

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS ALIMENTOS**

ÂNGELO PAGGI MATOS

**POTENCIALIDADES DE *CHORELLA VULGARIS* CULTIVADA
EM MEIO À BASE DE CONCENTRADO DE
DESSALINIZAÇÃO**

Florianópolis
2012

ÂNGELO PAGGI MATOS

POTENCIALIDADES DE *CHORELLA VULGARIS* CULTIVADA EM
MEIO À BASE DE CONCENTRADO DE DESSALINIZAÇÃO

Dissertação submetida ao Programa de
Ciência dos Alimentos da
Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do Grau de
Mestre em Ciência dos Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Ermani S.
Sant'Anna

Florianópolis
2012

Catálogo na fonte elaborada pela biblioteca da
Universidade Federal de Santa Catarina

M433p Matos, Ângelo Paggi
Potencialidades de *Chlorella vulgaris* cultivada em meio
à base de concentrado de dessalinização [dissertação] /
Ângelo Paggi Matos ; orientador, Ernani Sebastião Sant'Anna. -
Florianópolis, SC, 2012.
115 p.: il., grafs., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-
Graduação em Ciência dos Alimentos.

Inclui referências

1. Ciência dos alimentos. 2. Tecnologia de alimentos. 3.
Biomassa. 4. Proteínas. 5. Lipídios. 6. Ácidos graxos. 7.
Dessalinização da água. 8. Microalga. I. Sant'Anna, Ernani
Sebastião. II. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos. III.
Título.

CDU 663

BREJO DO CAJUEIRO

Meu brejo chama-se cajueiro,
Ele fica lá em Propriá,
O Rio São Francisco passa por ele,
Querendo assorear.

Na caatinga tem vaqueiro,
No agreste o sertanejo,
Nele cresceu um menino,
Que se chama Sabiá.

Nas margens do Velho Chico,
Vejo a Grota de Angicos,
A caatinga me indica,
A cruz de Virgulino.

Nos brejões e calabouços,
Tomei cachaça com tira gosto,
Imaginei Lampião e Maria Bonita,
No maior governado do sertão.

Zabumba a noite toda,
Viola e triângulo no Cariri,
Baile catिंगoso,
Beatos e cangaceiros.

Ipueiras, oh meu Pai Ceará,
Mostrou-me o Brasil nordeste,
Arrasta a sandália, forró e xaxado,
Exu, Luiz Gonzaga, sanfonar.

(O autor)

AGRADECIMENTOS

Aos que contribuíram para a realização deste trabalho, meu sincero reconhecimento e agradecimento.

Ao Professor Dr. Ernani Sant'Anna, sábio, cientista.

À Dra Regina Torres, pelos “minutos de sabedoria”.

Ao grande amigo de trabalho Luiz Morioka, guiou-me com a estatística na hora certa.

À meu Pai Anastácio, exímio jogador.

À minha Mãe Geni, arte de amar.

À meu irmão André, homem sagaz.

À meu irmão Nego, violadas eternas.

À minha namorada, Daniela Bidone, pura sintonia.

Aos meus grandes amigos Sérgio Zarth, Fernando Garcia Guanabara e Steferson Stares (Tefo), pelos bate-papos memoráveis.

À galera do Laboratório de Biotecnologia de Alimentos da UFSC, convivência, descontração, amizade.

Aos meus amigos de trabalho Fábio e Carla pela contribuição nas correções de inglês.

Aos moradores do Sítio de Uruçu, São João do Cariri, Paraíba; que na simplicidade fiz roda de amigos.

À CAPES e CNPq pelo financiamento.

À Universidade Federal de Santa Catarina, o maior universo que tenho assistido.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, pela oportunidade.

RESUMO

MATOS, Ângelo Paggi. **Potencialidades de *Chlorella vulgaris* cultivada em meio à base de concentrado de dessalinização**. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis – SC.

O objetivo deste trabalho foi avaliar as propriedades físico-químicas da biomassa de *Chlorella vulgaris* em um meio à base de concentrado de dessalinização proveniente do processo de dessalinização de águas subterrâneas na comunidade de Uruçu, no município de São João do Cariri – Paraíba. O concentrado de dessalinização possui alta concentração de sais minerais (cloretos, carbonatos e bicarbonatos) que se reincorporado ao solo podem causar o fenômeno de eritrofização, erosão e salinização do solo. Por isso, diversas pesquisas têm sido realizadas de modo a encontrar soluções de reciclagem deste concentrado. Entre estas pesquisas, o cultivo de microalgas para a produção de biomassa com finalidade biotecnológica. O cultivo autotrófico de *Chlorella vulgaris* foi inicialmente mantido em Bold Basal Medium (BBM). Para fazer uso do concentrado de dessalinização, realizou-se a caracterização físico-química, determinada segundo metodologia descrita no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* - APHA (2005). Com a aplicação da Metodologia de Superfície de Resposta foi possível avaliar o efeito de três nutrientes: NaNO_3 , KH_2PO_4 e solução micronutriente nas concentrações estabelecidas pelo planejamento experimental. O meio de cultura proposto para maximizar a produção de biomassa de *Chlorella vulgaris* consistiu de $0,09 \text{ g L}^{-1}$ de NaNO_3 , $0,014 \text{ g L}^{-1}$ de KH_2PO_4 e $0,20 \text{ mL L}^{-1}$ de solução micronutriente. Otimizado, o novo meio de cultura serviu de base para realizar um cultivo contínuo em fotobiorreator, com o objetivo de avaliar os teores de proteína e lipídeos totais que resultaram em 43,0 % e 9,5 %, respectivamente. A espécie *Chlorella vulgaris* apresentou predominância em três ácidos graxos: ácido linolênico (C18:3n3c); ácido palmítico (C16:0) e ácido linoléico (C18:2n6c), cujas proporções foram de 20,9 %; 20,5 %; 18,8 %, respectivamente. Estes ácidos graxos têm entre 14 e 18 carbonos na cadeia, sendo predominantemente poli-insaturados (39,7 %), saturados (25,7 %) e monoinsaturados (14,0 %). Adiante, com o novo meio de cultura realizou-se um cultivo sucessivo em biorreatores cônicos, a fim de avaliar a capacidade de reuso da solução contendo concentrado de dessalinização. Quatro foram os ciclos de cultivo. Para cada ciclo de

cultivo, os valores de biomassa resultaram em 1º ciclo, 1,55 g L⁻¹; 2º ciclo, 0,96 g L⁻¹; 3º ciclo, 0,62 g L⁻¹ e 4º ciclo em 0,42 g L⁻¹. Neste trabalho foi observado que a biomassa de *Chlorella vulgaris* é fonte de ácidos graxos essenciais ω-3 e ω-6. Por fim, obteve-se um meio de cultivo alternativo e de baixo custo para o crescimento de *Chlorella vulgaris*.

Palavras-chave: concentrado de dessalinização; *Chlorella vulgaris*; biomassa; proteínas; lipídeos; ácidos graxos.

ABSTRACT

MATOS, Ângelo Paggi. **Potential of *Chlorella vulgaris* cultivated in medium based on concentrated desalination.** 2012. Dissertation (Master in Food Science). Federal University of Santa Catarina. Florianópolis – SC.

The aim of this study was to optimize a medium culture for the microalgae *Chlorella vulgaris* using the concentrate from desalination process of groundwater by reverse osmosis from a water desalination plant in the community of Uruçu, in São João do Cariri – Paraíba/Brazil. The desalination concentrate contains high mineral concentrations such as chlorides, carbonates and bicarbonates, which may increase the risk of soil salinization in the case of being reincorporated in the soil. Therefore, many studies have been performed in order to find solutions for recycling this waste. Autotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* was initially kept in Bold Basal Medium (BBM). In order to use the desalination concentrate, the physical-chemical parameters were determined according to the *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* – APHA (2005). The Response Surface Methodology was used in order to evaluate the effect of three nutrients: NaNO₃, KH₂PO₄ and micronutrient solution as determined by the experimental design. The culture medium proposed for maximizing the biomass production of *Chlorella vulgaris* consists of 0.09 g L⁻¹ of NaNO₃; 0.014 g L⁻¹ of KH₂PO₄ and 0.20 mL L⁻¹ of micronutrient solution. Once optimized, the new culture medium was used as the basis for performing a continuous cultivation in photobioreactors, in which the total protein and lipids resulted in 43 % and 9.5 %, respectively. The *Chlorella vulgaris* species produced, predominantly, three fatty acids: linolenic acid (C18:3n3c); palmitic acid (C16:0) and linolenic acid (C18:2n6c), whose contents were 20.9 %; 20.5 %; 18.8 %, respectively. These fatty acids present 14 to 18 carbons in the carbon chain, being mainly polyunsaturated (39.7 %), saturated (25.7 %) and monounsaturated (14.0 %). With the optimized culture medium, then, a continuous cultivation in bioreactors was carried out. After each cultivation period, the biomass was collected and the culture medium was used in the further cultivation cycles in order to evaluate the ability of reusing the solution containing the desalination concentrate. Four cultivation cycles were performed. The values of biomass resulted in 1^o cycle, 1.55 g L⁻¹; 2^o cycle, 0.96 g L⁻¹; 3^o cycle, 0.62 g L⁻¹ and 4^o cycle,

0.42 g L⁻¹. In this work, it was observed that the biomass of *Chlorella vulgaris* is a potential source of essential fatty acids ω-3 e ω-6. Finally, it was possible to obtain an alternative and low cost culture medium for the growth of *Chlorella vulgaris*.

Keywords: Concentrated desalination; *Chlorella vulgaris*; biomass; proteins; lipids; fatty acids.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1.1 Relação perfuração versus fraturas em terreno cristalino	26
Figura 1.2 Equipamento de dessalinização por osmose reversa, instalado pelo Laboratório de Referência em Dessalinização (LABDES) da Universidade Federal de Campina Grande – UFCG	28
Figura 1.3 Curva de crescimento de uma cultura microalgal em cultivo do tipo estacionário	33
Figura 1.4 Metabolismo entre as séries ω -6 e ω -3	40
Figura 1.5 <i>Chlorella vulgaris</i> observada ao microscópio óptico, com aumento de 400x	42

CAPÍTULO 2

Figura 2.1 Cultivos de <i>Chlorella vulgaris</i> em erlenmeyers de 500 mL	70
Figura 2.2 Gráficos de superfície de resposta da produção de biomassa de <i>Chlorella vulgaris</i> em função da concentração de KH_2PO_4 e NaNO_3 (A), solução micronutriente e KH_2PO_4 (B) e solução micronutriente em função de NaNO_3 (C)	74
Figura 2.3 Gráficos de superfície de resposta da produtividade lipídica de <i>Chlorella vulgaris</i> em função da concentração de KH_2PO_4 e NaNO_3 (A), solução micronutriente e KH_2PO_4 (B) e solução micronutriente em função de NaNO_3 (C)	75

CAPÍTULO 3

Figura 3.1 Cultivo de <i>Chlorella vulgaris</i> em fotobiorreator de 6 litros	85
Figura 3.2 Curva padrão para determinação da concentração de <i>Chlorella vulgaris</i> cultivada em Bold Basal Medium modificado (250 mL L ⁻¹ de concentrado de dessalinização e 750 mL L ⁻¹ de água destilada)	88
Figura 3.3 Concentração celular (mg L ⁻¹) em função do tempo de cultivo (dias). A linha vertical delimita o tempo correspondente à mudança do processo de cultivo, de descontinuo para contínuo com taxa de diluição de 0,20 dia ⁻¹	89

Figura 3.4 Acompanhamento do pH ao longo de 19 dias de cultivo da microalga <i>Chlorella vulgaris</i> em meio de cultura modificado	90
--	----

CAPÍTULO 4

Figura 4.1 Cultivos de <i>Chlorella vulgaris</i> em biorreatores cônicos invertidos de 4.000 mL contendo concentrado de dessalinização	102
Figura 4.2 Visualização do decréscimo da biomassa de <i>Chlorella vulgaris</i> em função dos ciclos de cultivo	104

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1.1 Panorama da produção mundial de microalgas	37
Tabela 1.2 Particularidades dos ácidos graxos poli-insaturados (PUFA's) em microalgas	39
Tabela 1.3 Composição química básica de três espécies de microalgas, em % de peso seco	42
Tabela 1.4 Composição de aminoácidos em proteínas alimentares, <i>Chlorella vulgaris</i> e requerimentos em aminoácidos essenciais da FAO, em g/100g de proteína total	48
Tabela 1.5 Composição dos ácidos graxos contidos na espécie <i>Chlorella vulgaris</i>	51

CAPÍTULO 2

Tabela 2.1 Matriz de delineamento fatorial fracionário, constituída de 3 fatores em 3 níveis	68
Tabela 2.2 Níveis e variações das variáveis independentes	69
Tabela 2.3 Características físico-químicas do concentrado de dessalinização	70
Tabela 2.4 Biomassa (g L^{-1}) e produtividade lipídica ($\text{mg g}^{-1} \text{dia}^{-1}$) obtidos de <i>Chlorella vulgaris</i> após 7 dias de cultivo no meio à base de concentrado de dessalinização adicionado dos fatores (nutrientes) referentes aos tratamentos aplicados	72
Tabela 2.5 Análise de variância (ANOVA) para o modelo de superfície de resposta da biomassa e produtividade lipídica extraída de <i>Chlorella vulgaris</i>	73

CAPÍTULO 3

Tabela 3.1 Densidade celular máxima (DCM g L^{-1}), produtividade celular ($\text{mg L}^{-1} \text{dia}^{-1}$), velocidade específica (μ), proteínas totais e lipídeos totais de <i>Chlorella vulgaris</i> cultivada em fotobiorreator contínuo	91
Tabela 3.2 Perfil cromatográfico dos ácidos graxos de <i>Chlorella vulgaris</i> cultivada em Bold Basal Medium modificado durante 19 dias em fotobiorreator de 6 L	92

Tabela 3.3 Comparação do teor de lipídeos e frações dos ácidos graxos em microalgas cultivadas em diferentes condições de meios de cultura	93
---	----

CAPÍTULO 4

Tabela 4.1 Características físico-químicas do concentrado de dessalinização	102
--	-----

Tabela 4.2 Valores da biomassa em peso seco (g L^{-1}), proteínas e lipídeos totais de <i>Chlorella vulgaris</i> em cada ciclo de 7 dias de cultivo, em biorreatores de 4000 mL, com meio contendo concentrado de dessalinização (250 mL L^{-1})	104
--	-----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ala: Alanina
ANOVA: Análise de Variância
APHA: *American Public Health Association*
Arg: Arginina
Asp: Ácido aspártico
Asn: Asparagina
β: Beta
BBM: *Bold's Basal Medium*
CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CO₂: Dióxido de Carbono
Cys: Cisteína
Cys₂: Cistina
DCM: Densidade Celular Máxima
DHA: Ácido graxo docosaheptaenóico
EPA: Ácido Eicosapentaenóico
FAO: Organização para a Agricultura e Alimentação
g L⁻¹: grama por Litro
Gln: Glutamina
Glu: Ácido glutâmico
Gly: Glicina
His: Histidina
HPLC: *High Performance Liquid Chromatography*
Ile: Isoleucina
Km²: Kilometros quadrados
Km: Kilometro
KH₂PO₄: Fosfato de potássio monobásico
Leu: Leucina
L: Litro
Lys: Lisina
Met: Metionina
mg: Miligrama
mg L⁻¹ dia⁻¹: Miligrama por Litro por dia
mL: Mililitro
mL L⁻¹: Mililitro por litro
NaNO₃: Nitrato de sódio
OR: Osmose Reversa
ω-3: Ômega 3
ω-6: Ômega 6
ppm: Partes por milhão

Phe: Fenilalanina

pH: Potencial hidrogeniônico

Pro: Prolina

PUFA's: *Polyunsaturated Fatty Acids* - Ácidos graxos poli-insaturados

R²: Coeficiente de Determinação

rpm: Rotações por minuto

RSM: Metodologia de Superfície de Resposta

SCP: *Single Cell Protein* – Proteína unicelular

spp.: Espécie e subespécie

sp.: Espécie

Ser: Serina

Thr: Treonina

Trp: Triptofano

Tyr: Tirosina

TAP: Tris Acetate phosphate

UFSC: Universidade Federal de Santa Catarina

°C: Graus Celsius

%: Porcentagem

µm: Micrômetro

µS cm⁻¹: Microsiemens por centímetro

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	21
A.1 CONTEXTUALIZAÇÃO DO PROBLEMA	22
A.2 ESCOPO DA PESQUISA	23
CAPÍTULO 1 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	24
1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
1.1 Uso de águas subterrâneas	25
1.2 Concentrado de dessalinização	28
1.3 Algumas características das microalgas	29
1.4 Aspectos do crescimento microalgal	30
1.4.1 O metabolismo das microalgas	31
1.4.2 Avaliação do crescimento microalgal	32
1.4.3 Curva de crescimento de uma cultura microalgal	33
1.4.4 Parâmetros de crescimento das microalgas	34
1.5 Aplicações de importância econômica das microalgas	34
1.6 Conceitos elementares da microalga <i>Chlorella vulgaris</i>	41
1.6.1 Classificação e características de <i>Chlorella vulgaris</i>	41
1.6.2 Fatores relacionados ao cultivo de algas	43
1.6.3 Meios de cultura e fontes nutricionais	44
1.7 Coleta e concentração de biomassa algácea	45
1.7.1 Filtração	45
1.7.2 Centrifugação	45
1.7.3 Floculação	46
1.8 Análises de composição química de microalgas	47
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	
CAPÍTULO 2 - OTIMIZAÇÃO DE MEIO DE CULTURA À BASE DE CONCENTRADO DE DESSALINIZAÇÃO PARA A PRODUÇÃO DE <i>Chlorella vulgaris</i>	61
CAPÍTULO 3 – CULTIVO CONTÍNUO DE <i>Chlorella vulgaris</i> EM FOTOBIORREATOR UTILIZANDO UM MEIO À BASE DE CONCENTRADO DE DESSALINIZAÇÃO	80
CAPÍTULO 4 - REUSO DO MEIO RESIDUAL CONTENDO CONCENTRADO DE DESSALINIZAÇÃO POR MEIO DA MICROALGA <i>Chlorella vulgaris</i>	97

CONSIDERAÇÕES FINAIS	108
ANEXO A	110
APÊNDICE A	112
APÊNDICE B	113
APÊNDICE C	114

1 INTRODUÇÃO

Diversas regiões do planeta exploram águas subterrâneas como alternativa para assegurar o acesso à água potável. No entanto, devido à qualidade química muitas vezes não favorável, ou seja, com teores de cloreto acima de 1.000 mg L^{-1} - característica, essa que as torna impróprias ao consumo humano, estas águas necessitam ser dessalinizadas. A Organização Mundial da Saúde recomenda 250 mg L^{-1} de cloreto nas águas para o abastecimento das populações (SUASSUNA, 2005).

As tecnologias de dessalinização, com destaque ao processo de dessalinização por osmose reversa, constituem alternativas de obtenção de água potável para suprir o fornecimento às regiões que se encontram em escassez deste recurso. São técnicas de tratamento de água por remoção de sais e posterior enquadramento aos padrões de potabilidade para consumo humano (BREMERE et al., 2001; LABORDE et al., 2001).

Como consequência da sua implementação, o processo de dessalinização origina uma série de implicações ambientais, sendo o seu lançamento inadequado no meio ambiente a principal causa de degradação das áreas adjacentes às unidades de dessalinização (MOHAMED; MARAQA; AL HANDHALY, 2005).

Sob o ponto de vista ambiental, devido à capacidade poluidora deste material extremamente rico em sais, Albinati, Albinati e Medeiros (2003) citam a utilização do concentrado salino para a produção de alimentos, tais como: na criação de peixes em tanques de piscicultura e na larvicultura (cultivo de camarões); também no cultivo de plantas halófitas tolerantes a altas concentrações salinas, como exemplo - *Atriplex nummularia* - utilizada como recurso forrageiro.

Volkman (2006) aborda a viabilidade do cultivo de micro-organismos como as microalgas no concentrado de dessalinização para a produção de biomassa, com finalidade biotecnológica, que é fundamentado na boa adaptação destes micro-organismos tanto à alta salinidade quanto ao pH do concentrado salino.

Já há muito tempo os micro-organismos são utilizados pelo homem. Aparentemente, a descoberta da utilidade destes foi acidental, mas a partir de então, após muitas tentativas e erros, os micro-organismos passaram a ser empiricamente empregados na produção de bebidas, alimentos e, posteriormente insumos farmacêuticos e metabólitos (MATSUDO, 2010).

Ao final da segunda guerra mundial, alguns micro-organismos passaram a ser considerados interessante devido ao ser valor nutricional. Surge o termo “*Single Cell Protein (SCP)*” e a partir de então muitas pesquisas enfocaram a produção de biomassa microbiana. Nesse contexto, destacam-se os micro-organismos fotossintetizantes (microalgas e cianobactérias) devido à capacidade de crescimento utilizando CO₂ como única fonte de carbono (BOROWITZKA, 1992).

O crescente interesse no estudo de micro-organismos como microalgas, alguns fungos (leveduras, por exemplo) e bactérias, deve-se à essencial importância destes nas diversas cadeias tróficas e na possibilidade de aplicação comercial em distintas áreas como na nutrição, saúde humana e animal, no tratamento de águas residuais, reciclagem de matéria orgânica, na produção de energia (biogás) e na obtenção de compostos de interesse nas indústrias alimentar, química e farmacêutica (BOROWITZKA, 1993; KIRK; BEHRENS, 1999; GROBBELAAR, 2004; RICHMOND, 2004; HENRIKSON, 2009).

Segundo Pulz e Gross (2004), o mercado de alimentos funcionais utilizando microalgas em massas, pães, iogurtes e bebidas apresenta rápido desenvolvimento em países como França, Estados Unidos, China e Tailândia. As principais microalgas cultivadas comercialmente são *Chlorella* spp. e *Arthrospira* spp. para adição em alimentos funcionais (*health food*), *Dunaliella salina* para obtenção de β-caroteno e *Haematococcus pluvialis* para obtenção do pigmento astaxantina.

Considerando os benefícios relacionados à produção, aplicações biotecnológicas e reciclagem do concentrado de dessalinização, o presente trabalho objetiva o desenvolvimento e a avaliação das propriedades físico-químicas do cultivo de *Chlorella vulgaris* em concentrado de dessalinização.

A.1 CONTEXTUALIZAÇÃO DO PROBLEMA

As tecnologias de dessalinização são métodos de obtenção de água potável que surgiram para disponibilizá-la às populações estabelecidas em regiões áridas e semiáridas, devido às dificuldades para implantar métodos convencionais. Surgida na década de 1980, a osmose reversa firmou-se como um dos principais métodos de dessalinização de água salobra subterrânea (MOHAMED; MARAQA, AL-HANDHALY, 2005).

Todo método de dessalinização é limitado pelos resíduos produzidos deste processo, devido aos custos envolvidos no tratamento, quanto aos impactos causados quando lançados no meio ambiente, principalmente em plantas de larga escala. Na dessalinização de água subterrânea realizada em regiões continentais, o concentrado é geralmente canalizado para tanques de evaporação, injetado em poços profundos, ou despejado no solo. Essas medidas causam contaminação do solo, e possivelmente da própria fonte subterrânea, pelos vários agentes químicos utilizados no pré-tratamento e produtos utilizados na limpeza das membranas. Uma estratégia para evitar esses problemas é a diversificação da produção dessas estações de tratamento, a fim de evitar o lançamento do concentrado no solo e obter outros produtos de valor agregado a partir do concentrado de dessalinização (ALBINATI; ALBINATI; MEDEIROS, 2003).

Dentre essas estratégias há possibilidade de empregá-lo como base para um meio de cultura para produção de microalgas. Combinando-se a alta alcalinidade e salinidade do concentrado com as altas temperaturas e irradiação solar típicas das regiões onde a dessalinização de água salobra subterrânea é realizada.

