de um sistema (rusticidade);
- c) possuir alta produtividade de biomassa;
- d) ser capaz de acumular significativamente amido;
- e) ser nativa da região sul do Brasil.

A espécie *Landoltia punctata* atende esses requisitos, destacando-se por: remover eficientemente cargas elevadas de N e P; ser de pequeno porte, promovendo manutenção e manejo facilitados; possuir velocidade de crescimento elevada, podendo dobrar sua população em 48 h; ser capaz de quintuplicar seu teor de amido; e se manifestar na região litorânea catarinense, provando sua adaptação ao clima local.

Essas plantas são monocotiledôneas (angiospermas), pertencentes à subfamília Lemnoideae, família Araceae e ordem Alismatales. A Figura 5 ilustra a espécie *Landoltia punctata* vista em planta e de perfil.

Figura 5 – Lemnas da espécie *Landoltia punctata*.



Fonte: Autor.

4.2 LOCALIZAÇÃO E ESTRUTURA

O sistema em escala de bancada foi instalado em uma sala pertencente ao Laboratório Integrado do Meio Ambiente (LIMA), localizada no Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental (ENS), no campus da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis (SC). O experimento faz parte de uma linha de pesquisa desenvolvida pelo Laboratório de Efluentes Líquidos e Gasosos (LABEFLU).

A estrutura experimental foi concebida com a elaboração de seis câmaras de crescimento (unidades experimentais) expostas a um sistema de iluminação artificial e controle de temperatura, meio de cultura e ventilação.

4.2.1 Câmaras de crescimento

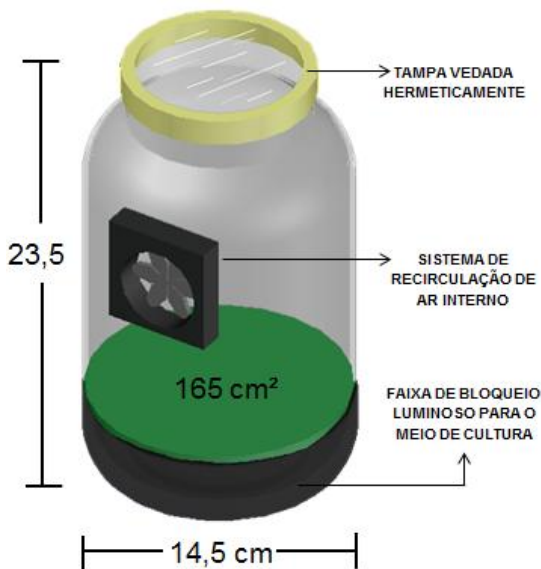
O crescimento das lemnas (*Landoltia punctata*) ocorreu em recipientes de vidro de aproximadamente 3 L de volume e formato cilíndrico, apresentando um diâmetro principal de 14,5 cm e altura de 23,5 cm.

Cada câmara foi preenchida com 0,5 L de meio de cultura segundo o *Swedish Standard Institute* (SIS) (vide Tabela 2, item 4.2.4). Esse volume resultou em 4,5 cm de profundidade da coluna líquida. A área superficial referente a essa lâmina líquida foi equivalente a $165,13 \text{ cm}^2$ ($0,016 \text{ m}^2$).

As câmaras de crescimento, denominadas de fotobiorreatores (FBR), são o suporte para o desenvolvimento das lemnáceas, recebendo

o meio de cultura com nutrientes necessários, o aporte de gás carbônico e permitindo a passagem de luz, para a realização da fotossíntese. Essas câmaras de crescimento estão representadas na Figura 6.

Figura 6 – Principais elementos presentes nas câmaras de crescimento.



Fonte: Autor.

Em cada câmara colocou-se uma faixa preta na área lateral até a altura em que o meio de cultura ocupava, a fim de evitar a passagem de luz lateralmente na coluna líquida. Essa medida teve o intuito de evitar a contaminação por algas e/ou outros organismos fotossintetizantes que possam habitar a coluna líquida e competir por nutrientes com as lemnas.

As câmaras de crescimento devem ser hermeticamente vedadas para evitar vazamentos do gás aplicado. Portanto, fez-se a vedação, com o uso de plástico filme e fita adesiva nos possíveis pontos de vazamento entre a tampa metálica e recipiente de vidro. As tampas metálicas possuem apenas as bordas de metal, pois seu centro foi substituído por plástico filme, de modo que permitisse a passagem de luz e ao mesmo tempo evitasse a saída de gás. Nesta tampa, foi deixada uma aba de abertura, para introdução do equipamento de medição de concentração

de CO_2 e temperatura, quando necessário. O detalhamento da tampa é demonstrado na Figura 7.

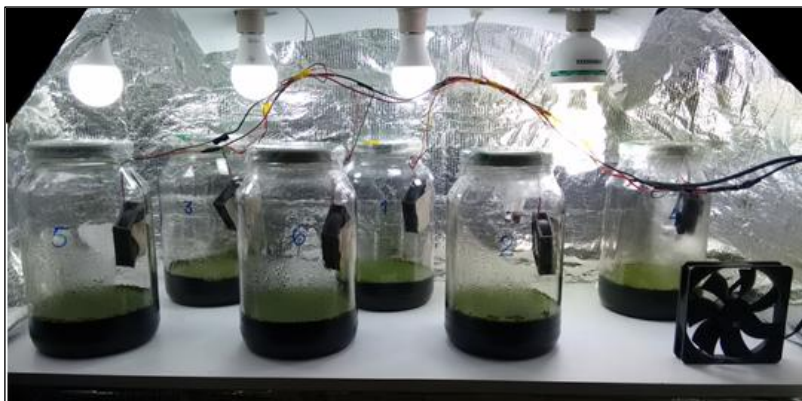
Figura 7 – Detalhamento da tampa do FBR.



Fonte: Autor.

Os fotobiorreatores também foram equipados com um sistema para recirculação do ar interno (*coolers* usados em eletrônicos), objetivando a homogeneização do gás na câmara durante as medições de CO_2 . Desse modo, se propôs tornar as leituras mais confiáveis, uma vez que o CO_2 tende sedimentar devido sua elevada densidade em relação ao ar. A ativação dos *coolers* de todas as câmaras ocorria de forma simultânea através de um interruptor. Tal homogeneizador possui dimensões quadradas de 6 cm, cada um funcionando com uma corrente de 1,5 A, devido a presença de uma fonte que atuava com 10 A. Essas estruturas são ilustradas na Figura 8.

Figura 8 – Reatores fotossintéticos em bancada.



Fonte: Autor.

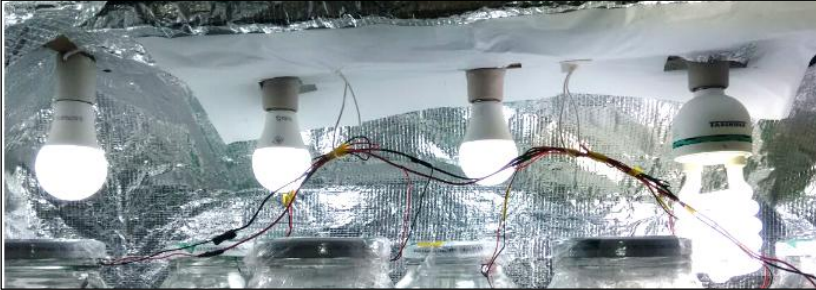
4.2.2 Sistema de iluminação

Objetivou-se manter uma luminosidade média de $100 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), condizente com o intervalo de 85 a $135 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, recomendado pela norma da *International Organization for Standardization (ISO)*, chamada ISO 20079 (2005); usada para padronização de testes toxicológicos. Tal faixa de Radiação Fotossinteticamente Ativa (*Photosynthetically Active Radiation – PAR*) também condiz com o utilizado em outras bibliografias para o cultivo de lemnas, como Caicedo (2005), Mohedano (2010) e Costa (2014).

Para garantir essa intensidade de luminosa, foram instaladas três lâmpadas de LED tipo bulbo (9 W cada) e uma fluorescente compacta tipo espiral (45 W) de forma distribuída em um suporte acima dos fotobiorreatores, como demonstrado na Figura 9 e na Figura 10. A distância entre a superfície líquida do meio de cultura e as lâmpadas de LED é de 26 cm e de 16 cm em relação à fluorescente. Essa estrutura foi construída para fornecer às plantas uma de 400 a 700 nm.

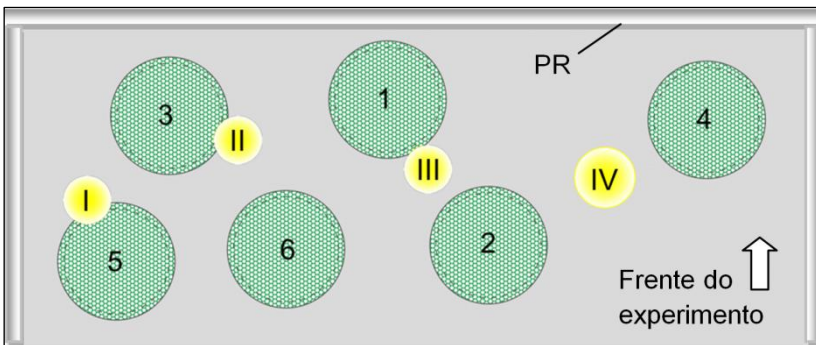
O sistema de iluminação apresentou uma potência total de aproximadamente 100 W de luz branca, porém, como a potência equivalente fluorescente de cada lâmpada de LED é de 16 W, obtém-se uma potência total de 141 W.

Figura 9 – Sistema de iluminação em perfil, com três lâmpadas de LED e uma fluorescente.



Fonte: Autor.

Figura 10 – Planta de localização do sistema de iluminação e fotobiorreatores.

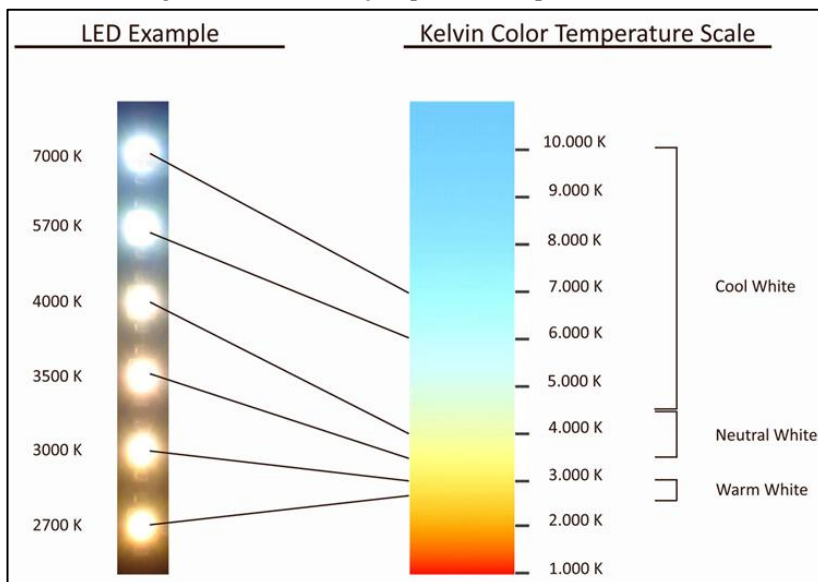


I, II e III: Lâmpadas de LED; IV: Lâmpada fluorescente; 1, 2, 3, 4, 5 e 6: fotobiorreatores; PR: Paredes refletoras.

Fonte: Autor.

As lâmpadas de LED representam 60% da iluminação do experimento (20% cada), enquanto que a fluorescente oferece 40% sozinha. A temperatura da cor das lâmpadas de LED e fluorescente são de 6.500 K e 6.400 K, respectivamente, sendo incluídas na categoria de luz fria. Para ampliar a luminosidade oferecida (principalmente pelas lâmpadas) às lemnas, revestiu-se as paredes no entorno do experimento com uma lona metalizada refletiva, sendo nítido o aumento de intensidade de luz devido ao uso dessa. Analisando a Figura 11, nota-se que a temperatura da cor do experimento equipara-se a luz fria, se aproximando de um dia com céu nublado a branco frio.

Figura 11 – Classificação quanto à temperatura da cor.



Fonte: keywordsuggest.org (2017).

O aparelho para medir a intensidade luminosa foi o luxímetro Testo 545, com medição de 0 a 100.000 lux, com precisão de 1 lux entre 0 e 32.000 lux. A conversão de lux para $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ varia de acordo com a fonte de luz. Dentre os fatores de conversão da Apogee, o escolhido para o experimento foi 0,0135, equivalente à luz branca fluorescente, visto que a temperatura da cor de ambos os tipos de lâmpadas são similares.

4.2.3 Fornecimento de CO₂

Considerou-se que a concentração de CO₂ deve se manter constantemente elevada, simulando uma fonte fixa de CO₂ próxima às lagoas de lemnas. Tal fato pode impulsionar e valorizar a combinação do tratamento secundário anaeróbio (de elevada emissão de biogás) com o tratamento terciário de polimento efetuado pelas lemnas. O teste em escala menor permite validar futuros experimentos em escala real. Porém, é importante existirem tecnologias que possibilitem a exposição das lagoas de lemnas ao CO₂, no caso, a técnica *Free Air Carbon Enrichment (FACE)* é promissora para aplicação em escala real.

A fonte do gás de estudo foi de um cilindro de CO₂ puro. Sendo assim, captou-se o CO₂ e o enclausurou em um recipiente especial para transportar gases, chamado de saco Tedlar, por questões de praticidade de manuseio com o gás. A concentração do gás no cilindro e no saco Tedlar foram mensuradas pelo equipamento GEM 5000.

O cálculo da concentração de CO₂ nos FBRs considerou as variações da concentração de CO₂ decorrentes da contaminação por ar durante a transferência de gás para o saco Tedlar. A concentração no FBR é definida pelo volume de CO₂ aplicado em relação ao volume do próprio recipiente, onde 1 ppm equivale a 1 mL/m³. Desse modo, efetuaram-se regras de proporcionalidade, onde se conhecia a concentração teórica a ser estabelecida no FBR e o volume de ar do mesmo (2,6 L). O resultado ainda é multiplicado por um fator para compensar a diluição do gás, de 1,18, conforme supracitado.

4.2.4 Meio de cultura

Os meios de cultura previstos na ISO 20079 (2005), que representam alguns dos meios existentes, proporcionam condições controladas de disponibilidade de nutrientes, como o meio *Steinberg medium*, *Swedish Standard Institute médium*, *Solid medium*, e *APHA medium*. Esses meios de cultura tornam possível a padronização dos nutrientes fornecidos inicialmente em todos os FBRs, provendo o necessário para desenvolvimento das lemnas de modo que não limite o seu crescimento.

O meio de cultura escolhido foi *Swedish Institute Standard (SIS)*, usado pela *Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) 221 Draft* (2000). Sua escolha foi devido à facilidade de obtenção dos nutrientes necessários para seu preparo no mercado, como o nitrato de sódio (NaNO₃).

Diferentemente da ISO 20079 (2005), onde o cultivo ocorre com cerca de 10 frondes de lemnas, a quantidade de biomassa utilizada nesse experimento pode ser 200 vezes superior. Visto a impossibilidade de renovação do meio de cultura, os nutrientes devem ser em quantidade suficiente para suprirem as necessidades de crescimento da lemna durante sete dias. Sendo assim, algumas modificações foram feitas no *SIS Medium* para garantir tal desenvolvimento, cuja descrição consta na Tabela 2.

A utilização desse meio de cultura permite que a concentração de nutrientes disponibilizada seja a mesma em todas as câmaras de

crescimento. Padronizar essa solução garante em parte, uma constância na condutividade e salinidade da mesma, até o momento em que as lemnas começarem a consumir os sais minerais básicos presentes.

Como as lemnas geralmente não apresentam dificuldades de crescimento em um potencial hidrogeniônico (pH) entre 5 e 9, o ajuste desse parâmetro não se torna necessário comumente. Assim, a norma ISO 20079 (2005) sugere que o pH do meio de cultura esteja entre 5 e 8, dependendo da capacidade de tamponamento da solução. Segundo esta ainda, a neutralização não é permitida se o efeito do pH for refletido nos resultados do teste, no qual modificações físicas ou reações químicas forem observadas devido ao ajuste do pH.

A variação desse parâmetro é comum durante o dia, devido fotossíntese e respiração da planta. Durante o dia, a planta exposta a luz executa a fotossíntese, na qual há a fixação de carbono dissolvido no meio líquido (CO_2D) e principalmente do carbono atmosférico (CO_2); diminuindo o pH do líquido na qual está inserida. Enquanto que, durante a respiração à noite, a planta libera CO_2 , produzindo compostos carbonatados e, conseqüentemente, aumentando o pH do meio líquido.

Para garantir que a biomassa de lemnas possua quantidade de nutrientes adequada para uma Velocidade de Crescimento Relativo (VCR) ideal, adotada de $20 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{dia}^{-1}$, modificou-se a concentração dos sais referentes às principais fontes de N e P no meio de cultura descrito na ISO 20079 (2005). Segundo a ISO, a concentração dos sais NaNO_3 e KH_2PO_4 seriam de 85 mg/L e 13,4 mg/L, respectivamente, no meio de cultura. Porém, foi necessário multiplicar essa concentração por um fator de aproximadamente 22 e 15, respectivamente, segundo cálculos de proporcionalidade e estequiometria. Esses cálculos consideraram que a composição da biomassa de lemnas contém 6% de nitrogênio e 1% de fósforo (TONON, 2016). A partir disto, obteve-se a quantidade de NaNO_3 e KH_2PO_4 necessários na área do FBR de VCR pré-determinada.

Na Tabela 2 estão representadas as concentrações de cada sal no meio de cultura, bem como sua concentração em cada Solução Estoque prevista na ISO 20079 (2005). As Soluções Estoque servem como uma solução concentrada a ser diluída para concentração usada no meio de cultura. Assim, se dispõe de maior praticidade no preparo do meio de cultura, pois como essas já contém os sais do mesmo, apenas misturam-se os volumes calculados de cada Solução Estoque com água destilada.

Os sais se encontravam na forma sólida e foram pesados em balança de precisão com as quantidades determinadas para diluir em água destilada e, assim, resultar nas concentrações supracitadas na Tabela 2.

Tabela 2 – Composição do meio de cultura *Swedish Standard Institute (SIS)* alterado.

Compostos	Concentração		Solução Estoque
	Solução Estoque (g/L)	Meio (mg/L)	
NaNO ₃	18,6*	1.860,0*	I
KH ₂ PO ₄	2,0*	202,7*	I
MgSO ₄ · 7H ₂ O	15	75	II
CaCl ₂ · 2H ₂ O	7,2	36	III
Na ₂ CO ₃	4	20	IV
H ₃ BO ₃	1	1	V
MnCl ₂ · 4H ₂ O	0,2	0,2	V
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,01	0,01	V
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0,05	0,05	V
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,005	0,005	V
Co(NO ₃) ₂ · 6H ₂ O	0,01	0,01	V

*Concentrações alteradas em relação à ISO 20079 (2005).

Fonte: ISO 20079 (2005).

Ademais, a Tabela 3 apresenta o volume de cada Solução Estoque que deve ser adicionado para o preparo de 1 L de meio de cultura. Devido ao aumento da concentração de sais na Solução Estoque I, o volume desta a ser adicionado no meio de cultura foi modificado (de 10 mL para 100 mL). Tal medida evita que o soluto atinja o limite máximo de solubilidade no solvente, isto é, que garante que o sal não precipite na água destilada e, portanto, no meio de cultura.

Tabela 3 – Volume referente a cada solução estoque adicionado no meio de cultura modificado.

Solução Estoque	Volume (mL)
I	100*
II	5
III	5
IV	5
V	1

*Volume alterado em relação à ISO 20079 (2005).

Fonte: ISO 20079 (2005).

4.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O experimento foi elaborado de modo a testar se as elevadas concentrações de CO₂ interferem não somente no teor de amido, mas também na velocidade de crescimento e na sanidade e morfologia das lemnas. Para isso, foi necessário manter todas as condições ambientais externas constantes (temperatura, meio de cultura, luminosidade e ventilação), variando apenas a concentração de CO₂ para permitir a análise de seus efeitos. Dessa maneira, admitiu-se uma variação mínima de luz e temperatura, cujas particularidades são melhores discutidas nos itens 4.2.2 e 4.2.4.

Após observar os valores de concentrações de CO₂ aplicadas às lemnas em trabalhos científicos, determinou-se por expor a biomassa de lemnas a dois níveis de concentração: 400 ppm (padrão) e acima de 6.000 ppm (elevado). Sendo chamados de situação A e situação B, respectivamente neste trabalho. A comparação dos efeitos na biomassa para cada nível de concentração norteou este estudo.

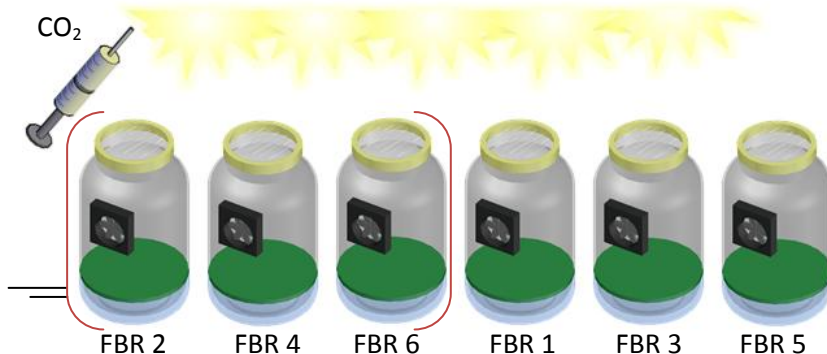
Como a concentração média de CO₂ na atmosfera vem se elevando nas últimas décadas, o valor mais atualizado para se utilizar é 400 ppm (KEELING, 2016). Sendo assim, estabeleceu-se esta concentração como o controle do sistema, visto que a tecnologia propõe que as lagoas de lemnas fiquem expostas ao CO₂ atmosférico.

A decisão do limite mínimo para concentração de CO₂ superior à atmosférica a ser aplicada nos reatores foi fundamentada no trabalho de Andersen e colaboradores (1985). Esses autores obtiveram resultados significativos para o crescimento das lemnas (*Lemna Giba*) com enriquecimento de CO₂ utilizando concentrações acima de 6.000 ppm. Além disso, na pesquisa de Mohedano (2010), também se obteve resultados positivos para o crescimento das lemnas, remoção de nutrientes e acúmulo de amido, com valores acima de 6.000 ppm, sendo o melhor resultado obtido com 100.000 ppm, cuja concentração não ocasionou efeito tóxico às lemnas. Ademais, outros autores também obtiveram sucesso usando valores próximos ou acima de 6.000 ppm, como Gerald (1985), Landolt e Kandeler (1987).

