



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE
ALIMENTOS

DINÂMICA DO FÓSFORO EM CULTIVO HETEROTRÓFICO E PRODUÇÃO DE
COMPOSTOS CELULARES POR CIANOBACTÉRIA INTEGRADO A
BIORREFINARIAS AGROINDUSTRIAIS

Juliana Guerra Vieira

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Isabel Queiroz

RIO GRANDE, RS

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE
ALIMENTOS

DINÂMICA DO FÓSFORO EM CULTIVO HETEROTRÓFICO E PRODUÇÃO
DE COMPOSTOS CELULARES POR CIANOBACTÉRIA INTEGRADO A
BIORREFINARIAS AGROINDUSTRIAIS

Juliana Guerra Vieira

Química Ambiental

Tese apresentada como requisito para a
obtenção do título de Doutor em
Engenharia e Ciência de Alimentos

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Maria Isabel Queiroz

RIO GRANDE, RS

2015

V658d Vieira, Juliana Guerra.

Dinâmica do fósforo em cultivo heterotrófico e produção de compostos celulares por cianobactéria integrado a biorrefinarias agroindustriais / Juliana Guerra Vieira. – 2015.

122 f.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Rio Grande/RS, 2015.

Orientadora: Dr^a. Maria Isabel Queiroz.

1. Laticínio 2. Fósforo 3. Biorrefinaria 4. *Aphanothece* 5. Cultivos heterotróficos 6. Nutrientes I. Queiroz, Maria Isabel II. Título.

CDU 637.13

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me proporcionar a oportunidade de viver.

A minha orientadora Profa. Maria Isabel Queiroz que transformou números em uma tese. Nunca vou ter palavras para agradecer o quanto cresci como pessoa e como profissional nestes seis anos que convivemos. Obrigada por ter sido a mãe, amiga, irmã, parceira, professora, orientadora, educadora e principalmente por **SEMPRE** ter acreditado em mim, quando eu mesma já não acreditava. Espero que estes sejam os primeiros seis anos de todos que ainda virão, pois gostaria de manter a convivência. Orientado é para **SEMPRE**, assim como os filhos!!!!!!

A minha mãe Sonia Guerra, meu **AMOR** maior! Minha maior incentivadora, torcedora, financiadora e fã número um. Agradeço todos os sacrifícios e dificuldades enfrentadas para me proporcionar tudo de melhor até hoje. Espero poder lhe dar tudo em dobro em um futuro próximo. Gostaria que todos tivessem a oportunidade de ter uma mãe tão dedicada, amorosa e carinhosa como a minha.

Ao meu marido Juliart Ferreira Gonçalves, amor da minha vida! Obrigada pelo amor, carinho, paciência, dedicação e auxílio nas noites e finais de semana que passamos no laboratório. Ao teu lado descobri que entre o sonho e a realidade, existe um espaço chamado felicidade, e para que a minha felicidade se torne realidade, preciso estar ao teu lado. Te amo para **SEMPRE**.

A minha irmã de coração Márcia Mota Clasen presente em todos os momentos da minha vida! Tu és meu porto seguro. A pessoa mais admirável que conheço, exemplo de ser humano. Obrigada por gostar de mim e acreditar que posso ser uma pessoa melhor apesar de todos os meus defeitos. Te amo para **SEMPRE**.

A minha amigona Juliana Latorres por toda a ajuda prestada no período que fomos do mesmo laboratório, aos conselhos e longas conversas. Tenho certeza que o teu sucesso é inevitável, pois sabes equilibrar a razão e a emoção. És um exemplo de pessoa e de profissional. Obrigada por fazer parte da minha vida.

A minha amiga Fabiane Cristina Petry minha “dupla”. Aprendi muito contigo nestes anos de convivência. És uma ótima pessoa e excelente profissional. Tenho muito orgulho de ti. Obrigada por tudo.

A amiga Liziane Garcia pela amizade, carinho, atenção e acolhida durante estes seis anos que nos conhecemos.

A amiga Adriana G. da Silva Manetti pelos ensinamentos e treinamento no cultivo da *Aphanothece microscopica* Nägeli. Por SEMPRE ser prestativa e pronta para auxiliar todos que chegavam no laboratório.