A.2 ESCOPO DA PESQUISA

O trabalho está dividido em quatro capítulos:

Capítulo 1 uma breve revisão sobre as características hídricas e geológicas do nordeste brasileiro, às tecnologias de dessalinização de águas subterrâneas e a consequência de sua implementação, o interesse no estudo de micro-organismos como as microalgas, conceitos da microalga *Chlorella vulgaris* foco deste estudo, fatores relacionados ao cultivo de algas e a caracterização química da biomassa algácea.

Capítulo 2 – Neste capítulo, um meio de cultura utilizando o concentrado de dessalinização foi otimizado para obter a máxima produção de *Chlorella vulgaris*, empregando como ferramenta estatística a metodologia de superfície de resposta.

Capítulo 3 – Este capítulo dará enfoque as análises químicas de proteínas totais, lipídeos totais e perfil dos ácidos graxos, após o cultivo da microalga em fotobiorreator contínuo utilizando o meio de cultura otimizado proposto no capítulo 2.

Capítulo 4 – Este último capítulo tem por objetivo avaliar a possibilidade de reciclagem do meio, após a adição de fonte de nitrogênio, e determinar o teor de proteínas e lipídeos na biomassa de *Chlorella vulgaris* em cada ciclo de cultivo.

CAPÍTULO 1
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Uso de águas subterrâneas

No território brasileiro a água subterrânea é intensamente explorada. Os sistemas aquíferos do País vêm sendo utilizados para diversos fins, tais como o abastecimento humano, irrigação, indústria e lazer. No Brasil, 15,6 % dos domicílios utilizam exclusivamente água subterrânea, 77,8 % usam rede de abastecimento de água e 6,6 % outras formas de abastecimento (IBGE, 2002). Embora o uso do manancial subterrâneo seja complementar ao superficial em muitas regiões, em outras áreas, a água subterrânea representa o principal recurso hídrico, desempenhando importante papel no desenvolvimento socioeconômico do País (BRASIL, 2005).

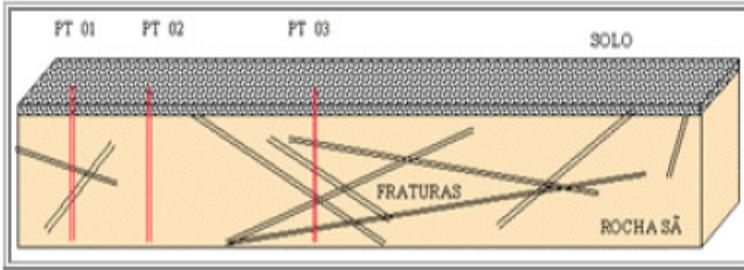
A distribuição regional dos recursos hídricos no Brasil é de 70 % região Norte, 15 % para o Centro-Oeste, 12 % regiões Sul e Sudeste, que apresentam o maior consumo de água, e 3 % para o Nordeste. Esta última região, além da carência de recursos hídricos, tem sua situação agravada por um regime pluviométrico irregular e pela baixa permeabilidade do terreno cristalino (FERREIRA, 2008).

O semiárido brasileiro, também chamado de Sertão – cenário geográfico onde ocorrem as secas – abrange os seguintes estados: Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia e o Vale do Jequitinhonha, no Norte de Minas Gerais. Com uma área aproximada de 900.000 km², o que representa cerca de 60 % da região nordeste (ALBINATI; ALBINATI; MEDEIROS, 2003). É uma região de elevadas temperaturas (média de 26°C), onde o regime pluvial é bastante irregular. A média pluviométrica anual oscila entre 400 a 800 mm. Os solos são geralmente rasos, pedregosos (escudo cristalino), com ocorrência de vegetação do tipo xerófila (BRASIL, 2005).

A região nordeste é formada por duas estruturas geológicas básicas, o embasamento cristalino e as bacias sedimentares, sendo que 70 % da região semi-árida são formadas pela primeira estrutura (SUASSUNA, 2005). O embasamento cristalino, caracterizado pela presença de rios temporários, possui pouca água no subsolo, apresentando baixo potencial hídrico. Isto se deve à baixa taxa de infiltração e grande capacidade de escoamento superficial neste tipo de solo. Desta forma, as águas subterrâneas ocorrem principalmente em fraturas de rochas e próximas a rios, porém estas mineralizam-se (salinizam) facilmente, o que compromete sua qualidade (SUASSUNA, 2005). Esse tipo de aquífero tem características próprias em função de

armazenar a água em certas fissuras entre rochas. Na Figura 1.1 é possível visualizar a relação perfuração versus fraturas em terreno cristalino.

Figura 1.1 Relação perfuração versus fraturas em terreno cristalino.
Fonte: Sobreira-Leite, (1997).



A Figura 1.1 mostra casos típicos de erros que podem ser cometidos pelo desconhecimento e falha na análise criteriosa das condições locais de campo; no exemplo, apenas o poço PT 03 teria condições de melhor produtividade, em função da interceptação de várias fraturas, que pelas condições de interconectividade teriam chances maiores de presença de água. Com respeito ao poço PT 01 apesar de ter encontrado fraturas, essas não parecem ter condições favoráveis pela pouca interconectividade e áreas de recarga; no poço PT 02 a inexistência de fraturas resulta em solo improdutivo (SOBREIRA-LEITE, 1997).

Nesse tipo de terreno cristalino, os escoamentos superficiais são muito maiores do que a parte que se infiltra no solo. Essas características dos solos nordestinos resultaram em corridas desenfreadas para a construção de represas, barragens e açudes, visando o armazenamento das águas para posterior aproveitamento (SUASSUNA, 2005).

A base de sustentação para a convivência na região semiárida está centrada nos recursos hídricos disponíveis, sendo que estes normalmente apresentam sérias restrições de volume e qualidade. O acesso à água, com boa qualidade, é um dos fatores limitantes para que as comunidades alcancem o mínimo necessário para atender suas necessidades básicas de consumo, assegurando a sua permanência no lugar onde vivem (FRANÇA, 2007).

Uma das formas de amenizar o quadro de déficit hídrico da região nordeste seria uma maior utilização das águas subterrâneas, por meio da construção de cisternas, barragens, estações de tratamento de águas e perfuração/instalação de poços. Porém, devido à qualidade química muitas vezes não favorável, ou seja, salobras com elevados teores salinos, estas águas necessitam ser dessalinizadas (LABORDE et al., 2001). Isto se torna necessário uma vez que a quantidade máxima de sólidos totais dissolvidos aceitável para o consumo humano é de 250 mg L^{-1} (MONTEIRO; PINHEIRO, 2004).

Segundo o Conselho Nacional do Meio Ambiente, através da Resolução nº 357, de 17 de março de 2005, considera-se água doce àquela que possui salinidade igual ou inferior a $0,5\%$ (500 ppm); salobra aquela com salinidade superior a $0,5\%$ e inferior a 30% ; e salina a que possui salinidade acima de 30% (3.000 ppm).

Diante dessa realidade, foi dada grande atenção para os programas de dessalinização, o que permitiu a utilização de dessalinizadores no semiárido brasileiro, com a finalidade de converter a água salgada ou salobra em água potável.

O processo de dessalinização produz, por osmose reversa (OR), a partir de água salgada ou salobra, dois tipos de efluentes: permeado (água potável) e concentrado. O equipamento utilizado para realizar esse processo é basicamente formado por uma bomba trifásica, uma bomba de sucção, uma bomba dosadora, coluna com membrana semipermeável, filtro de cartucho e rotâmetro (ARAÚJO et al., 2005). É um processo de separação de soluto de uma solução, através da aplicação de uma pressão maior do lado da solução mais salina ou concentrada, revertendo-se a tendência natural. Nesse caso, a membrana retém o soluto, permitindo apenas a passagem do solvente (SCHNEIDER; TSUTIYA, 2001).

Na Figura 1.2 é possível visualizar um equipamento dessalinizador por osmose reversa com produção média de 2.000 a 3.000 litros por hora.

Figura 1.2 Equipamento de dessalinização por osmose reversa, instalado pelo Laboratório de Referência em Dessalinização (LABDES) da Universidade Federal de Campina Grande – UFCG



Uma grande vantagem dessa tecnologia por osmose reversa é a remoção de micro-organismos, pois o processo de separação física por membrana permite instantaneamente a retenção de bactérias, vírus, pirogênicos e muitas das matérias orgânicas e coloidais presentes na água (ARAÚJO et al., 2005).

Porém, a introdução de unidades de dessalinização está associada a sérios impactos ambientais nas áreas adjacentes às plantas de produção, sendo o principal deles o lançamento do concentrado salino no meio ambiente (ALAMEDDINE; FADEL, 2007).

1.2 Concentrado de dessalinização

O maior problema do sistema de dessalinização está associado com o destino do concentrado produzido por este processo, já que é um material extremamente rico em sais. Este concentrado (rejeito) provoca grande impacto ambiental, pois é disposto normalmente, em lagoas de decantação ou mesmo ao ar livre (FURTADO; MOTA, 2003).

Em relação à disposição do concentrado, devido à capacidade poluidora deste rejeito, diversas alternativas têm sido sugeridas de modo a reciclar este concentrado salino. A solução encontrada foi à utilização

do rejeito da dessalinização para o cultivo da microalga (*Spirulina*); na piscicultura (cultivo de tilápias) que são espécies adaptadas a ambientes salinos; implantação de culturas hidropônicas, como o tomate, pimentão e pimenta; e no cultivo irrigado com plantas halófitas – a exemplo da *Atriplex nummularia* - que são espécies com capacidade de suportar altos níveis de salinidade e de acumular significativas quantidades de sais em seus tecidos, desta forma, usada para complementar a dieta para caprinos, ovinos e bovinos. Estas ações constituem formas de conciliar a reciclagem do concentrado salino com a produção de alimentos (ALBINATI; ALBINATI; MEDEIROS, 2003).

O perfil químico do concentrado de dessalinização varia conforme a composição da água de alimentação, a metodologia de dessalinização empregada, sua respectiva taxa de recuperação e agentes químicos utilizados na fase pré-tratamento. Alguns exemplos de agentes químicos utilizados são os polifosfatos, que impedem a formação de crostas nas paredes dos reservatórios de pré-tratamento e o cloro, aplicado para evitar a proliferação de micro-organismos e plantas nos dessalinizadores (ARAÚJO et al., 2005).

Tem-se que observar que os tanques de evaporação, concentrando o rejeito, fazem reter elementos como selênio, boro e metais pesados em níveis tóxicos (ONG et al., 1995). Em geral, nos países desenvolvidos, o rejeito está sendo transportado para os oceanos ou injetados em poços de grande profundidade; todavia, outras alternativas estão sendo estudadas, como: bacias de evaporação, redução de volume do rejeito por plantas aquáticas, bacias de percolação e irrigação de plantas halófitas (PORTO; AMORIN; SILVA JÚNIOR, 2001).

Das grandes estruturas instaladas no mundo para dessalinização de águas marítimas, a principal destinação do rejeito é seu retorno ao mar; esta alternativa de disposição é tida como ideal, considerando-se o poder de diluição dos oceanos (SOARES et al., 2006).

1.3 Algumas características das microalgas

Tomaselli (2004) cita que as microalgas têm sido tradicionalmente classificadas por diversos critérios como: tipos de pigmentos, a natureza química dos produtos de reserva e pelos constituintes da parede celular. Também, têm sido considerados aspectos citológicos e morfológicos, tais como a ocorrência de células flageladas, a estrutura dos flagelos, os processos de formação do núcleo e da divisão celular, a presença e a caracterização de envoltório do

cloroplasto e a conexão entre o retículo endoplasmático e a membrana nuclear.

As microalgas (produtores primários) armazenam energia solar, convertendo-a em energia biológica, sendo a biomassa microalgal a base de inúmeras cadeias tróficas nos ambientes aquáticos. Os constituintes deste nível trófico sintetizam nova matéria orgânica a partir de substratos inorgânicos como sais (nutrientes), CO_2 e água e, esta energia biológica é utilizada em sua maior parte como alimento pelos organismos que constituem o segundo nível trófico (consumidores primários), dando continuidade às cadeias alimentares aquáticas (Arredondo-Vega 1995).

Conforme Richmond (1990) a produção microalgal pode ser justificada por apresentar diversas vantagens, dentre as quais podem ser destacadas:

- um cultivo de microalgas é um sistema biológico eficiente na utilização de energia solar para a produção de matéria orgânica que envolve rendimentos de biomassa (maior produtividade);

- as condições de cultivo de microalgas podem ser induzidas para produção de substâncias como proteína, pigmentos, ácidos graxos e carboidratos;

- os cultivos podem ser desenvolvidos com água proveniente de diversos processos de produção (agropecuária, dejetos industriais e domésticos, concentrado de dessalinização);

- o ciclo de vida da maioria das microalgas se completa em poucas horas, o que favorece a seleção de cepas e o melhoramento genético das espécies.

Ao mesmo tempo em que micro-organismos podem ser cultivados a partir de rejeitos, como soro de queijo, mosto, celulose, entre outros; as microalgas são validamente cultivadas em um meio de cultivo a base do concentrado de dessalinização. Esta possibilidade fundamenta-se na boa adaptação destes organismos à alta salinidade e pH do concentrado salino (VOLKMANN, 2006).

1.4 Aspectos do crescimento microalgal

As respostas aos estímulos ou as mudanças ambientais são inerentes a todos os organismos vivos. Especificamente nas microalgas, a resposta das células às condições ambientais define os fatores como limitante – redução da taxa de crescimento e/ou de alguma reação bioquímica sem a necessidade de aclimação celular; ou estressante – implica em um desequilíbrio metabólico, o qual demanda ajustes

bioquímicos antes que as células possam estabelecer um novo estado de crescimento e biossíntese (VONSHAK; TORZILLO, 2004).

Tanto no ambiente natural quanto nos cultivos, o crescimento de uma população de microalgas é resultado da interação entre fatores biológicos, físicos e químicos. Os fatores biológicos estão relacionados às próprias taxas metabólicas da espécie cultivada. Quanto aos fatores físico-químicos, que afetam o crescimento de microalgas, são principalmente reportados estudos sobre a luz, temperatura, a salinidade e a disponibilidade de nutrientes (LOURENÇO, 1996; DERNER, 2006).

A condição de fonte luminosa, conhecida como fotoperíodo (tempo de exposição à luz), intensidade e qualidade (comprimento de onda), é de fundamental importância para as algas. Um incremento de luz proporcional a um nível de saturação ou de máxima produção celular pode causar um efeito de inibição da atividade fotossintética (BONEY, 1989).

Quanto à nutrição, para um crescimento ótimo, as microalgas têm necessidade de uma série de nutrientes. Entre as espécies, ocorrem muitas variações relacionadas principalmente à quantidade de nutrientes no meio. Ainda assim, estas necessidades nutricionais são dependentes de distintas condições ambientais (LOURENÇO, 2006).

Quanto aos macronutrientes, as microalgas requerem C, N, O, H, P, além de Ca, Mg, S e K. Como micronutrientes, geralmente requerem Fe, Mn, Cu, Mo e Co, enquanto algumas microalgas também necessitam baixas concentrações de vitaminas no meio de cultura (GUILLARD, 1975).

Além dos fatores anteriormente descritos, outros podem influenciar o desenvolvimento das culturas como o tamanho e a forma dos tanques, volume celular, aeração das culturas, pH, etc (RICHMOND, 1990a).

1.4.1 O metabolismo das microalgas

Os metabólitos gerados a partir das algas podem ser divididos em dois grandes grupos. Os primeiros, essenciais a todos os seres vivos, são os metabólitos primários ou macromoléculas. Nesse grupo estão incluídos os lipídeos, protídeos e glicídeos, com funções vitais bem definidas. Os produtos do metabolismo primário, através de rotas biossintéticas diversas e frequentemente desconhecidas, originam às custas de energia, o segundo grupo de compostos químicos – os metabólitos secundários ou micromoléculas – que geralmente apresentam estrutura complexa, baixo peso molecular, marcantes

atividades biológicas e cujos produtos, embora não necessariamente essenciais para o organismo produtor, garantem vantagens para sua sobrevivência e perpetuação da espécie em seu ecossistema. Assim, as rotas biossintéticas dos metabólitos secundários, são particularmente ativadas durante alguns estágios particulares de crescimento e/ou em períodos de estresse causados por limitações nutricionais e/ou ataque microbiano (SIMÕES et al., 2004).

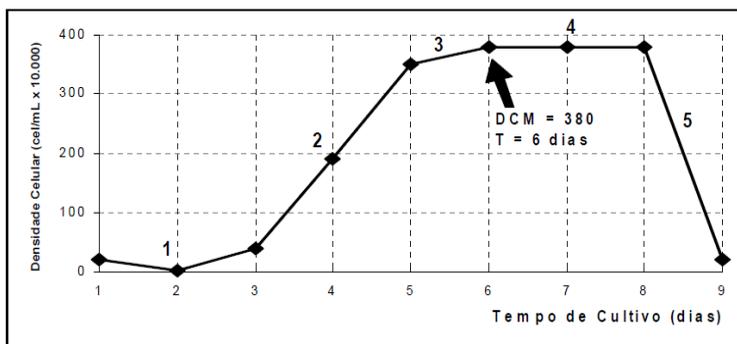
1.4.2 Avaliação do crescimento microalgal

O crescimento é definido como um aumento da matéria viva, usualmente o número de células para micro-organismos unicelulares ou a biomassa total para organismos multicelulares (TOMASELLI, 2004). Em cultivos de microalgas, e de outros organismos, podem ser aplicados determinados parâmetros de crescimento (empregando fórmulas) e representações gráficas para ilustrar o desenvolvimento das culturas (VONSHAK, 1990).

1.4.3 Curva de Crescimento de cultura microalgal

Um dos métodos empregados para a avaliação do crescimento das populações microalgais em cultivo é a curva de crescimento celular. Esta pode ser expressa como sendo a relação entre o incremento da biomassa ou do número de organismos em um determinado volume (densidade celular) pelo tempo. Em cultivo do tipo estacionário, teoricamente, a curva de crescimento celular apresenta cinco fases distintas (Figura 1.3).

Figura 1.3 Curva de crescimento de uma cultura microalgal em cultivo do tipo estacionário. Fonte: Derner (2006).



1 - Fase de indução: ocorre logo após a reciclagem, não existe um incremento na população devido à adaptação das células algais às novas condições de cultivo, podendo inclusive ocorrer uma redução na densidade celular.

2 – Fase exponencial ou fase Log: é fase de crescimento na qual a biomassa se duplica sucessivamente em intervalos regulares de tempo, ou seja, a cultura apresenta uma elevada e constante (logarítmica) velocidade (taxa) de crescimento.

3 – Fase de redução do crescimento relativo: o tempo requerido para duplicação celular aumenta, reduzindo assim a taxa de crescimento. Isto é consequência da diminuição na quantidade de nutrientes disponíveis no meio e, principalmente, da redução da atividade fotossintética devido ao aumento da densidade microalgal, sendo que desta forma, a quantidade de energia luminosa por célula microalgal torna-se bastante reduzida.

4 – Fase estacionária: nesta fase não há crescimento da população (a densidade celular permanece constante), a taxa de crescimento está compensada pela taxa de mortalidade, podendo existir alta contaminação.

5 – Fase de morte celular: é resultado da depleção de nutrientes a um nível que não suporta o crescimento, bem como da possível ocorrência de um estado tóxico de metabólicos.

1.4.4 Parâmetros de crescimento das microalgas

O crescimento de uma população microalgal pode ser estimado pelo emprego de determinados parâmetros, dentre os quais se destacam a densidade celular máxima alcançada, o tempo de cultivo e a velocidade (ou taxa) de crescimento. Segundo Lourenço (2006) a densidade máxima alcançada se refere ao número de células por mililitro e, o tempo de cultivo se refere ao período transcorrido entre o início da cultura (inóculo) e o momento no qual a cultura alcançou a densidade celular máxima. A velocidade de crescimento (k) é estabelecida por uma fórmula específica, citada por Stein (1973), a qual representa o número de divisões celulares da população por unidade de tempo (dia).

Nos sistemas comerciais de produção de microalgas, de maneira geral, as empresas produtoras de microalgas visam alcançar a máxima produtividade e, isto implica em elevada produção de biomassa (ou de produto de interesse) no menor espaço de tempo possível (TREDICI, 2004).

A produtividade ou o rendimento das culturas, ou ainda o rendimento em relação a algum composto de interesse, pode ser expresso de várias maneiras. Segundo Lourenço (2006) para expressar a produtividade das culturas em laboratório, onde são utilizadas iluminação artificial e condições controladas, é correto empregar produtividade/hora.

1.5 Aplicações de importância econômica das microalgas

O interesse em cultivar algas vem do valor que existe nos produtos extraídos delas. Quando alguém toma uma cerveja – há produto de alga para manter a espuma firme, coesiva; quando alguém consome sorvete industrializado – há produto de alga, no caso o polissacarídeo carragena, que forma complexos estáveis com a proteína láctea evitando a cristalização do gelo, deixando o produto macio; quando uma pessoa toma um medicamento encapsulado – há produto de alga que reveste a cápsula. Em alguns lugares do mundo, a exemplo Japão e Tailândia, é comum consumir algas em saladas, sopas, temperos e outros pratos. Portanto, isto significa que as algas têm valor comercial (BMLP, 2003).

O uso direto de microalgas na alimentação humana dá-se principalmente por meio da preparação de encapsulados de proteínas e vitaminas ou mistura de pós de alga em alimentos industrializados, como massas, biscoitos, doces e bebidas (PULZ; GROSS, 2004).

Uma notável aplicação dos cultivos de microalgas envolve a produção de biomassa para uso na alimentação de animais aquáticos, por meio de cultivos intensos. As condições de cultivo de microalgas podem ser induzidas a produção de maiores concentrações de substâncias de interesse em determinado empreendimento, como proteínas, pigmentos, ácidos graxos e carboidratos, por exemplo (SIPAÚBA-TAVARES; ROCHA, 2003).

Cultivos intensos podem ser realizados para outros fins, como a produção de microalgas para o aproveitamento de pigmentos. Os carotenóides têm duas funções principais: aumentar a captação de luz dos fotossistemas (a exemplo das clorofilas) e proteger os fotossistemas quando há luz em excesso, funcionando como uma espécie de filtro. Esses pigmentos acessórios da fotossíntese podem ser aproveitados comercialmente como alimento natural ou suplemento alimentar encontrado como formulações em pó, tabletes, cápsulas ou extratos. Alguns gêneros de microalgas têm sido utilizados para a produção e aproveitamento de pigmentos de alto valor agregado, como os carotenóides β -caroteno e a astaxantina, produzidos por *Dunaliella* e *Haematococcus*, respectivamente (RICHMOND, 2000).

Os carotenóides são pigmentos solúveis em solventes orgânicos e dotados de coloração amarela, laranja, vermelha, marron ou variações dessas cores. São divididos em dois grupos: os carotenos e as xantofilas. Outra classe de pigmentos fotossintéticos é composta pelas ficobilinas, que são pigmentos azuis ou vermelhos, solúveis em água e que além de aumentar o espectro de captação de luz pela fotossíntese, também atuam como reserva de nitrogênio (LOURENÇO, 2006).

Na busca de fonte alternativa de alimentos, diversos países no mundo têm cultivado algas como um sistema de agronegócio. Isto significa transformar o produto *in natura* em produto industrializado, conferindo-lhe mais durabilidade e valor de mercado. Jay (2005) cita a utilização de micro-organismos como fonte de proteínas com diversas vantagens quando comparado às proteínas animais e vegetais, entre elas: curto tempo de geração, ocasionando rápido aumento de biomassa; facilidade na manipulação gênica, possibilitando a produção de compostos desejados e alto conteúdo protéico.

Além de animais e plantas, algas (*Chlorella*, *Scenedesmus*, *Arthrospira* spp.) leveduras e bactérias também podem ser destinadas à produção de proteínas (proteínas unicelulares, *Single Cell Proteins*, SCP's) (BELITZ; GROSCH, 1997).

Desde muito tempo, populações indígenas perto do Lago Chade na África e astecas próximos ao lago Texcoco no México coletavam *spirulina* para consumo. Certamente seu caráter de fonte alimentar deve-se ao alto teor de proteínas, significativa quantidade de ácidos graxos essenciais, vitaminas (B₁₂) e minerais. Entre as algas, a *spirulina* é ainda amplamente consumida no mundo, inclusive por astronautas durante viagens espaciais (ANUPAMA; RAVINDRA, 2000).