Os fotobiorreatores foram planejados em triplicatas, ou seja, aplicava-se uma concentração de CO₂ superior a 6.000 ppm em três FBRs; e uma concentração atmosférica nos outros três restantes. A posição dos seis FBRs foi escolhida de forma aleatória, para não definir propositalmente alguma posição possivelmente mais favorável ou menos favorável para o crescimento das lemnas. Essa randomização teve como objetivo tornar o experimento mais fidedigno e imparcial

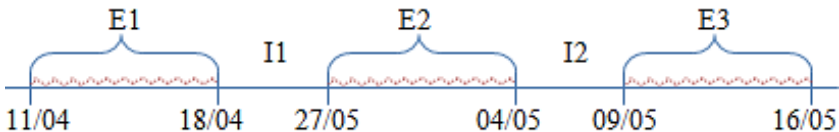
possível. Assim, decidiu-se previamente que os números pares receberiam quantidade extra de CO_2 . O resultado do sorteio das posições pode ser visto na planta de localização da Figura 10 (item 4.2.2), com a numeração dos FBRs. A Figura 12 apresenta o esquema simplificado do ensaio.

Figura 12 – Esquema simplificado do ensaio.



O ensaio foi realizado durante o período de 7 dias, pois estudos evidenciaram que o tempo de senescência de uma lemna é de aproximadamente 10 dias. Portanto, neste período a mesma já se reproduziu, atingindo a fase exponencial e estacionária de crescimento, e está iniciando a fase de morte (declínio do crescimento). A fim de analisar a consistência dos dados e verificar se há incoerências ou erros, optou-se por repetir três vezes esta análise, buscando fazê-la de forma idêntica. A cronologia dos três ensaios está esquematizada na Figura 13, com os intervalos para adaptação das lemnas às condições artificiais, entre um e outro.

Figura 13 – Cronologia do experimento desenvolvido em 2017.



E1: Ensaio 1; E2: Ensaio 2; E3: Ensaio 3; I1: Intervalo 1; I2: Intervalo 2.

Fonte: Autor.

Para definir o número de dias de intervalo, analisou-se a velocidade de crescimento após 5, 7 e 10 dias de ensaio. Em cada um

deles inoculou-se a biomassa de lemnas da pré-cultura nas condições artificiais. As velocidades de crescimento para a duração de 5 e 7 dias foram semelhantes, enquanto que a de 10 dias foi menor. Portanto, utilizar um intervalo entre 5 e 7 dias para adaptação das lemnas foi adotado entre um ensaio e outro. É importante ressaltar que ao iniciar cada ensaio oficial, foram selecionadas as lemnas com aparência mais saudável, pois era indesejável utilizar os indivíduos já na fase de senescência e/ou com sanidade já comprometida.

4.4 PROCEDIMENTOS

4.4.1 Pré-cultura e testes preliminares

Coletou-se uma determinada massa de lemnas da espécie *Landoltia punctata* em campo, de uma lagoa natural na Estação de Pesquisa em Aquicultura da UFSC, Barra Lagoa – Florianópolis.

Durante todo o cultivo das lemnas em laboratório, realizou-se o monitoramento dessas culturas, observando respostas visuais que o organismo das lemnas apresentava para as novas situações, no quesito morfológico e fitossanitário, principalmente.

Primeiramente realizou-se uma adaptação dessas lemnas, colocando-as em uma cultura estoque, a fim de dispensar a necessidade de coletar biomassa em seu habitat natural diversas vezes.

A fase de cultura estoque se iniciou antes mesmo da montagem da estrutura do experimento, com o intuito de cultivar as lemnas fora desse habitat natural. Assim, as lemnas ficaram expostas à luz solar e foram mantidas primeiramente em recipientes com um meio de cultura equivalente a uma solução de água potável com fertilizante NPK (30:10:10) na concentração de 1 g/L. Esse meio de cultura foi uma medida paliativa até a chegada de reagentes para o preparo do meio *Swedish Standard Institute*.

Ao transferir as lemnas para a estrutura em escala de bancada, as condições ambientais já eram as mesmas do experimento em si, o que caracteriza a pré-cultura. Nesse cultivo, há adaptação ao meio artificial, onde a iluminação provém de lâmpadas. Segundo a ISO 20079 (2005), a pré-cultura deve ser axênica, isto é, que não possuir qualquer tipo de contaminação e existir somente uma espécie de organismo sendo cultivado.

Para buscar uma axenia na pré-cultura, realizou-se diversas lavagens das lemnas com água da torneira corrente com auxílio de uma

peneira. Ademais, retirou-se com pinça todos os organismos macroscópicos visíveis (helmintos, crustáceos, insetos, besouros, entre outros). Após tais procedimentos, as lemnas ficaram de molho em uma solução de hipoclorito de sódio 0,5%, durante 4 minutos, e depois fez-se seguidos banhos com água da torneira e destilada (LALAU, 2014). Além disso, removeram-se as eventuais lemnas de outras espécies, como as do gênero *Wolffia*. Ao longo do tempo de cultivo, também foi-se selecionando as lemnas mais saudáveis aparentemente, retirando os exemplares de coloração amarelada, com necroses, com infestação de algas e fungos.

Após três semanas de adaptação a esse meio de cultura e expostas à luz solar, as lemnas foram alocadas para a estrutura experimental já montada. Nesta estrutura, houve a adaptação à iluminação artificial controlada por um fotoperíodo de 16h/8h (claro/escuro) e adaptação a todas as condições de possível estresse à planta, como temperatura, umidade e ventilação. Assim, a biomassa de lemnas foi dividida igualmente e inoculada em cada um dos seis FBRs (7 g). Nessa fase ainda houve a aplicação de CO₂, realizando testes durante três a quatro semanas para simular como o experimento iria ocorrer e aprimorar a metodologia da tecnologia desenvolvida.

Primeiramente, testou-se a estanqueidade do FBR, aplicando uma concentração conhecida de gás na câmara sem meio de cultura e lemnáceas, a fim de averiguar a eficácia da vedação proposta (através de medição com equipamento Testo 435-4). Quando a concentração se manteve constante por mais de 24 h, considerou-se a câmara estanque.

Averiguada a estanqueidade, pode-se realizar testes prévios para análise do decaimento de CO₂ para cada concentração (400 ppm e valores acima de 6.000 ppm) dentro da câmara de crescimento das lemnas. Isto é, aplicava-se a quantidade necessária para atingir cada concentração e em seguida monitorava-se o consumo desse gás pelas lemnas ao longo do período luminoso, até que o mesmo apresentasse uma queda brusca na concentração. Essa angulação maior na curva de decaimento indica o período em que é necessário repor uma parcela do gás. Sabendo a concentração decaída, calcula-se a quantidade a ser acrescentada para retornar a concentração inicial.

4.4.2 Partida do experimento e inoculação da biomassa

Em cada FBR foram introduzidas 7 g de lemnas frescas, espalhando-as em 0,5 L de meio de cultura. Essa quantidade foi o

suficiente para preencher a área da superfície líquida dentro do FBR de forma que as lemnas não se sobrepusessem, possibilitando que todas ficassem expostas a luz e a condições de crescimento semelhantes. Esse peso fresco (7 g) foi determinado para promover uma densidade ideal de lemnas entre 400 e 600 g.m², com base no peso fresco (SKILLICORN, SPIRA, JOURNEY, 1993; CHENG et al., 2002).

Para iniciar o experimento, foi necessário aplicar manualmente a quantidade de CO₂ calculada com uma seringa dentro das câmaras de crescimento, a fim de atingir a concentração requerida para cada trio de potes. Para isso, foi realizada a calibração da seringa com o medidor da concentração de CO₂, através da comparação dos cálculos de quantidade de gás com as concentrações marcadas no medidor.

4.4.3 Avaliação da produtividade da biomassa de lemnas

A produtividade da biomassa de lemnas é avaliada conforme a velocidade de crescimento da mesma, podendo resultar em uma valorização da tecnologia desenvolvida devido a eficácia na produção. Segundo Mohedano (2010), esta é a fase que merece extrema atenção e rigor na metodologia, pois a produção de biomassa é o principal indicador do tratamento avaliado. Há três maneiras de se quantificar o crescimento das lemnas, através do: peso seco (1); peso úmido (2); e número de frondes (3). As velocidades de crescimento mais utilizadas na bibliografia se baseiam no peso seco, apontando este como o modo mais confiável para avaliar um aumento de biomassa. O fato de as lemnas serem plantas aquáticas faz com que o seu peso úmido (ou fresco) possua uma umidade elevada, de 90% a 95%, podendo conferir certa imprecisão aos dados devido a essa variação. Já a contagem do número de frondes é uma medida descartada para o presente estudo, pois é uma forma mais aplicada a experimentos que desenvolvam pequenas populações de lemnáceas. Por exemplo, a área ocupada pelas lemnas neste experimento (165 cm²) pode conter de 2.500 a 3.000 frondes, sendo inviável devido à lentidão do processo.

A única dificuldade encontrada na utilização do peso seco como parâmetro no cálculo das velocidades de crescimento é a impossibilidade de obtê-lo no início do experimento. Ou seja, a biomassa inoculada no primeiro dia de ensaio permite efetuar somente o peso úmido, visto que a secagem ocasionaria a morte desses organismos, enquanto que, ao fim do sétimo dia de ensaio, é possível obter o peso úmido e seco da biomassa.

O crescimento específico (CE) é uma maneira direta de perceber a reprodução dos clones de lemnas, porém permite avaliar apenas de modo mais particular para cada estudo. Dessa forma, também se avaliou a Velocidade de Crescimento relativo (VCR) e a Velocidade de Crescimento específico (VCE), a fim de comparar os resultados com bibliografias. A VCE se destaca para representação do crescimento devido à configuração em bancada do experimento, no qual a quantidade de lemnas aumenta exponencialmente sem a retirada do excesso de biomassa. Sendo assim, utilizaram-se as Equações 3 a 5 para descrever o crescimento e sua velocidade.

$$\text{CE} = \mathbf{p1} - \mathbf{p0} \quad (3)$$

$$\text{VCR} = \frac{(\mathbf{p1} - \mathbf{p0})/\mathbf{N}}{\mathbf{A}} \quad (4)$$

$$\text{VCE} = \frac{\ln(\mathbf{p1}) - \ln(\mathbf{p0})}{\Delta t} \quad (5)$$

Onde:

CE = Crescimento Específico (g)

p0 = Peso inicial (g)

p1 = peso final (g)

N = duração do ensaio (dias)

VCR = Velocidade de crescimento relativo ($\text{g} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{dia}^{-1}$)

VCE = Velocidade de crescimento específico ($\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$)

$\Delta t = t1 - t0 =$ variação temporal (dias)

4.4.4 Fotoperíodo

Como a lemnas necessitam de luz somente durante um período do dia, as lâmpadas foram conectadas a um temporizador para controlar o fotoperíodo em 14 h/10 h (luz/escuro). Algumas bibliografias constam o uso de um fotoperíodo maior, de 16 h/8 h, porém devido questões de logística do experimento e um aparente estresse da planta exposta por longos períodos de iluminação artificial, optou-se por executar 14 h/10 h. O objetivo foi simular uma iluminação natural do dia, estimulando a fotossíntese, assim como um período de escuridão, promovendo uma respiração adequada às lemnas.

4.4.5 Temperatura

A temperatura definida para manter-se constante nos FBRs neste trabalho foi de $24\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. Este valor é utilizado pelos testes de toxicidade previstos na ISO 20079 (2005). A norma afirma que a temperatura deve se manter ao longo do período experimental, permitindo um desvio inferior a $\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ em todos os recipientes. Além disso, a mesma recomenda um controle contínuo deste parâmetro.

A temperatura foi aferida em intervalos de aproximadamente 4 h durante o fotoperíodo (claro) ao longo dos 21 dias referentes aos três ensaios. A verificação para observar a manutenção deste parâmetro dentro de uma faixa apropriada para o desenvolvimento das lemnas foi realizada com um termômetro no interior das câmaras.

O artifício para manutenção da temperatura escolhido foi a presença de um ar condicionado na sala de manipulação. Tal estratégia foi adotada no período de adaptação, onde se estabeleceu uma temperatura ambiente em torno de $18\text{ }^{\circ}\text{C}$ na sala para que a temperatura no experimento fosse mantida a $24\text{ }^{\circ}\text{C}$; visto que as lâmpadas aquecem a região próxima às câmaras.

4.5 MONITORAMENTO

4.5.1 Fase gasosa

A fim de buscar uma concentração em níveis constantemente acima de 6.000 ppm, houve a adição esporádica e manual de gás nos três FBRs ao longo do período luminoso. À medida que as lemnas no interior desses FBRs foram consumindo o CO_2 , percebido através da queda da concentração lida em equipamento, foi feita a aplicação da quantidade necessária para reestabelecer valores elevados novamente.

A lemna necessita de uma massa de gás aplicada diariamente para permitir seu crescimento. Portanto, esse parâmetro norteou os cálculos, a fim de balancear o número de aplicações de gás com a concentração estabelecida.

No presente experimento, supôs-se que as lemnas apresentariam uma Velocidade de Crescimento Relativo (VCR) ideal de $20\text{ g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{dia}^{-1}$. O estabelecimento desse valor teve o intuito de não limitar o crescimento elevado através da fotossíntese. A partir dessa velocidade, pode-se inferir que as lemnas possuiriam 0,13 g de Carbono (C) em sua estrutura, conhecendo a área superficial ocupada no FBR e sabendo que

as mesmas possuem cerca de 40% de C em sua composição. Como o CO₂ atmosférico é a fonte de Carbono para as lemnas, fez-se uma proporção estequiométrica, onde seria necessário 0,48 g deste gás para permitir tal crescimento ideal. Dessa forma, utilizou-se a equação de Clapeyron (Equação 6) para calcular o volume referente à massa de 1 mol de CO₂ e fez-se uma proporcionalidade com a massa obtida anteriormente para determinar o volume de gás necessário (com base na temperatura média de cada exnsaio), resultando, em média, 335 mL de CO₂ aplicado por dia.

$$P \cdot V = n \cdot R \cdot T \quad (6)$$

Onde:

P = pressão (atm);

V = volume do gás (L);

n = n° de mols do gás;

R = constante universal dos gases perfeitos (0,082 atm.L/mol.K);

T = temperatura absoluta (K).

A aplicação desse volume de gás em relação ao volume do FBR (mL/m³) determina a concentração necessária, cujo valor resultou em torno de 105.000 ppm (0,1%) diariamente. Contudo, ao invés de efetuar uma única aplicação com esta concentração, preferiu-se manter a concentração em um valor menor, porém mais constante ao longo do período luminoso. Sendo assim, adotou-se manter 20.000 ppm nos FBRs, com aplicações de gás em torno de 5 vezes por dia, efetuadas em um intervalo aproximado de 3 h. O volume adicionado para alcançar a concentração adotada é multiplicado por um fator para compensar a diluição da fonte de CO₂, resultando em aproximadamente 65 mL por aplicação.

A Tabela 4 apresenta os parâmetros de cálculo reunidos, com destaque para o resultado da quantidade de CO₂ necessária para ser aplicada diariamente.

Tabela 4 – Parâmetros para determinar detalhes do monitoramento da fase gasosa.

Parâmetros	Valores
VCR ideal (g.m ⁻² .dia ⁻¹)	20
Área superficial (m ²)	0,0165
Velocidade de crescimento (g.dia ⁻¹)	0,33

Proporção C na lenna (%)	40
Massa de C na lenna (g)	0,13
CO₂ necessário aplicar por dia (g)	0,48
Massa de 1 mol de CO ₂ (g)	44
Equação de Clapeyron-Volume (L)	24,8
CO ₂ necessário (mL)	272,6
Volume FBR (m ³)	2,6. 10 ⁻³
[CO ₂] diária aplicada (ppm)	104.854
[CO ₂] adotada inicial (ppm)	20.000
Fator de diluição - saco Tedlar	1,23
Volume aplicado pela seringa (mL)	64
Nº aplicação por dia com a seringa	5
Volume aplicado/dia (mL)	341
Tempo de luz (h)	14
Intervalo de medição (h)	2,7

Fonte: Autor.

As medições da concentração desse gás foram realizadas antes e após cada aplicação de CO₂, utilizando o equipamento Testo 435-4 no Ensaio 1 e GEMTM 5000 nos Ensaio 2 e 3. A troca de equipamento foi devido à danificação do primeiro, no intervalo entre um ensaio e outro.

O intervalo de medição do equipamento da Testo abrange de 0 a 10.000 ppm (com precisão de 1 ppm), enquanto que o equipamento GEMTM 5000 compreende de 0,0 a 100,0% (com precisão de 0,1%). Sabendo que 10.000 ppm corresponde à 1%, a precisão do equipamento Testo 435-4 é 1.000 vezes maior do que o GEMTM 5000, porém como o objetivo deste estudo não é manter a concentração elevada em um valor exato, e sim acima de 6.000 ppm, o uso deste equipamento foi coerente.

O equipamento Testo 435-4 possui uma sonda para avaliar a Qualidade do Ar Interior (QAI), com diferentes sensores para mensurar os multiparâmetros. No caso do teor de CO₂, a sonda utilizada é a infravermelha.

O equipamento GEMTM 5000 possui uma peculiaridade, pois para mensurar a concentração de uma amostra de gás, é necessário sugá-lo com uma vazão de 0,5 m³/s através de duas mangueiras e uma bomba interna. Dessa forma, o aparelho diminui a concentração do gás em um recipiente enclausurado, ao passo que o mede. Entretanto, essa sucção não prejudicou o experimento, pois se acrescentava a quantidade

complementar de gás para atingir a concentração desejada, lida no medidor. Assim como na sonda Testo, a leitura de dados é realizada por uma sonda infravermelha (termopar).

Aproximadamente 1 min antes de realizar tais medições, os coolers eram acionados para homogeneizar o volume de ar dentro da câmara de crescimento, desligando-o logo em seguida. Durante à noite, porém, esses homogeneizadores ficavam ativados para promover uma respiração melhor das lemnas, pois caso o CO_2 presente se acumulasse na superfície acima da planta, poderia dificultar a liberação do produto da fotossíntese pela mesma. A adoção desta ação foi intuitiva, pois no período de testes prévios, as lemnas adquiriam uma pigmentação amarelada de um dia para o outro.

4.5.2 Fase aquosa

O monitoramento da fase aquosa foi realizado no início e ao término de cada ensaio, ou seja, no primeiro e no sétimo dia de ensaio. Os parâmetros analisados nos dois momentos foram: pH, nitrato (NO_3^-) e fosfato (PO_4^{-3}).

No momento inicial, somente uma amostra foi coletada: a do meio de cultura recém-preparado para ser introduzido em todos os FBRs. Desse modo, tiveram apenas três amostras, referentes aos três ensaios realizados. Já após a conclusão de cada ensaio, os meios de cultura de todos os seis FBRs foram coletados para avaliação desses parâmetros, resultando em 18 amostras. Tais amostras do meio de cultura foram coletadas com o uso de peneira para separação entre biomassa e meio líquido, sendo filtradas e armazenadas em recipientes plásticos de 50 mL no congelador.

A aferição de nitrato de fosfato teve o objetivo de determinar a remoção de nutrientes, relacionando o consumo desses com o crescimento da biomassa de lemnas e possíveis fatores limitantes ao desenvolvimento dessa. Enquanto que a medição de pH verificou através do pHmetro se as elevadas aplicações de CO_2 interferiram na formação de íons e acidificou o meio aquoso.

As análises de NO_3^- e PO_4^{-3} foram realizadas pelo Kit de Nitrato e o Kit de Orthofosfato A/C, respectivamente, ambos da Alfacit. A análise de nitrato foi fundamentada no Método da Brucina, de acordo com descrito em *Organic Reagents for Trace Analysis* (MERCCK; 1977). Enquanto que, a análise de ortofosfato foi realizada conforme o Método do Ácido Ascórbico adaptado do *Standard Methods for the Examination*

of Water and Wastewater; 21ª edição de 2005, intitulado com o número 4500 E. 4-153.

4.5.3 Biomassa

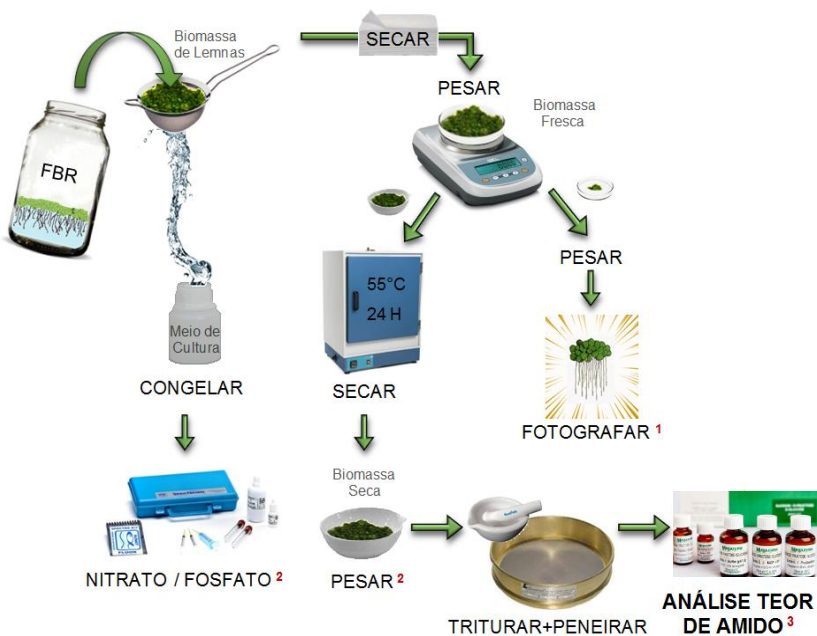
A avaliação qualitativa da biomassa de lemnas foi decorrente da análise do teor de amido na lemna e da morfologia e sanidade dessas plantas. Já a análise quantitativa observou as velocidades de crescimento e produtividade da biomassa de lemnas, como visto no item 4.4.3.

Ao término de cada ensaio, foi feita a pesagem da biomassa fresca de lemnas, retirando o excesso de água presente nesta através de uma peneira e papel toalha (deixando-a apenas úmida). Desta quantia fresca, pesada e anotada, separavam-se alguns exemplares de lemnas – 4 a 5 clones de cada FBR – para fotografar com escala (régua) e analisar em seguida as características morfológicas e fitossanitárias da planta. Em seguida, a biomassa era aquecida a 55 °C durante 24 h em estufa.

Após secas, pesa-se novamente a biomassa e só então se inicia o procedimento de análise de Amido Total (Kit) – descrita no Anexo A – sendo necessária a maceração desta biomassa seca. Essa análise consiste na introdução de enzimas que degradam o amido presente na amostra de lemnas secas e o transformam em glicose. Através da coloração da amostra, resultava-se em determinada absorbância, cujo valor era introduzido na fórmula para cálculo do teor de amido total. O kit forneceu uma amostra padrão, com teor de amido conhecido possibilitar uma conferência da análise.