A amiga Nívia Streit por ensinar que para alguém ganhar outro tem que perder. Tenho certeza que ganhei uma amiga ao longo destes seis anos de convivência e espero que realize todos os teus sonhos, pois és uma pessoa especial.

A Marina Mitterer-Daltoé pela convivência agradável e exemplo de profissional.

A Nádia Carbonera pela ajuda prestada no decorrer do doutorado e pelo carinho espontâneo sempre dedicado a mim e a todos os que estavam ao seu redor.

A Larine pela ajuda prestada no laboratório e troca de ensinamentos.

Aos Professores do programa de pós-graduação Eliana, Janaína, Jaqueline, Marta, Milton, Suzana, Leonor, Carlos André, Pinto, Ana Maria, pelos conhecimentos adquiridos.

Aos professores Milton L. P. Espírito Santo, Professora Eliana Furlong e a técnica Jesus por gentilmente emprestar seus equipamentos e dependências, bem como pela cooperação e atenção na realização deste trabalho.

Aos coordenadores do curso de pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos Luiz Antônio de Almeida Pinto e Myriam de las Mercedes Salas-Mellado.

A secretária da pós-graduação Islanda, pela amizade e disponibilidade em atender a tudo que foi necessário da parte da pós-graduação para a elaboração desta tese.

A secretária da escola Iraci pela amizade, eficiência e dedicação na execução de tudo que foi solicitado durante os seis anos de convivência.

Aos técnicos da escola Josiane Cardoso Ferreira e Murilo Vitoria da Silva pela disponibilidade, simpatia e profissionalismo.

A Anne Administradora da escola pelos serviços prestados de forma rápida e eficaz na mudança do Laboratório de Biotecnologia do campus cidade para o campus carreiros.

A técnica Sergiane e ao Laboratório LACOM por sempre estar a disposição para ajudar nas análises cromatográficas executadas nesta tese.

Aos técnicos da parte elétrica e hidráulica por **SEMPRE** executarem com rapidez e eficiência fazendo com que o Laboratório de Biotecnologia sempre funcionasse a todo vapor.

Ao técnico Danilo, por sempre estar disposto a ajudar no conserto e manutenção dos equipamentos do Laboratório de Biotecnologia e também pela confecção da câmara de cultivo autótrofo utilizada nesta tese.

Aos membros da banca examinadora, Adriana Gonçalves da Silva Manetti, Eliana Badiale Furlong, Eduardo Jacob Lopes, Leila Queiroz Zepka e Leonor Almeida de Souza Soares pela disponibilidade de tempo e por terem aceitado o convite.

À Universidade Federal do Rio Grande pela formação profissional.

À Cooperativa Sul-Riograndense Laticínios Ltda-COSULATI, por estarem sempre dispostos a nos ajudar nas coletas de efluente.

Ao CNPq/CAPES, pelo apoio financeiro.

Agradeço a todos aqueles que de alguma forma contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

*“Cada pessoa que passa em nossa vida passa sozinha,
É porque cada pessoa é única e nenhuma substitui a outra!
Cada pessoa que passa em nossa vida passa sozinha e não nos deixa só
Porque deixa um pouco de si e leva um pouquinho de nós.
Essa é a mais bela responsabilidade da vida
E a prova de que as pessoas não se encontram por acaso.”*

Charles Chaplin

*“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito.
Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes.”*