Outra aplicação das microalgas é na área de cultura microbiológica e de cultivos em nível industrial, em que extratos de algas verdes, como *Chlorella* e *Scenedesmus*, têm sido utilizados na estimulação do crescimento e na produção de leveduras e de outros micro-organismos. Extratos de algas também são conhecidos como estimulantes ao crescimento de plantas, provavelmente devido à presença de hormônios, como auxinas, giberilinas, citoquinina (SIPAÚBA-TAVARES; ROCHA, 2003).

Para consumo humano, os produtos a base de proteínas unicelulares são concentrados ou isolados, os quais podem ser processados adicionalmente como produtos texturizados e/ou funcionais (JAY, 2005).

Desta forma, o cultivo de micro-organismos, em sistemas independentes dos agrícolas tradicionais, é muito promissor. Apesar de parecer inaceitável para algumas pessoas, a utilização destes como fontes alimentares, tanto humano quanto animal, certamente é uma ideia inovadora. Na Tabela 1.1, torna-se compreensível o panorama da produção mundial de microalgas e aplicações comerciais.

Tabela 1.1 Panorama da produção mundial de microalgas

Alga	Região	Aplicação
<i>Arthrospira</i>	China, Índia, USA, Japão, Myanmar	Nutrição humana e animal, cosméticos
<i>Ascophyllum, Fucus, Laminaria</i>	Japão, USA, Nova Zelândia	Ração para gatos, aves e suínos
<i>Chlorella</i> sp.	Taiwan, Japão, Alemanha	Nutrição humana, aquíicultura, cosméticos
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	USA	Óleo DHA (Ácido docosahexaenóico)
<i>Dunaliella salina</i>	Austrália, Israel, USA, China	Nutrição humana, cosméticos, β -caroteno
<i>Laminaria, Ecklonia, Eisenia</i>	Grã-Bretanha, França e Escandinávia	Nutrição humana (aves e ovelhas)
<i>Haematococcus pluvialis</i>	USA, Índia, Israel	Aquíicultura, astaxantina
<i>Rhododymenia palmata, Gelidium, Grateloupia, Fucus</i>	Ilhas Pacíficas	Alga que acompanha pratos à base de frutos do mar
<i>Schizochytrium</i>	USA	Óleo DHA (Ácido docosahexaenóico)
<i>Spirogyra, Oedogonium</i>	Índia	Alga seca, adicionada em sopas
<i>Ulva</i>	Europa	Suplemento nutricional
<i>Ulva lactuca</i>	Escócia	Uso em saladas e sopas

Fonte: Anupama e Ravindra (2000); Pulz e Gross (2004)

A microalga *Nannochloropsis oculata*, por exemplo, apresenta alto teor em ácidos graxos poli-insaturados (PUFA's), especialmente ácido eicosapentaenóico (EPA). Nesta categoria (PUFA's) encontram-se os ácidos graxos de importância nutricional e tecnológica, pois estão inclusos os ácidos graxos essenciais para o ser humano que são precursores de metabólitos biológicos.

Os ácidos graxos são, frequentemente, nomeados em forma abreviada de acordo com suas estruturas químicas e são classificados como saturados, monoinsaturados e poli-insaturados, dependendo do número de duplas ligações. Os ácidos graxos saturados se encontram, predominantemente, em alimentos como carne, ovos, queijo, leite e manteiga, óleos de coco e palma, como também em “shortening” vegetais hidrogenados. O ácido oléico é o mais comum dos ácidos graxos monoinsaturados e se encontra na maioria das gorduras animais, incluindo aves, carne de vaca e cordeiro, bem como em azeitonas, sementes e nozes. Já, os ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) se classificam, principalmente, nas séries ômega 6 (ω -6) e ômega 3 (ω -3). O ácido linoléico é o expoente mais importante da série (ω -6) e está presente de forma abundante nos óleos vegetais como óleo de girassol, milho, soja, algodão e etc. O ácido α -linolênico, representante da família ω -3, é encontrado em quantidades apreciáveis em sementes oleaginosas como canola, soja e linhaça (GOMEZ, 2003). Contudo, tanto nos vegetais (algas, microalgas, fitoplâncton), quanto em animais de origem marinha (peixes, crustáceos), encontram-se outros ácidos graxos com maior número de carbonos e com maior quantidade de duplas ligações. São os chamados ácidos graxos de cadeia muito longa (superior a 18 carbonos) LCPUFA (do inglês “long chain polyunsaturated fatty acids”), eles são o ácido eicosapentaenóico (EPA, C20:5, ω -3) e o ácido docosaexaenóico (DHA, C22:6, ω -3). A formação desses LCPUFA ω -3 pelas algas marinhas e sua transferência através da cadeia alimentar aos peixes explica a abundância deles em alguns óleos de peixes de origem marinha (DZIEZAK, 1989). Atualmente, a maior fonte de EPA e DHA é obtida pelo pescado. Contudo, as microalgas sintetizam PUFA em elevada quantidade, o que as torna atrativas do ponto de vista nutricional, Tabela 1.2.

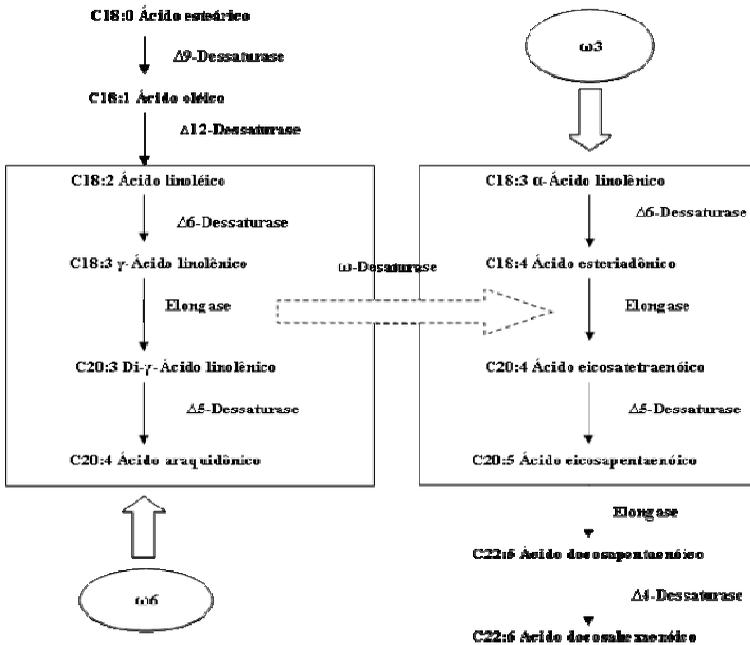
Tabela 1.2 Particularidades dos ácidos graxos poli-insaturados (PUFA's) em microalgas

PUFA's	Estrutura	Potencial aplicação	Micro-organismo produtor
γ - Ácido Linolênico (GLA)	18:3 ω 6, 9, 12	Formulação infantil Suplemento nutricional	<i>Arthrospira</i>
Ácido Araquidônico (AA)	20:4 ω 5, 8, 11, 14	Formulação infantil Suplemento nutricional	<i>Porphyridium</i>
Ácido Eicosapentaenóico (EPA)	20:5 ω 5, 8, 11, 14, 17	Suplemento nutricional Aqüicultura	<i>Nannochloropsis</i> , <i>Phaeodactylum</i> , <i>Nitzschia</i>
Ácido Docosahexaenóico (DHA)	22:6 ω 4, 7, 10, 13, 16,19	Formulação infantil Suplemento nutricional Aqüicultura	<i>Cryptocodinium</i> , <i>Schizochytrium</i>

Fonte: Oetterer; Reginato-D'Arce; Spoto (2006); Spolaore et al. (2006).

Os ácidos graxos linoléico e α -linolênico são precursores dos PUFA ω -6 e ω -3 de cadeia mais longa, respectivamente. Estes ácidos não podendo ser biossintetizados em animais, incluindo o homem, e sendo necessários para o desenvolvimento humano, são considerados essenciais (KEHOU et al., 2009). No entanto, uma vez consumidos, os ácidos linoléico e α -linolênico podem ser alongados até cadeias de pelo menos 20 ou 22 carbonos. O ácido linoléico pode ser metabolizado em outros ácidos γ -linolênico, dihomo- γ -linolênico e araquidônico. O ácido α -linolênico é metabolizado em outros da série ω -3, entre eles EPA e DHA. Este processo metabólico é mediado pelas enzimas chamadas elongases e dessaturases, as quais participam na formação dos PUFA, ω -6 e ω -3, resultando uma competição metabólica entre os dois grupos (Salem Jr., 1999), (Figura 1.4).

Figura 1.4 Metabolismo entre as séries ω -6 e ω -3. Fonte: Salem Jr. (1999)



Para a tecnologia de alimentos, os óleos e gorduras são componentes essenciais ao processamento industrial, pois agem como meio de transferência de calor em frituras, melhoram o gosto, aroma e a coloração dos alimentos, por funcionarem como carreadores de compostos lipídicos entre as fases água, gordura e vapor, o que influencia sua percepção sensorial (OETTERER; REGINATO-D'ARCE; SPOTO, 2006). A principal diferença entre óleo e gordura está no ponto de fusão, isto é, estar abaixo ou acima da temperatura ambiente. Essa propriedade física é um reflexo da sua composição em ácidos graxos e da posição que eles ocupam esterificados à molécula de glicerol (BOBBIO; BOBBIO, 1999).

Óleos e gorduras podem ter origem vegetal ou animal, derivar de frutos (dendê, coco e oliva) ou grãos (soja, algodão e amendoim), e se apresentar de forma visível (que foram separados da planta original ou

da fonte animal, como manteiga, gordura ou óleo para salada) ou invisível (presente em alimentos fritos ou como constituinte de alimentos básicos, como leite, queijo, carnes, pães e massas) (FENNEMA, 2000).

1.6 Conceitos elementares da microalga *Chlorella vulgaris*

Chlorella vulgaris, Kessler e Huss, 1992

Reino Eucariontes

Filo Chlorophyta

Classe Trebouxiophyceae

Ordem Chlorellales

Família das Chlorellaceae

Gênero *Chlorella*

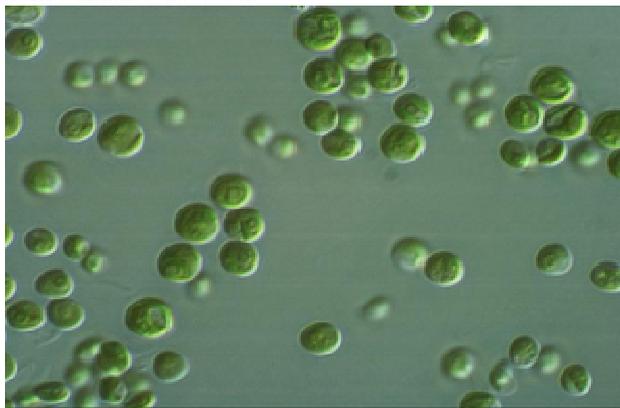
Espécie *C. vulgaris*

1.6.1 Classificação e características de *Chlorella vulgaris*

A *Chlorella vulgaris* (Figura 1.7) é uma microalga pertencente à divisão Chlorophyta, Classe das Trebouxiophyceae da Ordem das Chlorellales da Família das Chlorellaceae e Gênero *Chlorella* (KESSLER e HUSS, 1992). Como pertence à divisão Chlorophyta, a espécie *Chlorella vulgaris* apresenta uma rica composição em carotenóides, nomeadamente α e β -caroteno, neoxantina, luteína, violaxantina e zeaxantina, que se encontram incorporados nas lamelas dos cloroplastos. São predominantemente microscópicas e de água doce, podendo existir em águas salgadas, na neve, no solo e sobre folhas de plantas terrestres (KRIENITZ *et al.*, 2004).

A espécie *Chlorella vulgaris* possui forma esférica, medindo de 2 a 8 μm de diâmetro, unicelular e eucariótica. Micro-organismo fotossintetizante e com reprodução assexuada (DUARTE, 2001).

Figura 1.5 *Chlorella vulgaris*, observada ao microscópio óptico, com aumento de 400x.



Nos anos 40, a espécie *Chlorella vulgaris* começou a ser investigada do ponto de vista nutricional, por ser uma fonte promissora de proteína, lipídeos, carboidratos, vitaminas e minerais. *Chlorella* é considerada GRAS (*Generally Recognized As Safe*) pelo FDA (*Food and Drug Administration*) dos Estados Unidos, podendo ser utilizada como alimento sem causar risco à saúde humana (COSTA et al., 2006).

A biomassa de *Chlorella vulgaris* as seguintes proporções: carboidratos (18 % p/p); proteínas (60 % p/p); lipídeos (11 % p/p) e minerais (2-5 % p/p) Raymundo et al., (2005). Na Tabela 1.3 é apresentada a composição química de três espécies de microalgas.

Tabela 1.3 Composição química de três espécies de microalgas, em % de biomassa

Alga	Proteínas	Lipídeos	Carboidratos	Ácidos Nucléicos
<i>Arthrospira platensis</i> ^a	46 - 50	4,0 - 9,0	8,0 - 14	2,0 - 5,0
<i>Chlorella vulgaris</i> ^b	51 - 58	14 - 22	18 - 20	3,8 - 4,0
<i>Nannochloropsis oculata</i> ^c	25 - 30	31 - 68	7,8 - 8,0	3,8 - 4,2

^aRichmond (1990); ^bBecker (1994); ^cAdaptado Brown (1991).

1.6.2 Fatores relacionados ao cultivo de algas

Um dos pilares fundamentais do cultivo de microalgas é o conhecimento dos fatores de nutrição, físicos e químicos das algas. Estes fatores estão: nutrientes, intensidade de luz, temperatura, pH e agitação das culturas.

Pesquisas relacionadas à interação entre intensidade luminosa, temperatura, agitação e concentração de nutrientes podem contribuir para a otimização do cultivo. Quando se trata de meio de cultura sintético, o alto custo dos nutrientes pode ser um fator limitante para a produção. Entretanto, no caso de cultivos em meios de cultura alternativos, os fatores limitantes para a produção de biomassa restringem-se à luz, temperatura e agitação da cultura (DUARTE, 2001).

A luz é fundamental para o crescimento da microalga, pois atua como a principal fonte de energia no processo de produção de biomassa. As lâmpadas do tipo luz do dia são as que melhor simulam a amplitude de comprimento de onda (350-700 nm) necessária para a fotossíntese, entretanto, podem causar aquecimento nos cultivos, especialmente se as lâmpadas estiverem muito próximas dos frascos experimentais (LOURENÇO, 2006).

Em relação à temperatura, no caso da microalga *Chlorella vulgaris*, temperaturas entre 20 e 30 °C são desejáveis ao cultivo, pois proporcionam estabilidade nos experimentos e aumento da densidade celular (LOURENÇO, 2006).

Quanto ao pH, o aumento do pH próximo a 10,0 leva à decantação de ferro ($\text{Fe}(\text{OH})_3$) e pode ocasionar a aglomeração de algas adsorvidas ao precipitado. Além do ferro, sais de cálcio e alumínio decantam facilmente. O controle do pH pode se feito com a adição de gás carbônico (CO_2) ou utilizar solução tampão Tris (hidroximetil-amino-metano) que é amplamente usado para evitar ou reduzir a precipitação em meios de cultura marinhos. Tris é um material cristalino e pode ser dissolvido para uma solução-estoque. Se empregado no meio de cultura com concentrações de 10 mM, acarreta variações de pH entre 7,4 e 7,7 (LOURENÇO, 2006).

O cultivo de algas em sistemas abertos é considerado uma forma de agricultura e tem como benefício a luminosidade natural sem custos. No entanto, apresenta como desvantagem o risco de contaminação por outros organismos, que pode ser controlado com agitação e aumento do pH (CHEN, 1997).

A produção de biomassa em tanques abertos é feita em processo de propagação contínuo. O ideal é que os tanques sejam rasos com até 30 cm de profundidade, feitos de plástico, concreto ou fibra de vidro (LOURENÇO, 2006).

1.6.3 Meios de cultura e fontes nutricionais

O investimento em reagentes químicos para elaboração do meio de cultura é um dos maiores problemas no cultivo de microalgas. Segundo Cozza (1999), o custo estimado do substrato para o cultivo de micro-organismos costuma representar de 40 a 60 % dos gastos com o cultivo.

Dentre os meios de culturas alternativos utilizados para a produção de microalgas destacam-se: esgoto doméstico esterilizado, efluentes de biodigestores (RODULFO; MARMOL; EMRALINO, 1980), despejos industriais purificados (JUSSIÁK; DUSZOTA; MYCIELSKI, 1984), vinhaça de cana-de-açúcar (OLIVEIRA, 1988), águas residuais da produção de azeite de oliva (SÁNCHEZ et al., 2001), resíduos da suinocultura (RODRIGUES, 2000; MATOS et al., 2006) e concentrado de dessalinização (VOLKMAN, 2006; PINHO, 2009).

Na formulação de quase todos os meios de cultura para microalgas marinhas, a fonte de carbono é o dióxido de carbono. O CO_2 é um gás altamente solúvel em água e tende a se difundir do ar para a água continuamente. Isso supre as microalgas com fonte de carbono, entretanto, em cultivos densos e/ou de grandes volumes, a difusão de CO_2 para os frascos de cultivo tende a ser insuficiente para gerar crescimento satisfatório. Neste caso, o emprego de aeração (borbulhamento de ar dentro de frascos de cultivo) pode proporcionar adição adequada de fontes de carbono (LOURENÇO, 2006).

O nitrogênio é um componente fundamental de três classes de substâncias estruturais das células: proteínas, ácidos nucleicos e pigmentos fotossintetizantes (clorofilas e ficobilinas). A amônia e o íon amônio (NH_3 e NH_4^+ , respectivamente) são formas nitrogenadas utilizadas preferencialmente pelo fitoplâncton. Mandalam e Palsson (1995) destacam que a redução na quantidade de nitrogênio contribui com o aumento da clorofila e a redução de aminoácidos intracelulares. Quando isso ocorre, lipídeos e carboidratos são sintetizados preferencialmente.

1.7 Coleta e concentração de biomassa algácea

A separação das células do meio de cultura pode representar etapa laboriosa, longa ou mesmo de alto custo, dependendo da eficiência desejada, dos materiais empregados e dos volumes envolvidos. As formas mais comuns de aproveitar a biomassa de microalgas são tratadas a seguir.

1.7.1 Filtração

É um processo de retenção de células em uma membrana porosa, filtro ou tela de malha regular e controlada. A filtração é bastante eficiente e prática quando se deseja concentrar pequenos volumes de microalgas em filtros. Porém, em cultivo de grande escala, a separação de volumes expressivos de algas para posterior processamento da biomassa somente é viável se a espécie apresentar células grandes ou estrutura filamentosa (por exemplo, filamentos de *Arthrospira* ou *Aphanizomenon*) (LOURENÇO, 2006).

1.7.2 Centrifugação

A centrifugação é uma operação pela qual se separam substâncias por meio da força centrífuga. Na descrição das separadoras centrífugas utiliza-se o termo: força centrífuga relativa (RFC) ou então de fator 'g'. As centrífugas industriais podem rotacionar a uma RFC entre 700 e 22.000g e as centrífugas de laboratórios rotacionam até 34.000g. Esta operação pode ser bem-sucedida em escala de laboratório, quando pequenos volumes de biomassa são produzidos, variando de poucos mililitros até alguns litros de cultivo. A biomassa é concentrada sem a adição de produtos químicos, conservando suas características originais (LOURENÇO, 2006). Heasman et al. (2000) pesquisaram a coleta da biomassa de dez diferentes espécies de microalgas em três diferentes condições de centrifugação. Duas formas com alta velocidade de rotação - velocidade de aceleração de 6.000g e 13.000g. O terceiro tipo de centrífuga apresentava uma rotação de 1.300g. Os resultados mostraram que > 95 % das células coletadas foram obtidas com centrifugação de 13.000g. A eficiência da concentração das células diminuiu com a redução da aceleração: 60 % para a centrífuga de 6.000g e 40 % na rotação de 1.300g. A centrifugação é um processo de separação eficiente

e também pode ser usada de forma combinada com a floculação, processo tratado a seguir.

1.7.3 Floculação

A floculação consiste na remoção da capacidade das células serem mantidas em suspensão e/ou no estímulo da agregação de células, formando flocos que podem decantar. Essa alternativa é viável para recolher biomassa em qualquer sistema de cultivo. A floculação é bastante adequada em sistemas de grande porte e pode ser espontânea ou induzida. Qualquer processo não controlado que acarrete mudança de pH e produza agregação de células é entendido como floculação espontânea (LOURENÇO, 2006). Quando há interesse efetivo em concentrar biomassa, opta-se por realizar floculação induzida. A eletrofloculação consiste na introdução de corrente elétrica na cultura, formando flocos de algas que emergem e podem ser recolhidos facilmente. A forma mais comum de gerar floculação induzida é por meio de processos químicos. A floculação química envolve, em um primeiro momento, o recolhimento de uma fração do cultivo (por exemplo, 500 mL a 10.000 litros) e tratamento da mesma com agentes floculantes, como bases fortes (NaOH), ácidos fortes (HCl) ou sais inorgânicos, como o sulfato de alumínio ($\text{Al}(\text{SO}_4)_3$), o sulfato férrico ($\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$), o cloreto férrico (FeCl_3) e a cal (CaO), um óxido forte produzido a partir de CaCO_3 . Os agentes floculantes promovem alteração drástica do pH, causando agregação de partículas que estão em suspensão em água (UDUMAN et al. 2010). O floculante ideal deve ser de baixo custo, atóxico e efetivo em baixas concentrações. Oh et al. (2001) examinaram o uso de um floculante microbiano (AM49) na biomassa de *Chlorella vulgaris*. Este floculante foi capaz de agregar 83 % das células algais em pH entre 5-11, que foi consideravelmente maior do que o floculante iônico (sulfato férrico – 72 %) e floculante catiônico de poliacrilamida (78 %).

Algumas microalgas autofloculam espontaneamente. Este tipo de floculação está associada com o aumento do pH no meio - consumo do dióxido de carbono no processo fotossintético - e devido a precipitação de íons inorgânicos, além disso, ocorre a formação de agregados microalgais provavelmente pela excreção de macromoléculas orgânicas e associação entre microalga e bactéria (UDUMAN et al., 2010).

1.8 Análises de composição química de microalgas

As análises químicas com a biomassa algácea podem ser realizadas por diversas metodologias. Determinações de proteínas das microalgas apresentam vastas aplicações, desde informações básicas sobre a biomassa fitoplanctônica até o aproveitamento desses recursos em atividades de natureza biotecnológica e comercial. A dosagem de proteínas em microalgas demonstram particular dificuldade de comparação, em razão das diferentes metodologias analíticas. Diferenças na composição da parede celular e nos procedimentos utilizados na extração de proteínas (trituração, sonicação, extração química, etc) influenciam nos resultados obtidos (FLEURENCE, 1999).

Os métodos mais empregados para quantificação de proteínas em microalgas (LOURENÇO, 2006) são: i) método de Lowry et al.; ii) método de Bradford; iii) o somatório dos resíduos de ácidos aminados; e iv) a multiplicação do teor de N por 6,25. O uso de fatores de conversão de nitrogênio para proteínas (fatores N-Prot) é a maneira mais prática para estimar os conteúdos totais de proteínas. O método de Kjeldahl e suas variações é o mais utilizado em todo o mundo para quantificar o teor de nitrogênio, pois é barato, rápido e preciso.

A melhor forma de analisar ácidos aminados totais é por CLAE. Uma proporção protéica elevada por si só não é um indicativo de qualidade nutricional, uma vez que esta é determinada pelo conteúdo, presença e disponibilidade dos aminoácidos das proteínas (RICHMOND, 1990). Na Tabela 1.4, observar-se o perfil de aminoácidos de *Chlorella vulgaris* em comparação com outros alimentos e os valores mínimos requeridos pela FAO.