Com a secagem, também é possível calcular a umidade dessa biomassa de macrófitas aquáticas. Determinar um valor mais preciso da umidade permite o conhecimento mais conciso da parcela seca de biomassa, embasando o cálculo das velocidades de crescimento que utilizam a biomassa seca. Nesse contexto, a Figura 14 esquematiza o que ocorre após o término de um ensaio de sete dias.

Figura 14 – Esquema metodologia término ensaio.



1: Análise da morfologia e sanidade das lemnas; 2: Análise da velocidade de crescimento; 3: Análise de acúmulo de amido nas lemnas.

Fonte: Autor.

4.5.3.1 Avaliação dos aspectos morfológicos e de sanidade da lemna

A sanidade das lemnas é diretamente proporcional com a eficiência do tratamento de efluentes e com a produtividade de biomassa, passível de valorização (bioetanol). Portanto, avaliar esse aspecto é essencial para fundamentar a tecnologia estudada.

Para determinar a sanidade vegetal, também é necessário observar as características morfológicas da planta, atentando para a forma das estruturas componentes. Em escala real, tal avaliação deve ser mais relevante, onde a observação e controle desses aspectos são determinantes no manejo e na obtenção de bons resultados.

A importância da avaliação morfológica da planta está no possível entendimento de níveis de estresse submetidos ao organismo, associados à superpopulação, às condições climáticas extremas, à toxicidade do meio, entre outros. Os indicadores avaliativos foram embasados nos utilizados por Mohedano (2010) e dividem-se em dois

grupos: nos aspectos gerais da população lemnácea; e nos aspectos dos indivíduos (amostra de clones de lemnas). A Tabela 5 dispõe desses aspectos indicadores.

Tabela 5 – Divisão proposta dos aspectos morfológicos e de sanidade da lemna.

Aspectos	
Gerais da população	Individuais
Mudança de cor na população	Comprimento das raízes
Espécies invasoras de plantas	Comprimento das frondes
Sobreposição elevada de lemnas	Cor das frondes
Clareiras na superfície líquida	Necrose
Arraste pela ventilação	Clorose

Fonte: Adaptado de Mohedano (2010).

4.5.3.1.1 Avaliação do aspecto geral da população de lemnas

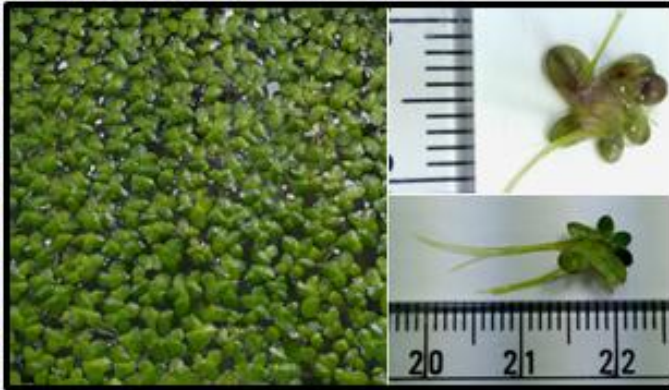
Para avaliar os aspectos gerais, foi necessário haver a observação na pigmentação das lemnas, com áreas manchadas destoando do resto da população como, por exemplo, as machas de pigmentação amarelada (clorose) e as machas com pigmentação esbranquiçada ou amarronzada (necrose).

Os aspectos gerais foram observados e fotografados ao longo do ensaio, com anotações sobre a aparência macroscópica da população de lemnas. Na análise das características gerais procurou-se relacionar as diferenças entre as populações expostas a concentrações elevadas e atmosféricas de CO₂, bem como foi necessário relacionar com os resultados de acúmulo de amido, a fim de encontrar um padrão nas lemnas submetidas a presente tecnologia. Caso um padrão for encontrado, o mesmo pode permitir um discernimento melhor do andamento de trabalhos futuros.

A tabela de tonalidades deve possuir uma coloração padrão, obtida a partir de lemnas saudáveis que não foram expostas à tecnologia, isto é, referente às lemnas cultivadas durante o período de adaptação (pré-cultura). Nesse período, as macrófitas receberam iluminação natural da luz solar e, mais próximo ao início do Ensaio 1, cultivou-as já em meio de cultura *Swedish Institute Standard*, presente na ISO 20079 (2005). Dessa forma, os clones-padrão obtiveram fonte de nutrientes equivalente à testada no estudo, visto que o meio de cultura foi o mesmo utilizado nos três ensaios decorrentes.

A coloração das lemnas consideradas como padrão neste estudo se assimilaram com o padrão definido no trabalho de Mohedano (2010), utilizando-se, portanto, a mesma cor padrão. As lemnas cultivadas como padrão no presente estudo estão ilustradas na Figura 15.

Figura 15 – Coloração das lemnas consideradas como padrão de sanidade e morfologia.



Fonte: Autor.

As tonalidades foram colocadas em sequência gradual, em relação à cor padronizada de sanidade. Esses tons foram criados de forma a retratar os principais estados das lemnas, onde as plantas com aparência verde mais escuro representam as mais saudáveis e as plantas com coloração mais clara demonstram maior senescência.

Ao analisar a fotografia apenas de um clone, torna-se limitado dizer que aquela coloração representou a tonalidade de toda a biomassa presente no FBR. Portanto, além da análise individual, neste caso, também se observou as fotografias da área superficial total de cada FBR. Nessa situação, a escolha da cor (condizente entre escala e imagem) é realizada de acordo com a predominância do tom na referida fotografia.

Segundo Mohedano (2010), a determinação dos tons de cores foi feita através do uso do *software* Corel Draw, cujo sistema RGB (*Red, Green, Blue*) pôde formar as cores pela composição de vermelho, verde e azul, em diferentes proporções. Essa proporção se obteve por meio de uma escala numérica de 0 a 255, onde, de acordo com o número, dosou-se a quantidade de cor no tom final.

Ainda conforme a metodologia criada pelo autor, a imagem referente às frondes das lemnas deve passar por um tratamento com acréscimo de 80% de contraste e, posteriormente, ter seus pixels

comparados com a escala, criada com 8 tons, de acordo com a Tabela 6. A utilização da mesma escala de cores de Mohedano (2010) se deu a fim de uniformizar uma metodologia para análise de cor relacionada à morfologia e sanidade da planta.

Tabela 6 – Escala de cores (RGB) ordenada numericamente de acordo com o estado de sanidade das lemnas.

	1	2	3	4	5	6	7	8
R	32	82	131	172	221	248	255	216
G	108	135	180	185	238	214	255	216
B	22	11	8	3	4	8	255	216

Fonte: Mohedano (2010).

Mohedano (2010) definiu que as cores de 1 a 5 representam as lemnas verdes; a 6 se refere às frondes amareladas; enquanto que as de 7 a 8 figuram as lemnas brancas ou com fungos. Dessa forma, determinou cinco estados de sanidade: ótimo, bom, regular, ruim e frondes mortas, conforme a Tabela 7.

Tabela 7 – Correlação entre estado de sanidade, numeração e cor.

Estado de Sanidade	Número da Cor	Escala de Cores	
Ótimo	1 e 2	1	2
Bom	3	3	
Regular	4 e 5	4	5
Ruim	6	6	
Mortas	7 e 8	7	8

Fonte: Mohedano (2010).

4.5.3.1.2 Avaliação do aspecto de plantas individuais (clones)

Na avaliação individual, o enfoque na morfologia da lemna foi maior do que no aspecto geral da população, sendo realizada uma análise biométrica das partes componentes dos clones de lemnas de cada fotobiorreator.

Nessa situação, 4 a 5 amostras de lemnas de cada FBR foram fotografadas, atentando-se para a presença de escala na foto – através de uma régua – para permitir a posterior medição dos comprimentos da raiz e fronde dos exemplares amostrados. Para isso, utilizou-se o software

Screen Caliper® (paquímetro virtual) para facilitar a medição das estruturas visíveis da lemna.

Como a área superficial ocupada pelas lemnas nos FBRs é relativamente pequena, comparado às lagoas em escala real e piloto, a totalidade dessa área pôde ser analisada quanto à tonalidade da fronde. Dessa forma, apenas foi verificado se a amostragem individual representava a coloração da população presente no FBR, não necessitando uma análise em separado.

4.6 EQUIPAMENTOS E MÉTODOS

Os parâmetros físico-químicos são fundamentos para constatar características relevantes, tanto qualitativas quanto quantitativas do meio de cultura e da biomassa de lemnas. A Tabela 8 compila os equipamentos e métodos utilizados em cada parâmetro analisado no presente trabalho.

A principal análise realizada foi a de quantificação do teor de amido na biomassa lemnácea, essencial para a comprovação da hipótese do trabalho. O Kit de Amido é o mesmo utilizado pela maioria das bibliografias encontradas.

Tabela 8 – Parâmetros e metodologia.

Parâmetro	Equipamento ou Método
pH	pHmetro.
Temperatura	Testo 435-4 - Instrumento de medição multifunções; Termômetro de mercúrio.
Morfologia e sanidade	Fotografia e escala de cores (RBG), com tratamento da imagem (contraste 80%).
Intensidade de luz	Testo 545 - Luxímetro.
Concentração de CO ₂	Testo 435-4 - Instrumento de medição multifunções; GEM™ 5000 (LANDTEC) - Instrumento de medição de concentração de gases.
Teor de Amido	Kit de Amido Total (Megazyme).
Fosfato (PO ₄ ⁻³)	Kit de Orthofosfato – Alfakit.
Nitrato (NO ₃ ⁻)	Kit de Nitrato – Alfakit.
Taxa de crescimento	Estufa de esterilização e secagem com renovação/circulação de ar (24 h; 55 °C).

Fonte: Autor.

4.7 ANÁLISE E TRATAMENTO DOS DADOS

Os resultados foram analisados a partir da organização dos dados em formato de gráficos e tabelas, obtidos pelo uso do programa Excel 2007 (Microsoft). Análises estatísticas de comprovação da hipótese do trabalho foram realizadas através do *software* SESTATNET®.

As informações estatísticas de teste de hipóteses devem ser apresentadas de forma estruturada no *software*, seguindo um movimento de transposição da área estatística para a realidade pesquisada. O nível de significância (α) adotado foi de 0,05, sendo determinado um conjunto de hipóteses H0 e H1 para cada teste estatístico aplicado.

O teste de hipótese foi aplicado para determinar a relação das categorias qualitativas: exposição a concentração atmosférica de CO₂ e exposição a concentrações elevadas de CO₂ (A e B, respectivamente) com as variáveis quantitativas de: teor de amido; velocidade de crescimento; características do meio de cultura (pH, concentração de nitrato e de fosfato); e temperatura.

Primeiramente, realizou-se o Teste Qui-quadrado de aderência à distribuição normal dos valores quantitativos correspondentes às duas categorias da variável qualitativa. Quando a variável quantitativa não atende às restrições de normalidade, utiliza-se o teste U de Mann Whitney, a fim de analisar a relação entre duas variáveis; qualitativa (QL) e quantitativa (QT). Em caso de confirmação de aderência à curva normal, aplica-se o teste T de Student.

Ressalta-se que o teste U de Mann Whitney também é utilizado como alternativa ao teste T de Student. Nesse caso, o valor numérico é desprezado e trabalha-se com a ordem ou posto das variáveis.

A aplicação do teste T de Student possui duas ramificações, dependendo da presença ou não de homocedasticidade entre as distribuições, isto é, da semelhança ou distinção das variâncias. A verificação se dá pelo Teste de Levene. Em caso de confirmação da homocedasticidade, utiliza-se o teste T de Student com variância agregada; caso contrário, aplica-se apenas sua fórmula geral.

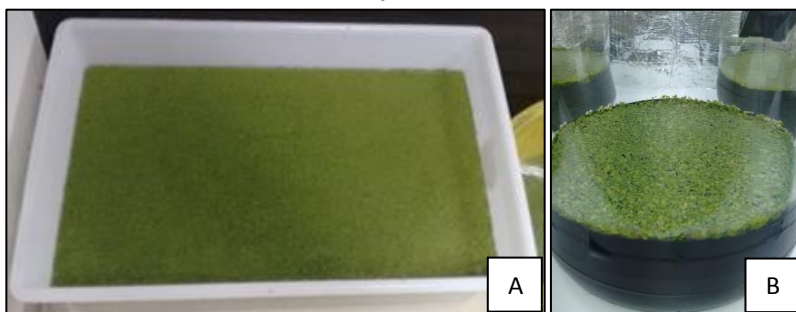
Nesses testes, se obtém a probabilidade de significância (pvalor), a qual é comparada com o nível de significância (α) para decidir estatisticamente a hipótese H0 ou H1. Assim, com base na diferença entre as médias, é possível determinar a presença (H1) ou ausência (H0) de associação entre as variáveis.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 MONITORAMENTO DA PRÉ-CULTURA

Ao transferir a biomassa lemnácea da cultura estoque para a pré-cultura (iluminação natural para artificial), ambas ilustradas na Figura 16, observou-se um crescimento com velocidade menor. De acordo com Cross (2006), esse curto período cujo crescimento é inferior deve-se às adaptações metabólicas da lemna. O tempo para adaptação foi testado antes de se iniciarem os ensaios, nos quais se concluiu que cinco dias seriam necessários para que as lemnáceas retornassem a ter um crescimento normalizado.

Figura 16 – Cultura estoque, com iluminação natural, e pré-cultura, com iluminação artificial.



A) cultura estoque; B) pré-cultura.

A troca do meio líquido, de uma solução com 1g.L^{-1} de NPK (30:10:10) para o meio de cultura, preparado como o original descrito na ISO 20079 (2005), resultou em um aumento nítido no tamanho das raízes (de 1,0 cm para 3,5 cm em média). Tal mudança indicou uma necessidade de incremento de nutrientes no meio de cultura para um crescimento ideal, sendo um dos motivos para a adaptação dos valores da norma.

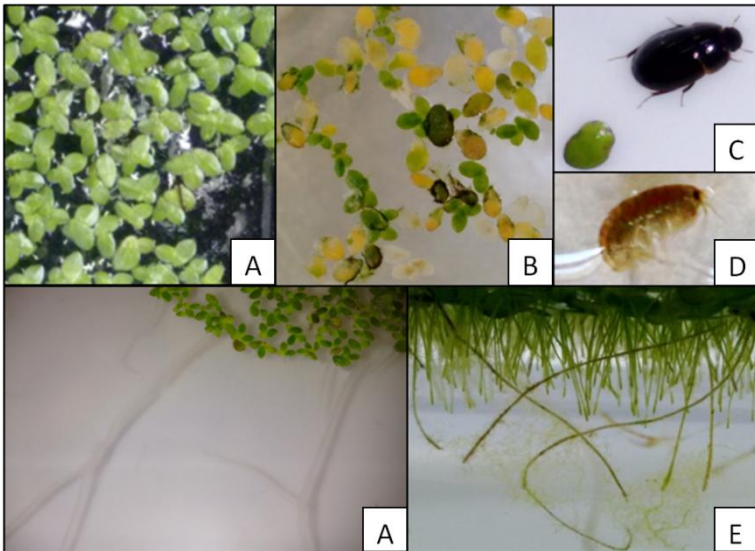
Por vezes, a pré-cultura demonstrou alterações negativas nas características fitossanitárias das lemnas. Nesse caso, as macrófitas apresentavam coloração amarelada (cloroses) pela simples mudança do cultivo estoque natural para o artificial. Acredita-se que o estresse provocado por mantê-las em recipientes abafados foi determinante para essas características prejudiciais na sanidade. Os recipientes, por possuírem a altura quase o dobro do diâmetro (1,9 vezes), foram capazes

de armazenar o ar por mais tempo no seu interior, o qual recebia os raios de luz provenientes das lâmpadas e aquecia mais que o ar externo.

Uma cultura estoque de lemnas, cultivada com iluminação natural, foi mantida como reserva durante todo o ensaio. No cultivo estoque, assim como no período de aclimatação dessas com a luz artificial, observou-se a presença intensa de algas, cujo desenvolvimento prejudicou nitidamente a saúde e o crescimento das lemnas (Figura 17, letra E). Para solucionar esse problema, primeiramente cobriu-se com fita preta a lateral e fundo onde a lâmina líquida ficava exposta à luz, a fim de inibir a fotossíntese das algas. Não resolvendo com essa medida paliativa, aplicou-se algicida junto no meio de cultura das lemnas, observando uma melhora expressiva após isto.

Em alguns períodos registrou-se a ocorrência de fungos nessas culturas (Figura 17, letra A). Ademais, notou-se um biofilme aderido nas raízes e frondes das macrófitas da cultura estoque, ilustrado na Figura 17 (letra B). Esse biofilme pode ser decorrente da morte de lemas do mesmo recipiente de cultivo. O mesmo se fixa nas raízes principalmente devido à sua finura e à densidade das raízes juntas, as quais fornecem uma alta superfície de contato.

Figura 17 – Generalidades observadas da cultura estoque e pré-cultura.



A) fungos; B) biofilme; C) inseto; D) crustáceo; E) algas.

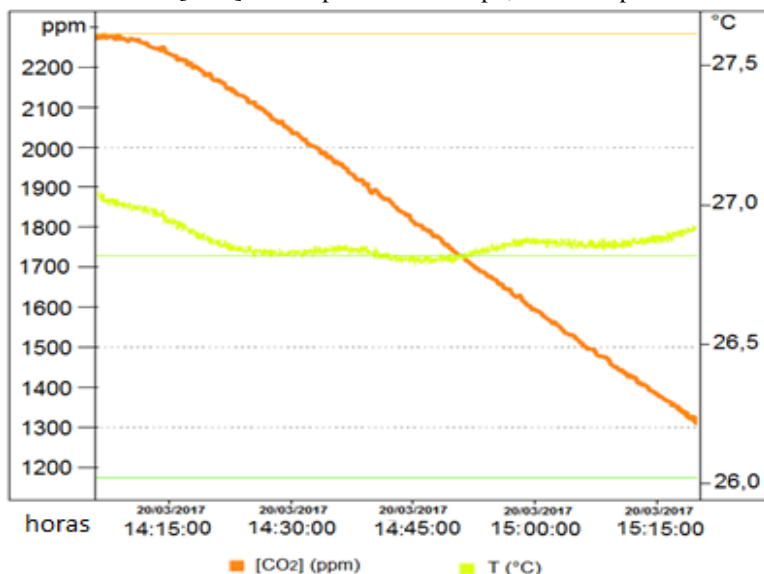
A Figura 17 reúne algumas das ocorrências relatadas na cultura estoque e pré-cultura, como a coexistência das lemnas e outros organismos (helmintos, insetos (C), crustáceos (D), fungos e algas).

5.1.1 Testes preliminares de CO₂ na pré-cultura

O decaimento da concentração do gás carbônico no interior do FBR foi analisado objetivando efetuar um reconhecimento do intervalo aproximado entre as aplicações de CO₂. Desse modo, aplicou-se concentrações elevadas, não necessariamente superiores a 6.000 ppm, para observar seu decaimento ao longo do tempo.

O decaimento de CO₂ foi descrito por Mohedano (2010) em fotobiorreatores de 24,75 L com 4 L de meio de cultura. Nessa descrição, a concentração de 6.000 ppm apresentou uma queda brusca para 4.000 ppm a partir das 36 h e a concentração de 400 ppm decaiu para 200 ppm em 24 h. Nota-se que houve um decaimento mais acentuado em um intervalo de tempo menor do que Mohedano (2010), conforme o exemplo demonstrado no gráfico da Figura 18, gerado pelo medidor Testo 435-4 com os dados deste estudo.

Figura 18 – Gráfico produzido pelo equipamento da Testo, mostrando o decaimento de [CO₂] e a temperatura no tempo, em testes preliminares.



Fonte: Testo 435-4 (2017).

Nesse gráfico (Figura 18), há um decréscimo de 1.000 ppm (de 2.300 ppm para 1.300 ppm) em pouco mais de 1 h. A partir dessas medições do decaimento, constatou-se que manter concentrações abaixo de 6.000 ppm implicaria em um intervalo de tempo expressivamente curto entre uma aplicação e outra (menos que 2 h), dificultando a manutenção da concentração do gás e a operação do sistema. Tais testes corroboram com a escolha da concentração limite de 6.000 ppm.

5.2 AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

5.2.1 Luminosidade

A intensidade de luz referente ao período luminoso dos três ensaios foi constante no tempo, porém diferenciada no espaço. Desse modo, compreendeu entre 90 e 123 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, isto é, apresentou valores contidos no intervalo indicado pela norma ISO 20079 (2005) (entre 85 e 135 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Os resultados das medições desse parâmetro de acordo com a posição de cada FBR na estrutura experimental estão representados a Tabela 9.

Tabela 9 – Luminosidade durante os três ensaios para cada FBR.

Condição	FBR	Intensidade de Luz ($\mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)	Média Intensidade de Luz ($\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)
A – [CO ₂] atmosférica	1	118,95	105,3 (± 13,1)
	3	104,26	
	5	92,71	
B – [CO ₂] elevada	2	106,08	106,4 (±16,3)
	4	122,85	
	6	90,28	

Ao analisarem-se as médias de intensidade luminosa para os FBRs expostos às condições A e B, é possível notar que ambas são semelhantes. Isso indica que, em média, a condição B não apresentou vantagem na iluminação em relação à condição A. caso sejam analisados os FBRs de forma individualizada, podem-se relacionar as diferentes intensidades de luz com a fotossíntese e o crescimento da biomassa de lemnas; com uma relação diretamente proporcional entre esses.

No trabalho de Yin e colaboradores (2015), foram testadas diferentes intensidades luminosas no cultivo da *Lemna aequinoctialis*, obtendo melhor resultado concomitante para acúmulo de amido e velocidade de crescimento da planta sob uma intensidade de luz de $110 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$; valor próximo ao das médias observadas.

Li et al. (2016) fez um experimento similar ao testar diferentes intensidades de luz para diversas espécies, resultando em velocidade de crescimento e teor de amido mais elevados em conjunto para espécie *Landoltia punctata* em uma luminosidade de $105 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

5.2.2 Temperatura do ar

A temperatura dos três ensaios foi mantida entre $29,0^\circ\text{C}$ a $32,2^\circ\text{C}$ ($\pm 1,0^\circ\text{C}$), diferente da proposta pela ISO 20079 (2005), de $24^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$. A variação da temperatura em escala piloto ou escala real seria natural, sendo assim, neste experimento, a mesma significou uma condição mais real para aplicação da técnica de enriquecimento de CO_2 , embora devesse se manter o mais constante possível.

Essa variação poderia ter interferido na avaliação dos efeitos do CO_2 , visto que a temperatura influencia no volume do gás no interior dos FBRs e, conseqüentemente, interfere na concentração necessária a ser aplicada de CO_2 em cada FBR. Entretanto, ressalta-se que, mesmo que tenha influenciado no volume aplicado, a concentração se manteve em valores consideravelmente mais elevados que o necessário, portanto, permitindo ainda a avaliação do objetivo deste estudo.