Marthin Luther King

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	i
SUMÁRIO.....	v
LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
NOMENCLATURA E SIMBOLOGIA	ix
RESUMO	2
ABSTRACT	3
1INTRODUÇÃO.....	4
2 OBJETIVOS	6
2.1 Objetivo geral	6
2.2 Objetivos específicos	6
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	8
3.1 Cianobactéria	8
3.2 Efluente de laticínios	11
3.3 Proteínas.....	14
3.4 Carboidratos.....	17
3.5 Lipídios	19
3.5.1 Metabolismo de ácidos graxos	21
3.6 Fósforo	24
3.7 Biorrefinaria.....	30
4 MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1 Micro-organismo e condições de crescimento.....	33
4.2 Água residuária	35
4.3 Reator heterotrófico	35
4.4 Experimentos	36
4.4.1 Primeira etapa	37
4.4.1.1 Delineamento Experimental	37
4.4.1.2 Eficiência de remoção de nutrientes e crescimento celular	38
4.4.1.3 Avaliação da cinética de crescimento	38
4.4.1.4 Avaliação da cinética de remoção de nutrientes	39
4.4.1.5 Determinação das razões C/N e N/P.....	39
4.4.2 Segunda etapa	39
4.4.2.1 Experimentos	39
4.4.2.2 Avaliação das frações de fósforo	40
4.4.2.2.1 Frações fosforadas na fase líquida	40
4.4.2.2.2 Frações fosforadas na fase sólida.....	41
4.4.3 Terceira etapa.....	41
4.4.3.1 Experimentos	42
4.4.3.2 Caracterização da Biomassa	42
4.4.3.2.1 Determinação de proteína	42

4.4.3.2.2	Determinação de carboidratos.....	42
4.4.3.2.3	Determinação de lipídios	42
4.4.3.2.4	Determinação de cinzas	43
4.4.3.2.5	Determinação do perfil de ácidos graxos.....	43
4.4.3.2.5.1	Extração da gordura da biomassa	43
4.4.3.2.5.2	Esterificação dos ácidos graxos.....	43
4.4.3.2.5.3	Identificação dos metil ésteres de ácidos graxos	43
4.4.3.2.5.4	Quantificação dos metil ésteres dos ácidos graxos.....	44
4.4.3.2.6	Manipulação da temperatura de reação biológica.....	44
4.4.3.2.7	Avaliação dos resultados do planejamento experimental	45
4.4.3.2.8	Definição de um reator heterotrófico descontínuo visando avaliar a perspectiva de implementação de uma biorrefinaria microalgal	45
4.4.3.2.9	Avaliação estatística dos resultados.....	46
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
6	CONCLUSÃO	90
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Matriz do planejamento experimental com seus valores reais em mg.L^{-1} e codificados.....	37
Tabela 2. Matriz do planejamento experimental com seus valores reais e codificados	45
Tabela 3. Caracterização do efluente da indústria de laticínios.	47
Tabela 4. Avaliação da cinética de crescimento.	52
Tabela 5. Valores de p obtidos a partir da análise de variância para eficiências de remoção (E) de nutrientes, produtividade (Px) e interações	53
Tabela 6. Remoção de nutrientes para as diferentes concentrações iniciais de fósforo e temperaturas de cultivo.....	54
Tabela 7. Caracterização do efluente da indústria de laticínios.	59
Tabela 8. Eficiência de remoção das frações de fósforo em sistema heterotrófico para um período experimental de 24 h.....	60
Tabela 9. Variações das concentrações de fósforo total, fósforo dissolvido total e fósforo total suspenso na fase líquida do reator heterotrófico e de fósforo total na fase sólida em 8 horas de cultivo.	63
Tabela 10. Concentração de fósforo reativo na fase líquida do reator heterotrófico, e teores de fósforo reativo e fósforo total na biomassa seca e intersticial	65
Tabela 11. Concentração de fósforo reativo na fase líquida do reator autotrófico, e teores de fósforo reativo e fósforo total na biomassa seca e intersticial	65
Tabela 12. Estimativa de custo para tratar o fósforo oriundo do efluente da indústria de laticínio.	68
Tabela 13. Caracterização do efluente da indústria de laticínio.....	69
Tabela 14. Concentrações de proteínas, carboidratos, lipídios e cinzas em biomassas de <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli extraídas em diferentes fases de crescimento.	69
Tabela 15. Porcentagens em ácidos graxos saturados, insaturados e razões AGPI/AGS em biomassas de <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli.....	77
Tabela 16. Análise dos efeitos para a resposta produção de lipídios por <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli.	79
Tabela 17. Análise de variância para o ajuste do modelo polinomial, segundo o planejamento experimental utilizado.....	81
Tabela 18. Discriminação e detalhamento do biorreator heterotrófico	86
Tabela 19. Estimativa de produção de fósforo por <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli a partir da geração anual de efluentes pela Companhia Sul Rio Grandense de laticínios, Pelotas RS..	89