Tabela 1.4 Comparação da composição de aminoácidos em proteínas alimentares, *Chlorella vulgaris* e requerimentos em aminoácidos essenciais da FAO, em g/100g de proteína total

aa	Bacalhau (filé) ^b	Bife Bovino ^b	Leite de vaca ^b	<i>Chlorella vulgaris</i> ^c	FAO ^d
Ile*	5,2	4,9	4,9	4,8	2,8
Leu*	8,3	7,6	9,1	10,7	6,6
Lys*	9,6	8,7	7,4	7,7	5,8
Met*	2,8	2,6	2,6	1,5	2,5
Cys*	1,1	1,2	0,8	0,5	2,5
Phe*	4,0	4,3	4,9	6,0	6,3
Tyr*	3,4	3,4	4,1	3,0	6,3
Thr*	4,7	4,5	4,4	5,2	3,4
Trp*	1,1	1,2	1,3	1,1	1,1
Val*	5,6	5,1	6,6	7,8	3,5
His*	2,8	3,5	2,7	1,9	1,9
Arg	6,2	6,4	3,6	7,8	
Ala	6,7	6,1	3,6	7,2	
Asp	10,2	9,1	7,7	10,4	
Glu	14,8	16,5	20,6	11,6	
Gly	4,6	5,6	2,0	5,0	
Pro	4,0	4,9	8,5	3,9	
Ser	4,8	4,3	5,2	3,5	

*aminoácidos essenciais para o ser humano; ^bCoultate (2004); ^cQuevedo et al. (1999); ^dFAO/WHO (apud ROMAN e SGARBIERI, 2005).

Em relação às análises de lipídeos totais em microalgas, estas substâncias são estruturalmente diversas, compreendendo ácidos graxos e esteróis, por exemplo. Não há uma reação química universal que possa ser aplicada a todos os lipídeos. Existem três fases principais do processo de preparação prévia da biomassa para a obtenção da fração lipídica: (a) a separação das algas, (b) o rompimento da parede celular das mesmas e, (c) extração dos lipídeos da biomassa. A eficiência e a metodologia utilizada nessas três etapas são um gargalo importante sobre a economia do processo para a produção de biocombustível a partir de microalgas (PIENKOS; DARZINS, 2009).

Na produção de biomassa das microalgas, a etapa de separação das mesmas é considerada mais difícil e cara em comparação aos cultivos de plantas oleaginosas. A extração de lipídeos a partir da biomassa algal apresenta desafios que não foram encontrados anteriormente com os grãos oleaginosos (HU et al., 2008). No caso das microalgas, não são bem compreendidas as relações entre a extração dos lipídios, a associação desses com estruturas celulares e o rompimento das mesmas. A maioria dos métodos de extração atual está enfrentando desafios com os altos custos associados com a remoção de água e as dificuldades de romper as estruturas celulares para tornar os lipídios suficientemente acessíveis (CHEN et al., 2009).

A maioria das análises econômicas publicadas extrapola os procedimentos de extração de óleo de sementes para biomassa algal. Sementes requerem muito menos pré-tratamento ou processamento e os óleos (principalmente triglicerídeos) são extraídos por prensagem do óleo ou usando um solvente apolar para extrair os triglicerídeos. Devido a grandes diferenças entre as propriedades da biomassa de algas e de sementes e na composição dos óleos, procedimentos específicos deverão ser desenvolvidos, aplicados e custeados para um processo de produção de algas (WILLIAMS; LAURENS, 2010).

Vários métodos podem ser usados para romper as células antes ou durante a extração, dependendo da parede celular das microalgas e da natureza do produto a ser obtido. Entre estes métodos citam-se: **ação mecânica** (homogeneização, trituração, ultrassom (sonicação), micro-ondas, autoclave e atomização), **química** (solventes orgânicos, choque osmótico, ácido e alcalino) e **enzimática** (reações enzimáticas) (DUSTAN et al., 1992; LEE; YOON; OH, 1998; CHEN et al., 2009; MATA; MARTINS; CAETANO, 2010). No entanto, o método mais eficiente para microalgas ainda não foi bem definido (LEE et al., 2010). As extrações assistidas por ultrassom e por micro-ondas são reconhecidas como técnicas eficientes de extração, pois reduzem drasticamente o tempo de realização desta, aumentando o rendimento e, muitas vezes, a qualidade do extrato (CRAVOTTO; CINTAS, 2007).

Lee et al. (2010) testaram diferentes métodos (autoclave, “bead-beating”, micro-ondas, sonicação e solução NaCl 10 %) para identificar o mais eficiente no rompimento das células de *Botryococcus* sp., *Chlorella vulgaris* e *Scenedesmus* sp. O conteúdo lipídico das três espécies foram 5,4-11,9; 7,9-8,1; 10,0-28,6; 6,1-8,8 e 6,8-10,9 g L⁻¹ quando usando autoclave, “bead-beating”, micro-ondas, ultrassom e solução de NaCl 10 %, respectivamente. Dos métodos aplicados nas três microalgas a extração por micro-ondas mostrou-se mais eficiente em

produtividade lipídica, seguido de homogeneização, sonicação, choque osmótico e autoclave. Os autores citam que resultados semelhantes pelo método de extração lipídica por micro-ondas foram obtidos com óleos vegetais e gorduras animais. Ainda, o método por micro-ondas mostrou-se simples, rápido e eficiente quando testado em microalgas e comprovado em outras matrizes oleicas.

Grima et al. (1996) relataram que a extração direta de ácidos graxos a partir da biomassa úmida de *P. tricornutum* com etanol 96 % produziu rendimento ligeiramente inferior (90 %) aos obtidos a partir da biomassa liofilizada (96 %), tornando a secagem dispensável para a redução dos custos da extração. Entre os métodos utilizados para secagem da biomassa de microalgas como *Chlorella*, *Scenedesmus* e *Spirulina* incluem atomização (spray-drying), secagem por tambor (drum-drying), liofilização (freeze-drying) e secagem ao sol (RICHMOND, 2004).

O conteúdo de lipídeos da biomassa microalgal pode variar entre 1 a 40 % do peso seco e, em certas condições de cultivo, pode alcançar até 85 %. Os lipídeos algais são tipicamente compostos por glicerol, açúcares ou bases esterificadas e ácidos graxos contendo entre 12 e 22 carbonos, podendo ser tanto saturados quanto mono ou poli-insaturados (BECKER, 2004).

Francisco (2010) quantificou o extrato lipídico da microalga *Chlorella vulgaris*, utilizando o método de Bligh e Dyer (1959) e qualificou-o pelo método de Hartman e Lago (1976), através de cromatografia gasosa. A espécie *Chlorella vulgaris* apresentou um conteúdo lipídico na biomassa de 27 %. O perfil dos ácidos graxos (Tabela 1.5) do extrato lipídico seco demonstrou que as frações saturadas, monoinsaturadas e poli-insaturadas são respectivamente, 43,50 %; 41,89 % e 16,09 %. A mesma espécie apresentou predominância praticamente equivalente em dois ácidos graxos, o pentadecanóico (C15:0) e cis-10-heptadecenóico (C17:1), cujas proporções foram de 31,8 e 31,6 %, respectivamente. Estes ácidos graxos têm entre 14 e 18 carbonos na cadeia, sendo predominantemente monoinsaturados

Tabela 1.5 Composição dos ácidos graxos contidos na espécie *Chlorella vulgaris*

Ácidos Graxos	Designação Estenográfica	Peso Seco (%)
Ácido mirístico	C14:0	1,19
Ácido pentadecaenóico	C15:0	31,8
Ácido palmítico	C16:0	2,22
Ácido palmitoléico	C16:1	1,02
Ácido heptadecanóico	C17:0	3,90
Ácidocis-10-heptadecenóico	C17:1	31,6
Ácido esteárico	C18:0	1,06
Ácido oléico	C18:1n9c	7,98
Ácido linoléico	C18:2n6c	0,10
Ácido araquídico	C20:0	2,80
Ácido eicosapentaenóico	C20:5n3	0,53
Ácido docosahexaenóico	C22:6n3	0,54
Ácido nervônico	C24:1	0,47

Fonte: Francisco (2010)

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALAMEDINE, I.; FADEL, M. Brine discharge from desalination plants: a modeling approach to an optimized outfall design. **Desalination**, v. 214, p. 241-260, 2007.
- ALBINATI, R. C. B.; ALBINATI, A. C. L.; MEDEIROS, Y. D. Utilização de águas desprezadas para a produção de alimentos no semi-árido. **XV Simpósio Brasileiro de Recursos Hídricos**, 2003.
- ANUPAMA, P.; RAVINDRA, L. Value-added food: Single cell protein. **Biotechnology Advances**, v. 18, p. 459-479, 2000.
- ARAÚJO, A. L. C.; FONSECA, A. L.; VALE, M. B.; FERNANDES, A. K. S.; GADELHA, C. P. F. **Avaliação dos sistemas de dessalinização de águas no semiárido no Rio Grande do Norte**. ABES - Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental, 2005.
- ARREDONDO-VEGA, B. O. **Crecimiento autotrófico y mixotrófico de la microalga marina *Porphyridium cruentum***. 1995. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Facultad de Farmácia, Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, 1995.
- BECKER, E. W. **Microalgae: Biotechnology and Microbiology**. Cambridge: Cambridge University Press, 1994. 301 p.
- BECKER, E. W. Microalgae in human and animal nutrition. In: RICHMOND, A. (ed.) **Handbook of Microalgae Culture: Biotechnology and Applied Phycology**. London: Blackwell Science, 2004. p. 312-351.
- BELITZ, H. D.; GROSCH, W. **Química de los alimentos**. 2ed. Zaragoza: Acribia, 1997. 1087p.
- BLIGH, E. G.; DYER, J. W. A Rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, p. 911-917, 1959.
- BMLP – Brazilian Mariculture Linkage Program – Programa Brasileiro de Intercâmbio em Maricultura. Série Maricultura – **Cultivo de Algas**. Instituto de Biologia – UFBA, 2003.
- BOBBIO, P. A; BOBBIO, F. O. **Química do Processamento de Alimentos**. 2 ed. São Paulo: Varela, 1999.
- BONEY, A. D. **Phytoplankton: new studies in biology**. 2 ed. London: Edward Arnold, 1989, 118p.
- BOROWITZKA, M. A. Products from microalgae. **Infofish International**, n.5, p. 21-26, 1993.

BOROWITZKA, M. A. Algal biotechnology products and process – matching science and economics. **Journal of Applied Phycology**, v. 4, p. 267-279, 1992.

BRASIL. ANA - AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS. MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **PANORAMA DA QUALIDADE DAS ÁGUAS SUBTERRÂNEAS NO BRASIL**. CADERNOS DE RECURSOS HÍDRICOS. BRASÍLIA – DF, 2005.

BREMERE, I.; KENNEDY, M.; STIKKER, A.; SCHIPPERS, J. How water scarcity will effect the growth in the desalination market in the coming 25 years. **Desalination**, v. 138, p. 7-15, 2001.

BROWN, M. R. The amino-acid and sugar composition of 16 species of microalgae used in maricultura. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 145, p. 79-99, 1991.

CERTIK, M.; SHIMIZU, S. Biosynthesys and regulation of microbial polyunsaturated fatty acid production. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 87, n. 1, 1-14, 1999.

CHEN, F. High cell density culture of microalgae in heterothophic growth. **Trends in Biotechnology**, v.14, p.421-426, 1997.

CHEN, P.; MIN, M.; CHEN, Y.; WANG, L.; LI, Y.; CHEN, Q.; WANG, C.; WAN, Y.; WANG, X.; CHENG, Y.; DENG, S.; HENNESSY, K.; LIN, X.; LIU, Y.; WANG, Y.; MARTINEZ, B.; RUAN, R. Review of the biological and engineering aspects of algae to fuels approach. **International Journal of Agricultural and Biological Engineering**, v. 2, n.4, 2009.

CONNON, M. Culturing of *Chlorella vulgaris* - Standard Operating Procedure. **University of Reading, Cambridge, 2007. Disponível em:** <http://www.biosci.rdg.ac.uk/Research/eb/daphnia.htm>

COSTA, J. A. V.; RADMANN, E. M.; CERQUEIRA, V. S.; SANTOS, G. C.; CALHEIROS, M. N. Perfil dos ácidos graxos das microalgas *Chlorella vulgaris* e *Chlorella minutíssima* cultivadas em diferentes condições. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 17, n. 4, p. 429-436, 2006.

COULTATE, T. P. **Alimentos: a química de seus componentes**. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 368p.

COZZA, K. L. ***Spirulina platensis* em meios naturais e sintéticos: fatores nutricionais e custos experimentais**. 1999. 204p. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 1999.

- CRAVOTTO, G.; CINTAS, P. **Extraction of flavourings from natural sources**. In: Taylor, A. Hort, J. (Eds.) *Modifying Flavour in Food*. Cambridge: Woodhead Publishing Ltd., p. 41-63, 2007.
- DERNER, R. B. **Efeito de Fontes de Carbono no Crescimento e na Composição Bioquímica das Microalgas *Chaetoceros muelleri* e *Thalassiosira fluviatilis*, com Ênfase no Teor de Ácidos Graxos Poliinsaturados**. 2006. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.
- DUARTE, I. C. S. **Influência do meio nutricional no crescimento e composição centesimal de *Chlorella* sp (Chlorophyta, Chlorococcales)**. 2001. 148p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2001.
- DUSTAN, G. A.; VOKMAN, J. K.; JEFFREY, S. W.; BARRET, S. M. Biochemical composition of microalgae from the green algal classes *Chlorophyceae* and *Parasinophyceae*: 2. Lipid classes and fatty acid. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v.161, p.115-134, 1992.
- DZIEZAK, J. Fats, oils and fat substitutes. **Food Technology**, Chicago, v. 43, p.66-74, 1989.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) 2004. **The State of World Fisheries and Aquaculture**. Disponível em: www.fao.org/fishery/sofia/en
- FENNEMA, O. R. **Química de los Alimentos**. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza, Espanha, 2000.
- FERREIRA, W. B. **Solução Alternativa de Abastecimento de Água para consumo humano em Comunidade difusas: Monitoramento e Controle da Qualidade da Água**. *Dissertação* (Mestrado em Engenharia Química), UFCG, Campina Grande – PB, 2008.
- FLEURENCE, J. Seaweed proteins: biochemical, nutritional aspects and potential use. **Trends Food Science Technology**, v. 10, p. 25-28, 1999.
- FRANÇA, K. B. Aplicação da Osmose Inversa em Dessalinização. **II Escola Latino América de Membranas e Processos com Membranas**, Campina Grande-PB, Julho 2007.
- FRANCISCO, E. C. **Biofixação de dióxido de carbono por microalgas acumuladoras de materiais graxos**. 2010. Dissertação (Mestrado em Processos Químicos) – Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, 2010.

- FURTADO, F. N.; MOTA, S. Impactos do uso de rejeitos de um dessalinizador de água na irrigação da erva-sal, sobre a planta e o solo. **Saneas**, v. 15, p. 6-10, 2003.
- GÓMEZ, M. E. D. B. **Modulação da composição de ácidos graxos poli-insaturados ômega 3 de ovos e tecidos de galinhas poedeiras, através da dieta. I. Estabilidade oxidativa.** 2003. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.
- GRIMA, E. M.; MEDINA, A. R.; GIMÉNEZ, A. G.; GONZÁLEZ, M. J. I. Gram-scale purification of eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5n-3) from wet *Phaeodactylum tricornutum* UTEX 640 biomass. **Journal of Applied Phycology**, v.8, p.359-367, 1996.
- GROBBELAAR, J. U. Algal Biotechnology: real opportunities for África.** South African Journal of Botany, n. 70 (1), p. 140-144, 2004.
- GUILLARD, R. R. L. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: Smith, W. L. & Chanley, M. H. (eds.). **Culture of Marine Invertebrate Animals.** Plenum, New York, USA, p.29-60, 1975.
- GUNSTONE, F. D. **Fatty acid and lipid chemistry.** Londres, Blackie Acad. Prof., p. 1-86, 1996.
- HARTMAN, L; LAGO, R. C. A. A rapid determination of fatty acid methyl esters from lipids. **Laboratory practice**, v. 22 (8), p. 475-476, 1976.
- HEASMAN, M.; DIEMAR, J.; O' CONNOR, W.; SUSHAMES, T.; FOULKES, L.; NELL, J. A. Development of extended shelf-life microalgae concentrate diets harvested by centrifugation for bivalve molluscs a summary. **Aquaculture Research**, v. 31, p. 637, 2000.
- HENRIKSON, R. **Earth Food Spirulina.** Hawaii: Ronore Enterprises, 2009.
- HU, Q.; SOMMERFELD, M.; JARVIS, E.; GHIRARDI, M.; POSEWITZ, M.; SEIBERT, M.; DARZINS, A. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. **The Plant Journal**, v.54, p.621-639, 2008.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Pesquisa Nacional de Saneamento Básico - 2000.** Rio de Janeiro: IBGE, 2002.
- JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos.** 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.
- JUSSIAK, M. P.; DUSZOTA, K.; MYCIELSKI, R. Intensive culture of *Chlorella vulgaris* as the second stage on biological purification of nitrogen industry wastewater. **Water Research**, v. 18, p. 1-7, 1984.

- KEHOU, P.; XIAOLEI, M.; JIANZHONG, Y.; BAOHUA, Z.; GUANPIN, Y. Cloning and Phylogenetic Analysis of a Fatty Acid Elongase Gene from *Nannochloropsis oculata* CS179. **Journal Ocean University China**, v. 8, p. 392-398, 2009.
- KESSLER, E.; HUSS, V. A. R. Comparative physiology and Biochemistry and taxonomic assignment of the *Chlorella* (Chlorophyceae) strains of the culture collection of the University of Texas at Austin. **Journal of Phycology**, v. 28, p. 550-553, 1992.
- KRIENITZ, L.; HEGEWALD, E. H.; HEPERLE, D.; HUSS, V. A. R. Phylogenetic relationship of *Chlorella* and *Parachlorella* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). **Phycologia**, 2004.
- KIRK, E. A.; BEHRENS, P. W. Commercial developments in microalgal biotechnology. **Journal of Phycology**, n. 35, p. 215-226, 1999.
- LABORDE, H. M.; FRANÇA, K. B.; NEFF, H.; LIMAB, A. M. N. Optimization strategy for a small-scale reverse osmosis water desalination system based on solar energy. **Desalination**, v. 133, p. 1-12, 2001.
- LEE, Y. K. Commercial production of microalgae in the Asia-pacific rim. **Journal of Applied Phycology**, v. 9, p. 403-411, 1997.
- LEE, S. J.; YOON, B. D.; OH, H. M. Rapid method for the determination of lipid from the green alga *Botryococcus braunii*. **Biotechnology Techniques**, v.12, n.7, p. 553-556, 1998.
- LEE, J. Y.; YOO, C.; JUN, S. Y.; AHN, C. Y.; OH, H. M. Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 75-77, 2010.
- LOURENÇO, S. O. **Variação da Composição Bioquímica de Microalgas Marinhas em Cultivos com Ênfase nos Efeitos da Disponibilidade do Elemento Nitrogênio**. 1996. 164 f.. Tese (Doutorado em Oceanografia Biológica) – Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1996.
- LOURENÇO, S. O. **Cultivo de Microalgas Marinhas: Princípios e Aplicações**. São Carlos: RiMa, 2006.
- MANDALAM, R. K.; PALSSON, B. O. Elemental balancing of biomass and medium composition enhances growth capacity in high density *Chlorella vulgaris*. **Biotechnology Letters**, v. 17, p. 225-228, 1995.
- MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, p. 217-232, 2010.

- MATSUDO, M. C. **Cultivo contínuo de *Arthrospira (Spirulina) platensis* em fotobiorreator tubular utilizando uréia como fonte de nitrogênio e CO₂ puro ou proveniente de fermentação alcoólica.** 2010. Tese (Doutorado em Tecnologia de Fermentações). Universidade Federal de São Paulo. São Paulo – SP.
- MATOS, A. C.; BOLL, M. G.; TESTOLIN, G.; ROCZANSKI, M. **Piscicultura sustentável integrada com suínos.** Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão – EPAGRI. Florianópolis: Boletim Técnico n. 131, 2006.
- MOHAMED, A.M.O.; MARAQA, M.; AL HANDHALY, J. Impact of land disposal of reject brine from desalination plants on soil and groundwater. **Desalination**, v. 182, p. 411-433, 2005.
- MONTEIRO, V. P.; PINHEIRO, J. C. V. Critério para implantação de tecnologias de suprimentos de água potável em municípios cearenses afetados pelo alto teor de sal. **Revista de Economia & Sociologia Rural**, v. 42, n. 2, p. 365-387, 2004.
- OETTERER, M.; REGINATO-D'ARCE, M. A. B.; SPOTO, M. H. F. **Fundamentos de Ciência e Tecnologia de Alimentos.** Barueri, SP: Manole, 2006.
- OH, H. M.; LEE, S. J.; PARK, M. H.; KIM, H. S.; KIM, H. C.; YOON, J. H.; KWON, G. S.; YOON, B. D. Harvesting of *Chlorella vulgaris* using a bioflocculant from *Paenibacillus* sp. AM49. **Biotechnology Letters**, v. 23, p. 1229–1234, 2001.
- OLIVEIRA, H. T. **Utilização de vinhaça como meio de cultura para *Chlorella vulgaris*.** 1988. 146 p. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1988.
- ONG, C.; TANJI, K.; DAHLGREN, R.; SMITH, G.; QUEK, A. Water quality and trace element evapoconcentration in evaporation ponds for agricultural waste water disposal. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.43, n.7, p.1941-1947. 1995.
- PIENKOS, P. T.; DARZINS, A. The promise and challenges of microalgal-derived biofuels. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**. v.3, p. 431-440, 2009.
- PINHO, M. A. **Desenvolvimento de meio de cultura a base de concentrado de dessalinização para *Arthrospira (Spirulina) platensis*.** 2009. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis –SC.
- PORTO, E. R.; AMORIM, M. C. C.; SILVA JÚNIOR, L. G. A. Uso do rejeito da dessalinização de água salobra para irrigação da erva-sal

- (*Atriplex nummularia*). **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v.5, n.1, p.111-114, 2001.
- PULZ, O.; GROSS, W. Valuable products from biotechnology of microalgae. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 65, p. 635-648, 2004.
- QADIR, M.; SHARMA, B. R.; BRUGGEMAN, A.; CHOUKR-ALLAH, R.; KARAJEH, F. Non-conventional water resources and opportunities for water augmentation to achieve food security in water scarce countries. **Agricultural Water Management**, v. 87, p. 2-22, 2007.
- QUEVEDO, H. J. M.; CABRALES, M. M. Q.; ARCEO-Y, A. A.; NAZARIO, L. H. Composición bioquímica y evaluación de la calidad proteica de la biomasa autotrófica de *Chlorella vulgaris*. **Revista Cubana de Alimentação e Nutrição**, v. 13, p. 123-128, 1999.
- RAYMUNDO, A.; GOUVEIA, L.; BATISTA, A. P.; EMPIS, J.; SOUZA, I. Fat mimetic capacity of *Chlorella vulgaris* biomass in oil-in-water food emulsions stabilized by pea protein. **Food Research International**, v. 38, p. 961-965, 2005.
- RICHMOND, A. Cell response to environmental factors. In: RICHMOND, A. (ed.) *CRC Handbook of Microalgal Mass Culture*. Boca Raton: CRC, 1990. p. 69-100. (a).
- RICHMOND, A. **Handbook of microalgal mass culture**. Boston: CRC Press, 1990. 558p.
- RICHMOND, A. Microalgal biotechnology at the turn of the millennium: A personal view. **Journal Applied Phycology**, v. 12, p. 441-451, 2000.
- RICHMOND, A. **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. Oxford: Blackwell Science, 2004. 566p
- RODRIGUES, J. B. R. **Eficiência do crescimento da microalga *Chlorella minutissima* e sua aplicação em resíduos de suinocultura – Valorização e tratamento**, 2000. 118p. Tese (Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2000.
- RODULFO, B. R.; MARMOL, N. H. R.; EMRALINO, G. A. Production of *Chlorella* in clarified effluent from hog manure biogas digester. **Phillipp Journal Science**, v. 109, p. 51-58, 1980.
- ROMAN, J. A.; SGARBIERI, V. C. Obtenção e caracterização química e nutricional de diferentes concentrados de caseína. **Revista de Nutrição**, v. 8, n. 1, p.75-83, 2005.