É importante salientar que esse parâmetro não ultrapassou 35°C , valor que começaria a ser prejudicial ao processo fotossintético e ao crescimento das lemnas, conforme explica Prism (1990). Iqbal (1999) apresenta temperaturas entre 25°C e 32°C como capazes de propiciar uma velocidade de crescimento adequada para maioria das espécies de lemnas. Nesse contexto, o experimento apresentou, em média, um intervalo de temperatura condizente com esse intervalo ideal.

Analisando estatisticamente os valores referentes às temperaturas dos FBRs nos dois níveis de concentração, constatou-se não haver diferença significativa entre ambos ($p\text{-valor} > \alpha$). Em outras palavras, a temperatura foi similar entre os FBRs variando igualmente ao longo do tempo.

Na Tabela 10 se encontram as médias de temperatura para as duas condições de CO_2 analisadas, realizando-se a média das triplicatas dos FBRs 1, 3 e 5 – $[\text{CO}_2]$ atmosférica – e 2, 4 e 6 – $[\text{CO}_2]$ elevada.

Tabela 10 – Médias diárias de temperatura para condições atmosféricas e elevadas de [CO₂].

Ensaio	[CO ₂]	T (°C)
1	atmosférica	-
	elevada	32,2
2	atmosférica	28,5
	elevada	29,2
3	atmosférica	29,0
	elevada	29,0
Média	atmosférica	29,8
	elevada	29,1

Infere-se da Tabela 10 que as temperaturas médias nas duas condições foram semelhantes. No experimento 1, não foi observada a temperatura dos FBRs nas condições atmosféricas (1, 3 e 5). As médias diárias de temperatura durante os 7 dias (ou 168 h) de cada experimento estão expressas no Apêndice A.

Analisando estatisticamente os valores referentes às temperaturas dos FBRs nos dois níveis de concentração, constatou-se não haver diferença significativa entre ambos ($p\text{-valor} > \alpha$). Em outras palavras, a temperatura foi similar entre os FBRs, variando igualmente no tempo.

5.3 MONITORAMENTO DA FASE GASOSA DO EXPERIMENTO

5.3.1 Comportamento do CO₂ nos fotobiorreatores

A proposta do presente trabalho foi manter todos os parâmetros que influenciam a fotossíntese e o crescimento da planta; variando apenas as concentrações aplicadas de gás carbônico. Essa variação seria feita somente através da escolha de duas concentrações distintas (uma elevada e outra padrão) que deveriam ser mantidas constantes ao longo do tempo. Atualmente, já existem equipamentos que permitem a manutenção do CO₂ ao longo do tempo, com a reposição proporcional deste conforme o seu declínio (consumo pelas plantas). Entretanto, como não foi possível obter equipamentos com tal tecnologia, essa manutenção ao longo do tempo tornou-se uma prática difícil. Porém,

essa variação não prejudicou a implantação da tecnologia de enriquecimento de CO_2 estudada neste trabalho.

O comportamento do CO_2 foi monitorado nos seis FBRs por meio de medições com intervalo de 2 h a 4 h, sendo mantido em três FBRs acima de 6.000 ppm através de aplicações de gás nesses mesmos intervalos de tempo. Conforme o passar dos 7 dias ou 168 horas, o CO_2 foi consumido pelas lenhas e reintroduzido no FBR, repetidamente, conforme demonstrado na Figura 19, na Figura 20 e na Figura 21, referentes aos experimentos 1, 2 e 3, respectivamente.

Figura 19 – Valores das concentrações elevadas de CO_2 ao longo do tempo no Experimento 1.

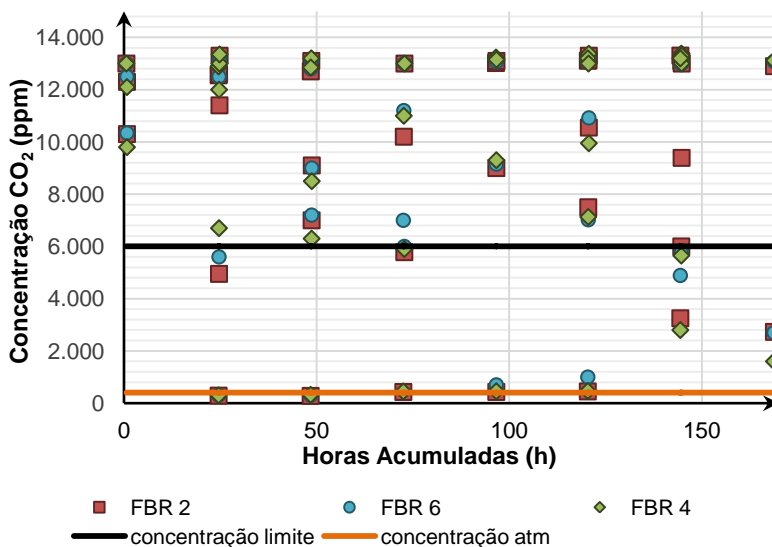


Figura 20 – Valores das concentrações elevadas de CO₂ ao longo do tempo no Experimento 2.

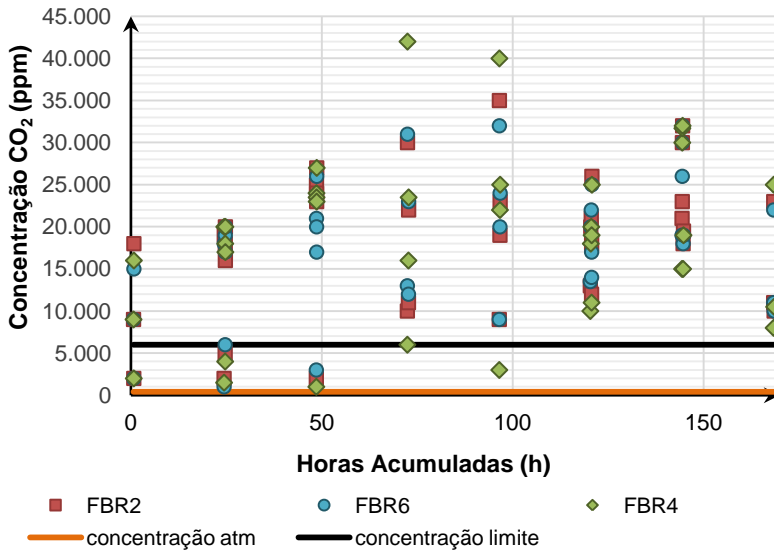
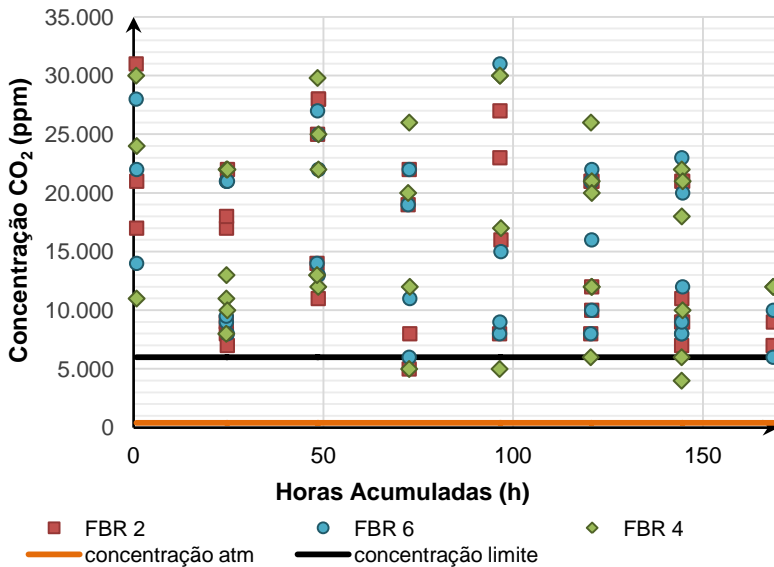


Figura 21 – Valores das concentrações elevadas de CO₂ ao longo do tempo no Experimento 3.



De acordo com os gráficos da Figura 19, da Figura 20 e da Figura 21, as concentrações de CO₂ aplicadas, principalmente nos experimentos 2 e 3, variaram significativamente no tempo quando comparada à bibliografia, na qual não se relata variações na concentração testada. No experimento 3, por exemplo, a mesma variou de 6.000 a 40.000 ppm.

Nesses gráficos, há uma linha representando a concentração média atmosférica de CO₂ (400 ppm), cujo valor se refere aos FBRs padrões 1, 3 e 5, visto que não houve variações significativas (devido a uma pequena abertura nas tampas). Por sua vez, existe outra linha que representa a concentração mínima de CO₂ mantida nos FBRs 2, 4 e 6, com o valor determinado nos experimentos de 6.000 ppm. Assim, o intuito foi manter a concentração desses três FBRs sempre em uma faixa acima desse valor, sem limite máximo estabelecido.

Nota-se que em breves momentos não foi respeitada a manutenção da concentração em valores acima do limite inferior de 6.000 ppm. Todavia, tal fato pode aproximar o ensaio de condições mais reais, como na proposta de aplicação de CO₂ pela técnica de *Free Air Carbon Enrichment*. Assim, caso a fonte desse gás fosse um biodigestor – que libera CO₂ diretamente e/ou pela queima do CH₄ – a produção do mesmo pode não ser constante (carga variável), bem como a ação dos ventos pode ocasionar variações significativas na concentração disponibilizada.

A partir do gráfico da Figura 19, pode-se observar que houve mais quedas nos valores de concentração elevada durante o Experimento 1. Em cinco momentos a concentração de CO₂ chegou a se equiparar à atmosférica. Todos foram registrados no início do fotoperíodo de cada dia e, imediatamente, a concentração elevada era reestabelecida. Portanto, em termos de horas, os períodos em que a concentração se manteve abaixo do limite inferior foram insignificantes em relação ao tempo em que ficou com valores adequados.

5.4 EFEITOS DE ELEVADAS CONCENTRAÇÕES DE CO₂ SOBRE AS LEMNAS

5.4.1 Efeitos sobre a velocidade de crescimento das lemnas

Para comprovar os efeitos da aplicação extra de CO₂, foi realizado um comparativo entre as velocidades de crescimento referentes às triplicatas de FBR expostos à concentração atmosférica (situação A) e as velocidades de crescimento referentes aos FBRs

expostos a elevadas concentrações (situação B) nos três experimentos. Os resultados das velocidades de crescimento para cada FBR estão dispostos na Tabela 11, na Tabela 12 e na Tabela 13, para os experimentos 1, 2 e 3, respectivamente. Nota-se que diferentes letras (^a ou ^b) na mesma coluna denotam diferenças significativas de acordo com o teste estatístico (SESTAT).

Tabela 11 – Resultado de crescimento das lemnas no Experimento 1.

Experimento 1	FBR	CE (g)	VCR (g.m ⁻² .dia ⁻¹)	VCE (g.g ⁻¹ .dia ⁻¹)
A	1	2,5 ^a	2,1 ^a	0,04 ^a
[CO₂]	3	3,6 ^a	3,2 ^a	0,06 ^a
atm	5	3,9 ^a	3,3 ^a	0,06 ^a
B	2	9,5 ^b	8,2 ^b	0,12 ^b
[CO₂]	4	12,4 ^b	10,7 ^b	0,15 ^b
elevada	6	9,2 ^b	8,0 ^b	0,12 ^b

FBR: Fotobiorreator; CE: Crescimento específico; VCR: Velocidade de Crescimento Relativo; VCE: Velocidade de Crescimento Específico.

Tabela 12 – Resultado de crescimento das lemnas no Experimento 2.

Experimento 2	FBR	CE (g)	VCR (g.m ⁻² .dia ⁻¹)	VCE (g.g ⁻¹ .dia ⁻¹)
A	1	7,1 ^a	6,2 ^a	0,10 ^a
[CO₂]	3	4,5 ^a	3,9 ^a	0,07 ^a
atm	5	5,0 ^a	4,3 ^a	0,08 ^a
B	2	10,8 ^b	9,3 ^b	0,13 ^b
[CO₂]	4	13,2 ^b	11,4 ^b	0,15 ^b
elevada	6	12,7 ^b	11,0 ^b	0,15 ^b

FBR: Fotobiorreator; CE: Crescimento específico; VCR: Velocidade de Crescimento Relativo; VCE: Velocidade de Crescimento Específico.

Tabela 13 – Resultado de crescimento das lemnas no Experimento 3.

Experimento 3	FBR	CE (g)	VCR (g.m ⁻² .dia ⁻¹)	VCE (g.g ⁻¹ .dia ⁻¹)
A	1	1,8 ^a	1,6 ^a	0,03 ^a
[CO₂]	3	1,9 ^a	1,6 ^a	0,03 ^a
atm	5	1,1 ^a	0,9 ^a	0,02 ^a

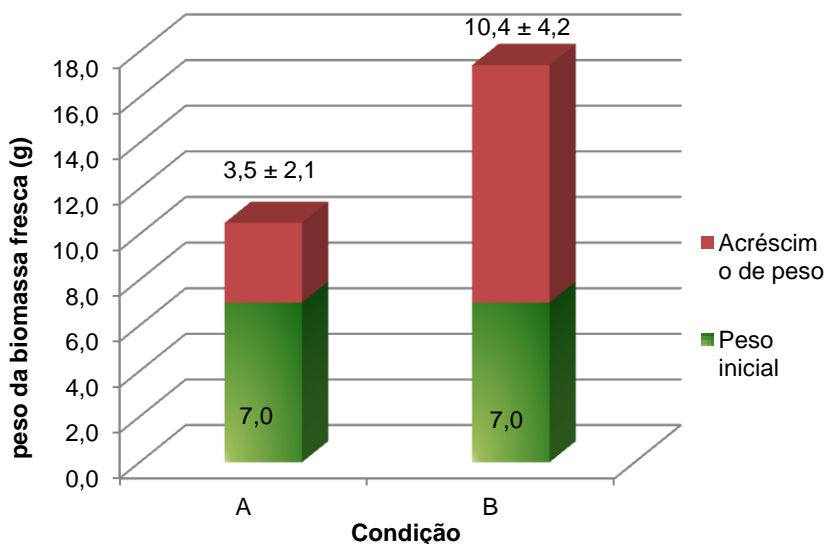
Tabela 13 – Resultado de crescimento das lemnas no Experimento 3.
(continuação)

Experimento 3	FBR	CE (g)	VCR ($\text{g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{dia}^{-1}$)	VCE ($\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{dia}^{-1}$)
B	2	9,2 ^b	8,0 ^b	0,12 ^b
[CO₂]	4	10,2 ^b	8,8 ^b	0,13 ^b
elevada	6	6,6 ^b	5,7 ^b	0,09 ^b

FBR: Fotobiorreator; CE: Crescimento específico; VCR: Velocidade de Crescimento Relativo; VCE: Velocidade de Crescimento Específico.

Observando-se o Crescimento Específico (CE) referente a cada FBR, apresentado na Tabela 11, na Tabela 12 e na Tabela 13 e representado, em média, pela Figura 23, é possível notar a superioridade no crescimento da biomassa exposta a elevadas concentrações de CO₂ – situação B – em relação à situação A. De modo concomitante nas tabelas acima, as Velocidades de Crescimento Relativo e Específico (VCR e VCE) visivelmente foram maiores nos FBRs submetidos à situação B, sendo mais significativa essa diferença nos experimentos 1 e 3, com uma VCR até quatro vezes maior.

Figura 22 – Crescimento da biomassa.

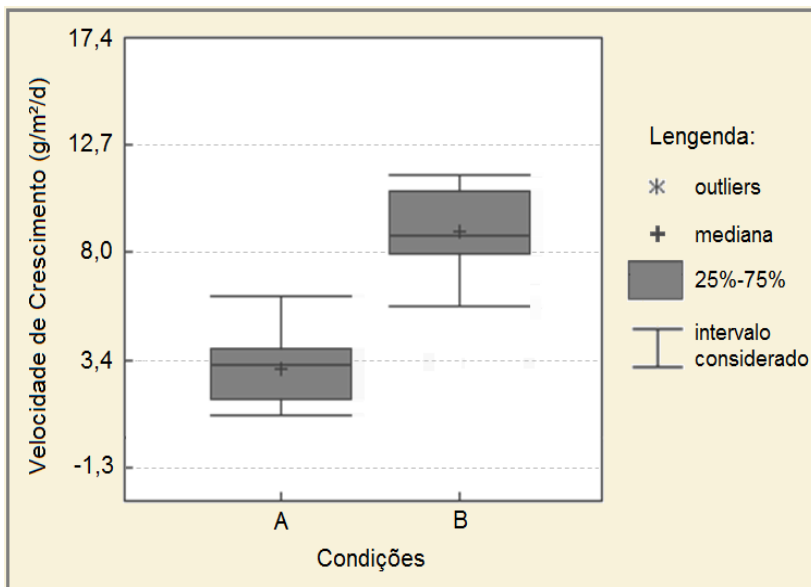


Condição A: Lemnas expostas a concentrações atmosféricas de CO₂;
Condição B: Lemnas expostas a concentrações elevadas de CO₂.

Os dados de velocidade de crescimento foram compilados e testados matematicamente pelo método estatístico de Mann Whitney, para verificar a relação entre seus valores com a presença ou não de CO₂ extra.

O diagrama de caixas pode ser visualizado na Figura 23. A partir da análise do mesmo, é possível observar que as velocidades de crescimento na condição B (com adição de CO₂) são superiores às da condição A. Isso pode ser visualizado a partir da diferença entre as medianas, com 3,15 g.m⁻².dia⁻¹ nas concentrações atmosféricas e 8,80 g.m⁻².dia⁻¹ com o adicional.

Figura 23 – Valores médios das Velocidades de Crescimento Relativo.



Condição A: Lemnas expostas a concentrações atmosféricas de CO₂;

Condição B: Lemnas expostas a concentrações elevadas de CO₂.

Cada condição apresentou uma amostragem de nove dados (n=9). Em média, os FBRs com aporte extra de CO₂ (B) apresentaram uma VCR de 9,0 g.m⁻².dia⁻¹ (±1,8), enquanto que os FBRs com CO₂ atmosférico obtiveram 3,0 g.m⁻².dia⁻¹ (±1,7), isto é, três vezes menor.

Essa diferença pode ser explicada pelo fato do CO₂ ser um insumo da fotossíntese, sendo assim, o mesmo intensificou essa reação que, por sua vez, permitiu a produção de mais glicose para a lemna. A

glicose, em conjunto com oxigênio e água, foi utilizada na respiração celular efetuada nas mitocôndrias, resultando em energia para as atividades e divisão celular. O aumento das mitoses celulares caracteriza uma maior velocidade de crescimento.

Extrapolando a produção de lemna para um ano, esta seria de $32,9 \text{ t.ha}^{-1}.\text{ano}^{-1}$ (em relação ao peso seco), valor superior aos $20 \text{ t.ha}^{-1}.\text{ano}^{-1}$ descritos por Barão (2014). Ademais, se aproxima do intervalo inferior obtido por Xu et al (2012) cujos rendimentos de lemna foram 39,1 a $105,9 \text{ t.ha}^{-1}.\text{ano}^{-1}$, usando as águas residuárias como fonte de nutrientes. Já Mohedano (2010) obteve mais que o dobro em sua produtividade máxima, com $68 \text{ t.ha}^{-1}.\text{ano}^{-1}$.

O indício da influência das condições A e B na velocidade de crescimento foi comprovado após a aplicação do teste estatístico U de Mann Whitney. Esse teste foi utilizado após a verificação de ausência de normalidade pelo teste Qui Quadrado de aderência.

O teste U de Mann Whitney resultou em um pvalor de $2,41.10^{-4}$, o que indica que há relação entre as variáveis (Hipótese H1), com chance de erro de 0,024%. Como o nível de significância (α) adotado foi de 0,05 (5%), a verificação estatística encontra-se dentro da faixa de erro aceitável para o experimento.

A existência da relação entre a adição de CO_2 e a VCR indicaria também a influência na VCE, devido à proporcionalidade entre ambas. Assim, a associação estatística entre as variáveis foi comprovada. As médias foram $0,13 \text{ g.g}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ e $0,06 \text{ g.g}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ para a condição A e B, respectivamente. Sendo assim, os FBRs da condição B apresentaram, em média, uma VCE 2,3 vezes maior do que as referentes aos padrões atmosféricos. A avaliação da biomassa, com dados de carbono fixado para as velocidades de crescimento está expressa no Apêndice C.

A bibliografia apresenta diversos resultados de velocidades de crescimento da biomassa lemnácea, cujos valores foram compilados por Mohedano (2010) e também atualizados no presente trabalho, como demonstrados na Tabela 14.

É importante ressaltar que a comparação com tais valores intenciona apenas fornecer uma noção quantitativa dos valores obtidos, uma vez que os autores desenvolveram seus respectivos trabalhos em outras condições experimentais, diferentes deste.

Tabela 14 – Velocidade de crescimento, em ordem crescente, encontradas em diferentes estudos.

Origem	VCR* (g.m⁻².dia⁻¹)⁺	VCE** (g.g⁻¹.dia⁻¹)⁺	Espécie	Autores
Portugal	3,1	-	<i>Lemna minor</i>	Oliveira et al. (2017)
Austrália	3,0 - 5,4	-	<i>Landoltia punctata</i>	Muradov et al. (2014)
China	3,5 - 14,1	-	<i>Lemna minor</i>	Ge et al. (2012)
China	4,3 – 10,0	-	<i>Lemna aequinoctialis</i>	Yu et al. (2014)
China	4,34	-	<i>Landoltia S3</i>	Xiao et al. (2013)
Brasil	5,36	0,11	<i>Landoltia punctata</i>	Barão (2014)
Holanda	5,50	-	<i>Lemna gibba</i>	Korner et al. (1998)
Áustria	6,1	-	<i>Lemna minor</i>	Landolt e Kandeler (1987)
Vietnam	6,7	-	<i>Lemna minor</i>	Anh and Peterson (1998)
USA	8,5	-	<i>Lemna gibba</i>	Lyerly (2004)
Brasil	9,0	0,13	<i>Landoltia punctata</i>	Presente estudo
Vietnam	10	-	<i>Lemna spp.</i>	Rodriguez and Preston (1997)
Brasil	10,5	-	<i>Lemna valdiviana</i>	Tavares (2008)
China	12,4	-	<i>Spirodela polyrrhiza</i>	Xu et al (2011)
Egito	13,8	-	<i>Lemna gibba e Lemna minor</i>	El-Shafai (2006)
Israel	14	-	<i>Lemna gibba</i>	Oron et al. (1987)
Holanda	15,1	-	<i>Spirodela spp.</i>	Alaerts et al. (1996)
Brasil	18	0,24	<i>Landoltia punctata</i>	Moheadano (2016)
USA	21	-	<i>Landoltia punctata</i>	Mestayer et al. (1984) apud Leng

Tabela 14 – Velocidade de crescimento, em ordem crescente, encontradas em diferentes estudos. (continuação)

Origem	VCR* (g.m ⁻² .dia ⁻¹) ⁺	VCE** (g.g ⁻¹ .dia ⁻¹) ⁺	Espécie	Autores
USA	28,5	-	<i>Lemna minor</i>	Cheng et al. (2002b)
USA	32	-	<i>Landoltia punctata</i>	Cheng et al. (2002a)
USA	8 - 38	0,2	<i>Lemna obscura</i>	Landsman et al. (2005)
China	-	0,19	Diversas	Li et al. (2016)
Dinamarca	-	0,2	<i>Lemna minor</i>	Cedegreen and Madsen (2002)
Colômbia	-	0,28	<i>Spirodela polyrrhiza</i>	Caicedo (2005)
Holanda	-	0,3	<i>Lemna minor</i>	Driever et al. (2004)
USA	-	0,3	<i>Landoltia punctata</i>	Bergman et al. (2002)

*VCR - Velocidade de Crescimento Relativo; **VCE - Velocidade de Crescimento Específico; + peso da matéria seca.