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Reator autotrófico.....	34
Figura 2. Reator heterotrófico.....	36
Figura 3. Crescimento celular e variação do pH com o tempo de cultivo para diferentes concentrações de fosfato.....	50
Figura 4. Avaliação comparativa das remoções de fosfato, nitrogênio total e matéria orgânica do efluente de laticínio por <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli, em função das concentrações de fosfato e temperatura de crescimento.....	56
Figura 5. Variação das frações de fósforo com o tempo de cultivo, em sistema heterotrófico.	61
Figura 6. Curva de crescimento da <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli desenvolvida no efluente da indústria de laticínio nas condições experimentais.	64
Figura 7. Variação das taxas de consumo das frações de fósforo com as concentrações na fase líquida do reator heterotrófico.	66
Figura 8. Variação da concentração de nutrientes e de biomassa com o tempo de cultivo.	72
Figura 9. Perfil de ácidos graxos da cianobactéria <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli, desenvolvida no efluente de laticínio a 20°C.	74
Figura 10. Avaliação do teor de lipídios em função do tempo e da temperatura de reação.....	80
Figura 11. Superfície de resposta para produção de lipídios por <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli.	81
Figura 12. Comparação entre a composição de ácidos graxos em cultivo heterotrófico a 10°C e 20°C.	82
Figura 13. Proposta de uma plataforma de biorrefinaria microalgal, a partir da cianobactéria <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli desenvolvida no efluente de laticínio.....	87

NOMENCLATURA E SIMBOLOGIA

APHA: American Public Health Association

ANOVA: análise de variância

BG-11: Brau-Grunow Medium

AGPI: ácidos graxos polinsaturados

AGS: ácidos graxos saturados

Cf: concentração final (mg.L^{-1})

Co: concentração inicial (mg.L^{-1})

C/N: razão entre carbono e nitrogênio

C_{TDH} : Concentração no tempo de detenção hidráulica (mg.L^{-1})

CV: coeficiente de variação

DQO: demanda química de oxigênio (mg.L^{-1})

EPA: Environmental Protection Agency Report

E: eficiência de remoção (%)

F: fonte de variação para 95 % de confiança

F_{calc} : F calculado

F_{Tab} : F tabelado

K: constante de velocidade (h^{-1})

GL: graus de liberdade

MQ: média quadrática

N/P: Razão entre nitrogênio e fósforo

N- NH_4^+ : Nitrogênio amoniacal (mg.L^{-1})

N-NTK: Nitrogênio Total Kjeldahl (mg.L^{-1})

p: probabilidade de diferença entre médias

P_x : produtividade ($\text{mg.L}^{-1}\text{h}^{-1}$)

pH: potencial hidrogeniônico

PTR: fósforo total reativo (mg.L^{-1})

PDR: fósforo dissolvido reativo (mg.L^{-1})

PSR: fósforo suspenso reativo (mg.L^{-1})

PTHA: fosforo total por hirólise ácida

PDHA: fosforo dissolvido por hirólise ácida

PSHA: fosforo suspenso por hirólise ácida

POT: fósforo orgânico total

POD: fósforo orgânico dissolvido (mg.L^{-1})

POS: fósforo orgânico suspenso (mg.L^{-1})

PT: fósforo total (mg.L^{-1})

PDT: fósforo dissolvido total (mg.L^{-1})

PST: fósforo suspenso total (mg.L^{-1})

PDRI: fósforo dissolvido reativo intersticial (mg.L^{-1})

PTI: fósforo total intersticial (mg.L^{-1})

P- PO_4^{-3} : fósforo dissolvido reativo (mg.L^{-1})

PVC: cloreto de polivinila

P_X: produtividade de biomassa ($\text{mg.L}^{-1}\text{h}^{-1}$)

Q: vazão do efluente (m^3)

q: taxa de consumo ($\text{mg P.h}^{-1}.\text{mgX}$)

R: coeficiente de correlação

R²: coeficiente de determinação

SQ: soma dos quadrados

t_{log}: duração da fase logarítmica (h)

tg: tempo de geração (h)

TDH: tempo de detenção hidráulica (h)