SALEM Jr., N. Introduction to polyunsaturated fatty acids.

Backgrounder, v. 3, n. 1, p.1-8, 1999.

SÁNCHEZ, S.; MARTÍNEZ, M. E.; ESPEJO, M. T.; PACHECO, R.; ESPINOLA, F.; HODAIFA, G. Mixotrophic culture of *Chlorella pyrenoidosa* with olive-mill wastewater as the nutrient medium.

Journal of Applied Phycology, v. 13, p.443–449, 2001.

SCHNEIDER, R. P.; TSUTIYA, M. T. **Membranas Filtrantes para o Tratamento de Água, Esgoto e Água de Reúso**. São Paulo:

Associação Brasileira de Engenharia Sanitária, 1ª edição, 2001. 115p.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROCICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed. Editora UFSC/UFRGS, 2004

SIPAÚBA-TAVARES, L. H.; ROCHA, O. **Produção de Plâncton (Fitoplâncton e Zooplâncton) para Alimentação de Organismos Aquáticos**. Editora: São Carlos – RiMa, SP, 2003.

SOARES, T. M.; SILVA, I. J. O.; DUARTE, S. N.; SILVA, E. F. F.

Destinação de águas residuárias provenientes do processo de dessalinização por osmose reversa. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.10, n.3, p.730–737, 2006.

SOBREIRA-LEITE, C. E. **O Potencial de Água Subterrânea do Semiárido Brasileiro**. 1º Simpósio sobre captação de água de chuva no semiárido brasileiro. Petrolina – PE, 1997.

SPOLAORE, P.; JOANNIS-CASSAN, C.; DURAN, E.; ISAMBERT, A. Commercial Applications of Microalgae. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 101, n. 2 p. 87-96, 2006.

STEIN, J. R. **Handbook of Phycological Methods**. Culture Methods and Growth Measurements. Cambridge: University Press, 1973. 448p.

SUASSUNA, J. Potencialidades hídricas do nordeste brasileiro.

Parcerias Estratégicas, n.20, p. 119-144, 2005.

TOMASELLI, L. The microalgal cell. In: RICHMOND, A. (ed.).

Handbook of Microalgal Culture: biotechnology and applied phycology. Oxford: Blackwell Science, 2004. p. 3-19.

TREDICI, M. R. Mass production of microalgae: photobioreactors. In: RICHMOND, A. (ed.). **Handbook of Microalgal Culture: biotechnology and applied phycology**. Oxford: Blackwell Science, p. 178-214, 2004.

UDUMAN, N.; QI, Y.; DANQUAH, M. K.; FORDE, G. M.

HOADLEY, A. Dewatering of microalgal cultures: A major bottleneck

- to algae-based fuels. **Journal of Renewable and Sustainable Energy**, v. 2, p. 01-15, 2010.
- VOLKMANN, H. **Utilização de rejeito dessalinizador como meio de cultura alternativo para o cultivo de *Arthrospira (Spirulina) platensis***. 2006. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis –SC.
- VONSHAK, A. Laboratory techniques for the cultivation of microalgae. In: RICHMOND, A. (ed.). **CRC Handbook of Microalgal Mass Culture**. Boca Raton: CRC, 1990. p. 117-145.
- VONSHAK, A.; TORZILLO, G. Environmental stress physiology. In: RICHMOND, A. (ed.). **Handbook of Microalgal Culture: biotechnology and applied phycology**. Oxford: Blackwell Science, p. 57-82, 2004.
- WHITE, J. A.; HART, R. J.; KRY, J. C. An evaluation of the Waters Pico-Tag system for the amino acid analysis of food materials. **Journal of Automatic Chemistry**, v. 8, p. 170-177, 1986.
- WILLIAMS, P. J. le B.; LAURENS, L. M. L. Microalgae as biodiesel & biomass feedstocks: Review & analysis of the biochemistry, energetics & economics. **Energy & Environmental Science**, v.3, p. 554-590, 2010.
- YAMASAKI, S.; HIRATA, H. CO₂ Concentration Change in *Nannochloropsis* sp. Culture Medium. **Aquacultural Engineering**, v. 14, p. 357-365, 1995.

CAPÍTULO 2

**OTIMIZAÇÃO DE MEIO DE CULTURA À BASE DE
CONCENTRADO DE DESSALINIZAÇÃO PARA A
PRODUÇÃO DE *Chlorella vulgaris***

OTIMIZAÇÃO DE MEIO DE CULTURA À BASE DE CONCENTRADO DE DESSALINIZAÇÃO PARA A PRODUÇÃO DE *Chlorella vulgaris*

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi otimizar um meio de cultura padrão utilizado no cultivo da microalga *Chlorella vulgaris* adicionado de concentrado de dessalinização para avaliar a produção de biomassa e produtividade lipídica. O cultivo inicial foi mantido em frascos de 500 mL em Bold Basal Medium (BBM), a 27°C, sob iluminação de 10 klux fornecida por lâmpadas fluorescentes com fotoperíodo de 12-h claro/12-h escuro. Foi avaliado o efeito de três nutrientes: NaNO₃, KH₂PO₄ e solução micronutriente adicionados ao meio de cultura padrão. Segundo a análise das superfícies de respostas, foi possível maximizar a produção de biomassa fazendo uso do concentrado de dessalinização. O meio de cultura proposto para otimizar o cultivo autotrófico de *Chlorella vulgaris* consiste de 0,09 g L⁻¹ de NaNO₃, 0,014 g L⁻¹ de KH₂PO₄ e 0,20 mL L⁻¹ de solução micronutriente. A máxima produção de biomassa e produtividade lipídica obtidas utilizando o meio de cultura otimizado foram de 0,59 g L⁻¹ e 10,42 mg g⁻¹ dia⁻¹, respectivamente.

Palavras-chave: concentrado de dessalinização, superfície de resposta, *Chlorella vulgaris*, biomassa, produtividade lipídica

**OPTIMIZATION OF CULTURE MEDIUM BASED ON
DESALINATION CONCENTRATE FOR
PRODUCTION OF *Chlorella vulgaris***

ABSTRACT

The aim of this study was to optimize a standard culture medium used in the cultivation of microalgae *Chlorella vulgaris* supplemented with the reject from concentrated desalination in order to evaluate biomass production and lipid productivity. The initial culture was kept in 500 mL flasks containing Bold Basal Medium (BBM), at 27°C and under 10 klux illumination provided by fluorescent lamps with a photoperiod of 12-h light/12-h dark. The effect of the three nutrients was evaluated: sodium nitrate, potassium phosphate and micronutrient solution. According to the analysis of response surfaces, production of biomass can be maximized by using of desalination concentrate. The culture proposed for optimization of the autotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* consisted of 0.09 g L⁻¹ of NaNO₃, 0.014 g L⁻¹ of KH₂PO₄ and 0.20 mL L⁻¹ of micronutrient solution. The maximum biomass production and lipid content were 0.59 g L⁻¹ and 10.42 mg g⁻¹ day⁻¹, respectively.

Keywords: Concentrated desalination; Response surface; *Chlorella vulgaris*, Biomass, Lipid productivity

1 INTRODUÇÃO

As tecnologias de dessalinização, com destaque ao processo de dessalinização por osmose reversa, constituem alternativas de obtenção de água potável para suprir o fornecimento às regiões que se encontram em escassez deste recurso. São técnicas de tratamento de água por remoção de sais e posterior enquadramento aos padrões de potabilidade para consumo humano (LABORDE et al., 2001).

Como conseqüência da sua implementação, o processo de dessalinização origina uma série de implicações ambientais, sendo o seu lançamento inadequado no meio ambiente a principal causa de degradação das áreas adjacentes às unidades de dessalinização (MOHAMED; MARAQA; AL HANDHALY, 2005).

Devido à capacidade poluidora deste material extremamente rico em sais, Albinati, Albinati e Medeiros (2003) citam a utilização do concentrado do processo de dessalinização para a produção de alimentos, tais como: na piscicultura e larvicultura (cultivo de camarões); também no cultivo de plantas halófitas tolerantes a altas concentrações salinas, como exemplo - *Atriplex nummularia* - utilizada como recurso forrageiro.

Volkman (2006) aborda a viabilidade do cultivo de micro-organismos como as microalgas no concentrado de dessalinização para a produção de biomassa, com finalidade biotecnológica.

Ainda, na aplicação comercial em distintas áreas como na nutrição humana e animal, no tratamento de águas residuais, na produção de energia (biogás) e na obtenção de compostos de interesse nas indústrias alimentar, química e farmacêutica (BOROWITZKA, 1993; RICHMOND, 2004; LORENÇO, 2006).

Vários fatores devem ser observados para obter custo-efetividade em uma produção em larga escala de microalgas, tais como o custo do terreno, da mão de obra, o clima da região e a biologia da alga (BOROWITZKA, 1999; HENRIKSON, 2009). *Chlorella vulgaris* geralmente é produzida como uma monocultura em sistemas abertos de cultivo em massa, no qual o meio de cultura empregado constitui uma parcela significativa dos custos envolvidos em sua produção (LOURENÇO, 2006). Desta forma, o desenvolvimento de meios de cultura de baixo custo tornou-se uma importante área de estudo, resultando em um grande número de meios de cultura obtidos a partir de

diversos tipos de resíduos e fontes alternativas de nutrientes (OLIVEIRA, 1988; ANAGA; ABU, 1996; PINHO, 2009).

A microalga *Chlorella vulgaris* possui grande capacidade fotossintética, alto teor de clorofila, proteínas e ácidos graxos (HENRIKSON, 2009). Além disso, *Chlorella vulgaris* tem sido muito estudada como fonte promissora para a produção de biodiesel e no seqüestro de carbono (BILANOVIC et al. 2009; MATA; MARTINS; CAETANO, 2010).

Em geral, a otimização de um processo de cultivo microalgal pode ser alcançada utilizando métodos estatísticos, como a metodologia de superfície de resposta (RSM). A metodologia de superfície de resposta é um método estatístico baseado no modelo multivariado não-linear, sendo amplamente utilizada na otimização de bioprocessos (GRANATO et al., 2011).

Este estudo tem como objetivo otimizar um meio de cultura à base de concentrado de dessalinização, utilizando como ferramenta estatística um delineamento fatorial fracionário, para obter a máxima produção de biomassa e produtividade de lipídeos de *Chlorella vulgaris*.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Microalga e condições de cultivo

A microalga *Chlorella vulgaris*, foi isolada em tanques de cultivo de peixes (tilápias) contendo concentrado de dessalinização. A mesma foi mantida em sala específica denominada de cepário no Laboratório de Biotecnologia Alimentar da Universidade Federal de Santa Catarina, a 27°C, sob iluminação de 10 klux fornecida por lâmpadas fluorescentes com fotoperíodo de 12-h claro/12-h escuro em frascos de 500 mL em Bold Basal Medium (BBM) contendo (g L^{-1}): K_2HPO_4 , 0,075; KH_2PO_4 , 0,175; $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,075; NaNO_3 , 0,250; $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,025; NaCl , 0,025; 1,0 mL L^{-1} de solução micronutriente contendo (g L^{-1}): EDTA-Na_4 , 0,05; $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,00498 e H_3BO_3 , 0,01142; 0,1 mL L^{-1} de solução traços de metais e 30 mL L^{-1} de extrato de levedura 1%.

2.2 Medidas da biomassa

O peso da biomassa, em g L^{-1} de *Chlorella vulgaris* foi obtido por filtração de 30 mL do cultivo em membrana *cellulose acetate filter* com porosidade de 45 μm , e secagem em estufa a 110°C por 24 horas, para cálculo da biomassa em g L^{-1} .

2.3 Extração de lipídeos totais

Ao final do experimento foi realizado a extração dos lipídeos totais da biomassa de acordo com o método descrito por Folch et al. (1957), com modificações. As células de microalgas foram obtidas por centrifugação a 4000 rpm por 15 min. As células foram lavadas com água destilada (100 mL) duas vezes. A biomassa seca foi obtida por gravimetria. O pellet da biomassa foi transferido para uma mistura de clorofórmio:metanol (2:1 v/v) e homogeneizada durante 10 min. Em seguida, foi feita centrifugação a 4000 rpm a 10 °C por 10 minutos. O precipitado foi descartado e o sobrenadante foi coletado em um funil de separação. O processo de extração inteiro foi repetido duas vezes. Em seguida, foi adicionada a solução de NaCl (0,9 %) numa proporção de 1:5 v/v do extrato lipídico. O extrato foi vigorosamente agitado por 1 minuto e deixado em repouso durante 15 minutos para a separação das fases. A camada contendo clorofórmio foi coletada e seca a 60 °C até peso constante. Os lipídeos totais foram quantificados gravimetricamente.

2.4 Produtividade de lipídeos

O cálculo da produtividade de lipídeos foi realizado segundo a Eq. (1):

$$P_L = C_L / t \quad (1)$$

onde,

C_L é a concentração de lipídeos na biomassa final e t é o tempo de cultivo em dias.

3 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

O planejamento experimental foi realizado através da metodologia de delineamento fatorial fracionário com três fatores (SILVEIRA, 2007). Foi avaliado o efeito da concentração de 3 nutrientes: nitrato de sódio, fosfato de potássio monobásico e solução micronutriente (X_1 , X_2 e X_3 ; respectivamente) adicionados ao meio de cultura. Empregou-se uma região experimental de 3 níveis (concentrações dos nutrientes; valores codificados -1; 0; +1; Tabela 2.1). O ponto central (0) foi replicado 4 vezes para a estimativa do erro experimental, totalizando 12 ensaios. Os experimentos foram realizados aleatoriamente.

A região experimental estudada, variação entre máximo (+1) e mínimo (- 1) foram determinadas com base em estudos prévios e na literatura (GONG; CHEN, 1997; BEZERRA et al., 2008; SINGH; PARMAR; MADAMWAR, 2009). Além disso, empregou-se um variação de 0,04 para a concentração de nitrato de sódio (NaNO_3), fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) com Δx de 0,006 e Δx de 0,10 para a solução micronutriente (Tabela 2.2).

Tabela 2.1 Matriz de delineamento fatorial fracionário, constituída de 3 fatores em 3 níveis

Experimento	Valores codificados			Valores naturais		
	X ₁	X ₂	X ₃	NaNO ₃ (g L ⁻¹)	KH ₂ PO ₄ (g L ⁻¹)	Sol. micronutriente (mL L ⁻¹)
1	-1	-1	-1	0,05	0,008	0,10
2	-1	0	+1	0,05	0,014	0,30
3	-1	+1	0	0,05	0,020	0,20
4	0	-1	+1	0,09	0,008	0,30
5	0	0	0	0,09	0,014	0,20
6	0	+1	-1	0,09	0,020	0,10
7	+1	-1	0	0,13	0,008	0,20
8	+1	0	-1	0,13	0,014	0,10
9	+1	+1	+1	0,13	0,020	0,30
10	0	0	0	0,09	0,014	0,20
11	0	0	0	0,09	0,014	0,20
12	0	0	0	0,09	0,014	0,20

Combinações dos diferentes níveis de concentração de nutrientes. Delineamento obtido através do software *STATISTICA 7.0* (STATSOFT, 2004), aplicando-se 3 fatores (X₁, X₂, X₃) e 3 níveis (pontos centrais: 0; pontos axiais: +1 e -1).

Tabela 2.2 Níveis e variações das variáveis independentes

Variável	Componentes	Variação (Δx)	Nível das variáveis em estudo		
			- 1	0	+ 1
X ₁	NaNO ₃ (g L ⁻¹)	0,04	0,05	0,09	0,13
X ₂	KH ₂ PO ₄ (g L ⁻¹)	0,006	0,008	0,014	0,020
X ₃	Solução micronutriente (mL L ⁻¹)	0,10	0,10	0,20	0,30

3.1 Procedimento experimental

As amostras de concentrado de dessalinização utilizadas no presente trabalho são provenientes de uma planta de dessalinização de água salobra subterrânea situada no município de São João do Cariri, no Estado da Paraíba. Área de 702 Km² e uma altitude aproximada de 458 metros, à 187 Km da capital do estado, João Pessoa (PINHO, 2009).

Para fazer uso do concentrado de dessalinização, realizou-se a caracterização físico-química expressa na Tabela 2.3, que foi determinada segundo metodologia descrita por *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* - APHA (2005). Para favorecer o cultivo da microalga *Chlorella vulgaris* em concentrado de dessalinização, estudos preliminares indicaram que a formulação ideal seria na ordem de 250 mL L⁻¹ de concentrado e 750 mL L⁻¹ de água destilada, obtendo-se uma condutividade elétrica aproximada de 1400 $\mu\text{S cm}^{-1}$. Definido este valor, volumes de 400 mL foram distribuídos em erlenmeyers de 500 mL (Figura 2.1). Em seguida, suplementou-se com as soluções de Bold Basal Medium, e adicionaram-se os nutrientes avaliados: NaNO₃, KH₂PO₄ e solução micronutriente nas concentrações estabelecidas pelo planejamento experimental (Tabela 2.1).

Os experimentos foram realizados sob as mesmas condições de temperatura e iluminação do cultivo inicial, com 10 % de inóculo e tempo de cultivo de 7 dias. O valor da variável dependente (resposta) foi à biomassa final (g L⁻¹) e a produtividade lipídica (mg g⁻¹ dia⁻¹) produzida após 7 dias de cultivo.

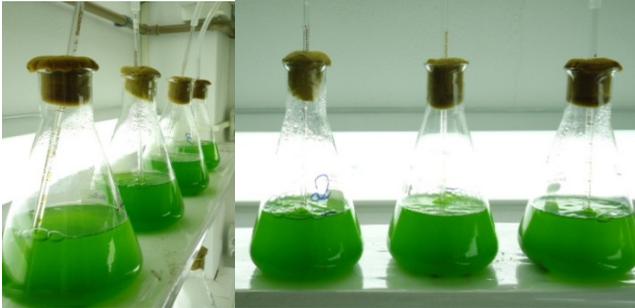


Figura 2.1 Cultivos de *Chlorella vulgaris* em erlenmeyers de 500 mL

Tabela 2.3 Características físico-químicas do concentrado de dessalinização

Parâmetros	Valor médio
pH	8,11
Condutividade Elétrica	4.321 $\mu\text{S cm}^{-1}$
Cloretos (Cl)	1088,5 mg L^{-1}
Dureza Total (CaCO_3)	756,9 mg L^{-1}
Fosfato (P)	1,48 mg L^{-1}
Nitrogênio Total	19,77 mg L^{-1}
Sódio (Na)	800,0 mg L^{-1}
Sólidos Totais Dissolvidos	1927,3 mg L^{-1}
Cálcio (Ca)	126,5 mg L^{-1}
Potássio (K)	47,0 mg L^{-1}

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Otimização do meio de cultura utilizando RSM

Neste estudo, o modelo experimental fatorial fracionário foi empregado para otimizar um meio de cultura, proporcionando como resposta dois modelos estatísticos. Para este método, os fatores estudados resultaram diretamente em biomassa e produtividade lipídica.

A metodologia de fatorial fracionário baseado em uma resposta de superfície conduz a um estudo completo que permite avaliar diversos fatores e variáveis simultaneamente e desta maneira, quantificar os efeitos causados pelas variáveis independentes e a interação entre os fatores (SILVEIRA et al., 2007). Propôs-se que o efeito das diferentes combinações de níveis dos nutrientes estudados nitrato de sódio, fosfato de potássio monobásico e solução micronutriente, adicionados ao meio base para obtenção de biomassa e produtividade lipídica de *Chlorella vulgaris* segue o modelo de regressão de segunda ordem segundo a Eq. 2:

$$\hat{y} = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{13} X_1 X_3 + \varepsilon \quad \text{Equação (2)}$$

Onde, Y a variável predita, β_0 o intercepto; β_1 , β_2 , β_3 os coeficientes lineares; β_{11} , β_{22} , β_{33} os coeficientes quadráticos; β_{12} , β_{13} , β_{23} os coeficientes das interações e, X_i X_j os valores codificados para os níveis das variáveis X_i X_j ; ε é o erro aleatório. O programa Statistica versão 7.0 (Statsoft, Inc. Tulsa, OK, USA) foi utilizado para a análise de variância (ANOVA) e definir o coeficiente de determinação (R^2).

A Tabela 2.4 mostra os valores estimados da biomassa (g L^{-1}) e produtividade lipídica ($\text{mg g}^{-1} \text{dia}^{-1}$) produzidos após 7 dias de cultivo.

Os coeficientes de regressão do intercepto, linear, quadrático e interações do modelo experimental foram calculados e seus níveis de significância foram determinados usando a Análise de Variância (ANOVA), expressos na Tabela (2.5).

Tabela 2.4 Biomassa final (g L^{-1}) e produtividade lipídica ($\text{mg g}^{-1} \text{dia}^{-1}$) obtidos de *Chlorella vulgaris* após 7 dias de cultivo no meio à base de concentrado de dessalinização* adicionado dos fatores (nutrientes) referentes aos tratamentos aplicados.

Experimento	Respostas		
	Biomassa (g L^{-1})	Prod. lipídica ($\text{mg g}^{-1} \text{dia}^{-1}$)	Lipídeos totais (%)
1	0,40	6,43	4,50
2	0,36	3,17	2,22
3	0,42	3,74	2,62
4	0,42	2,71	1,90
5	0,41	6,61	4,63
6	0,38	3,74	2,62
7	0,50	8,84	6,19
8	0,36	8,72	6,11
9	0,37	5,78	4,05
10	0,57	5,75	4,03
11	0,52	10,42	7,30
12	0,59	5,32	3,73

* concentrado de dessalinização = 250 mL L^{-1} para 1000 mL L^{-1} de água destilada.

O teor de biomassa e produtividade lipídica obtida a partir dos coeficientes de regressão pode ser predito segundo o modelo construído mostrado nas Eq. (3) e (4).

$$\text{Biomassa} = + 0,30 + 0,12X_1 - 0,05X_2 + 0,23X_3 + 0,07X_1^2 - 0,003X_2^2 + 0,24X_3^2 + 0,006X_1X_2 - 0,04X_1X_2^2 \quad \text{Equação (3)}$$

$$\text{Produtividade lipídica} = + 4,1 + 0,47X_1 + 0,62X_2 + 2,8X_3 - 3,24X_1^2 + 2,19X_2^2 + 5,40X_3^2 + 1,93X_1X_2 - 0,58X_1X_2^2 \quad \text{Equação (4)}$$

Onde, X_1 , X_2 e X_3 são respectivamente NaNO_3 , KH_2PO_4 e solução micronutriente.

A partir desses modelos, as concentrações ótimas dos nutrientes avaliados foram representadas em gráficos de superfície de resposta (Figuras 2.2 e 2.3).

Tabela 2.5 Análise de variância (ANOVA) para o modelo de superfície de resposta da biomassa e produtividade lipídica extraída de *Chlorella vulgaris*

<i>Biomassa (g L⁻¹) R² = 0,70</i>					
Fatores	Soma de quadrados	GL	Quadrado médio	Valor F	Valor p
NaNO ₃ (g L ⁻¹) L+Q	0,004245	2	0,002123	0,326958	0,743951
KH ₂ PO ₄ (g L ⁻¹) L+Q	0,003752	2	0,001876	0,288960	0,767778
Sol. micro. (mL L ⁻¹)	0,022892	2	0,011446	1,763158	0,311659
Interação L + Q	0,001668	2	0,000834	0,128498	0,884008
Erro puro	0,019475	3	0,006492		
Total SS	0,073967	11			
<i>Produtividade lipídica (mg g⁻¹ dia⁻¹) R² = 0,75</i>					
NaNO ₃ (g L ⁻¹) L+Q	1,9328	2	0,9664	0,6570	0,5799
KH ₂ PO ₄ (g L ⁻¹) L+Q	1,9420	2	0,9710	0,6601	0,5786
Sol. micro. (mL L ⁻¹)	6,8065	2	3,4032	2,3136	0,2466
Interação L+Q	1,2087	2	0,6043	0,4108	0,6954
Erro puro	4,4128	3	1,4709		
Total SS	19,1854	11			

Sendo:

L = efeito linear; Q = efeito quadrático; GL = grau de liberdade; Sol. micro. = Solução micronutriente.