Fonte: Adaptado Mohedano (2010).

Observa-se comparativamente à Tabela 13 que os valores para VCR nos FBRs expostos a mais de 6.000 ppm de CO₂ podem ser considerados satisfatórios, alcançando valores próximos a Lyerly (2004), Tavares (2008) e Rodriguez e Preston (1997), bem como, encontra-se inserido no intervalo apresentado por Landesman et al. (2005). Todos esses autores caracterizam-se por terem trabalhado com lagoas de lemnas para o tratamento de efluentes líquidos com elevada carga nutricional, como: suíno (Lyerly e Tavares); biodigestor (Rodriguez e Preston); e águas residuárias (Landesman).

A VCR também se aproximou do limite superior do intervalo obtido por Yu e colaboradores (2014). Este, por sua vez, também realizou o acúmulo de amido na lemna com iluminação e temperatura similar (105 μmol.m⁻².s⁻¹ e 25 °C), porém, testou o cultivo em esgoto sanitário e no meio de cultura *Schenk & Hildebrandt medium*.

A proximidade dos valores de VCR encontrados no presente trabalho com os valores de autores que cultivaram lemnas em efluentes enriquecidos em nutrientes é positiva, pois a maioria das bibliografias

para acúmulo de amido o fazem em escassez de nutrientes e possuem velocidades de crescimento inferiores ao obtido no atual estudo. Essas bibliografias geralmente afirmam a não proporcionalidade entre velocidade de crescimento e enriquecimento de amido, como concluiu Xiao (2013).

No caso das VCEs, as mesmas podem ser consideradas relativamente baixas, pois inclusive a biomassa exposta a elevadas concentrações apresentou valores menores do que os encontrados na literatura. Entretanto, o fato de a biomassa exposta à concentração atmosférica ter apresentado VCEs menores ainda, significa que as condições impostas às lemnas provavelmente estavam provocando um estresse o suficiente para não permitir velocidades tão elevadas em ambas as situações. O valor mais próximo ao obtido, observado na Tabela 13, foi de Barão (2014), com $0,11 \text{ g.g}^{-1}.\text{dia}^{-1}$.

Os autores citados na Tabela 13 utilizaram diferentes condições experimentais e técnicas variadas para resultar nesses valores de velocidade de crescimento, desde a inanição de nutrientes ao uso no tratamento de efluentes com elevadas concentrações de nutrientes, como supracitado.

Os estudos que utilizaram a escassez de N e P e/ou a aplicação de elementos inibidores do crescimento, a fim de acumular amido, representaram as menores velocidades da Tabela 13. Enquanto que, nos casos de cultivo sem essa finalidade, como no tratamento de efluentes, as velocidades de crescimento foram consideravelmente superiores. Isso ocorre, pois esse parâmetro é diretamente proporcional à carga de nutrientes, cuja assimilação é bem elevada, como $0,4 \text{ NTK.m}^{-2}.\text{d}^{-1}$ no trabalho de Lyerly (2004).

5.4.2 Efeito sobre a remoção de nutrientes do meio de cultura

A remoção dos nutrientes presentes no meio de cultura é decorrente do crescimento da biomassa de lemnas, sendo uma análise complementar à avaliação do efeito do CO_2 sobre a velocidade de crescimento da lemna. Dessa forma, por meio do monitoramento da fase aquosa, obteve-se os resultados de nitrato, fosfato e pH referente à permitiu-se um melhor entendimento das inter-relações entre os parâmetros, sendo estes descritos nos itens a seguir.

5.4.2.1 Remoção de nitrato do meio de cultura

O meio de cultura inicial de cada experimento foi igual para todos os FBRs, sendo o meio de cultura final diferente para cada FBR após o cultivo das lemnas nas duas condições de concentração gasosa.

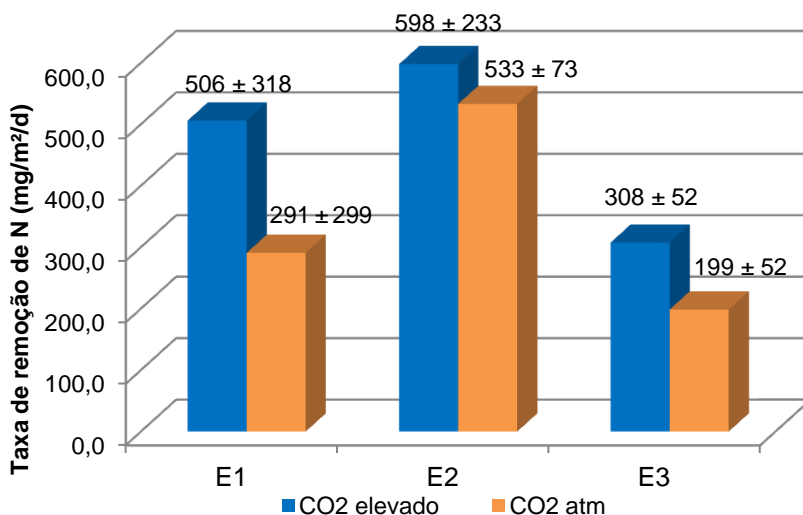
A remoção de nitrato no meio de cultura efetuada pelas lemnas é representada pela diferença das concentrações inicial e final, como consta na Tabela 15, para ambas as condições.

Tabela 15 – Concentração inicial e final de nitrato nos ensaios.

Condição	NO ₃ ⁻ (mg/L)					
	Ensaio 1		Ensaio 2		Ensaio 3	
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
A – [CO ₂] atm	1.426,0	1.128,4	1.684,0	1.138,4	1.269,3	1.066,1
B – [CO ₂] elevada	1.426,0	908,2	1.684,0	1.072,2	1.269,3	954,7

A partir da Tabela 15, pode-se inferir que a adição de CO₂ promove um acréscimo da remoção de nitrato em todos FBRs. Tal fato é proporcional ao aumento da taxa de crescimento, porque há uma maior quantidade de biomassa consumindo os nutrientes. A taxa de remoção média de nitrogênio também pode ser visualizada na Figura 24.

Figura 24 – Taxa de remoção média de nitrogênio nos ensaios.



E1: Ensaio 1; E2: Ensaio 2; E3: Ensaio 3.

Como a única fonte de nitrogênio no meio de cultura foi o nitrato, pode-se entender que a remoção de nitrogênio se deu na remoção desse composto. Desse modo, ao observar a Figura 24, fica evidente que as remoções de nitrogênio variam de forma significativa entre os experimentos, em especial nas condições com CO₂ atmosférico. Os desvios padrões foram elevados, mostrando certa imprecisão da análise. Nesse caso, os métodos procurados para mensurar o nitrato detectavam apenas concentrações baixas (0 a 5 mg NO₃/L). Assim, as amostras foram diluídas 200 vezes para se incluírem no intervalo de detecção da curva de leitura no espectrofotômetro, podendo indicar uma falta de representatividade.

A relação da remoção de nitrato no meio de cultura mediante à adição de CO₂ pode ser verificada através de análise estatística. A descrição dos dados encontra-se na Tabela 16.

Tabela 16 – Descrição estatística da remoção de nitrogênio em relação à adição ou não de CO₂

Estatísticas quanto à remoção de Nitrogênio	Condição	
	[CO ₂] atm	[CO ₂] elevada
Observações	9	9
Média (mg N.m ⁻² .dia ⁻¹)	340,8	470,4
Desvio-padrão (mg N.m ⁻² .dia ⁻¹)	238,1	236,6
Coefficiente de variação (%)	69,8	50,3
Mediana (mg N.m ⁻² .dia ⁻¹)	411,7	359,6
Mínimo (mg N.m ⁻² .dia ⁻¹)	0,00	171,0
Máximo (mg N.m ⁻² .dia ⁻¹)	626,7	0,825,4
Intervalo	626,4	654,4
1º Quartil	183,7	321,8
3º Quartil	495,0	608,4

Com os dados apresentados na Tabela 16, observa-se que há um aumento sensível na remoção de nitrato com a presença extra de CO₂.

Devido à ausência de normalidade apresentada pelos dados, aplicou-se o teste U de Mann Whitney, resultando em um pvalor de 0,20. Isso significa que afirmar a influência de elevadas concentrações de CO₂ na remoção de nitrato teria apenas uma confiabilidade de 80%. Como o nível de significância adotado foi de 5%, a confiança necessária

seria de 95%. Portanto não se comprovou estatisticamente a relação entre as variáveis (Hipótese H0).

Em média, a remoção para 400 ppm foi de 340,8 mgN.m⁻².dia⁻¹ ($\pm 238,1$) e de 470,4 mgN.m⁻².dia⁻¹ ($\pm 236,6$) para acima de 6000 ppm. Ambas as remoções foram superiores ao encontrado por Oliveira et al. (2017) em seu estudo de acúmulo de amido por inanição de nutrientes, cuja remoção foi de 140 mgN.m⁻².dia⁻¹, três vezes inferior à atual técnica.

Por outro lado, a maior remoção deste estudo se mostrou menor quando comparado ao obtido por Landolt e Kendeler (1987) com o uso de *Lemna minor* no tratamento de efluentes domésticos, cuja taxa de remoção foi 590 mgN.m⁻².dia⁻¹.

5.4.2.2 Remoções de fosfato do meio de cultura relacionadas ao crescimento da biomassa de lemnas

Assim como com o nitrato, é possível avaliar o crescimento lemnáceo a partir da remoção da concentração do fosfato. Os dados obtidos nos três experimentos estão expostos na Tabela 17.

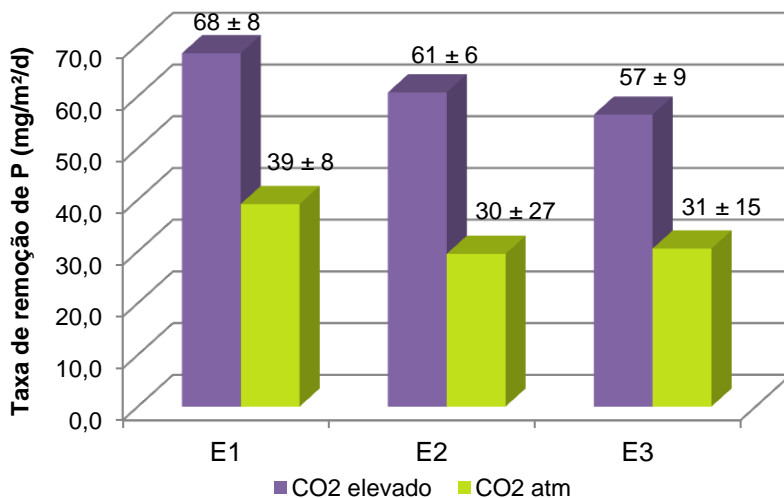
Tabela 17 – Concentração inicial e final de fosfato nos ensaios.

Condição	PO ₄ ⁻³ (mg/L)					
	Ensaio 1		Ensaio 2		Ensaio 3	
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
A - CO ₂ atm	137,0	109,2	133,8	112,9	132,0	110,3
B - CO ₂ elevado	137,0	88,6	133,8	90,7	132,0	92,0

A partir da Tabela 17, pode-se obter as médias de fosfato final de 110,8 mg/L ($\pm 11,3$) e 90,4 mg/L ($\pm 5,0$), para as condições A e B, respectivamente, havendo valores estatisticamente menores para B. Entretanto, deve-se ter cuidado ao comparar os valores finais de concentração de fosfato com outras bibliografias, que utilizam diferentes condições experimentais, visto que a remoção depende da concentração inicial de fósforo.

Pode-se constatar que houve, uma remoção maior de fosfato para os FBRs com CO₂ extra. Isso também pode ser explicado pelo aumento da velocidade de crescimento, que propicia um consumo superior de nutrientes. A remoção média de fósforo para ambas as condições pode ser vista na Figura 25.

Figura 25 – Taxa de remoção média de fósforo nos ensaios.



E1: Ensaio 1; E2: Ensaio 2; E3: Ensaio 3.

Ao comparar os gráficos das Figura 24 e Figura 25, percebe-se que a taxa de remoção de fósforo foi aproximadamente 5 a 10 vezes menor que a de nitrogênio. Mohedano (2010) afirma que essa mesma proporção é relatada em outras literaturas.

De forma análoga à análise de nitrato, a remoção de fosfato também deve ser analisada estatisticamente, a fim de comprovar a existência ou ausência de correlação entre as variáveis. As estatísticas descritivas estão expostas na Tabela 18.

Tabela 18 – Descrição estatística da remoção de fósforo em relação à adição ou não de CO₂.

Estatísticas quanto à remoção de Fósforo	Condição	
	[CO ₂] atm	[CO ₂] elevada
Observações	9,0	9,0
Média (mg P.m ⁻² .dia ⁻¹)	22,9	42,8
Desvio-padrão (mg P.m ⁻² .dia ⁻¹)	11,4	5,9
Coeficiente de variação (%)	49,9	13,9
Mediana (mg P.m ⁻² .dia ⁻¹)	25,2	41,2
Mínimo (mg P.m ⁻² .dia ⁻¹)	1,1	32,1

Tabela 18 – Descrição estatística da remoção de fósforo em relação à adição ou não de CO₂. (continuação)

Estatísticas quanto à remoção de Fósforo	Condição	
	[CO ₂] atm	[CO ₂] elevada
Máximo (mg P.m ⁻² .dia ⁻¹)	37,8	51,9
Intervalo	36,7	19,8
1º Quartil	22,5	39,9
3º Quartil	28,0	47,0

Ao observar as medianas e as médias, nota-se um aumento considerável na remoção de fosfato com a adição de CO₂. Dessa forma, há um forte indício da correlação entre as variáveis.

Estaticamente essa correlação (Hipótese H1) foi comprovada utilizando o teste U de Mann Whitney, tendo em vista a ausência de distribuição normal. O teste gerou um pvalor de $3,4 \cdot 10^{-4}$, menor do que o nível de significância 0,05. Portanto, a porcentagem de erro da inferência de relação é de 0,034%, menor do que os 5% considerados.

A média de remoção para 400 ppm foi de 22,9 mgPO₄.L⁻¹ (± 11,4), e de 42,8 mgPO₄.L⁻¹ (±5,9) para acima de 6000 ppm.

El-Shafai et al (2006), Nozaily et al (2000), Korner e Vermaat (1998) apontam taxas de remoção mais elevadas, de 74 a 95 mgP.m⁻².dia⁻¹ em experimentos em escala piloto para efluentes de reator UASB e doméstico.

Quando comparado às taxas de remoção de trabalhos que visam o acúmulo amido por meio de inanição de nutrientes, há uma remoção até 9 vezes superior, como no caso de Oliveira et al (2017), cujo valor foi 3,47 mgP.m⁻².dia⁻¹.

Cheng e colaboradores (2002a), obtiveram uma taxa de remoção de fósforo de 0,129 mgP.L⁻¹.h⁻¹ no tratamento de efluente suíno sintético com *Spirodela punctata*, muito próxima à condição A deste estudo (0,136 mgP.L⁻¹.h⁻¹) e menor que a condição B (0,255 mgP.L⁻¹.h⁻¹). Como o autor obteve tal resultado a partir de uma concentração de 10 mgP.L⁻¹, menor que o utilizado nesse trabalho (46 mgP.L⁻¹), as remoções podem ter sido mais significativas.

Mohedano (2010), expondo lemnas (*Landoltia punctata*) a diferentes concentrações de CO₂, aplicou as quantidades de gás apenas no primeiro dia, havendo um decaimento da concentração ao longo dos sete dias e, por conseguinte, da remoção de fosfato. Sendo assim, removeu 3 e 7 mgPO₄.L⁻¹ para 380 e 6.000 ppm. No presente estudo,

houve a manutenção em concentrações elevadas durante todo o experimento (B), sendo assim, estimulou continuamente o aumento do crescimento lemnácea e, portanto, a remoção de fosfato progressiva.

5.4.2.3 Efeito da concentração de CO₂ no pH do meio de cultura

Os resultados médios para a análise do pH no início e ao fim dos três experimentos está apresentado na Tabela 19.

Tabela 19 – Valores médios de pH.

Meio de cultura	pH médio
Inicial para todas as condições	6,12 ($\pm 0,05$)
Final para condição A – [CO ₂] atm	7,34 ($\pm 0,34$)
Final para condição B – [CO ₂] elevada	7,56 ($\pm 0,51$)

Observando a Tabela 19 e após análise estatística, constata-se que o pH dos FBRs foi similar para ambas as condições de concentração de CO₂, não havendo diferença estatística entre essas (pvalor = 0,1; $\alpha = 0,005$). Além disso, o pH não foi acidificado ao final do enriquecimento de CO₂. Isso pode indicar que não houve difusão significativa das quantidades elevadas de gás aplicado e formação de carbonatos; devido à camada espessa de lemnas.

Em seu experimento, Mohedano (2016) também não registra variações significativas no pH, bem como, relata baixos valores de CO₂ dissolvido (< 35 mg/L).

El Halouani et al. (1993) afirmam que, para pH acima de 7,6, há o aumento na remoção de fósforo do sistema devido a sua precipitação na forma de fosfato de cálcio. Observando individualmente o pH dos FBR (Figura 15) após o término de cada experimento, se destacam valores de pH acima de 7,6 principalmente no Experimento 2, sendo estes valores indiferentes da condição de CO₂.

Essa relação pode ser observada na Tabela 20, através da concentração de fosfato esperada e obtida. A concentração esperada é encontrada por meio de cálculos de proporcionalidade a partir da velocidade de crescimento para cada FBR. Nota-se que os resultados obtidos foram maiores que o esperado para praticamente todos os meios de cultura com pH acima de 7,6, significando uma possível precipitação do fosfato, visto que a análise no meio de cultura teria considerado esse precipitado e o crescimento da planta não.

Tabela 20 – Relação entre pH e concentração resultante de fosfato.

FBR	pH final			Concentração final de PO_4^{-3} (mg/L) esperada e resultante					
	E1	E2	E3	E1 ^D	E1 ^R	E2 ^D	E2 ^R	E3 ^D	E3 ^R
2	7,7	7,1	7,2	79	84	68	93	75	99
4	8,6	8,0	7,2	61	87	53	86	70	86
6	7,0	7,8	7,4	80	95	56	94	92	91
1	7,1	7,8	7,4	122	103	90	133	121	103
3	6,9	7,7	7,2	115	111	106	95	120	105
5	7,2	7,8	7,1	113	113	103	111	125	123

E_x: Experimento X; D: esperada; R: resultante. Valores de pH acima de 7,6 e casos de possível precipitação: destacado em vermelho escuro; casos de aparente precipitação, porém com o pH menor que 7,6: destacado em tom mais claro.

Diferentemente do nitrato que tinha como uma única forma de remoção o consumo pela lemna, o fosfato pôde ser removido tanto pela absorção das lemnas, como pela precipitação no fundo dos FBRs.

5.4.2.4 Balanço de massa dos nutrientes relacionada à velocidade de crescimento

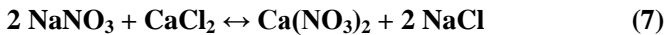
Ao efetuar o balanço de massa de nitrogênio e fósforo nas lemnas, a partir da quantidade de nitrato e fosfato removida e da velocidade de crescimento referente a cada FBR, é possível estimar qual seria a porcentagem desses elementos na composição da lemnácea. Neste caso, considera-se que tal remoção tenha sido efetuada apenas por parte das lemnas. Desse modo, concluiu-se a biomassa exposta à concentração padrão atmosférica de CO_2 apresentaria maior teor de nitrogênio e fósforo em sua composição, de 11,8 e 1,4% (p/p base seca), respectivamente. Enquanto que a biomassa em condições elevadas de CO_2 possuiria 5,1 e 0,7% (p/p base seca), respectivamente.

Os teores de N e P maiores nas lemnas em concentração padrão seriam justificados por sua velocidade de crescimento inferior e, portanto, um armazenamento desses elementos cujas concentrações no meio líquido eram elevadas (a ponto de promover VCR de $20\text{g.m}^{-2}.\text{d}^{-1}$). Ou seja, pode-se dizer que o fator limitante ao seu crescimento nesse caso foi a concentração de CO_2 , e não nutrientes. Dessa forma, as lemnas absorviam nitrato e fosfato (em menor proporção que a condição B), porém ao invés de usar para crescer, os armazenavam.

O pensamento inverso pode ser usado para as lemnas expostas a concentrações superiores de CO₂, onde a velocidade de crescimento elevada não permitiu o armazenamento de N e P. O crescimento não foi limitado nem por nutrientes e nem por gás carbônico, por isso foi superior.

A configuração do experimento (volume do reator, volume do meio de cultura e área superficial de lemnas) associada à ausência de renovação do meio em um período de 7 dias, fez com que se utilizasse um meio de cultura modificado (em relação a ISO 20079 /2005). Porém, deve-se atentar a essas adições de nutrientes com o intuito de não limitar o crescimento da lemna, pois a concentração pode ser tamanha, a ponto de deixar a salinidade do meio elevada e inibir o crescimento.

Observando os sais componentes do meio de cultura, destaca-se os dois componentes mais abundantes com sódio e cloro na sua fórmula: nitrato de sódio e cloreto de cálcio dihidratado. A presença desses sais em conjunto provavelmente formou o cloreto de sódio (NaCl), conforme demonstra a reação descrita na Equação 7.