T: temperatura (°C)

ton: tonelada

V: volume do reator (m^3)

VVM: volume de ar por volume de meio por minuto ($\text{m}^3 \text{ m}^{-3} \text{ min}^{-1}$)

Y_{X/S}: fator de conversão de substrato em célula ou carboidrato extracelular (mg biomassa/mg S)

X: concentração celular final (mg.L^{-1})

X_0 : concentração celular inicial (mg.L^{-1})

$X_{\text{máx}}$: concentração celular máxima (mg.L^{-1})

$\mu_{\text{máx}}$: máxima velocidade específica de crescimento do micro-organismo (h^{-1})

ΔX : variação da concentração final e inicial (mg.L^{-1})

Δt : variação entre o tempo final e inicial (h)

$\lambda_{\text{máx}}$: comprimento de onda máximo

RESUMO

O objetivo desta tese foi avaliar a dinâmica do fósforo em cultivo heterotrófico e produção de compostos celulares por *Aphanothece microscopica* Nägeli visando avaliar a perspectiva de implementação de uma biorrefinaria microalgal. Desta forma, foi avaliado o comportamento do micro-organismo em estudo no cultivo heterotrófico, utilizando como meio de cultivo o efluente de laticínios. O trabalho foi desenvolvido em 3 etapas. Em um primeiro momento foi avaliada a influência da temperatura (20 e 30°C) e os valores máximos e mínimos de nutrientes, em especial do fósforo dissolvido reativo (PDR), disponíveis no efluente de laticínio, na remoção de nutrientes. Os resultados demonstraram que a concentração inicial de fósforo dissolvido e a temperatura exerceram influência no crescimento celular e na eficiência de remoção de nutrientes. Em termos de otimização de processo os cultivos conduzidos a 20°C e maiores concentrações de PDR (5,5 mg.L⁻¹) no efluente de laticínio, foram os mais eficientes na conversão de poluentes em biomassa e remoção de nutrientes. A segunda etapa foi desenvolvida com o objetivo de avaliar a dinâmica de distribuição de fósforo na fase líquida e sólida do reator heterotrófico, quando o efluente de laticínio foi tratado pela *Aphanothece microscopica* Nägeli, a 20°C e nas máximas concentrações de fósforo dissolvido encontradas no efluente. Foi demonstrado que as formas fosforadas na fase líquida do reator se caracterizam pela predominância da fração dissolvida em comparação à particulada e por apresentar como fração predominante a de fósforo orgânico. No que se refere à fase sólida, ficou demonstrado que a *Aphanothece microscopica* Nägeli, quando cultivada heterotroficamente apresenta 3,8 vezes mais fósforo que o requerido para o crescimento celular. Ficando demonstrado ainda que a remoção biológica de fósforo por *Aphanothece microscopica* Nägeli pode resultar em substanciais aportes financeiros para as estações de tratamento de efluentes. Uma terceira etapa foi desenvolvida, a qual teve como objetivo avaliar a estimativa de produção de compostos celulares por *Aphanothece microscopica* Nägeli, a partir do efluente de laticínio, bem como o efeito da redução de temperatura de cultivo no teor de lipídios, no momento em que é obtida a máxima concentração deste componente celular, nas condições otimizadas. Foi obtido na fase logarítmica de crescimento, concentrações de 41,8 % de proteínas, carboidratos 28,5 %, lipídios 10,4 % e minerais 10,8 %. O maior teor de lipídio registrado a 20°C correspondeu a biomassa analisada na fase logarítmica. Com a redução da temperatura para 5°C por um período de 30 h é possível obter concentrações de lipídios 2,4 vezes superior ao registrado na fase logarítmica a 20 °C. No entanto, não foram indicadas diferenças significativas ($p \leq 0,05$) em função da temperatura entre as concentrações de lipídios obtidas para a biomassa a 10°C em 40 h. O perfil de ácidos graxos da biomassa gerada a 20°C, apresentou como ácidos graxos majoritários, os ácidos graxos: palmítico, oléico, γ -linolênico, palmitoleico e esteárico, resultando um aumento na concentração de ácidos graxos saturados às expensas dos insaturados, quando a temperatura é reduzida. Em paralelo, um reator heterotrófico descontínuo foi definido, ficando demonstrado que a extrapolação da operação em batelada para contínua requer um biorreator heterotrófico com volume útil de trabalho de 240,51 m³, permitindo tratar 950 m³ diários de efluente, gerando 11,8 kg.d⁻¹ de biomassa útil para produção de compostos celulares por *Aphanothece microscopica* Nägeli, visando à simultânea remoção de matéria orgânica, nitrogênio total e fósforo total, gerando insumos que podem suportar a implementação de uma biorrefinaria microalgal.