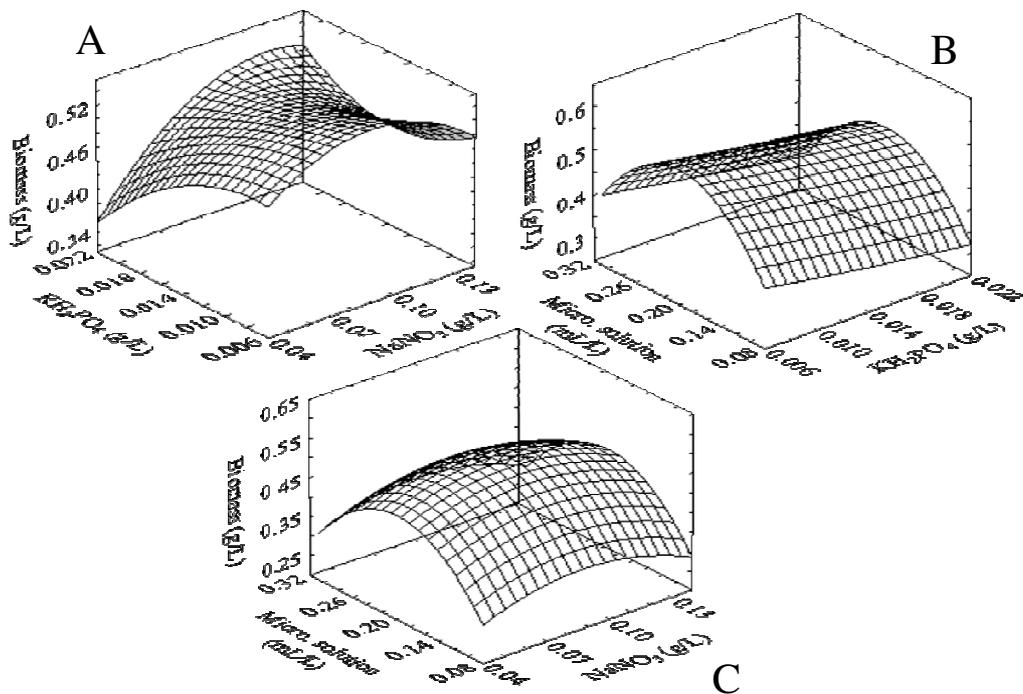


Figura 2.2 Gráficos de superfície de resposta da biomassa de *Chlorella vulgaris* em função da concentração de KH_2PO_4 e NaNO_3 (A), solução micronutriente e KH_2PO_4 (B) e solução micronutriente em função de NaNO_3 (C).

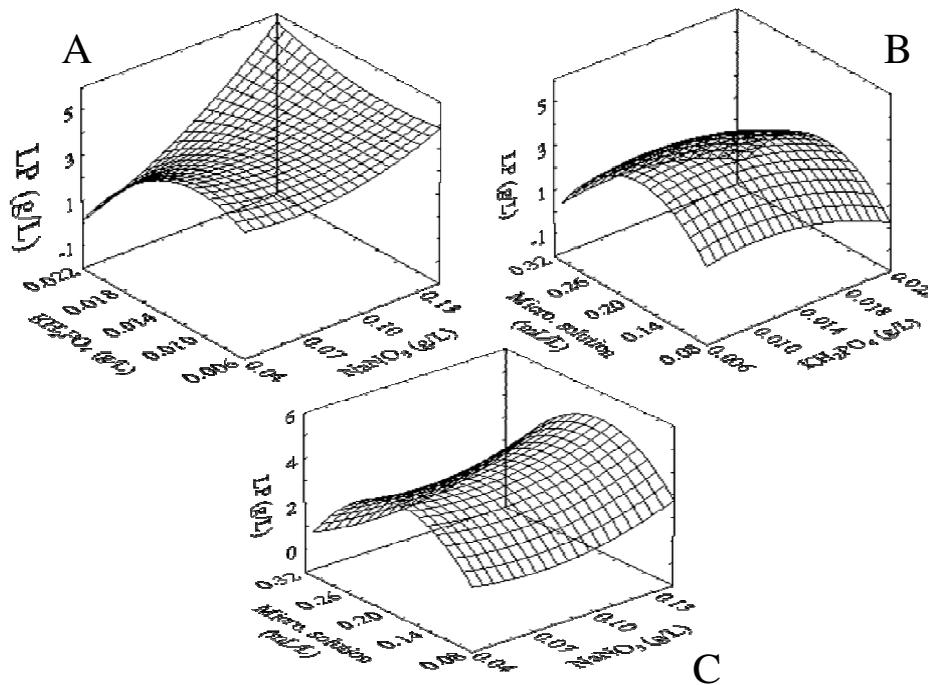


Figura 2.3 Gráficos de superfície de resposta da produtividade lipídica de *Chlorella vulgaris* em função da concentração de KH_2PO_4 e NaNO_3 (A), solução micronutriente e KH_2PO_4 (B) e solução micronutriente em função de NaNO_3 (C).

4.1.1 Efeito da variação dos componentes na biomassa final

A Figura 2.2 apresenta uma análise de superfície de resposta da biomassa de *Chlorella vulgaris* em função da concentração de NaNO_3 , KH_2PO_4 e solução micronutriente.

As maiores concentrações de biomassa foram obtidas quando se utilizou as seguintes concentrações: NaNO_3 entre 0,07 a 0,11 g L^{-1} , para o componente KH_2PO_4 valores abaixo de 0,014 g L^{-1} e para a solução micronutriente entre 0,15 e 0,25 mL L^{-1} . A máxima produção de biomassa (0,59 g L^{-1}) após 7 dias de cultivo foi obtida adicionados de 0,09 g L^{-1} , 0,014 g L^{-1} e 0,20 mL L^{-1} de NaNO_3 , KH_2PO_4 e solução micronutriente, respectivamente.

O componente NaNO_3 apresentou efeito linear e quadrático positivo, logo, concentrações acima de 0,11 g L^{-1} de nitrogênio maior concentração de biomassa pode ser obtida. Em relação ao componente KH_2PO_4 , as maiores produções de biomassa ocorreram sob a menor concentração de KH_2PO_4 aplicada.

As superfícies de respostas apresentadas nos gráficos da Figura 2.2, demonstram que o ponto máxima está localizado dentro da região experimental escolhida, exemplo (Figura 2.2C), e no gráfico da (Figura 2.2B) existe um platô em relação a variável KH_2PO_4 , indicando que a uma variação na concentração deste nutriente não afeta a concentração de biomassa (Bezerra et al. 2008).

4.1.2 Efeito da variação dos componentes na produtividade lipídica

Com relação à produtividade lipídica de *Chlorella vulgaris* em função da concentração de NaNO_3 , KH_2PO_4 e solução micronutriente, a maior produtividade de lipídeos (10,42 $\text{mg g}^{-1} \text{dia}^{-1}$) foi obtida quando utilizou-se as concentrações de 0,09 g L^{-1} , 0,014 g L^{-1} e 0,20 mL L^{-1} , NaNO_3 , KH_2PO_4 e solução micronutriente, respectivamente. A Figura 2.3A mostrou que a máxima produtividade lipídica pode ser obtida quando a concentração de NaNO_3 for acima de 0,13 g L^{-1} e concentração de KH_2PO_4 acima de 0,020 g L^{-1} . A região de produtividade ótima pode ser obtida quando a concentração de KH_2PO_4 for 0,014 g L^{-1} , e 0,20 mL L^{-1} da concentração da solução micronutriente, (Figura 2.3B).

4.1.3 Efeitos dos três componentes no crescimento de *Chlorella vulgaris*

Os gráficos de superfície de reposta indicaram que a concentração ótima de NaNO_3 para a produção de biomassa (g L^{-1}) foi entre 0,07 a 0,11 g L^{-1} (Figura 2.2A e 2.2C). Porém, para se obter maior produtividade de lipídeos é necessário que a concentração de nitrogênio no meio de cultivo fique acima de 0,11 g L^{-1} (Figura 2.3A e 2.3C).

Em relação ao componente KH_2PO_4 , os gráficos de superfície de resposta indicaram que a máxima produção de biomassa foi obtida sob a menor concentração de KH_2PO_4 aplicada (Figura 2.2A e 2.2B), e que entre 0,006 a 0,016 g L^{-1} a produtividade de lipídeos é máxima (Figura 2.3B).

Quanto ao componente solução micronutriente foi estimado que a concentração ótima será fixada no valor de 0,20 mL L^{-1} (Figura 2.2C e 2.3B).

Na Tabela 2.4 foi possível visualizar que a máxima concentração de biomassa (0,59 g L^{-1}) não resulta em máxima produtividade lipídica. Neste estudo, o cultivo de *Chlorella vulgaris* em meio contendo 250 mL L^{-1} de concentrado de dessalinização apresentou máxima produtividade lipídica de 10,42 $\text{mg g}^{-1} \text{dia}^{-1}$.

A maioria das microalgas apresenta baixo teor lipídico quando cultivadas em águas residuais, no entanto, alguns estudos reportam alto rendimento em biomassa. O acúmulo de lipídeos em microalgas resulta diretamente em produtividade lipídica e a concentração de biomassa e acúmulo de lipídeos não está necessariamente correlacionado (PITTMAN et al. 2011).

5 CONCLUSÕES

Este estudo mostrou a possibilidade do uso do concentrado de dessalinização (250 mL L^{-1}) no cultivo da microalga *Chlorella vulgaris* na produção de biomassa. O meio de cultura proposto para otimizar o cultivo autotrófico de *Chlorella vulgaris* consiste de 0,09 g L^{-1} de NaNO_3 , 0,014 g L^{-1} de KH_2PO_4 e 0,20 mL L^{-1} de solução micronutriente. A máxima concentração de biomassa e produtividade lipídica obtidos utilizando o meio de cultura otimizado foram 0,59 g L^{-1} e 10,42 $\text{mg g}^{-1} \text{dia}^{-1}$, respectivamente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBINATI, R. C. B.; ALBINATI, A. C. L.; MEDEIROS, Y. D. Utilização de águas desprezadas para a produção de alimentos no semi-árido. **XV Simpósio Brasileiro de Recursos Hídricos**, 2003.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standart methods for the examination of water and wastewater**. 20 ed. New York: American Public Health Association, 2005.
- ANAGA, A.; ABU, G. O. A laboratory-scale cultivation of *Chlorella* and *Spirulina* using waste effluent from a fertilizer company in Nigeria. **Bioresource Technology**, v. 58, n. 1, p. 93-95, 1996.
- BEZERRA, M. A.; SANTELLI, R. E.; OLIVEIRA, E. P.; VILLAR, L. S.; ESCALEIRA, L. A. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry, **Talanta**, v. 76, p.965-977, 2008.
- BILANOVIC, D.; ANDARGATCHEW, A.; KROEGER, T.; SHELEF, G. Freshwater and marine microalgae sequestering of CO₂ at different C and N concentrations – Response surface methodology analysis. **Energy Conversion and Management**, n. 50, p. 262-267, 2009.
- BOROWITZKA, M. A. Products from microalgae. **Infofish International**, n.5, p. 21-26, 1993.
- BOROWITZKA, M. A. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. **Journal of Biotechnology**, v. 70, p. 313-321, 1999.
- GONG, X.; CHEN, F. Optimization of culture medium for growth of *Haematococcus pluvialis*, **Journal of Applied Phycology**, v. 9, p. 437-444, 1997.
- GRANATO, D.; BRANCO, G. F.; CALADO, V. M. de A. Experimental design and application of response surface methodology for process modeling and optimization: A review, **Food Research International**, 2011.
- HENRIKSON, R. **Earth Food Spirulina**. Hawaii: Ronore Enterprises, 2009.
- FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANE STANLEY, G. H. A simple for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **Journal Biological Chemistry**, v. 226, p. 497-509, 1957.
- LABORDE, H. M.; FRANÇA, K. B.; NEFF, H.; LIMAB, A. M. N. Optimization strategy for a small-scale reverse osmosis water desalination system based on solar energy. **Desalination**, v. 133, p. 1-12, 2001.

- LOURENÇO, S. O. **Cultivo de microalgas marinhas: Princípios e aplicações**. São Carlos: RiMa, 2006.
- MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, p. 217-232, 2010.
- MOHAMED, A.M.O.; MARAQA, M.; AL HANDHALY, J. Impact of land disposal of reject brine from desalination plants on soil and groundwater. **Desalination**, v. 182, p. 411-433, 2005.
- OLIVEIRA, H. T. **Utilização de vinhaça como meio de cultura para *Chlorella vulgaris***. 1988. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais) – Universidade Federal de São Carlos. São Carlos – SP.
- PINHO, M. A. **Desenvolvimento de meio de cultura a base de concentrado de dessalinização para *Arthrospira (Spirulina) platensis***. 2009. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis –SC.
- PITTMAN, J. K., DEAN, A. P., OSUDENKO, O. The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources, **Bioresour. Technol.** 102, 17-25. 2011.
- RICHMOND, A. **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. Oxford: Blackwell Science, 2004. 566p.
- SILVEIRA, S. T.; BURKERT, J. F. M.; COSTA, J. A. V.; BURKERT, C. A. V.;
- STATSOFT, Inc., 2004. Statistica 7.0, Tulsa, OK, USA.
- KALIL, S. J. Optimization of phycocyanin extraction from *Spirulina plantensis* using factorial design, **Bioresource Technology**, v. 98, p. 1629-1634, 2007.
- SINGH, N. K.; PARMAR, A.; MADAMWAR, D. Optimization of medium components for increased production of C-phycocyanin from *Phormidium ceylanicum* and its purification by single step process, **Bioresource Technology**, v. 100, p. 1663-1699, 2009.
- VOLKMANN, H. **Utilização de rejeito dessalinizador como meio de cultura alternativo para o cultivo de *Arthrospira (Spirulina) platensis***. 2006. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis –SC.
- WANG, H.; JIANG, P.; LU, Y.; RUAN, Z.; JIANG, R. ; XING, X. ; LOU, K. WEI, D. Optimization of culture conditions for violacein production by a new strain of *Duganella* sp. B2. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, p. 119-124, 2009.

CAPÍTULO 3

CULTIVO CONTÍNUO DE *Chlorella vulgaris* EM FOTOBIORREATOR UTILIZANDO UM MEIO À BASE DE CONCENTRADO DE DESSALINIZAÇÃO

CULTIVO CONTÍNUO DE *Chlorella vulgaris* EM FOTOBIORREATOR UTILIZANDO UM MEIO À BASE DE CONCENTRADO DE DESSALINIZAÇÃO

RESUMO

O processo de dessalinização por osmose reversa é o principal método de obtenção de água potável. No entanto, esse processo origina um resíduo com alta concentração iônica. O objetivo deste estudo foi cultivar a microalga *Chlorella vulgaris* em concentrado de dessalinização. O cultivo foi realizado em fotobiorreator de 6 L sob condições controladas (30°C, com agitação de 100 rotações por minuto, iluminação de 20 klux fornecida por lâmpadas fluorescentes com fotoperíodo de 12-h dia/12-h escuro e insuflação constante de ar atmosférico). O experimento foi iniciado com 10 % de inóculo (10^5 células mL⁻¹) até atingir a fase estacionário de 10^7 células/mL, aproximadamente no 7^a dia, e então o cultivo foi mantido de forma contínua durante 19 dias. Foram avaliados os teores de proteínas e lipídeos totais, bem como, a quantificação do perfil dos ácidos graxos da microalga em estudo. Os teores de proteína e lipídeos resultaram em 43,0 % e 9,5 %, respectivamente. A espécie *Chlorella vulgaris* apresentou predominância em cinco ácidos graxos: o ácido linolênico (C18:3n3c); ácido palmítico (C16:0); ácido linoléico (C18:2n6c); ácido cis-10-heptadecenoico (C17:1) e ácido elaídico (C18:1n9t), cujas proporções foram de 20,9 %; 20,5 %; 18,8 %; 6,4 % e 5,4 %, respectivamente. Estes ácidos graxos têm entre 14 e 18 carbonos na cadeia, sendo predominantemente poli-insaturados (39,7 %), saturados (25,7 %) e monoinsaturados (14,0 %), respectivamente.

Palavras chave: *Chlorella vulgaris*, Cultivo contínuo, proteína, lipídeos, ácidos graxos.

**CONTINUOUS CULTIVATION OF *Chlorella vulgaris* IN
PHOTOBIOREACTOR USING A CULTURE MEDIUM BASED
ON CONCENTRATED DESALINATION**

ABSTRACT

The reverse osmosis is the main process to obtain potable drinking water. However, this process originates a residue containing high ionic concentration. The aim of this study was to cultivate microalgae *Chlorella vulgaris* in concentrated desalination. The culture was performed in photobioreactors of 6L under controlled conditions (30°C, agitation of 100 rpm, 20 klux illumination in a photoperiod of 12-h dark/12-h light and constant atmospheric air insufflation). The experiment was started with 10 % inoculum (10^5 cells mL⁻¹) until the stationary phase of 10^7 cells/mL and then the cultivation was carried out for 19 days. Total content of protein and lipids were determined, as well as, the quantification of the fatty acids profile. The total protein and lipid contents resulted in 43.0 % and 9.5 %, respectively. The species *Chlorella vulgaris* produced, predominantly, five fatty acids: linolenic acid (C18:3n3c); palmitic acid (C16:0); linoleic acid (C18:2n6c); cis-10-heptadecenoico acid (C17:1) and elaidic acid (C18:1n9t), whose contents were 20.9 %; 20.5 %; 18.8 %; 6.4 % e 5.4 %, respectively. These fatty acids are between 14 and 18 carbons in the carbon chain, being polyunsaturated (39.7 %), saturated (25.7 %) and monounsaturated (14.0 %), respectively.

Keywords: *Chlorella vulgaris*, Continuous culture, protein, lipids, fatty acids

1 INTRODUÇÃO

O cultivo de microalgas em fotobiorreatores contínuos é a forma mais produtiva de gerar biomassa. Esse tipo de sistema de cultivo é bem estabelecido e aplicado para a produção de biomassa microbiana em fermentadores (bactérias e fungos), por exemplo, a indústria de bebidas alcoólicas (ANUPAMA, 2000).

No sistema de cultivo contínuo, um fluxo constante de cultura microalgal é removido do fotobiorreator simultaneamente com a entrada de meio de cultivo fresco. As taxas de crescimento são reguladas e a densidade celular é controlada automaticamente por sensores óticos. A concentração de células e nutrientes é mantida constante e o cultivo atinge um estado estacionário de crescimento. Assim, a cultura pode permanecer em estado estacionário por um período constante, conseqüentemente, são produzidas grandes quantidades de biomassa (LOURENÇO, 2006).

Para o cultivo de microalgas, é indispensável encontrar meios de cultura que envolva custos de produção mais baixos do que os convencionais, mas que sejam eficientes ao crescimento e alcancem composição nutricional adequada. Uma alternativa para redução de custos é o cultivo de microalgas integrado com resíduo proveniente do processo de dessalinização de águas subterrâneas, que foi sugerido por PINHO (2009).

A microalga *Chlorella vulgaris* tem sido cultivada mundialmente em fotobiorreatores no sistema contínuo para gerar biomassa, utilizada na preparação de cápsulas como suplemento protéico para a alimentação humana (SPOLAORE et al., 2006). O interesse econômico pelo cultivo contínuo de microalgas esta associado à facilidade de cultivo e conteúdo protéico elevado, podendo chegar até 65 % em matéria seca, dependendo do meio de cultivo (VOLKMANN, 2006; PITTMAN et al., 2011).

Os ácidos graxos poli-insaturados ω -6 e ω -3 podem ser obtidos de fontes animais e vegetais, sendo os óleos de pescado sua fonte principal. Contudo, as microalgas sintetizam PUFA'S em elevada quantidade, o que os torna atrativas do ponto de vista nutricional (PULZ; GROSS, 2004).

O objetivo deste estudo foi avaliar e quantificar o teor de proteínas, lipídeos e o perfil dos ácidos graxos da biomassa de *Chlorella vulgaris* cultivada em meio de cultura modificado em fotobiorreator no sistema de cultivo contínuo.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Micro-organismo e manutenção da cultura

A microalga *Chlorella vulgaris* foi isolada em tanques de cultivo de peixes (tilápias) contendo concentrado de dessalinização. O cultivo inicial foi mantido em Bold Basal Medium (BBM) modificado a 27°C, sob iluminação de 10 klux fornecida por lâmpadas fluorescentes com fotoperíodo de 12-h dia/12-h escuro em frascos de 250 mL contendo 100 mL de meio de cultura BBM modificado.

2.2 Condições do cultivo contínuo

O cultivo contínuo foi realizado em fotobiorreator (Bioflo 2000 Fermentor – New Brunswick - USA) com capacidade de 6L (Figura 3.1) previamente esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos. Foi preparado 5L de meio de cultura BBM modificado (250 mL L⁻¹ de concentrado de dessalinização para 1000 mL L⁻¹ de água destilada) contendo (g L⁻¹): K₂HPO₄, 0,075; KH₂PO₄, 0,014; MgSO₄·7H₂O, 0,075; NaNO₃, 0,09; CaCl₂·2H₂O, 0,025; NaCl, 0,025; 0,20 mL L⁻¹ de solução micronutriente contendo (g L⁻¹): EDTA-Na₄, 0,05; FeSO₄·7H₂O, 0,00498 e H₃BO₃, 0,01142; 0,1 mL L⁻¹ de solução traços de metais e 30 mL L⁻¹ de extrato de levedura 1%. O cultivo foi mantido a temperatura de 30°C, com insuflação de gás carbônico atmosférico, agitação de 100 rotações por minuto, sob iluminação de 20 klux fornecida por lâmpadas fluorescentes com fotoperíodo de 12-h dia/12-h escuro. O experimento foi iniciado com 10 % de inóculo (10⁵ células/mL) até atingir a fase estacionário em 10⁷ células/mL, aproximadamente no 7^a dia, e então o cultivo foi mantido de forma contínua durante 19 dias. A cada 24 horas, amostras foram coletadas para análises do cultivo.



Figura 3.1 Cultivo de *Chlorella vulgaris* em fotobiorreator de 6 litros

2.3 Técnicas analíticas

Diariamente foram coletadas amostras para determinação de pH e biomassa. O pH foi medido no pHmetro Sensoglass SP990 M. A biomassa foi calculada através da absorbância a 670 nm, em espectrofotômetro SP-2000 UV/SPECTRUM – METER. Através de uma curva de calibração obteve-se a correlação entre a absorbância da suspensão celular e a biomassa seca, obtida por gravimetria.

2.3.1 Cálculo da produtividade da biomassa

O cálculo da produtividade da microalga foi realizado segundo Eq. (1) Silva (2008):

$$P = (X_i - X_0) / t_i \text{ onde,} \quad (1)$$

P = produtividade (mg L⁻¹ dia⁻¹);

X₀ = biomassa inicial (mg L⁻¹);

X_i = biomassa no tempo i (mg L⁻¹) e

t_i = intervalo de tempo (dia) entre X₀ e X_i.

2.3.2 Velocidade de crescimento da microalga

A velocidade de crescimento específica (μ), foi determinada através da seguinte Eq. (2), citado por Converti et al. (2009):

$$\mu = 1/t \cdot \ln (X_m/X_0) \quad (2)$$

onde, X_m e X₀ são as concentrações de biomassa no final e no início do cultivo em mg/L, respectivamente, e t é o tempo de cultivo.