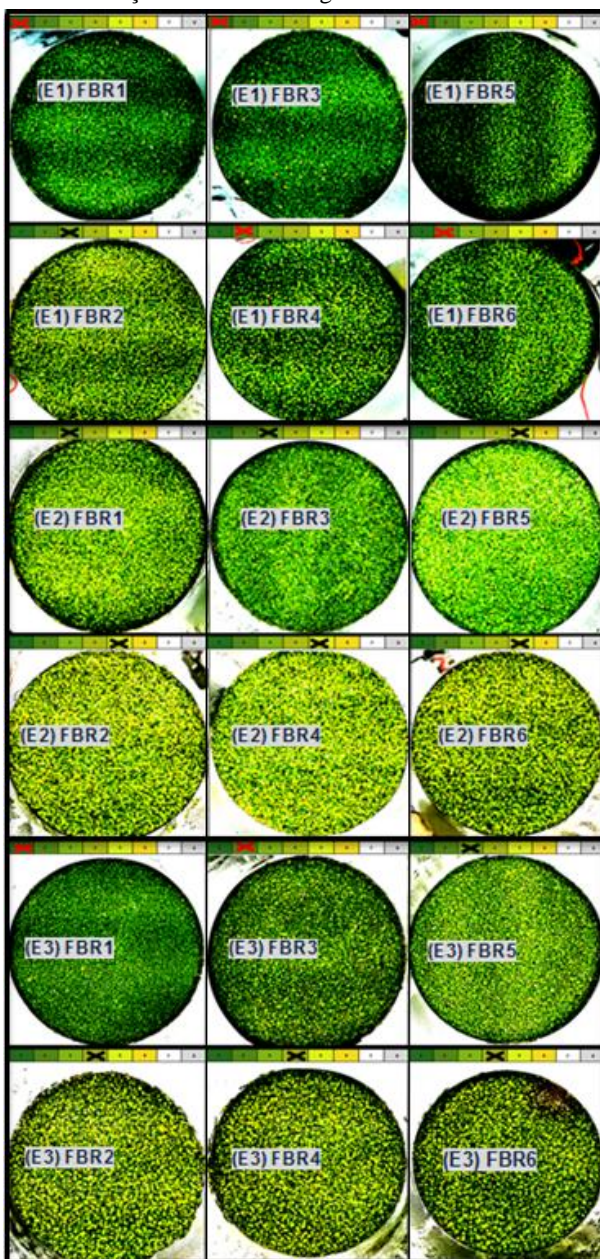
Ao observar as concentrações de NaNO₃ e CaCl₂.2H₂O no meio de cultura (1860 e 36 mg.L⁻¹) pode-se obter até 0,7 mM de NaCl. Ainda há a formação cloreto de sódio por meio da interação de outros sais do meio de cultura, todavia, de forma insignificante.

Estudos realizados por Xu et al (2011) e Sree (2015) mostram que as lemnas suportam até 10 mM de NaCl, sem apresentar queda considerável na velocidade de crescimento. Portanto, o nitrato aparentemente não apresentou estresse à lemna. Todavia deve-se estudar melhor a presença de cátions no meio de cultura e o estresse da planta.

5.4.3 Efeitos de elevadas concentrações de CO₂ sobre a sanidade vegetal

Foi analisada a sanidade da lemna de acordo com observações na população de cada FBR como um todo, com uma escala colorimétrica. Sendo assim, a Figura 27 contém os resultados das fotografias tratadas com 80% de contraste, onde apresenta a coloração assinalada em cada um dos FBRs nos três experimentos. As imagens foram organizadas de forma a agrupar as triplicatas de FBRs 1, 3 e 5, com concentração atmosférica e os FBRs 2, 4 e 6, com enriquecimento de CO₂.

Figura 26 – Avaliação da sanidade vegetal de acordo com sua coloração.



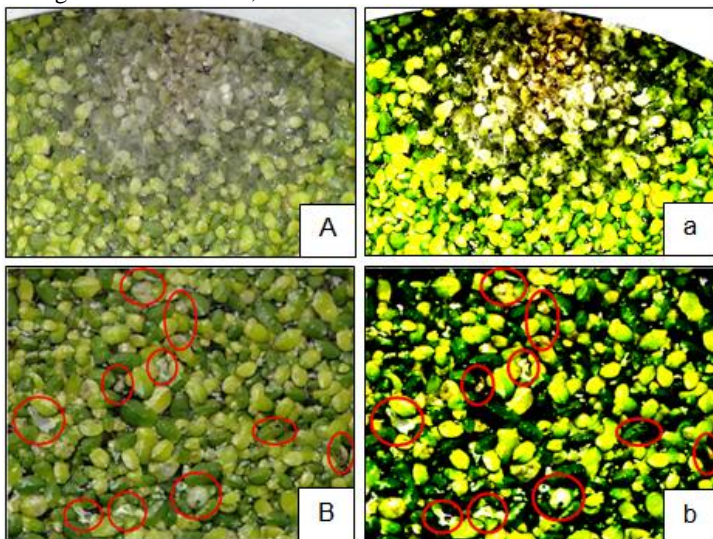
FBR: Fotobiorreator; (E): Ensaio.

Observando atentamente a Figura 26, percebe-se que os reatores sem aporte extra de CO_2 (1, 3 e 5) do Experimento 1 possuíram um estado de sanidade ótimo, enquanto que a sanidade dos FBRs 2, 4 e 6 decaiu de forma suave, apresentando estado de bom a ótimo. Ressalta-se que nesse Experimento as concentrações, embora acima de 6.000 ppm, foram consideravelmente menores que nos Experimentos 2 e 3.

Nas fotografias referentes ao Experimento 2 (Figura 26), nota-se que o estado de sanidade das lemnas sob concentração padrão classificou-se entre regular e bom, podendo indicar maior estresse comum a ambas as condições de CO_2 de um experimento para outro. Nesse caso já é possível notar certa sobreposição das lemnas para os FBRs com mais CO_2 , cuja sanidade foi regular.

O Experimento 3 (Figura 26) foi aquele em que, visualmente, a diferença entre as condições impostas de CO_2 foi mais significativa. Desse modo, variou de bom a ótimo (FBRs 1, 3 e 5) para regular (FBRs 2, 4 e 6), representando uma queda de dois estados de sanidade. Além disso, no FBR 6 houve a contaminação com uma espécie invasora de fungos, cujo desenvolvimento resultou na morte de parte das lemnas, adquirindo coloração branco a cinza. Na Figura 27, é possível observar a diferença entre as imagens originais e o tratamento com 80%, o qual auxilia a identificar melhor as lesões e manchas nas frondes desse FBR.

Figura 27 – Necroses, cloroses e lesões em frondes do FBR6/E3.



A) Necrose das lemnas (causa: fungo); B) Manchas e lesões nas frondes, circuladoas em vermelho; a) e b) tratamento das respectivas imagens com 80% de contraste.

É possível observar nas Figura 26 e Figura 27 que, ao final de cada experimento (7 dias), a biomassa que foi exposta a mais de 6.000 ppm de CO₂ (FBRs 2, 4 e 6) apresentou uma sobreposição das plantas. Isso ocorreu, pois o crescimento específico nesses FBRs foi elevado ao ponto de tornar a densidade de lemnas superior ao indicado por Skillicorn et al., (1993) e Cheng et al. (2002) (400 a 600 g/m²).

Como as lemnas comumente apresentam um crescimento exponencial, manter uma densidade ideal no início e fim do experimento torna-se difícil sem a retirada do excesso de biomassa ao longo do tempo, portanto, decidiu-se iniciar com uma densidade ideal (de 424 g/m²), para evitar a formação de clareiras na superfície líquida, e assim, o desenvolvimento de outras espécies fotossintetizantes.

Nesse estudo, não foram identificadas espécies invasoras durante os experimentos de enriquecimento de CO₂ nas lemnas. Isso foi garantido, pois houve um cuidado em retirar tais espécies, como do gênero *Wolffia* das culturas estoque e pré-cultura.

Outra observação realizada foi a inexistência de arraste da camada flutuante de lemnas nos FBRs, isto é, o fluxo de ar criado pelos *coolers* para homogeneização do CO₂ durante as medições não foi suficiente para provocar esse arraste. Isso deveu-se a escolha correta da dos homogeneizadores, aliado à colocação um dispositivo atrás dos mesmos para evitar esse processo prejudicial às lemnas.

Sem o arraste da camada superior de lemnas, também não foram observadas clareiras significativas na superfície líquida. Tal fato contribuiu de forma essencial para a ausência de algas durante os experimentos.

5.4.3.1 Coloração das frondes expostas ao CO₂ extra

A biomassa exposta a elevadas concentrações de CO₂ obteve ao fim de cada experimento uma coloração mais amarelada (Figura 26), Esse resultado vai de encontro com a literatura, pois geralmente as lemnas com mais insumo para a fotossíntese, no caso com mais CO₂, desenvolvem mais clorofila, adquirindo uma coloração próxima de um verde mais escuro e vivo.

Essa coloração pode ser atribuída a condições experimentais de estresse e a produção de ácido abscísico na planta. Esse ácido é um hormônio vegetal que regula diferentes aspectos fisiológicos da planta. Dentre os efeitos do ácido abscísico relatados por Regina e Carbonneau (1997) bem como por Cui e Cheng (2015), elenca-se:

- a) fechamento de estômatos induzido por estresse hídrico;
- b) desenvolvimento de sementes ou dormência de sementes;
- c) promoção de senescência foliar.
- d) retardamento de floração;
- e) promoção de crescimento de raízes em baixo potencial hídrico;
- f) diminuição da velocidade de crescimento.

O que se infere que tenha tido interferência do ácido abscísico foi a coloração das frondes. Como supracitado, as folhas entram em processos de senescência com presença elevada do mesmo, havendo posterior processo de queda ou abscisão. A coloração amarelada pode ter sido decorrente desse processo de senescência e estresse ambiental.

5.4.4 Efeitos de elevadas concentrações de CO₂ sobre os aspectos morfológicos vegetais

Os aspectos morfológicos vegetais analisados foram: o comprimento da raiz e o tamanho das frondes. Esses são as principais estruturas visíveis, sendo potenciais indicadores de sanidade na lemna. Sendo assim, destacou-se as anormalidades ocorridas.

Foram observados 44 dados de comprimento da raiz para a condição A e 43 para a B. Em média, o comprimento das raízes de lemnas expostas a elevadas concentrações foi de 19,4 mm ($\pm 8,9$). Esse valor é aproximadamente duas vezes maior do que os medidos nas condições atmosféricas, cuja média foi 9,8 mm ($\pm 2,6$). A correlação entre as variáveis pode ser vista também com a comparação entre as medianas, com 16,4 mm com CO₂ extra e 9,6 mm para CO₂ atmosférico.

Com relação ao tamanho das frondes, registram-se 43 observações para os FBRs expostos à condição atmosférica e 37 para concentrações elevadas de CO₂. As medianas encontradas foram, respectivamente, 4,9 mm e 6,1 mm, o que indica uma tendência proporcional entre crescimento dessa estrutura e a concentração de CO₂. O tamanho médio foi de 6,2 mm ($\pm 1,3$), na condição B, diante de 5,2 mm ($\pm 1,5$) na condição A.

O aumento do comprimento da raiz e do tamanho das frondes pode ter relação com o desenvolvimento do tecido meristemático, que estimula o crescimento da planta por um todo. Além disso, as raízes podem ter sido maiores na condição B, devido à densidade maior de

lemnas e, por conseguinte, uma concentração menor de nutrientes disponíveis por organismo. Isso faz com que as raízes cresçam em busca de nutrição.

Estatisticamente, foi comprovado que o aporte extra de CO_2 influencia tanto no aumento do comprimento da raiz, quanto no do tamanho da fronde.

O comprimento da raiz foi a única variável QT que apresentou aderência à distribuição normal no teste Qui-quadrado para ambas as categorias da variável QL. Sendo assim, verificou-se a homocedasticidade dos dados através do teste Levene, cujo resultado foi heterocedasticidade, ou seja, variâncias distintas. Dessa forma, o teste T de Student foi utilizado para relacionar os parâmetros, obtendo-se um pvalor inferior a $1,0 \cdot 10^{-6}$, comprovando estatisticamente a hipótese H1, (com um erro de 0,0001%).

Para o tamanho da fronde, não houve normalidade dos valores para uma das categorias, o que implica no uso do teste U de Mann Whitney. O pvalor encontrado foi de $8,3 \cdot 10^{-4}$, menor do que o nível de significância adotado de 0,05, comprovando a correlação (hipótese H1).

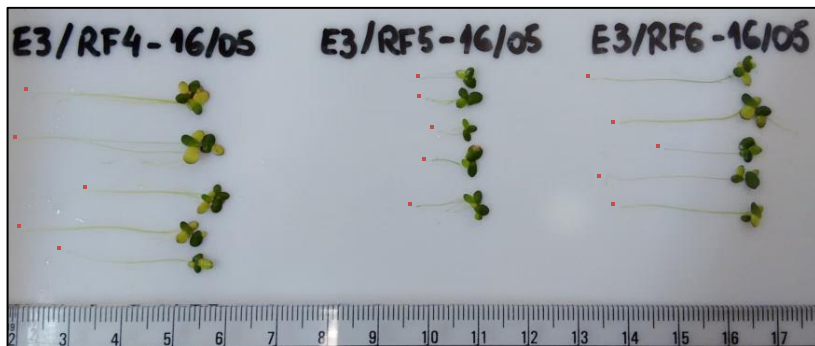
Na Tabela 21 estão apresentadas as médias dos parâmetros morfológicos, comparando os resultados entre a biomassa exposta (B) e não exposta (A) a elevadas concentrações de CO_2 . Conclui-se que houve um aumento de três e duas vezes nas raízes e frondes, respectivamente, de A para B.

Tabela 21 – Médias dos aspectos morfológicos quantitativos.

Aspecto morfológico	A - CO_2 atm	B - CO_2 elevada	Relação B/A
Comprimento raiz (mm)	6,18	19,23	3,11
Diâmetro da fronde (mm)	5,16	9,84	1,91

A Figura 28 demonstra um exemplo de fotografia realizada para medição de aspectos individuais com paquímetro virtual. Nessa, nota-se que os FBRs 4 e 6 (CO_2 extra) apresentam raízes com um comprimento consideravelmente maior que o FBR 3 (CO_2 atm)

Figura 28 – Amostras de indivíduos dos FBRs 4, 5 e 6, do E3, com destaque para as raízes.



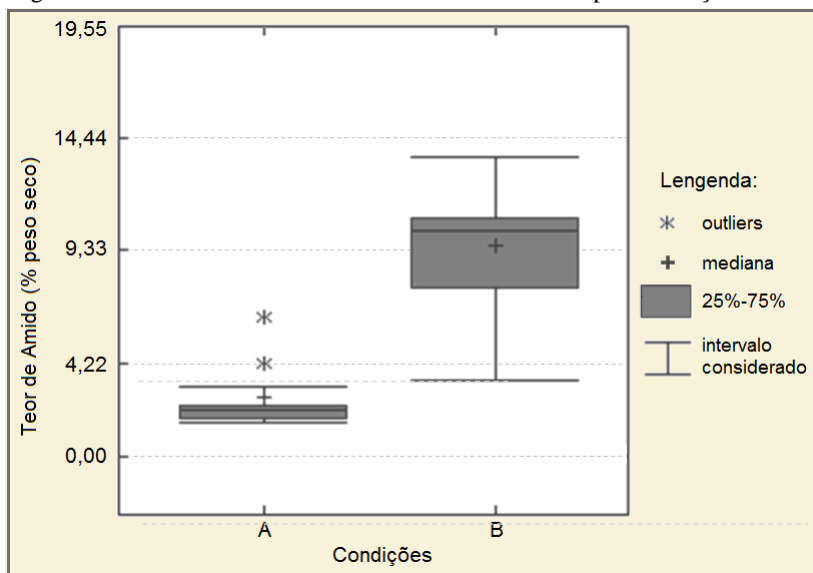
E3: Ensaio 3; RF: reator fotossintético (fotobiorreator).

Aditivamente, ainda pode-se observar na Figura 29 que, além da nítida diferença morfológica no tamanho das raízes e frondes, existe uma discrepância visível na coloração dessas frondes. Dessa forma, percebe-se que os organismos analisados individualmente foram representativos em relação à população total.

5.4.5 Efeitos de elevadas concentrações de CO₂ sobre o acúmulo de amido na lemna

Neste experimento, as lemnas expostas a condições elevadas de CO₂ apresentaram maior teor de amido em relação às cultivadas em concentração atmosférica. A relação entre amido e concentração de gás carbônico foi testada estaticamente, conforme demonstra a Figura 29.

Figura 29 – Valores médios do teor de amido nas lernas para condições A e B.



Condições A - Lernas expostas a concentrações atmosféricas de CO₂.

Condições B - Lernas expostas a concentrações elevadas de CO₂.

A comprovação estatística se deu através do teste de Mann Whitney, devido à ausência de normalidade dos dados, gerando um pvalor de $9,7 \cdot 10^{-4}$, acima do nível de significância adotado de 0,05. Isto é, afirmar que existe uma relação positiva entre o enriquecimento de CO₂ e o acúmulo de amido possuiu uma confiabilidade de 99,999%. Na condição A, os dois pontos discrepantes foram eliminados da análise, pois poderiam promover a distorção dos resultados, devido à baixa amostragem.

De acordo com o diagrama de caixas da Figura 30, em média, o teor de amido para condição A foi de 2,6% ($\pm 1,6$) e para condição B foi de 10,2% ($\pm 3,5$) (p/p base seca). Já as medianas foram de 2,0% e 10,6% para condição A e B, respectivamente.

A Tabela 22 contém os dados individuais de teor de amido para os FBRs dos três ensaios, o que permite uma análise mais detalhada.

Tabela 22 – Teor de amido na lemna por condição e ensaio.

Condição	FBR	Teor de Amido (%)			Média
		E1	E2	E3	
A - [CO ₂] atm	1	1,6 ^a	6,3 ^b	1,5 ^a	2,6
	3	1,7 ^a	1,9 ^a	2,2 ^a	
	5	4,1 ^b	2,3 ^a	2,1 ^a	
B - [CO ₂] elevada	2	14,9 ^c	9,9 ^c	10,6 ^c	10,2
	4	3,4 ^b	12,6 ^c	13,5 ^c	
	6	10,8 ^c	7,7 ^c	8,1 ^c	

Analisando os valores obtidos para cada FBR na Tabela 22, pode-se notar que dentre os FBRs mantidos sob concentração atmosférica, o Ensaio 2 apresentou, em média, o maior teor de amido (mesmo desconsiderando os valores discrepantes). Neste ensaio, houve dias com temperaturas mais baixas do que nos outros (em torno de 28,7 °C), podendo haver relação da temperatura com o amido na lemna. Segundo Xiao (2013), temperaturas menores favorecem o acúmulo de amido na planta, porém retardam seu crescimento, como observado neste estudo.

As médias de cada ensaio foram bem similares para os FBRs na condição B, resultando em 9,7, 10,1 e 10,7% para os Ensaios 1, 2 e 3, respectivamente; mesmo havendo um valor bem inferior para o FBR 4 no Ensaio 1. Esse valor inferior pode ter ocorrido devido algum vazamento de CO₂ não detectado ou algum erro analítico.

O maior teor de amido encontrado neste estudo foi referente ao FBR 2 no Ensaio 1, com 15% de amido presente em sua biomassa. Um fato curioso, pois nesse ensaio as temperaturas foram mais elevadas e a luminosidade mensurada no local do FBR foi menor do que o FBR 4. Porém, nos demais ensaios, o FBR 4 obteve maior teor de amido, provavelmente devido sua luminosidade superior.

Landolt e Kandeler (1987) afirmam que o amido pode ser até 100 vezes maior na lemna quando exposta a 9.000 ppm do que em relação a 300 ppm.

Diversos autores estudaram o acúmulo de amido nas lemnas, utilizando técnicas diferenciadas para tal. Na Tabela 23, pode-se observar os teores de amido obtido em trabalhos mais recentes.

Tabela 23 – Teores de amido e respectivas técnicas de seu acúmulo encontrados em bibliografias, organizados em ordem crescente.

País	Teor de amido* (%)	Espécie	Autores	Técnica
China	6,5 - 16,3	Diversas	Li et al. (2016)	Cultivo durante 12 dias com diferentes luminosidades (melhor 105 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)
China	10 - 36	<i>Lemna minor</i>	Ge et al. (2012)	Inanição de nutrientes ou crescimento no escuro com adição de glicose.
Brasil	10,2	<i>Landoltia punctata</i>	Presente estudo	Enriquecimento de CO₂ durante 7 dias.
China	11,1 - 17,2	Diversas	Li et al. (2016)	Cultivo durante 12 dias com diferentes temperaturas (melhor 20°C).
China	15,0 - 28,8	Diversas	Li et al. (2016)	Cultivo durante 12 dias com diferentes meios de cultura (escassez de nutrientes).
Brasil	15,7	<i>Landoltia punctata</i>	Costa (2014)	Escassez de nutrientes durante 6 dias (água destilada).
China	18,7	<i>Spirodela polyrrhiza</i>	Xu et al. (2011)	Controle de NaCl no meio de cultura.
China	20 - 45,8	<i>Spirodela polyrrhiza</i>	Cheng e Stomp (2009)	Inanição de nutrientes durante 5 dias.
Brasil	24,7	<i>Landoltia punctata</i>	Mohedano et al. (2016)	Aplicação de CO ₂ , com seu decaimento durante 7 dias.
EUA	26,6	<i>Spirodela polyrrhiza</i>	Cui et al. (2011)	Teste de temperatura, nutrientes em escassez, integralidade de luz diária, durante 4 dias.
Brasil	27	<i>Landoltia punctata</i>	Souto (2016)	Escassez de nutrientes durante 10 dias.
China	31 - 45,8	Diversas	Xu et al. (2012)	Inanição de nutrientes durante 5 a 10 dias.
China	34 - 39	<i>Lemna aequinoctialis</i>	Yu et al. (2014)	Cultivo em meio Schenk & Hildebrandt e esgoto.

Tabela 23 – Teores de amido e respectivas técnicas de seu acúmulo encontrados em bibliografias, organizados em ordem crescente. (continuação)

País	Teor de amido* (%)	Espécie	Autores	Técnica
China	45,8	<i>Landoltia punctata</i>	Tao et al. (2013)	Inanição de nutrientes durante 7 dias.
Alemanha	50	<i>Lemna minor</i>	Sree (2014)	Estresse abiótico: Metais pesados (4 dias) Aplicação de sal (7 dias) Inanição nutrientes (14 dias)
China	52,9	<i>Landoltia OT</i>	Xiao et al. (2013)	Frequência de colheita e inanição de nutrientes.
China	62,71	<i>Lemna aequinoctialis</i>	Yin et al. (2015)	Combinações entre diferentes fotoperíodos e intensidade luminosa.
China	64,9	<i>Spirodela polyrrhiza</i>	Xu et al. (2011)	Inanição de nutrientes durante 10 dias.
China	76,7	<i>Landoltia punctata</i>	Huang et al. (2014)	Abordagem proteômica da inanição de nutrientes, com regulação de proteínas identificadas.

*p/p base seca.

Observando as técnicas utilizadas para o enriquecimento de amido na lemna, presentes na Tabela 23, percebe-se que a maioria dos estudos são relacionados com maneiras para evitar que a lemna degrade o grânulo de amido, obtendo valores superiores ao encontrado no presente estudo.

O teor de amido médio deste trabalho se aproxima a valores encontrados por Ge et al. (2012) e Li et al. (2016), cujas técnicas foram a inanição de nutrientes e testes com diferentes temperaturas e luminosidades, respectivamente. O trabalho de Li et al. (2016) segue uma vertente que estuda fatores estimuladores da fotossíntese e crescimento da planta, como a do presente trabalho.