Palavras-chave: *Aphanothece*; Nutrientes; Fósforo; Cultivos heterotróficos; Lipídios, Ácidos graxos, Reator, Biorrefinaria.

ABSTRACT

The objective of the work was to evaluate the phosphorus dynamics in heterotrophic cultivation, as well as the production of cellular compounds by *Aphanothece microscopica* Nägeli. This was performed to assess the possibility of a microalgal biorefinery implementation. Therefore, the behavior of the microorganism in heterotrophic cultivation was evaluated using dairy effluent as culture medium. The work was accomplished in three steps. Firstly, the influence of temperature (20 and 30°C) as well as the available maximum and minimum values of nutrients, especially reactive dissolved phosphorus (RDP), in the nutrients removal was assayed. The results demonstrated that the initial concentration of dissolved phosphorus and temperature exerted influence on cellular growth as well as in the nutrient removal efficiency. Regarding to the process optimization, cultivations conducted at 20°C and higher concentrations of RDP (5.5 mg.L⁻¹) in dairy effluent were the more efficient on pollutant conversion into biomass and nutrients removal. In the second step, the phosphorus distribution dynamics in the liquid and solid phases of the heterotrophic reactor of the dairy effluent treated by *Aphanothece microscopica* Nägeli was evaluated at 20°C and maximum dissolved phosphorus concentration found in the effluent. The results demonstrated that the phosphorous forms in the reactor liquid phase were characterized by the predominance of the dissolved fraction compared to the particulate one. Moreover, the predominant form was related to the organic phosphorus. Regarding to the solid phase, *Aphanothece microscopica* Nägeli cultivated heterotrophically presents around 3.8 folds more phosphorus than the necessary for cell growth. Additionally, the biological phosphorus removal by *Aphanothece microscopica* Nägeli can result in substantial financial contribution for effluent treatment plants. The third step consisted in evaluate the estimation of cell compounds production from the dairy effluent by *Aphanothece microscopica* Nägeli. Furthermore, the effect of temperature reduction on lipid contents of the cultivation at the exact moment when the maximum contents of such component were achieved, at the optimal conditions were also investigated. In the logarithmic growth phase, 41.8 % of protein, 28.5 % of carbohydrates, 10.4% of lipids and 10.8 % of minerals were obtained. The highest lipid content at 20°C was registered for the biomass analyzed in the logarithmic phase. The temperature reduction to 5°C for 30 h enabled the achievement of lipid contents 2.4 folds higher than those registered for the logarithmic phase at 20°C. Moreover, significant differences ($p \leq 0.05$) were not observed for lipid concentration in the biomass produced at 10°C for 40 h, when 2.1 to 2.3 increases were obtained. The more abundant fatty acids of the biomass generated at 20°C were palmitic, oleic, γ -linolenic, palmitoleic and stearic. The temperature reduction resulted in an increment in the concentration of saturated fatty acids and concomitant decrease in the unsaturated fatty acid contents. In parallel, a discontinuous heterotrophic reactor was defined, and we demonstrated that the extrapolation of the discontinuous to continuous operation requires a heterotrophic reactor with a nominal working volume of 240.51 m³. Therefore, 950 m³ of effluent could be treated per day, generating 11.8 kg.d⁻¹ of biomass, which could be applied to the production of several cell components by *Aphanothece microscopica* Nägeli. Thereby, simultaneous removal of organic matter, total nitrogen and total phosphorus could be achieved, generating input that could support the implementation of a microalgal biorefinery.

Keywords: *Aphanothece*; Biorefinery; Fatty acids; Heterotrophic cultivation; Lipids; Nutrients; Phosphorus; Reactor.