2.4 Avaliação da biomassa de *Chlorella vulgaris*

Ao final do cultivo, a cultura foi centrifugada (CENTRÍFUGA REFRIGERADA/NOVA TÉCNICA) a 4000 rpm, 10°C, durante 30 minutos. A biomassa coletada foi lavada duas vezes com 400 mL de água destilada para retirada do excesso de sais. Em seguida a biomassa foi ressuspensa em água destilada e armazenada em estufa de secagem a 60°C por 12 horas. Foram analisados os teores de proteínas totais, lipídeos totais e o perfil dos ácidos graxos da biomassa seca.

2.4.1 Quantificação de lipídeos totais e perfil de ácidos graxos

O teor lipídico total da amostra foi determinado de acordo com o método de extração com solvente orgânico em extrator contínuo do tipo Soxhlet (AOAC, 2005). As amostras trituradas foram submetidas à extração da fração lipídica por solvente orgânico (clorofórmio 2: metanol 1), em extrator contínuo de Soxhlet. Os resíduos lipídicos, juntamente ao solventes, foram então submetidos a tratamento de em sistema evaporador rotativo a vácuo, para eliminação destes últimos. O valor de massa de lipídeos foi calculado com base de diferença de peso do balão de fundo redondo utilizado, antes e depois do procedimento.

A partir do extrato obtido na determinação dos lipídios totais, realizou-se a esterificação dos ácidos graxos conforme procedimento desenvolvido por Hartman e Lago (1973). Os metil ésteres dos ácidos graxos foram determinados por cromatografia gasosa com detector de

ionização em chama, coluna capilar RESTEK com 105 m de comprimento e 0,25 mm de diâmetro interno com filme de fase estacionária de 0,25 μm de espessura contendo 10 % de cyanopropylphenil e 90 % de biscyanopropylsiloxane. As condições operacionais programadas foram: temperatura inicial da coluna de 140°C por 5 minutos, aumentando até 240°C a uma taxa 2,5°C por minuto, permanecendo ao final por 15 minutos. O detector ficou isotérmico a 260°C e o injetor a 260 °C splitless. Os ácidos graxos foram identificados por cromatografia gasosa (MODELO CG-2014 SHIMADZU) através do software GC solution por comparação dos tempos de retenção com padrão (Sigma), utilizando padrão C4 a C24 (SUPELCO).

2.4.2 Proteínas totais

O teor protéico total na biomassa seca foi determinado pelo clássico método de Kjeldahl, adotando-se o fator de 6,25 para conversão a partir dos teores de nitrogênio total (AOAC, 2005). As amostras desengorduradas, provenientes da etapa de lipídeos, foram trituradas novamente e submetidas a aquecimento intenso, na presença de H_2SO_4 concentrado e catalisador. Tal procedimento promove a destruição da matéria orgânica e formação de nitrogênio inorgânico, na forma de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. A alcalinização deste resíduo, durante uma etapa de destilação do nitrogênio, promove a conversão do sal em amônia, recolhida em solução saturada de HBO_3 . A titulação desta solução com HCl 0,20N permite a determinação da concentração de nitrogênio da amostra utilizada.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seguir, são dispostos em gráficos os resultados da determinação de concentração celular (Figura 3.1); processo contínuo (Figura 3.2) e acompanhamento do pH (Figura 3.3). Estão dispostos também em tabelas os valores em parâmetros da Densidade celular máxima (DCM g L^{-1}), produtividade celular ($\text{mg L}^{-1} \text{dia}^{-1}$), velocidade específica (μ) de *Chlorella vulgaris* cultivada em fotobiorreator contínuo (Tabela 3.1); os resultados referentes as análises de teores de proteínas e lipídeos totais (Tabela 3.1) e perfil dos ácidos graxos (Tabela 3.2).

3.1 Determinação de concentração celular

A determinação da concentração celular (Figura 3.2) durante a fase exponencial de crescimento de *Chlorella vulgaris* foi obtida através da correlação entre a massa seca de biomassa e a absorvância a 670 nm da cultura dada pela Eq. (3) abaixo.

$$X \text{ (g L}^{-1}\text{)} = 0,1725 [\text{Abs 670 nm}] + 0,0082 \quad (3)$$

onde X = concentração celular

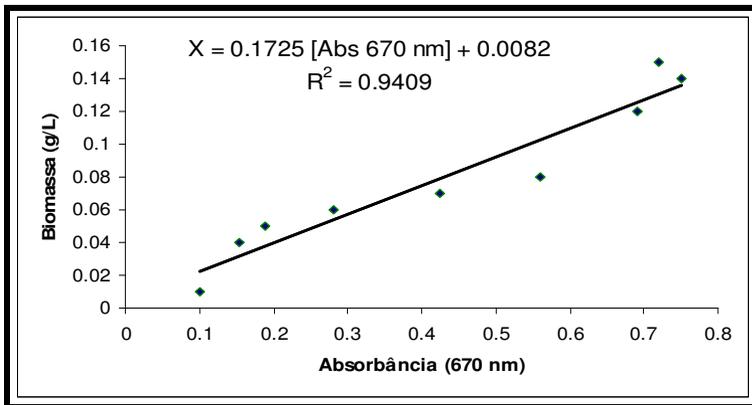


Figura 3.2 Curva padrão para determinação da concentração de *Chlorella vulgaris* cultivada em Bold Basal Medium modificado (250 mL L⁻¹ de concentrado de dessalinização e 750 mL L⁻¹ de água destilada).

3.2 2 Condições do cultivo contínuo de *Chlorella vulgaris*

Para se iniciar um cultivo contínuo de microalgas geralmente inclui-se um cultivo descontínuo para a obtenção da densidade celular suficiente. A matéria prima é adicionada ao fotobiorreator com uma vazão constante e o meio fermentado é retirado com a mesma vazão de alimentação. Anteriormente ao desenvolvimento do processo contínuo, o reator foi operado por processo descontínuo, o ensaio apresentou crescimento satisfatório, possibilitando o início do processo contínuo a partir do 7º dia. Isso, aliado ao sucesso do processo contínuo, indica a rápida adaptação do micro-organismo à nova fonte de nutrientes. Por

isso, como se pode ver na Figura 3.3 é possível perceber o crescimento contínuo da microalga em biomassa.

Duas variáveis são extremamente importantes no processo fermentativo contínuo são a vazão específica de alimentação (D) e a concentração de nutriente limitante no meio de alimentação, sendo determinantes, por exemplo, para a obtenção de regime permanente no processo, além de afetarem a produtividade e o rendimento do mesmo. Além disso, quanto maior a vazão específica de alimentação maior é a vazão de retirada de meio do sistema (taxa de diluição) e conseqüentemente menor concentração celular (LÉON, 2010). Após testes preliminares, foi estabelecido para o cultivo contínuo uma taxa de diluição de $0,20 \text{ dia}^{-1}$, ou seja, um fluxo de aproximadamente 1008 mL de meio BBM modificado por dia.

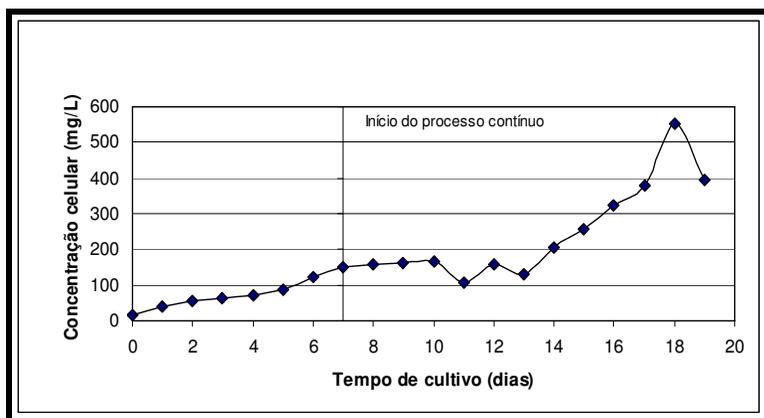


Figura 3.3 Concentração celular (mg L^{-1}) em função do tempo de cultivo (dias). A linha vertical delimita o tempo correspondente à mudança do processo de cultivo, de descontínuo para contínuo com taxa de diluição de $0,20 \text{ dia}^{-1}$

Ao observar a Figura 3.3, no tempo zero a cultura apresentou uma concentração celular inicial de 10 mg L^{-1} e no sétimo dia de cultivo atingiu uma concentração celular próxima de 150 mg L^{-1} . A partir de então, iniciou-se o processo contínuo, alimentado com Bold Basal Medium (BBM) modificado.

No 18º dia de cultivo a microalga *Chlorella vulgaris* apresentou densidade celular máxima e a partir do 19º dia de cultivo apresentou declínio, possivelmente pelo excesso de excreção de metabólitos

tóxicos, acúmulo de matéria orgânica devido à decomposição e morte celular, além de limitação da intensidade luminosa devido ao efeito de sombreamento causado pela elevada concentração celular (FERREIRA, 2008).

3.3 Determinação do pH

A Figura 3.4 mostra o resultado do acompanhamento do pH ao longo dos 19 dias de cultivo contínuo. Com o crescimento celular foi observado um aumento gradativo no pH que permaneceu na faixa entre 8,0 a 11,0. Matsudo (2006) afirma que a forma de carbono preferencialmente assimilada por microalgas é o bicarbonato, os íons bicarbonato são transportados ativamente do meio de cultivo para o interior das células, onde são convertidos a carbonato e gás carbônico, aumentando o pH.

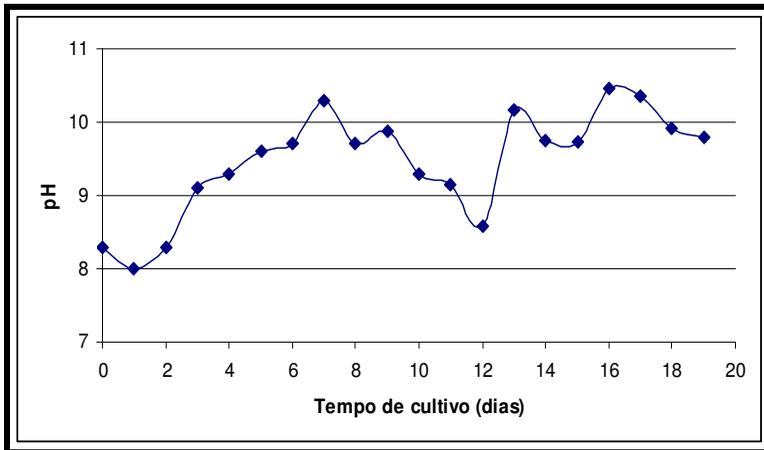


Figura 3.4 Acompanhamento do pH ao longo de 19 dias de cultivo de *Chlorella vulgaris* em meio modificado.

Tendo em vista que os principais componentes da biomassa de *Chlorella vulgaris* são proteínas e lipídeos, a biomassa resultante foi levada a estufa de secagem, para posterior análise desses teores, expressos na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 Densidade celular máxima (DCM g L⁻¹), produtividade celular (mg L⁻¹dia⁻¹), velocidade específica (μ), proteínas totais e lipídeos totais de *Chlorella vulgaris* cultivada em fotobiorreator contínuo

Parâmetros	<i>Chlorella vulgaris</i>
Amostragem (dias de cultivo)	19
DCM (g L ⁻¹)	0,55
P _c (mg L ⁻¹ dia ⁻¹)	20,0
μ (dia ⁻¹)	0,19
Proteínas totais (% biomassa peso úmido)	43,0
Lipídeos totais (% biomassa peso úmido)	9,5

Na Tabela 3.1 foi possível visualizar que em 19 dias de cultivo contínuo, a microalga *Chlorella vulgaris* apresentou uma velocidade de crescimento de 0,19 d⁻¹ e produtividade celular de 20 mg L⁻¹dia⁻¹. A densidade celular máxima (DCM) de 0,55 g L⁻¹ foi alcançada no décimo oitavo dia de cultivo e os teores de proteínas e lipídeos totais foram de 43,0 % e 9,5 %, respectivamente.

3.5 Perfil cromatográfico dos ácidos graxos

Pode-se observar, na Tabela 3.2 que a espécie *Chlorella vulgaris* apresentou predominância em cinco ácidos graxos, o ácido linolênico (C18:3n3c), ácido palmítico (C16:0), ácido linoléico (C18:2n6c), ácido cis-10-heptadecenoico (C17:1) e ácido elaídico (C18:1n9t), cujas proporções foram de 20,9 %; 20,5 %; 18,8 %; 6,4 % e 5,4 %, respectivamente. Estes ácidos graxos têm entre 14 e 18 carbonos na cadeia, sendo predominantemente poli-insaturados (39,7 %), saturados (25,7 %) e monoinsaturados (14,0 %), respectivamente.

Tabela 3.2 Perfil cromatográfico dos ácidos graxos de *Chlorella vulgaris* cultivada em Bold Basal Medium modificado durante 19 dias em fotobiorreator de 6 L.

Composição dos ácidos graxos		Designação Estenográfica	Peso Úmido (%)
Ácidos graxos saturados	Láurico	C12:0	0,1
	Tridecanóico	C13:0	0,4
	Mirístico	C14:0	0,3
	Pentadecanóico	C15:0	2,7
	Palmítico	C16:0	20,5
	Heptadecanóico	C17:0	0,5
	Esteárico	C18:0	1,2
	<i>Subtotal</i>		25,7
Ácidos graxos monoinsaturados	Palmitoléico	C16:1	1,6
	Cis-heptadecenóico	C17:1	6,4
	Elaídico	C18:1n9t	0,6
	Oléico	C18:1n9c	5,4
	<i>Subtotal</i>		14,0
Ácidos graxos poli-insaturados	Linoléico	C18:2n6c	18,8
	Linolênico	C18:3n3c	20,9
	<i>Subtotal</i>		39,7
Lipídeos totais (%)			9,5

Tabela 3.3 Comparação do teor de lipídeos e frações dos ácidos graxos em microalgas cultivadas em diferentes condições de meios de cultura.

Meio de cultivo	Microalga	Frações dos ácidos graxos e lipídeos totais (%)				Autores
		Saturados	Monoinsaturados	Poli-insaturados	Lipídeos totais	
BBM padrão	<i>Chlorella vulgaris</i>	43,5	42,0	17,0	27,0	Francisco (2010)
BBM + solução hidropônica	<i>Chlorella vulgaris</i>	38,5	19,8	34,1	18,2	Bertoldi et al. (2006)
Zarrouk + resíduo de suinocultura	<i>Spirulina</i> sp. (<i>Arthrospira</i>)	43,9	7,9	48,0	28,6	Olguín et al. (2001)
TAP meio + efluente de águas residuais	<i>Chlorella</i> sp.	37,7	19,3	42,9	11,0	Li et al. (2011)
BBM + concentrado de dessalinização	<i>Chlorella vulgaris</i>	25,7	14,0	39,7	9,5	*Estudo em questão

* 20,6 % dos ácidos graxos não foram identificados. TAP = Tris Acetate Phosphate; BBM = Bold Basal Medium;

O conteúdo de ácidos graxos das microalgas não é dependente apenas da espécie, mas também de fatores relacionados às condições de cultivo. Na Tabela 3.3 é possível visualizar as diferentes frações de ácidos graxos obtidas em diversas condições de cultivo.

Conforme a Tabela 3.3 é possível confrontar diversos estudos com relação à produção de lipídeos por microalgas. Bertoldi et al. (2006) verificaram que a composição dos ácidos graxos de *Chlorella vulgaris* cultivada em Bold Basal Medium com adição de resíduo hidropônico, obtiveram as seguintes frações: saturados (38,5 %), poli-insaturados (34,1 %) e monoinsaturados (19,0 %). Francisco (2010) avaliou o perfil dos ácidos graxos de *Chlorella* sp., os lipídeos foram extraídos pelo método de Bligh e Dyer, seguido da análise quantitativa por cromatografia gasosa, a microalga apresentou prevalência nas frações saturadas (43,5 %), monoinsaturadas (42,0 %) e poli-insaturadas (17,0 %).

Em outro estudo, Li et al. (2011) isolaram cinco cepas nativas de *Chlorella* sp. em lagoa de tratamento de águas residuais, um mix da cultura foi mantida em meio TAP para purificação e, uma vez adaptada ao meio de cultura, foi realizado um cultivo de 15 dias para avaliação dos ácidos graxos, as frações indicaram predominância em, poli-insaturados (42,9 %), saturados (37,7 %) e monoinsaturados (19,3 %).

Longas cadeias carbônicas foram reportadas em espécies de microalgas como *Botryococcus braunii* (BANERJEE et al. 2002), para a espécie *Chlorella vulgaris* foi constatado que o perfil dos ácidos graxos apresentam curtas cadeias carbônicas, entre 16-18 carbonos, que é ideal para a produção de biodiesel (XU et al. 2006).

4 CONCLUSÕES

A microalga *Chlorella vulgaris* apresentou após 19 dias de cultivo contínuo em concentrado de dessalinização biomassa máxima de 0,55 g L⁻¹. Os teores de proteína e lipídeos totais foram de 43,0 e 9,5 %, respectivamente. O perfil dos ácidos graxos de *Chlorella vulgaris* mostrou que as frações predominantes são poli-insaturados (39,7 %), saturados (25,7 %) e monoinsaturados (14,0 %), respectivamente.

Neste estudo, a biomassa obtida do cultivo da microalga *Chlorella vulgaris* apresentou elevado teor de ácidos graxos essenciais ω -3 e ω -6, podendo estes ser adicionados em alimentos enriquecidos (*health foods*), ração animal suplementada e até mesmo como fonte promissora na produção de biodiesel.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANUPAMA, P. R. Value-added food: Single cell protein. **Biotechnology Advances**, v. 18, p. 459-479, 2000.
- AOAC. 2005. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. Method nr 991.20. AOAC: Washington D.C.
- BANERJEE, A.; SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. *Botryococcus braunii*: a renewable source of hydrocarbons and other chemicals. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 22, p. 245-279, 2002.
- BERTOLDI, F. C.; SANT'ANNA, E.; BRAGA, M. V. C.; OLIVEIRA, J. L. B. Lipids, fatty acids composition and carotenoids of *Chlorella vulgaris* cultivated in hydroponic wastewater. **Grasas y Aceites**, v. 57, p. 270-274, 2006.
- CONVERTI, A.; CASAZZA, A. A.; ORTIZ, E. Y.; PEREGO, P.; BORGHI, M. D. Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 48, p. 1146-1151, 2009.
- FERREIRA, L. S. **Estudo da intensidade luminosa no cultivo de *Arthrospira (Spirulina) platensis* em reator tubular utilizando sulfato de amônio como fonte de nitrogênio por processo descontínuo alimentado**. 2008. 2010. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Fermentações). Universidade Federal de São Paulo. São Paulo – SP.
- FRANCISCO, E. C. **Biofixação de dióxido de carbono por microalgas acumuladoras de materiais graxos**. 2010. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP. Campinas – SP.
- HARTMAN, L; LAGO, R. C. A. A rapid determination of fatty acid methyl esters from lipids. **Laboratory practice**, v. 22, n. 8, p. 475-476, 1976.
- LEÓN, I. A. Á. **Estudo do cultivo contínuo de *Spirulina platensis* por processo contínuo com uréia como fonte de nitrogênio**. 2010. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Fermentações). Universidade Federal de São Paulo. São Paulo – SP.
- LI, Y.; CHEN, Y-F.; CHEN, P.; MIN, M. ZHOU, W.; MARTINEZ, B.; ZHU, J.; RUAN, R. Characterization of a microalga *Chlorella* sp. well adapted to highly concentrated municipal wastewater for nutrient removal and biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 5138-5144, 2011.

- LOURENÇO, S. O. **Cultivo de microalgas marinhas – princípios e aplicações**. São Carlos: RiMa, 2006.
- MATSUDO, M. C. **Cultivo *Spirulina platensis* por processo descontínuo alimentado repetitivo utilizando uréia como fonte de nitrogênio**. 2006. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Fermentações). Universidade Federal de São Paulo. São Paulo – SP.
- MATSUDO, M. C. **Cultivo contínuo de *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* em fotobiorreator tubular utilizando uréia como fonte de nitrogênio e CO₂ puro ou proveniente de fermentação alcoólica**. 2010. Tese (Doutorado em Tecnologia de Fermentações). Universidade Federal de São Paulo. São Paulo – SP.
- OLGUÍN, E. J.; GALICIA, S.; ANGULO-GUERRERO, O.; HERNÁNDEZ, E. The effect of low light and nitrogen deficiency on the chemical composition of *Spirulina* sp. (*Arthrospira*) grown on digested pig waste. **Bioresource Technology**, v. 77, p. 19-24, 2001.
- PINHO, M. A. **Desenvolvimento de meio de cultura a base de concentrado de dessalinização para *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis***. 2009. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis –SC.
- PITTMAN, J. K.; DEAN, A. P.; OSUDENKO, O. **The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources**. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 17-25, 2011.
- PULZ, O.; GROSS, W. **Valuable products from biotechnology of microalgae**. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 65, p. 635-648, 2004.
- SILVA, L. A. **Estudo do processo biotecnológico de produção, extração e recuperação do pigmento ficocianina da *Spirulina platensis***. 2008. Dissertação (Mestrado em Processos Biotecnológicos). Universidade Federal do Paraná. Curitiba-PR.
- SPOLAORE, P.; JOANISS-CASSAN, C.; DURAN, E. ISAMBERT, A. **Commercial applications of microalgae**. **Journal Bioscience Bioengineering**, v. 101, p. 87-96, 2006.
- VOLKMANN, H. **Utilização de rejeito dessalinizador como meio de cultura alternativo para o cultivo de *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis***. 2006. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis –SC.
- XU, H.; MIAO, X.; WU, Q.; High quality biodiesel production from microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. **Journal of Biotechnology**, v. 126, p. 499-507, 2006.

CAPÍTULO 4

**REUSO DO MEIO RESIDUAL CONTENDO
CONCENTRADO DE DESSALINIZAÇÃO POR MEIO
DA MICROLAGA *Chlorella vulgaris***

**REUSO DO MEIO RESIDUAL CONTENDO
CONCENTRADO DE DESSALINIZAÇÃO POR MEIO
DA MICROLAGA *Chlorella vulgaris***

RESUMO

A dessalinização é um método de obtenção de água potável limitado pelos problemas ambientais causados pelo resíduo gerado em seu processo. O objetivo deste estudo foi realizar cultivos sucessivos sem necessidade de troca de água, a fim de avaliar a capacidade de reuso da solução contendo concentrado de dessalinização por meio do cultivo de *Chlorella vulgaris*. A microalga foi cultivada em biorreator cônicos invertidos de 4000 mL sob condições controladas (27°C, iluminação de 10 klux fornecida por lâmpadas fluorescentes com fotoperíodo de 12-h dia/12-h escuro e insuflação constante de ar atmosférico). O experimento foi iniciado com 10 % de inóculo em triplicata e cultivado durante 28 dias resultando em quatro ciclos de cultivo. Para cada ciclo de cultivo, os valores de biomassa (peso seco) resultaram em 1° ciclo, 1,55 g L⁻¹; 2° ciclo, 0,96 g L⁻¹; 3° ciclo, 0,62 g L⁻¹ e 4° ciclo em 0,42 g L⁻¹. Os valores de proteínas e lipídeos totais resultaram em média, 45,9 % e 9,7 %, respectivamente.

Palavras chave: Concentrado de dessalinização, *Chlorella vulgaris*, Proteínas, Lipídeos

**REUSING OF RESIDUAL MEDIUM CONTAINING
CONCENTRATED DESALINATION THROUGH
MICROALGAE *Chlorella vulgaris***

ABSTRACT

Desalination is a method of obtaining potable drinking water which is limited by environmental problems caused by the waste generated in the process. After each cultivation period, the biomass was collected and the culture medium was used in the further cultivation cycles in order to evaluate the ability of reusing the solution containing the desalination concentrate. The microalgae was cultivated in 4000 mL reverse conical bioreactors under controlled conditions (27°C, 10 klux illumination in a photoperiod of 12-h light/12-h dark and constant atmospheric air insufflation). The experiments were started with 10 % inoculum in triplicate and grown for 28 days resulting in four cultivation cycles. The values of biomass (dry weight) were in 1° cycle, 1.55 g L⁻¹; 2° cycle, 0.96 g L⁻¹; 3° cycle, 0.62 g L⁻¹ and 4° cycle at 0.42 g L⁻¹. The values of total proteins and lipids were, in average, 45.9 % and 9.7 %, respectively.