Estudos recentes vêm aplicando um fotoperíodo de 24h/0h (luz/escuro) a fim de acumular amido. Essa condição ambiental serve como aparato para a planta realizar fotossíntese integralmente, isto é, sem o consumo das reservas de amido no período escuro, no qual apenas

efetua-se a respiração. Yin et al (2015) obteve valores elevados para amido utilizando esse fotoperíodo. Entretanto, embora com valores positivos, deve-se avaliar o custo e complexidade de implantar técnicas assim, pois expor as lemnas à luz de modo integral, diariamente, pode ser inviável.

Yu et al. usou fotoperíodo de 16h/8h, 23°C, 110 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, obteve valores bons para inanição de nutrientes. O meio de cultura influencia muito, assim como concluiu Li et al (2016), onde obteve valores mais elevados em uma situação de escassez nutricional também.

A Tabela 24 mostra o resultado das taxas de acúmulo calculadas para ambas as condições de CO_2 , considerando a área e duração do ensaio (0,0165 m^2 e 7 dias).

Tabela 24 – Teor de amido na lemna por condição e ensaio.

Condição	Taxa acúmulo de amido ($\text{g.m}^{-2}.\text{d}^{-1}$)
A - [CO_2] atm	0,11 ^a
B - [CO_2] elevada	0,73 ^b

Xiao et al. (2013) apresenta uma taxa de acúmulo de amido de 0,55 $\text{g.m}^{-2}.\text{d}^{-1}$ para o cultivo de *Landoltia OT* com escassez de nutrientes, menor do que a condição B do presente estudo. Nesse caso, a produtividade de bioetanol a partir das lemnas enriquecidas com amido pelo CO_2 seria maior do que as com privações de nutrientes.

A questão-chave deste estudo é que a taxa de crescimento e o acúmulo de amido são diretamente proporcionais. Xu et al. (2011) cita que a produtividade de biomassa de lemnas para produção de bioetanol pode ser muito elevada, podendo produzir 50% a mais do que o etanol à base de milho.

O acúmulo de amido na lemna simultâneo a elevadas velocidades de crescimento das mesmas se mostra uma potencial vantagem especialmente para as lemnas usadas no tratamento de efluentes, pois poderia remover eficientemente nutrientes e enquanto é enriquecida com amido para produção de bioetanol.

6 CONCLUSÃO

A partir da técnica de enriquecimento de CO₂, concluiu-se os seguintes tópicos sobre os efeitos de elevadas concentrações de CO₂ em lemnas (*Landoltia punctata*):

- a biomassa exposta a elevadas concentrações de CO₂ (condição B) obteve um teor de amido em média quatro vezes superior do que as expostas às condições atmosféricas (condição A) (10,2% e 2,6% p/p base seca, respectivamente). O valor máximo de amido foi de 14,9% (p/p base seca) para condições enriquecidas de CO₂.
- o aporte de CO₂ estimulou um crescimento superior da biomassa de lemnas, registrando-se uma Velocidade de Crescimento Relativo (VCR) 3,0 vezes maior (9,0 g.m⁻².dia⁻¹ em relação a 3,0 g.m⁻².dia⁻¹), bem como uma Velocidade de Crescimento Específico (VCE) 2,3 vezes maior do que em relação ao cultivo padrão atmosférico (0,13 g.g⁻¹.dia⁻¹ e 0,06 g.g⁻¹.dia⁻¹);
- houve alterações significativas na morfologia e sanidade da biomassa de lemnas expostas a elevadas concentrações de CO₂, visto que as mesmas apresentaram frondes com uma coloração amarelada e com tamanho duas vezes maior, assim como triplicaram o comprimento das raízes;
- as lemnas enriquecidas com amido podem elevar o potencial de valorização do tratamento de efluentes e desenvolvimento da economia circular através da produção de bioetanol;
- quando comparado às técnicas de acúmulo de amido por outras técnicas, como inanição de nutrientes e fatores limitantes de cultivo, o enriquecimento de CO₂ apresentou uma velocidade de crescimento maior, porém o teor de amido resultou em valores menores.

6.1 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Repetir o experimento com condições semelhantes, mantendo a temperatura e as diferentes concentrações de CO₂ testadas constantes ao longo do tempo.
- Viabilizar reposição do meio de cultura durante os ensaios para evitar possíveis estresses às lemnas.

- Testar diferentes meios de cultura que permitam uma elevada velocidade de crescimento sem ocasionar fatores estresse às lemnas.
- Analisar a correlação entre diferentes concentrações de CO₂ e outras condições ambientais (temperatura e luminosidade, por exemplo) nos resultados de acúmulo de amido e velocidade de crescimento.
- Desenvolver maneiras de aplicar a tecnologia em escala piloto e real, podendo se basear na técnica FACE.
- Realizar uma análise de custo comparativa do ciclo de vida, desde a implantação até operação entre as tecnologias de escassez de nutrientes e enriquecimento de CO₂ associado à economia circular.
- Avaliar comparativamente a produtividade de bioetanol para métodos de acúmulo de amido por inanição de nutrientes e por enriquecimento de CO₂.

REFERÊNCIAS

ALAERTS, G.; MAHBUBAR, R.; KELDERMAN, P. Performance analysis of a full-scale duckweed-covered sewage lagoon. **Water Research**, v. 30, n. 4. 1996. p. 843-852.

ANA – AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS. 2011. Informações sobre recursos hídricos. Disponível em: <<http://www3.snirh.gov.br/portal/snirh>>. Acesso em: 09 fev. 2017.

ANA – AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS. **Panorama da Qualidade das Águas Superficiais do BRASIL**. 2012. Brasília 264 p. Disponível em: <<http://arquivos.ana.gov.br/institucional/sge/CEDOC/Catalogo/2012/PanoramaAguasSuperficiaisPortugues.pdf>> Acesso em: 11 set. 2016.

ANDERSEN, H., et al. Growth, photosynthesis and photorespiration of *Lemna gibba*: response to variations in CO₂ and O₂ concentrations and photon flux density. **Photosynthesis Research**, v. 6, n. 1, 1985. p. 87-96.

ANDRADE, D. F; OGLIARI, P. J. **Estatística para ciências agrárias e biológicas: com noções de experimentação**. Editora da UFSC. Florianópolis, SC. 438 p. 2007.

APG II (2003). The Angiosperm Phylogeny Group. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 141, p. 399-436, Abr. 2003.

APG III (2009). The Angiosperm Phylogeny Group. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 161, p. 105-121, Ago. 2009.

APHA (American Public Health Association); AWWA (American Water Works Association); WEF (Water Environment Federation). **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 20th Edition, 2005.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 10520**: informação e documentação: citações em documentos: apresentação. Rio de Janeiro, 2002. 7 p.

_____. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 24 p.

_____. **NBR 6028**: informação e documentação: resumo: apresentação. Rio de Janeiro, 2003. 2 p.

BACH, Albert Otto. **Avaliação de Lagoas de Lemnas no Polimento de Efluentes e na Fixação de CO₂**. 2013. 86 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Curso de Engenharia Sanitária e Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

BARÃO, Luigi Zanatta. **Avaliação Inicial de Lagoas de Lemnas com Chicanas na Remoção de DQO e Fósforo de Efluentes Domésticos e na Fixação de CO₂**. 2014. 79 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Curso de Engenharia Sanitária e Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.

BARÉA, Luis César; ALEM SOBRINHO, Pedro. Comportamento de lagoa de polimento na região metropolitana de Curitiba e possibilidade de uso de lentilhas d'água para melhoria da qualidade do efluente. In: CONGRESSO INTERAMERICANO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 30, 2006, Punta del Este. Associação Interamericana de Engenharia Sanitária e Ambiental. Punta del Este: AIDIS. 2006. p. 01 - 17.

BARRETO, L. V.; FREITAS, A. C. S.; PAIVA, L. C. Sequestro de Carbono. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v. 5, n. 07, p.1-10, out. 2009. Semestral. Publicado por: Centro Científico Conhecer. Disponível em: <<http://www.conhecer.org.br/enciclop/2009/sequestro.pdf>>. Acesso em: 08 set. 2016.

BASTOS, R. K.X. 2003. **Utilização de esgotos tratados em fertirrigação, hidroponia e piscicultura**. Rio de Janeiro: ABES, RiMa, 2003. 267p. Projeto PROSAB.

BASTOS, V. D. Etanol, alcoolquímica e biorrefinarias. Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social Setorial, Rio de Janeiro, n. 25, p. 5-38, 2007.

BERGMANN, B. A. et al. Nutrient removal from swine lagoon effluent by Duckweed. **Transactions of the ASAE**, v. 42, n. 2, p. 263-269. 2000.

BRASIL. Constituição (1988). **Constituição da República Federativa do Brasil**. Brasília, DF: Senado, 1988.

_____. Ministério de Minas e Energia. Petrobras. **Biocombustíveis: 50 perguntas e respostas sobre este novo mercado**. Rio de Janeiro: Petrobrás, 2007. 46 p. Disponível em: <https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/matprima1_000g7pctcc02wx5ok0wtedt32e6jis7.pdf>. Acesso em: 11 set. 2016.

BROOKHAVEN FACE RESEARCH (Estados Unidos). Brookhaven National Laboratory (Org.). The FACE Program. 2006. Disponível em: <<https://www.bnl.gov/face/faceprogram.asp>>. Acesso em: 10 set. 2016.

BRUGNAGO, Natália. **Avaliação de Lagoas de Lemnas (*Landoltia punctata*) para o Polimento de Esgoto Sanitário e Fixação de Gás Carbônico**. 2014. 134 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.

BUNCE, James A. Limitations to soybean photosynthesis at elevated carbon dioxide in free-air enrichment and open top chamber systems. **Plant Science**, Estados Unidos, Set. 2014. p. 131-135.

CAICEDO, J. R. **Effect of Operational Variables on Nitrogen Transformations in Duckweed Stabilization Ponds**. 2005. 163 f. Tese (Doutorado). Wageningen University. Delft, The Netherlands, 2005.

CASTILHOS JÚNIOR, Armando Borges de. **Trabalho de Conclusão de Curso em Engenharia Sanitária e Ambiental II**. Florianópolis: UFSC, Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, 2017. 11 p. (Apostila da disciplina ENS 5171. Semestre 2017.1).

CERNA, César Enrique Leytón. **Degradação da amônia em Efluentes com Ácido de Caro**. 2008. 102 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais e Metalurgia. Pontifícia Universidade Católica de Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

CHAVES, Maria Cecília de Carvalho; GOMES, Carlos Francisco Simões. Avaliação de biocombustíveis utilizando o apoio multicritério à decisão. **Produção**, [s.l.], Fap UNIFESP (SciELO), 2013. p. 495-507.

CHEN, Q., et al. Improving production of bioethanol from Duckweed (*Landoltia punctata*) by pectinase pretreatment. **Energies**, v. 5, 2012. p. 3019-3032.

CHENG, J. J., et al. Nutrient recovery from swine lagoon water by *Spirodela punctata*. **Bioresource Technology**, ed. Elsevier, v. 81, 2002a. p. 81-85.

_____. Nutrient removal from swine lagoon liquid by *Lemna minor* 8627. **Transactions of the ASAE**, v. 45, 2002b. p. 1003-1010.

CHENG, J. J.; STOMP, A. M. Growing duckweed to recover nutrients from wastewaters and for production of fuel ethanol and animal feed. **Clean: Soil Air Water**, v. 37, 2009. p. 17-26.

COOK, C. D. K. Aquatic Plant Book. **The Hague**. SPB Academic Publishers, 1990.

COSTA, Flávia Nunes. **Valorização de Landoltia punctata proveniente de tratamento de esgoto doméstico através de hidrólise enzimática visando a produção de etanol**. 2014. 103 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York: Columbia University Press, 1981.

CROSS, J. W. **The charms of duckweed**. 2006. Disponível em: <<http://www.mobot.org/jwccross/duckweed/duckweed.htm>> Acesso em: Fev. 2015.

CUI, W. H. et al. Starch accumulation in duckweed for bioethanol production. **Biol Eng**, v. 3, 2011. p. 187–197.

CUI, W.; CHENG, J. J. Growing duckweed for biofuel production: a review. **Plant Biology**, German Botanical Society and The Royal Botanical Society of the Netherlands, v. 17(1), 2015. p. 16-23.

DRIEVER, S. M.; EGBERT, V. N. H.; ROJACKERSR, M. M. Growth limitation of *Lemna minor* due to high plant density. **Aquat. Bot.**, v. 81, n. 3, 2005. p. 245-251.

EL HALOUANI, H., PICOT, B., CASELLAS, C., PENA, G., BONTAUX, J. Elimination de l'azote et du phosphore dans un lagunage à haut rendement. *Revue des Science de l'Eau*, N° 6, p. 47-61, 1993.

EL-SHAFI, S. A et al. Nutrient Recovery from domestic wastewater using a UASB-duckweed ponds system. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 4, p. 798-807, Mar. 2007.

ENGLER, Adolf. **Vergleichende Untersuchungen über die morphologischen Verhältnisse der Araceae**. 4. ed. Dresden: Nova Acta, Der Ksl. Leop. Carol - Deutschen Akademie der Naturforscher, 1877. v. 39, n. 3, p. 159-232.

ESHEL, A.; BEER, S. Inorganic carbon assimilation by *Spirodela polyrrhiza*. **Hydrobiologia**, Israel, v. 131, n. 2, p.149-153, jan. 1986. Springer Nature.

ESTEVEZ, F. A. **Fundamentos da limnologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Interciência, 1998.

FANGMEIER, A. et al. Design and performance of a new FACE (free air carbon dioxide enrichment) system for crop and short vegetation exposure. **Environmental And Experimental Botany**, ed. Elsevier BV, [s.l.], v. 130, Out. 2016. p. 151-161.

FERREIRA, S. C. Sequestro de Carbono. **Folha biológica 4** (Edição especial 2-3): 3. 2013.

FIGUEIRÊDO, M. C. B. de, et al. Avaliação da vulnerabilidade ambiental de reservatórios à eutrofização. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, Rio de Janeiro, v. 12, n. 4, p. 399-409, out./dez. 2007. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/esa/v12n4/a06v12n4.pdf>>. Acesso em: 08 set. 2016.

GE, X., et al. Growing Lemna minor in agricultural waste water and converting the duckweed biomass to etanol. **Bioresource Technology**, v. 124, Nov. 2012. p. 485–488.

GIJZEN, H.; KHONDKER M. **An overview of the ecology, physiology, cultivation and application of duckweed**: literature review. Report of Duckweed research Project, Dhaka, Bangladesh, 1997.

GIJZEN, H. J. Low cost wastewater treatment and potentials for reuse: a cleaner production approach to wastewater management. In: **proceedings International symposium on low cost wastewater treatment and re-use**. Cairo, Egypt, February 3-4. 2001.

GIORDANO, Gandhi. Tratamento e Controle de Efluentes Industriais. **Revista Abes**, Rio de Janeiro, v. 4, n. 76, Ago. 2004. p. 1-81.

HENDREY, G.R. et al. A free-air enrichment system for exposing tall forest vegetation to elevated atmospheric CO₂. **Global Change Biology**, v. 5, Mar. 1999. p. 293-309.

HILLMAN, W. S. The Lemnaceae, or duckweeds. **Bot. Rev.** v. 27, 1961. p. 221-287.

HUANG, Mengjun; et al. Proteomic analysis to investigate the high starch accumulation of duckweed (*Landoltia punctata*) under nutrient starvation. **Industrial Crops And Products**, ed. Elsevier BV, v. 59, China, Ago. 2014. p. 299-308.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Dados sobre o saneamento básico no Brasil. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>> Acesso em: Nov. 2016.

IQBAL, Sascha. Duckweed Aquaculture: Potentials, Possibilities and Limitations for Combined Wastewater Treatment and Animal Feed Production in Developing Countries. **SANDEC**. Report n. 6/99, ed. Duebendorf: Department Of Water & Sanitation In Developing Countries, EAWAG/ SANDEC, Switzerland, n. 6, 1999. 89 p.

ISO 20079. Water quality – Determination of the toxic effect of water constituents and waste water on duckweed (*Lemna minor*) – Duckweed growth inhibition test. Normalization, ISO 20079:2005(E). 23 p. First edition, Nov. 2005.

JORDÃO, Eduardo Pacheco; PESSÔA, Constantino Arruda. **Tratamento de esgotos domésticos**. 3. ed. Rio de Janeiro: Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental – Abes, 1995. 720 p.

KEYWORDSUGGEST.ORG. Imagens sobre a temperatura de cores na escala Kelvin. Disponível em: <<http://keywordsuggest.org/gallery/1322430.html>>. Acesso em: 06 Mai. 2017

KÖRNER, S.; VERMAAT, J. E; VEENSTRA, S. The effect of pH variation at the ammonium/ammonia equilibrium in wastewater and its toxicity to *Lemna gibba*. **Aquatic Botany**, v. 71, 2001. p. 71-78.

LALAU, Cristina Moreira. **Uso de Macrófitas Lemnáceas como Organismos - Teste em Avaliações Toxicológicas**. 2010. 72 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Curso de Engenharia Sanitária e Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

LALAU, Cristina Moreira. **Avaliação da toxicidade de nanopartículas de óxido de cobre através de macrófitas da espécie *Landoltia punctata***. 2014. 114 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.

LANDESMAN, L. et al. Modeling Duckweed Growth In Wastewater Treatment Systems. *Livestock Research for Rural Development*. 17 (6). 2005.

LANDOLT, E. Distribution of the family Lemnaceae in North Carolina. **Veröffentlichungen des Geobotanischen Institutes**, Stiftung Rubel, Zürich, v. 77, 1981. p. 112-148.

LANDOLT, E.; KANDELER, R. **The Family Lemnaceae – A monographic study: Morphology, karyology, ecology, geographic distribution, systematic position, nomenclature, descriptions.** Veröffentlichungen des Geobotanischen Institutes, Stiftung Rubel, Zürich, v. 1, 1986, 566 p.

LANDOLT, E.; KANDELER, R. **The family of Lemnaceae – A monographic study: Phytochemistry, physiology, application, bibliography. Biosystematic investigation the family of duckweeds.** Veröffentlichungen des Geobotanischen Institutes, Stiftung Rubel, Zürich, v. 2, 1987. 638 p.

LENG, R. A.; STAMBOLIE, J. H.; BELL, R. Duckweed – A potencial high-protein feed resource for domestic animals and fish. AAAP Conf. Proc. Bali, 1995.p.103-114.

LENG, R. A. **Duckweed - a tiny aquatic plant with enormous potential for agriculture and environment.** FAO Animal Production and Health Paper. 231p. 1999.

LES D. H., CRAWFORD, D. J. *Landoltia* (Lemnaceae), a New Genus of Duckweeds. **Journal for Botanical Nomenclature**, v. 9, n. 4, 1999. p. 530-533.

LI, Y. et al. Positive effects of duckweed polycultures on starch and protein accumulation. **Bioscience Reports**, Portland Press Ltd., [s.l.], v. 36, n. 5, 11 ago. 2016. p. 1-7.

LYERLY N. C. **Swine Wastewater Treatment In an Integrated System of Anaerobic Digestion and Duckweed Nutrient Removal: Pilot Study.** 2004. 97 f. Dissertação (Mestrado) – US North Carolina State University, North Carolina, 2004.

MANOCHIO, Carolina. **Produção de bioetanol de cana-de-açúcar, milho e beterraba: uma comparação dos indicadores tecnológicos, ambientais e econômicos.** 2014. 35 f. TCC (Graduação) – Curso de

Engenharia Química, Universidade Federal de Alfenas, Campus Poços de Caldas, Minas Gerais, 2014.

MATOS, A., et al. Capacidade extratora de plantas em sistemas alagados utilizados no tratamento de águas residuárias de laticínios. **121 Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. Campina Grande, v. 12, n. 14, Set. 2010. p. 1311-1317.

MELCHIOR, H.; WERDERMANN, E. Engler's Syllabus der Pflanzenfamilien. **Gebr. Bornträger**, Berlin, v. 2, 1964. p. 596-598.

METCALF & EDDY. Wastewater engineering: treatment and reuse. Tchobanoglous G. and Burton F. L [eds.]. 4.ed. New York: McGraw-Hill, Inc., USA. 2003. 1819 p.

MOHEDANO, Rodrigo de Almeida. **Tratamento de efluente e produção de alimento, em cultivos de tilápias (*Oreochromis niloticus*), através da macrófitas aquática *Lemna valdiviana* (Lemnaceae) – Uma contribuição para a sustentabilidade da aquíicultura**. 2004. 52 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Aquíicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004.

MOHEDANO, Rodrigo de Almeida. **Uso de macrófitas Lemnáceas (*Landoltia punctata*) no polimento e valorização do efluente de suinocultura e na fixação de carbono**. 2010. 270 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

MOHEDANO, Rodrigo de Almeida, et al. High nutrient removal rate from swine wastes and protein biomass production by full-scale duckweed ponds. **Bioresource Technology**, ed. Elsevier, v. 112, 2012. p. 98-104.

MOHEDANO, Rodrigo de Almeida; COSTA, Rejane H. R.; BELLI FILHO, Paulo. Effects of CO₂ concentration on nutrient uptake and starch accumulation by duckweed used for wastewater treatment and bioethanol production. **Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Alga**, Sociedad Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal, v. 7, n. 1, 2016. p. 30-41.

MOTA, Francisco Suetônio Bastos; VON SPERLING, Marcos (Coord.). Programa de Pesquisa em Saneamento Básico – PROSAB – Edital 05. **Nutrientes de esgoto sanitário: utilização e remoção**. Tema 2: Esgoto. Rio de Janeiro: ABES, 2009. 428 p. Disponível em: <https://www.finep.gov.br/images/apoio-e-financiamento/historico-de-programas/prosab/prosab5_tema_2.pdf>. Acesso em: 05 out. 2016.

MULLER, P.; FELLER, U.; ERISMENN, K. H. Eifluss Verschiedener CO₂-Konzentrationen auf Wachstum vom *lemna minor*. **Z. Pflanzenfisiologie**, v. 85, 1977. p. 233-241.

MURADOV, Nazim et al. Dual application of duckweed and azolla plants for wastewater treatment and renewable fuels and petrochemicals production. **Biotechnology For Biofuels**, [s.l.], Springer Nature, v. 7, n. 1, 2014. p. 7-30.

NASSAR, Silvia M., WRONSCKI, Vilson R., OHIRA, Masanao et al. SEstatNet - Sistema Especialista para o Ensino de Estatística na Web. Florianópolis - SC, Brasil. Disponível em: <http://sestatnet.ufsc.br>. Acesso em: 16 de jun. 2017.

NOZAILY, A. F. ALAERTS, G., VEENSTRA, S. Performance of duckweed-covered sewage lagoon - Oxygen balance and cod removal. **Water. Research**. 34, (10): 2727-2733, 2000.