Keywords: Concentrated desalination, Recycling, *Chlorella vulgaris*, Proteins, Lipids

1 INTRODUÇÃO

Um número crescente de equipamentos de dessalinização de água, pelo processo de osmose inversa, vem sendo instalado na região semiárida brasileira e isto tem causado impactos ambientais devido ao manejo inadequado do efluente produzido. Em função da eficiência destes equipamentos e da qualidade da água do poço, a quantidade de efluente gerado é da ordem de 40 % a 70 % do total de água salobra a ser dessalinizada. Considerando-se o número de dessalinizadores na região nordeste, estimado em 2000 equipamentos, um volume considerável de efluente está sendo gerado. Quase na totalidade dos casos, estes efluentes não recebem nenhum tipo de tratamento, e são lançados diretamente no solo, propiciando alto acúmulo de sais nas camadas superficiais do terreno, os quais podem ser lixiviados com as águas das chuvas, atingindo os aquíferos e causando eritrofização do solo (EMBRAPA, 2004).

Em geral, nos países desenvolvidos os efluentes são lançados nos oceanos ou injetados em poços de grandes profundidades; todavia, alternativas estão sendo estudadas, como: bacias de evaporação; redução de volume do efluente por plantas aquáticas e bacias de percolação (ALBINATI; ALBINATI; MEDEIROS).

No semiárido brasileiro, desde 1996 estudos têm sido conduzidos para o aproveitamento deste efluente, por exemplo, na produção de peixes, cultivo de camarões, cultivo de microalgas, implantação de culturas hidropônicas, como o tomate, pimentão e pimenta; irrigação de plantas halófitas, gerando produto para consumo e comercialização (SOARES et al., 2006; VOLKMANN, 2006).

A biotecnologia de microalgas demonstra ser versátil, podem ser cultivadas em diferentes meios de cultura e substratos, atuar em processos de tratamento de efluentes, biorremediação de metais pesados, e gerar produtos biotecnológicos para a indústria de ração animal, fertilizantes e química fina (PITTMAN; DEAN; OSUNDEKO, 2011).

No processo de biorremediação de nitrogênio, as microalgas assimilam esse nutriente incorporando-O à sua biomassa, obtendo um produto nutricionalmente rico, que pode ser utilizado como suplemento alimentar, na aquíicultura e em várias outras áreas de atuação (BERTOLDI et al., 2007).

Este estudo tem como objetivo realizar cultivos sucessivos no meio residual a fim de avaliar a possibilidade de reciclagem do meio contendo concentrado de dessalinização para o cultivo de *Chlorella vulgaris*.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Micro-organismo e manutenção da cultura

A microalga *Chlorella vulgaris* foi isolada em tanques de cultivo de peixes (tilápias) contendo concentrado de dessalinização. O cultivo foi mantido sob aeração constante, a 27°C, sob iluminação de 10 klux fornecida por lâmpadas fluorescentes com fotoperíodo de 12-h claro/12-h escuro em frascos de 500 mL em Bold Basal Medium (BBM) modificado contendo (g L^{-1}): K_2HPO_4 , 0,075; KH_2PO_4 , 0,014; $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,075; NaNO_3 , 0,09; $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,025; NaCl , 0,025; 0,20 mL L^{-1} de solução micronutrientes contendo (g L^{-1}): EDTA- Na_4 , 0,05; $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,00498 e H_3BO_3 , 0,01142; 0,1 mL L^{-1} de solução traços de metais e 30 mL L^{-1} de extrato de levedura 1% e 250 mL L^{-1} de concentrado de dessalinização.

2.2 Condições do cultivo em biorreatores de 4000 mL

O crescimento da microalga até a fase exponencial ($2,5 \times 10^6$ células/mL) serviu como inóculo, que foi transferido em um volume correspondente a 10 % (v/v) para biorreatores cônicos invertidos com capacidade de 4.000 mL, contendo 3.500 mL de solução BBM modificado, realizados em três repetições independentes (Figura 4.1). Para eliminar bactérias e protozoários, o concentrado de dessalinização foi esterilizado em autoclave por 30 minutos à temperatura de 105 °C.

2.3 Caracterização do concentrado de dessalinização

As amostras de concentrado de dessalinização utilizadas no presente trabalho são provenientes de uma planta de dessalinização de água salobra subterrânea situada no município de São João do Cariri, no Estado da Paraíba. Sua caracterização (Tabela 4.1) foi determinada segundo metodologia da *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* - APHA (2005).

Tabela 4.1 Características físico-químicas do concentrado de dessalinização

Parâmetros	Valor médio
pH	8,11
Condutividade Elétrica	4.321 $\mu\text{S cm}^{-1}$
Cloretos (Cl)	1088,5 mg L^{-1}
Dureza Total (CaCO_3)	756,9 mg L^{-1}
Fosfato (P)	1,48 mg L^{-1}
Nitrogênio Total	19,77 mg L^{-1}
Sódio (Na)	800,0 mg L^{-1}
Sólidos Totais Dissolvidos	1927,3 mg L^{-1}
Cálcio (Ca)	126,5 mg L^{-1}
Potássio (K)	47,0 mg L^{-1}



Início do ciclo de cultivo

Final do ciclo de cultivo

Figura 4.1 Cultivos de *Chlorella vulgaris* em biorreatores cônicos invertidos de 4.000 mL contendo concentrado de dessalinização.

2.4 Técnicas analíticas

2.4.1 Avaliação da biomassa de *Chlorella vulgaris* no final de cada ciclo de cultivo

Do volume total contido em cada biorreator (3500 mL), ao final de cada ciclo (7 dias de cultivo), foram retirados 30 mL para determinação do peso seco e 3000 mL para coleta da biomassa através da centrifugação em (CENTRÍFUGA REFRIGERADA/NOVA

TÉCNICA). Após a separação da biomassa por meio da centrifugação, o sobrenadante (aproximadamente 3000 mL) contendo o meio de cultivo residual parcialmente exaurido, foi reintroduzido nos biorreatores e recomposto quimicamente com a adição de 10 mL L⁻¹ de nitrato de sódio (concentração de 0,09 g L⁻¹). A biomassa foi lavada duas vezes com água destilada (300 mL) para retirada do sal absorvido às células e após secagem a 60°C por 12 horas, foram analisados os teores de proteínas e lipídeos totais para cada ciclo de 7 dias de cultivo.

2.4.2 Lipídeos totais

O teor lipídico total da biomassa foi determinado de acordo com o método de extração com solvente orgânico em extrator contínuo do tipo Soxhlet (AOAC, 2005). As amostras trituradas foram submetidas à extração da fração lipídica por solvente orgânico (clorofórmio 2: metanol 1), em extrator contínuo de Soxhlet. Os resíduos lipídicos, juntamente ao solventes, foram então submetidos a tratamento de em sistema evaporador rotativo a vácuo, para eliminação destes últimos. O valor de massa de lipídeos foi calculado com base de diferença de peso do balão de fundo redondo utilizado, antes e depois do procedimento.

2.4.3 Proteínas totais

O teor protéico total na biomassa seca foi determinado pelo clássico método de Kjeldahl, adotando-se o fator de 6,38 para conversão a partir dos teores de nitrogênio total (AOAC, 2005).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os cultivos foram mantidos durante 28 dias, totalizando quatro ciclos de cultivo. Como forma de comparação, para cada ciclo foram determinados os valores da biomassa em peso úmido, proteínas e lipídeos totais, expressos na Tabela 4.2.

Tabela 4.2 Valores da biomassa em peso úmido (g L^{-1}), proteínas e lipídeos totais de *Chlorella vulgaris* em cada ciclo de 7 dias de cultivo, em biorreatores de 4000 mL, com meio contendo concentrado de dessalinização (250 mL L^{-1}).

Ciclos de cultivo	Biomassa peso úmido (g L^{-1})	Proteínas Totais (%)	Lipídeos Totais (%)
1º	1,55	46,80	9,88
2º	0,96	45,27	11,46
3º	0,62	46,44	8,57
4º	0,42	45,31	8,95
Média	0,88	45,95	9,71

Observou-se que o teor de biomassa de *Chlorella vulgaris* decresce a cada ciclo de cultivo (Figura 4.2), sendo inicialmente de $1,55 \text{ g L}^{-1}$ passando a decrescer para $0,96 \text{ g L}^{-1}$, $0,62 \text{ g L}^{-1}$ e $0,42 \text{ g L}^{-1}$, respectivamente.

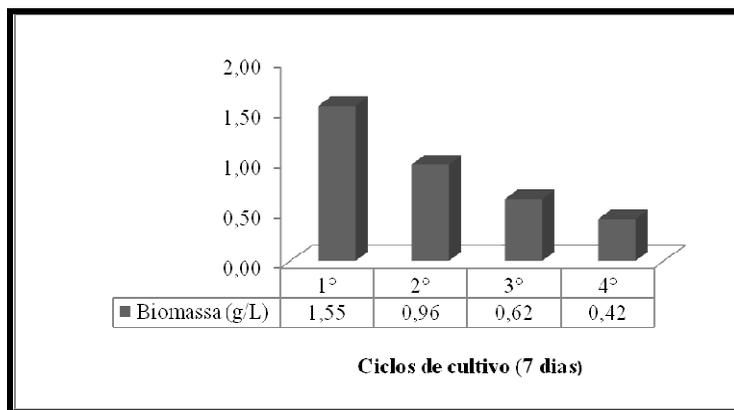


Figura 4.2 Visualização do decréscimo da biomassa de *Chlorella vulgaris* em função dos ciclos de cultivo.

No 4º e último ciclo de cultivo observou-se uma diferenciação na coloração dos cultivos, a cor inicialmente verde, associada ao processo fotossintético e consequente produção de clorofila, tornou-se amarelado indicando fase de declínio, possivelmente pelo excesso de excreção de metabólitos tóxicos, limitação de nutrientes e limitação da intensidade luminosa devido ao efeito de sombreamento causado pela aderência das microalgas no interior dos biorreatores (BRINDLEY et al., 2011).

Apesar da limitante condição de cultivo observado ao longo dos ciclos, a microalga *Chlorella vulgaris*, não apresentou variações expressivas na composição química. Desta forma, os valores para proteínas e lipídeos totais foram em média de 45,9 e 9,7 %, respectivamente.

Pesquisas relacionadas à interação entre intensidade luminosa, temperatura, agitação e concentração de nutrientes podem contribuir para a otimização do cultivo de *Chlorella*. Quando se trata de meio de cultura sintético, o alto custo dos nutrientes pode ser um fator limitante para a produção (DUARTE, 2001).

Outra característica no crescimento das microalgas consiste na disponibilidade de nutrientes (BEZERRA et al., 2011). Sendo o nitrogênio o segundo elemento químico mais abundante na célula que precisa ser adicionado ao cultivo, fica clara a importância da escolha desta fonte. Embora os nitratos sejam tradicionalmente utilizados, fontes de nitrogênio de baixo custo, como sais de amônio e/ou uréia, podem reduzir ainda mais o custo do meio de cultivo (SASSANO et al., 2007; CONVERTI et al., 2009; SASSANO et al., 2010; BEZERRA et al., 2012).

Como observado neste estudo, a cada ciclo de cultivo a concentração de nutrientes no meio diminuía, instituindo um fator limitante e afetando diretamente a biomassa final. Apesar de nutricionalmente limitante, a microalga *Chlorella vulgaris* obteve crescimento nos quatro ciclos de cultivos, isto só ocorreu, porque a fonte de carbono proveniente da insuflação de CO₂ atmosférico, intensidade luminosa (fornecida por lâmpadas fluorescentes), temperatura de 27°C ± 2°C e suplementação de nitrogênio foram constantes, proporcionando condições de crescimento microalgal.

4 CONCLUSÕES

Neste capítulo, foi possível comparar da biomassa seca, proteínas e lipídeos da microalga *Chlorella vulgaris* em cada ciclo de cultivo.

Quatro foram os ciclos de reciclagem ao realizar cultivos sucessivos sem necessidade de troca de água.

Foi observado que nos quatro ciclos de cultivo, o teor de proteínas e lipídeos totais manteve-se equivalente.

É importante destacar neste capítulo 4, que a sucessão de cultivos sem necessidade de troca de água, teve por objetivo reduzir o consumo de água e aproveitar ao máximo os nutrientes e/ou minerais existentes no concentrado de dessalinização.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBINATI, R. C. B.; ALBINATI, A. C. L.; MEDEIROS, Y. D. **Utilização de Águas Desprezadas para a Produção de Alimentos no Semiárido**. XV Simpósio Brasileiro de Recursos Hídricos, 2003.
- AOAC. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. Method nr 991.20. AOAC: Washington D.C., 2005.
- BERTOLDI, F. C.; SANT'ANNA, E. S.; OLIVEIRA, J. L. B.; REBELO, A. M. **Biorremocão de nitrogênio e fósforo da solução hidropônica residual por meio da microalga *Chlorella vulgaris***. Evidência, Joaçaba, v. 7, n. 2, p. 85-92, 2007.
- BEZERRA, R. P.; MONTOYA, E. Y. O.; SATO, S.; PEREGO, P.; CARVALHO, J. C. M.; CONVERTI, A. Effects of light intensity and dilution rate on the semicontinuous cultivation of *Arthrospira (Spirulina) platensis*. A kinetic Monod-type approach. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 3215-3219, 2011.
- BEZERRA, R. P.; MATSUDO, M. C.; SATO, S.; PEREGO, P.; CONVERTI, A.; CARVALHO, J. C. M. Effects of photobioreactor configuration, nitrogen source and light intensity on the fed-batch cultivation of *Arthrospira (Spirulina) platensis*. Bioenergetic aspects. **Biomass and Bioenergy**, doi:10.1016/j.biombioe.2011.11.007., 2012.
- BRINDLEY, C.; ACIÉN, FERNÁNDEZ, F. G.; FERNÁNDEZ-SEVILHA, J. M. Analysis of light regime in continuous light distributions in photobioreactors. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 3138-3148, 2011.
- CONVERTI, A.; CASAZZA, A. A.; ORTIZ, E. Y.; PEREGO, P.; BORGHI, M. D. Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. **Chemical Engineering Processing: Process Intensification**, v. 48, p. 146-151, 2009.
- DUARTE, I. C. S. **Influência do meio nutricional no crescimento e composição centesimal de *Chlorella* sp (Chlorophyta, Chlorococcales)**. 2001. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2001.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Centro de Pesquisa Agropecuária do Trópico Semiárido. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Sistemas de Produção Integrado Usando Efluentes da Dessalinização**, Embrapa Semiárido: Petrolina – PE, Documentos 187, ISSN 1516-1633, 2004.

PITTMAN, J. K.; DEAN, A. P.; OSUNDEKO, O. The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources, **Bioresource Technology**, v. 102, p. 17-25, 2011.

SASSANO, C. E. N.; GIOIELLI, L. A.; ALMEIDA, K. A.; SATO, S.; PEREGO, P.; CONVERTI, A.; CARVALHO, J. C. M. Cultivation of *Spirulina platensis* by continuous process using ammonium chloride as nitrogen source. **Biomass and Bioenergy**, v. 31, p. 593-598, 2007.

SASSANO, C. E. N.; GIOIELLI, L. A.; FERREIRA, L. S.; RODRIGUES, M. S.; SATO, S.; CONVERTI, A.; CARVALHO, J. C. M. Evaluation of the composition of continuously-cultivated *Arthrospira (Spirulina) platensis* using ammonium chloride as nitrogen source. **Biomass and Bioenergy**, v. 34, p. 1732-1738, 2010.

SOARES, T. M.; SILVA, I. J. O.; DUARTE, S. N.; SILVA, E. F. F. Destinação de águas residuárias provenientes do processo de dessalinização por osmose reversa. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 10, n.3, p.730–737, 2006.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ao término deste estudo foi possível otimizar um meio de cultura alternativo para a microalga *Chlorella vulgaris*, fazendo uso do concentrado do processo de dessalinização de águas subterrâneas.

O meio de cultura proposto para otimizar o cultivo autotrófico de *Chlorella vulgaris* consiste de 0,09 g L⁻¹ de NaNO₃, 0,014 g L⁻¹ de KH₂PO₄ e 0,20 mL L⁻¹ de solução micronutriente. A máxima produção de biomassa e produtividade lipídica obtidos utilizando o meio de cultura otimizado foram 0,59 g L⁻¹ e 5,42 mg L⁻¹ dia⁻¹, respectivamente.

A biomassa obtida do cultivo da microalga *Chlorella vulgaris* apresentou elevado teor de ácidos graxos essenciais ω-3 e ω-6, podendo estes ser adicionados em alimentos enriquecidos (*health foods*), ração animal suplementado e até mesmo como fonte promissora na produção de biodiesel.

Foi observado que a espécie *Chlorella vulgaris* obteve crescimento satisfatório durante quatro ciclos de cultivo, ao realizar cultivos sucessivos sem necessidade de troca de água. Neste caso, é importante ressaltar que a sucessão de cultivos sem necessidade de troca de água, teve por objetivo reduzir o consumo de água nos cultivos e aproveitar ao máximo os nutrientes e/ou minerais existentes no concentrado de dessalinização.

Este estudo pode servir como base e fornecer subsídios para uma aplicação de produção de microalgas no semiárido nordestino a “céu aberto” em tanques do tipo “raceway” visando uma projeção em escala comercial.

ANEXO

Anexo A

Composição e modo de preparo de Bold Basal Medium (BBM) empregado no cultivo de microalgas marinhas, recomendado pelo Centro de Cultura de Algas e Protozoários, Cambridge (CCAP 1992):

Solução estoque	Fórmula	Peso (g)	Água destilada (mL)
1	K ₂ HPO ₄	1,875	250
2	KH ₂ PO ₄	4,375	250
3	MgSO ₄ .7H ₂ O	1,875	250
4	NaNO ₃	6,250	250
5	CaCl ₂ .2H ₂ O	0,625	250
6	NaCl	0,625	250
7	EDTA – Na ₄	5,000	100
8	FeSO ₄ .7H ₂ O	0,498	100
9	H ₃ BO ₃	1,142	100
10	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,353	25
11	MnSO ₄ .H ₂ O	0,049	25
12	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,063	25
13	CaCl ₂ .6H ₂ O	0,036	25
14	NaMoO ₄ .2H ₂ O	0,048	25

Os volumes das soluções estoques estão baseados no preparo de 1 Litro de meio de cultura BBM e são adicionados em ordem numérica, como consta no anexo 1. Para preparar 1L de Bold Basal Medium são necessários as seguintes alíquotas:

- 10 mL da solução estoque 1 a 6
- 1 mL da solução micronutriente 7 a 9
- 0,1 mL da solução traços de metais 10 a 14
- 30 mL de extrato de levedura 1 %.

APÊNDICES

Apêndice A

Composição e modo de preparo de Bold Basal Medium (BBM) empregado no cultivo da microalga *Chlorella vulgaris* após a otimização.

Solução estoque	Fórmula	Peso (g)	Água destilada (mL)
1	K ₂ HPO ₄	1,875	250
2	KH ₂ PO ₄	0,245	250
3	MgSO ₄ .7H ₂ O	1,875	250
4	NaNO ₃	2,250	250
5	CaCl ₂ .2H ₂ O	0,625	250
6	NaCl	0,625	250
7	EDTA – Na ₄	5,000	100
8	FeSO ₄ .7H ₂ O	0,498	100
9	H ₃ BO ₃	1,142	100
10	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,353	25
11	MnSO ₄ .H ₂ O	0,049	25
12	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,063	25
13	CaCl ₂ .6H ₂ O	0,036	25
14	NaMoO ₄ . 2H ₂ O	0,048	25

Preparação do BBM:

Os volumes das soluções estoques estão baseados no preparo de 1 litro de meio de cultura BBM e são adicionados em ordem numérica, como consta no anexo 1. Para preparar 1L de Bold Basal Medium são necessários as seguintes alíquotas:

- 10 mL da solução estoque 1 a 6
- 0,2 mL da solução micronutriente 7 a 9
- 0,1 mL da solução traços de metais 10 a 14
- 30 mL de extrato de levedura 1 %.

Apêndice B

Concentrado de dessalinização proveniente de uma planta de dessalinização de água salobra subterrânea situada no município de São João do Cariri, localizado na comunidade de Uruçu, no estado da Paraíba. Resultados de Ensaio realizados pelo Laboratório de Análises – LABCAL, no Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos – CAL, da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC.

Unidades	Resultado
Cloretos (Cl)	1691,3 mg L ⁻¹
Cálcio (Ca)	126,5 mg L ⁻¹
Dureza cálcica	30,7 mg L ⁻¹
Dureza de magnésio	801,7 mg L ⁻¹
Dureza total (CaCO ₃)	985,2 mg L ⁻¹
Ferro	0,44 mg L ⁻¹
Fosfato	0,70 mg L ⁻¹
Magnésio	198,3 mg L ⁻¹
Nitrogênio total	30 mg L ⁻¹
Potássio	47,0 mg L ⁻¹
Sulfato	170,0 mg L ⁻¹
Sódio	987,5 mg L ⁻¹
Sólidos totais dissolvidos	2190,5 ppm
pH	8,46
Condutividade Elétrica	4875,0 µS cm ⁻¹

Apêndice C

Dados brutos de análises de *Chlorella vulgaris* cultivada em Bold Basal Medium (BBM) padrão e BBM + concentrado de dessalinização, realizadas pelo Laboratório de Físico-Química (LABCAL) no Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos – CAL, da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC.

Condições de cultivo: A microalga *Chlorella vulgaris*, foi isolada em tanques de cultivo de peixes (tilápias) contendo concentrado de dessalinização. O cultivo foi realizado em fotobiorreatores com capacidade de 100 litros, a 27°C, sob iluminação de 20 klux fornecida por lâmpadas fluorescentes com fotoperíodo de 12-h claro/12-h escuro em Bold Basal Medium (BBM) contendo (g L⁻¹): K₂HPO₄, 0,075; KH₂PO₄, 0,175; MgSO₄·7H₂O, 0,075; NaNO₃, 0,250; CaCl₂·2H₂O, 0,025; NaCl, 0,025; 1,0 mL L⁻¹ de solução micronutriente contendo (g L⁻¹): EDTA-Na₄, 0,05; FeSO₄·7H₂O, 0,00498 e H₃BO₃, 0,01142; 0,1 mL L⁻¹ de solução traços de metais, 30 mL L⁻¹ de extrato de levedura 1% e 250 mL L⁻¹ de concentrado de dessalinização.

Composição química (g/100g)	BBM Padrão	BBM + Concentrado de dessalinização
Umidade	6,25 ± 0,10	7,06 ± 0,13
Cinzas	7,27 ± 0,04	27,27 ± 0,03
Fibra Bruta	5,48 ± 0,9	5,48 ± 1,40
Carboidratos Totais	14,00 ± 0,03	12,46 ± 0,04
Proteínas Totais	54,16 ± 0,06	40,35 ± 0,01
Lipídeos Totais	12,58 ± 0,05	7,38 ± 0,13

Continuação Apêndice C

Composição dos ácidos graxos		BBM Padrão (%)	BBM + Concentrado de dessalinização (%)
Ácidos graxos saturados	Láurico	0,10	0,63
	Tridecanóico	0,58	0,95
	Mirístico	0,34	0,46
	Pentadecanóico	0,18	0,26
	Palmítico	19,35	17,33
	Heptadecanóico	0,26	0,27
	Esteárico	0,67	0,65
	<i>Subtotal</i>	21,48	20,55
Ácidos graxos monoinsaturados	Palmitoléico	1,53	1,76
	Cis-heptadecenóico	0,88	0,26
	Elaídico	1,37	1,12
	Oléico	12,64	18,61
	<i>Subtotal</i>	16,24	21,75
Ácidos graxos poli-insaturados	Linoléico (ω -6)	10,28	9,10
	Linolênico (ω -3)	31,00	24,62
	<i>Subtotal</i>	41,28	33,72
Lipídeos Totais		12,58	7,38