OECD – ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **Guidelines for Testing Chemicals (2000): Lemna sp. Growth Inhibition Test**. Proposal for a new guideline 221, draft document, April 2004.

ONU – ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS. Dispõe sobre o direito humano à água e ao saneamento. Resolução n. 64/292, de 28 de julho de 2010. **Assembleia Geral da Organização das Nações Unidas**, 28 jul. 2010. 64ª sessão. Agenda item 48. Disponível em: <www.un.org/ga/search/view_doc.asp?symbol=A/RES/64/292>. Acesso em: 11 set. 2016.

ORON, G., PORATH D. & JANSEN, H. Performance of duckweed species *Lemna gibba* on municipal waste water for effluent renovation and protein production. **Biotechnology & Bioengineering**, v. 29, n. 2, 1987. p. 258-268.

PARANÁ. SOLANO, Martins Aquino. (Org.). Instituto Brasileiro de Florestas. 2014. Disponível em: <<http://www.ibflorestas.org.br/blog/sequestro-de-carbono/>>. Acesso em: 10 set. 2016.

OLIVEIRA, M., et al. Potential of Duckweed for Swine Wastewater Nutrient removal and Biomass Valorisation through Anaerobic Co-digestion, **Journal of Sustainable Development of Energy, Water and Environment Systems**, v. 5(2), 2017. p 127-138.

PORATH, D., POLLOCK, J. Ammonia stripping by duckweed and its feasibility circulating aquaculture. **Aquat. Bot.**, v. 13, 1982.p. 125-131.

PORTAL DA ENERGIA. Principais tipos de biocombustível. Disponível em: <<http://portaldenergia.com/o-que-e-biocombustivel/>>. Acesso em: 11 set. 2016.

POTT, Vali Joana; CERVI, Armando Carlos. A família Lemnaceae Gray no Pantanal (Mato Grosso e Mato Grosso do Sul), Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 22, n. 02, Ago. 1999.

PRESTES, Maria Elice Brzezinski; OLIVEIRA, Patrícia; JENSEN, Gerda Maísa. As origens da classificação de plantas de Carl von Linné no ensino de biologia. **Filosofia e História da Biologia**, São Paulo, v. 4, p.101-137, 2009.

PRIYA. A; AVISHEK, K.; PATHAK, G. Assessing the potentials of *Lemna minor* in the treatment of domestic wastewater at pilot scale. **Environmental Monitoring and Assessment**. v. 184, n. 7, 2012. p. 4301–4307.

RIDESA – Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro. Disponível em: <http://www.ridesa.com.br/>. Acesso em: 08 jan. 2017.

RODRÍGUEZ , L.; PRESTON, T. R. **Productive use of livestock wastes: a manual for the use of biodigester effluent and ponds for duckweed production**. Vietnam: FAO Organization, University of Tropical Agriculture Foundation, v. 1, 12 p. 1997.

SIS – Swedish Standards Institute: Water quality – Determination of growth inhibition (7-d) *Lemna minor*, duckweed. SS 02 82 13. (in Swedish), 1995, 15 p.

SKILLICORN, P. W.; SPIRA, W; JOURNEY, W. **Duckweed aquaculture, a new aquatic farming system for developing countries**. The World Bank, Washington, D.C.1993.

SMITH. V. H.; TILMAN, G. D.; NEKOLA, J. C. Eutrophication: impacts of excess nutrient inputs on freshwater, marine, and terrestrial ecosystems. **Environmental Pollution**, n. 100, p. 179-196, 1999.

SNIS (Brasil). Ministério das Cidades. Secretaria Nacional de Saneamento Ambiental. **Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento: Diagnóstico dos Serviços de Água e Esgoto – 2015**. Brasília, DF: SNSA/MCIDADES, 2017. 212 p.

SOUSA, V.P., CHERNICHARO, C.A.L.. **Sistema compacto de tratamento de esgotos domiciliares composto de tanque séptico modificado e reatores anaeróbios híbridos operando em série**. In: Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, 23., 2005, Campo Grande. Anais... . Campo Grande: ABES, 2005. p. 1 - 8.

SOUTO, Luciana Reis Fontinelle. **Valorização Biotecnológica de *Landoltia punctata* com Vistas a uma Produção de Etanol**. 2016. 161 p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.

STEVENS, P. F. (Comp.). Angiosperm Phylogeny Website: Alismatales. (2001 onwards). Version 12, 2012. Disponível em: <<http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/welcome.html>>. Acesso em: 05 out. 2016.

SREE, K. S.; APPENROUTH, K. J. Increase of starch accumulation in the duckweed *Lemna minor* under abiotic stress. **Albanian Journal of Agricultural Sciences**, Agricultural University of Tirana, ed. especial. 2014. p. 11-14.

SREE, K. Sowjanya et al. Natural variance in salt tolerance and induction of starch accumulation in duckweeds. **Planta**, Heidelberg, Berlin, v. 241, n. 6, p.1395-1404, 19 fev. 2015. Springer Nature

TAO, X. et al. Comparative transcriptome analysis to investigate the high starch accumulation of duckweed (*Landoltia punctata*) under nutrient starvation. *Biotechnology for Biofuels*, v. 72, n. 6, 2013.

TAVARES, Flávia de Almeida. **Eficiência da *Lemna sp* no tratamento de efluentes de suinocultura e sua utilização como fonte alternativa de alimento para tilápias.** 2004. 106 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004.

TAVARES, Flávia de Almeida. **Reuso de água e polimento de efluentes de lagoas de estabilização por meio de cultivo consorciado de plantas da família lemnaceae e tilápias.** 2008. 260 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

TELES, Camila Cassuly. **Avaliação de lagoas de lemnas para o polimento de esgoto doméstico com foco na microbiota associada.** 2016. 135 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.

TONON, Gustavo. **Avaliação de lagoas de lemnas para o polimento de esgoto doméstico: emissões de GEE e valorização de biomassa na produção de biometano.** 2016. 154 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.

REGINA, Murillo de Abulquerque. trocas gasosas em vitis vinifera sob regime de estresse hídrico. *Pesq, agropec. bras.*, Brasília, v.32, n.6, p.579-584, jun. 1997

UNIVERSIDADES FEDERAIS (Org.). Brasil ajuda EUA a cumprir meta de utilização de biocombustíveis avançados. Universidade Federal de Goiás. Disponível em: <<https://ridesa.agro.ufg.br/n/41080-brasil-ajuda-eua-a-cumprir-meta-de-utilizacao-de-biocombustiveis-avancados>>. Acesso em: 11 set. 2016.

VIEIRA, Branda. **Remoção de nutrientes de efluentes líquidos através de lagoas de lemnas com chicanas.** 2013. 58 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Curso de Engenharia Sanitária e

Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

VON SPERLING, M. **Princípios do tratamento biológico de águas residuárias – Introdução à Qualidade das Águas e ao Tratamento de esgotos**. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, Universidade Federal de Minas Gerais, v.1, 240 p. 1995.

VON SPERLING, Marcos. **Lagoas de Estabilização: princípios do tratamento biológico de águas residuárias**. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, Universidade Federal de Minas Gerais, 2. ed., 196 p. 1996.

VON SPERLING, M.. **Lagoas de estabilização**. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, Universidade Federal de Minas Gerais, 196 p. 2002.

VON SPERLING, M.. **Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos**. v.3. Belo Horizonte: Depto. De Engenharia Sanitária e Ambiental; Universidade Federal de Minas Gerais. 452p. 2009.

XIAO, Yao et al. Culturing duckweed in the field for starch accumulation. **Industrial Crops And Products**, ed. Elsevier BV, PR China, n. 48, Jul. 2013. p. 183-190.

XU, Jiele et al. Production of high-starch duckweed and its conversion to bioethanol. **Biosystems Engineering**, [s.l.], ed. Elsevier BV, v. 110, n. 2, Out. 2011. p. 67-72.

XU, Jiele et al. The production of duckweed as a source of biofuels. **Biofuels**, [s.l.], v. 3, n. 5, Set. 2012. p. 589-601.

YIN, Yehu et al. The influence of light intensity and photoperiod on duckweed biomass and starch accumulation for bioethanol production. **Bioresource Technology**, v. 187, 2015. p. 84–90.

YU, Chang Man. **Sequestro Florestal do Carbono no Brasil: dimensões políticas, socioeconômicas e ecológicas**. São Paulo: Annablume, 2004.

ZHAO X. et al. Enzymatic saccharification of duckweed: biomass without thermophysical pretreatment. **Biomass and Bioenergy**, v. 47, 2012, p. 354-361,

ZHANG, S. et al. Impact of aquaculture on eutrophication in Changshou Reservoir. **Chinese Journal of Geochemistry**, China, n. 25, v. 1, p. 90-96, 2006.

ZHANG, Guoyou et al. The effects of free-air CO₂ enrichment (FACE) on carbon and nitrogen accumulation in grains of rice (*Oryza sativa L.*). **Journal Of Experimental Botany**, ed. Elsevier, China, p. 3179-3188, 2013.

ZIMMO, O. R.; ALSAED R. M.; STEEN N. P. GIJZEN H. Nitrogen mass balance across pilot scale algae and duckweed-based wastewater stabilization ponds. **Water Research**, v. 38, 2004. p. 913-920.

APÊNDICES

APÊNDICE A – TEMPERATURAS MÉDIAS DIÁRIAS

Tabela 1 – Temperaturas médias diárias do Ensaio 1.

Data	Médias diárias T(°C)		
	6	2	4
11/abr	32,4	32,4	33,6
12/abr	30,5	30,6	32,6
13/abr	33,2	33,2	34,4
14/abr	32,5	32,3	34,3
15/abr	32,7	33,2	34,7
16/abr	31,4	31,3	33,6
17/abr	30,3	30,5	31,9
18/abr	29,3	30,0	31,6
média semanal	31,5	31,7	33,3
desvio padrão	1,4	1,3	1,2

Figura 1 – Temperaturas médias diárias do Ensaio 1.

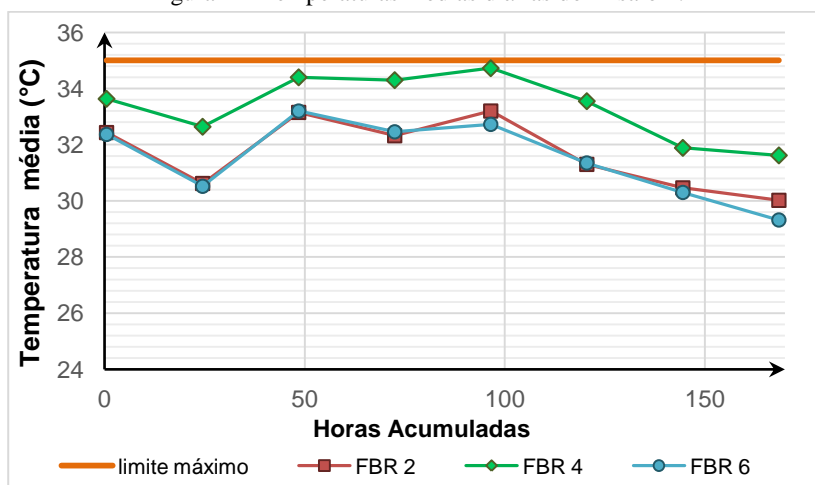


Tabela 2 – Temperaturas médias diárias do Experimento 2.

Data	Médias diárias T(°C)					
	2	4	6	1	3	5
27/abr	26,7	26,9	26,7	26,0	26,3	26,2
28/abr	27,3	27,7	27,1	26,9	26,8	26,6
29/abr	29,8	30,9	28,7	29,5	29,2	27,8
30/abr	29,9	30,2	28,7	29,0	29,3	27,8
01/mai	29,4	30,1	28,3	28,9	29,0	27,5
02/mai	29,0	29,6	28,4	28,7	28,5	28,0
03/mai	30,6	31,2	29,7	30,4	30,1	29,1
04/mai	31,9	32,1	30,6	30,6	31,4	29,5
média semanal	29,3	29,8	28,5	28,7	28,8	27,8
desvio padrão	1,7	1,8	1,3	1,6	1,6	1,1

Figura 2 – Temperaturas médias diárias do Ensaio 2.

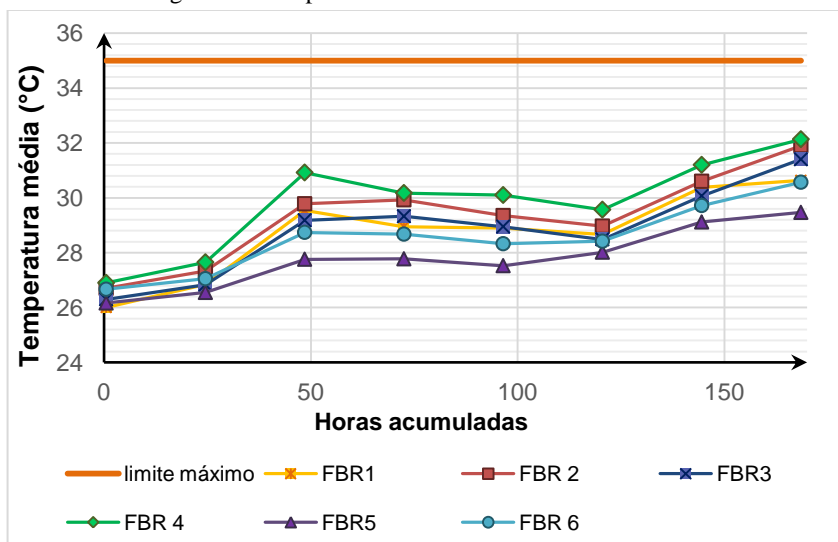
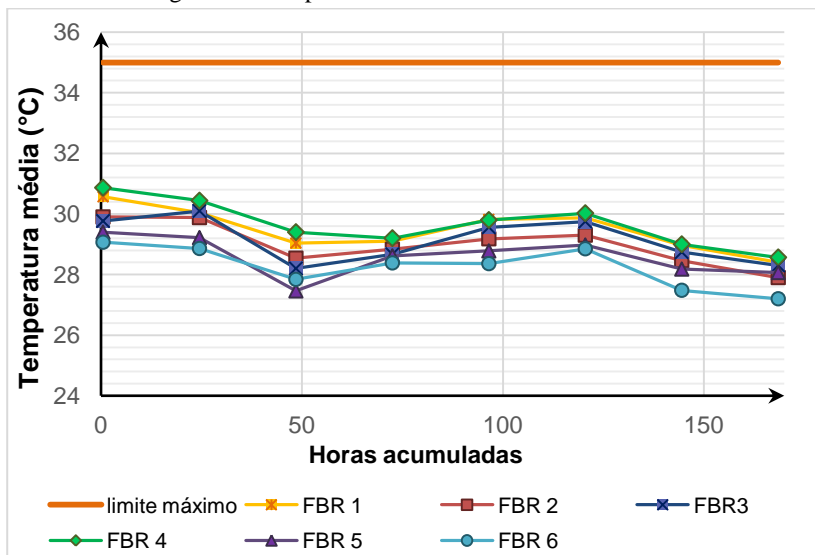


Tabela 3 – Temperaturas médias diárias do Ensaio 3.

Data	Médias diárias T(°C)					
	2	4	6	1	3	5
09/mai	29,9	30,9	29,1	30,6	29,8	29,4
10/mai	29,9	30,4	28,9	30,0	30,1	29,2
11/mai	28,5	29,4	27,8	29,0	28,2	27,5
12/mai	28,8	29,2	28,4	29,1	28,7	28,6
13/mai	29,2	29,8	28,4	29,8	29,6	28,8
14/mai	29,3	30,0	28,9	29,9	29,8	29,0
15/mai	28,5	29,0	27,5	29,0	28,7	28,2
16/mai	27,9	28,6	27,2	28,4	28,3	28,1
média semanal	29,0	29,7	28,3	29,5	29,1	28,6
desvio padrão	0,7	0,8	0,7	0,7	0,7	0,6

Figura 3 – Temperaturas médias diárias do Ensaio 3.



APÊNDICE B – MONITORAMENTO pH

Tabela 1 – pH do meio de cultura inicial.

FBR	pH do meio de cultura inicial		
	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3
todos	6,06	6,14	6,15

Tabela 2 – pH do meio de cultura final.

FBR	pH do meio de cultura final		
	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3
1	7,05	7,76	7,37
2	7,68	7,13	7,18
3	6,86	7,74	7,16
4	8,59	8,02	7,22
5	7,23	7,8	7,13
6	7,03	7,81	7,38

Tabela 3 – pH médio do meio final.

Condição	FBR	pH médio do meio final		
		Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3
A – [CO₂] atm	2	7,77	7,65	7,26
	4			
	6			
B – [CO₂] elevada	1	7,05	7,77	7,22
	3			
	5			

APÊNDICE C – AVALIAÇÃO DA BIOMASSA

Tabela 1 – Avaliação da biomassa de lemnas nos dois níveis de CO₂.

Condição	CO₂ atm	CO₂ elevado
Peso inicial fresco (g)	7,0	7,0
Peso final fresco (g)	10,5	17,4
Umidade biomassa (%)	95,3	95,2
Ganho peso seco (mg)	152,0	488,0
VCE (g.g ⁻¹ .dia ⁻¹)	0,06	0,13
VCR (g.m ⁻² .dia ⁻¹)	9,0	3,0
Taxa de fixação de C (mg.m ² .h ⁻¹)	86	257

ANEXOS

ANEXO A – ANÁLISE DE AMIDO

Neste apêndice é apresentado o método de determinação de amido utilizando um Kit de Amido Total (Megazyme Internacional Irlanda Co., Ltd., Wicklow, Irlanda) de acordo com as instruções do fabricante.

Reagentes

- a) Kit de amido Megazyme, que contém os seguintes conteúdos nos seus seis frascos:
 - Frasco 1: α -amilase termoestável (10 mL);
 - Frasco 2: amilogucosidade (10 mL);
 - Frasco 3: reagente para tampão GOPOD (50 mL pH 7,4);
 - Frasco 4: enzimas reagentes GOPOD (glicose oxidase mais peroxidase liofilizado);
 - Frasco 5: solução padrão de D-Glicose (5 mL, de 1mg/mL);
 - Frasco 6: padrão (amido de milho -controle, 5g).
- b) Etanol 80%.
- c) Ácido acético glacial.
- d) Hidróxido de sódio 1M (4g/mL).
- e) Cloreto de cálcio di-hidratado.
- f) Ácido clorídrico.

Equipamentos

- a) Balança analítica.
- b) Centrífuga.
- c) Vórtex.
- d) Banho maria (50 °C).
- e) Banho de água fervente.
- f) Pipetas.
- g) pHmetro.
- h) Espectrofotômetro (510 nm).
- i) Tubos de vidro.
- j) Balão volumétrico (100 mL).

Preparo das soluções

- a) Tampão acetato de sódio (100 mM, pH 5,0): adicionar 5,8 mL de ácido acético glacial a 900mL de água destilada. Ajustar o pH para 5,0 por adição de solução de hidróxido de sódio 1 M (aproximadamente 30 mL são necessários). Adicionar 0,74 g de cloreto de cálcio di-hidratado e dissolver. Ajustar o volume para 1 L e armazenar o tampão a 4°C (estável durante 6 meses).
- b) Solução 1: Diluir 1,0 mL do conteúdo do frasco 1 a 30 ml do tampão acetato de sódio (100 mM, pH 5,0). Dividir em tamanho adequado de alíquotas e congelar a -20°C. Estável por 3 anos.
- c) Reagente GOPOD: 1) Diluir o conteúdo do frasco 3 para 1 L com água destilada (solução 3), seu uso deve ser imediato na próxima solução; 2) Dissolver o conteúdo do frasco 4 em 20 mL da solução 3 e transferir quantitativamente isso para o frasco contendo o restante da solução a 3. Cubra esta garrafa com folha de alumínio para proteger o reagente da luz. Estável por aproximadamente 3 meses a 2-5°C ou 12 meses a -20°C.
- d) Soluções 2, 5 e 6: utilizar como fornecidos.

Procedimentos

Determinação de amido em produtos que não contenham D-glicose de amido resistente e/ou maltodextrinas (Método Oficial AOC 996.11).

- a) Moer amostra de modo a passar por uma peneira de 0,5 mm.
- b) Adicionar 100 mg da amostra em tubo de ensaio de vidro. Bater no tubo para assegurar que todas as amostras caiam para a parte inferior do tubo.
- c) Adicionar 0,2 mL de solução aquosa de etanol (80% v/v) para auxiliar na dispersão e agitar no vórtex.
- d) Imediatamente adicionar 3 mL da Solução 1. Incubar o tubo em banho-maria fervente durante 6 minutos (agitar o tubo vigorosamente depois de 2, 4 e 6 minutos).
- e) Adicionar 0,1 mL do conteúdo do Frasco 2, agitar nos vórtex e incubar a 50°C durante 30 min.
- f) Transferir a totalidade do conteúdo do tubo de ensaio para um balão volumétrico de 100 mL. Use uma piceta para lavar o

conteúdo do tubo completamente. Ajuste o volume com água destilada. Misture bem. Centrifugar uma alíquota desta solução a 3000 rpm durante 10 min. Usar a parte límpida para o ensaio. Alternativamente, no passo 6, ajustar o volume para 10 mL com água destilada e, em seguida, centrifugar os tubos a 3.000 rpm por 10 min. Para as amostras contendo 1-10% de teor de amido, esta solução é utilizado diretamente no passo seguinte. Para as amostras contendo 10-100% 103 de amido, uma alíquota (1,0 mL) é diluída até 10 mL com água destilada antes de prosseguir para o passo seguinte.

- g) Transferir as alíquotas em duplicata (0,1 mL) da solução diluída, para os tubos de ensaio de vidro.
- h) Adicionar 3,0 mL do reagente GOPOD a cada tubo, incluindo o controle de D-glicose e o de reagentes em branco, e incubar os tubos a 50 °C durante 20 min. Controle consiste em 0,1 mL de solução padrão de D-glicose (1 mg/mL) e 3,0 mL de reagente GOPOD e o branco em 0,1 mL de água e 3,0 mL de reagente GOPOD.
- i) Leia a absorbância para cada amostra e o controle de D-glicose em 510 nm contra o reagente branco.

Cálculos

$$\text{Amido} = \Delta A \times F \times \frac{FV}{0,1} \times \frac{1}{1.000} \times \frac{100}{W} \times \frac{162}{180}$$

$$\text{Amido} = \Delta A \times \frac{F}{W} \times FV \times 0,9$$

Onde:

- ΔA = Absorbância (reação) lida contra o branco;
- $F = 100$ (**μg de D-glicose**) **absorbância para 100 μg de glicose** (conversão de absorbância para μg);
- FV = Volume final (isto é, igual a 100 mL ou 10 mL);
- 0,1= Volume da amostra analisada;
- $1/1.000$ = Conversão de μg para mg;
- $100/W$ = Fator que expressa amido como porcentagem do peso da amostra;
- W = Peso em mg da amostra analisada;
- $162/180$ = Ajuste de D-glicose livre para D-glicose anidro.