1 INTRODUÇÃO

O cultivo de cianobactérias vem sendo utilizado de formas extremamente versáteis, como para produção de alimentos, fertilizantes, química fina e já há algumas décadas como importante avanço no que se refere ao tratamento de águas residuária (De la NOUE et al., 1992; GONZALES et al., 1997; BASTOS et al; 2004; JACOB-LOPES et al., 2006; HARUM et al., 2010; ZEPKA et al., 2010; PEREZ-GARCIA, 2011).

O tratamento de efluentes a partir de microalgas caracteriza-se por trazer consigo, inúmeras vantagens, fazendo-se salientar o fato de não gerar poluição adicional, quando a biomassa é separada (De la NOUE, 1992), bem como a possibilidade de utilização desta biomassa gerada a partir dos nutrientes oriundos do efluente, para diferentes fins biotecnológicos, associada a características de algumas linhagens desenvolverem-se heterotroficamente, na ausência de luz (ARDELEAN; ZARNEA, 1998; TAM;WONG, 2000; BASTOS et al., 2004; JACOB-LOPES et al., 2007; ZEPKA et al., 2008; SILVA-MANETTI et al., 2011; VIEIRA et al., 2012a QUEIROZ et al., 2013; BASTOS et al., 2014; MARONEZE et al., 2014).

A abordagem do crescimento heterotrófico traz como principal vantagem à relação custo benefício, a relativa simplicidade de operação e manutenção diária, assim como a possibilidade de obter alta densidade celular possibilitando sua aplicação em escala industrial (CHEN, 1996; LEE; KIM, 2001; GRAVER HOLT; ERIKSEN, 2007; PEREZ-GARCIA, 2011). Dentre os nutrientes contemplados pelos efluentes agroindustriais, o fósforo apesar de possuir elevado potencial poluidor está entre os elementos químicos listados como essenciais para o crescimento celular, cujos requisitos variam consideravelmente, entre as espécies de microalgas (SHELEF; SHOEDER, 1980). Assim, o fósforo é um elemento de elevada demanda biológica o que o torna limitante na natureza (HANNON et al., 2010; ELSER, 2012). Por outro lado, as microalgas que exigem baixa demanda de fósforo, são as preferidas para os processos de biorrefinarias, uma vez que baixa exigência deste elemento para o crescimento microalgal pode refletir em redução de custo para o cultivo em massa (ROONARAIN; CINZA; SYM, 2013).

As elevadas concentrações de fósforo em águas residuárias é uma das principais causas de eutrofização dos corpos hídricos receptores, havendo em virtude disto, uma crescente preocupação com o gerenciamento de cargas de fósforo dos efluentes

industriais. Além dos aspectos de contenção ambiental, é estrategicamente desejável, que os processos de tratamento permitam a recuperação e o reuso deste elemento de considerável demanda biológica. Neste sentido, sistemas de tratamento de efluentes, focado no desenvolvimento sustentável, têm sido desenvolvidos extensivamente, visando a reciclagem e valorização dos compostos poluentes onde estão inseridos os sistemas de tratamento com microalgas (XIN; HONG-VING; KE; YIN-XUE; 2010; QUEIROZ et al., 2013; BEEVI et al., 2014; MARONEZE et al., 2014).

A indústria de laticínio gera de 10 a 11 L de efluente por litro de leite processado (BRIÃO, 2007; VOURCH et al., 2008; MARKOU; GEORGAKAKIS, 2011). Os efluentes das indústrias de laticínios diferem largamente tanto em quantidade como em qualidade dependendo dos tipos de produtos processados, os quais irão apresentar características muito distintas destes produtos, são manufaturados separadamente fazendo com que a carga poluente apresente mudanças ao longo do período de produção (JANCZUKOWICZ et al., 2000; SARKAR et al., 2006; BRIÃO; TAVARES, 2007; MARKOU; GEORGAKAKIS, 2011; CHEN; LIU, 2012). Os processos de tratamento de águas residuárias, que utilizam microalgas e cianobactérias em condições heterotróficas têm sido considerados alternativas potenciais para eliminação de matéria orgânica nitrogênio e fósforo de efluentes industriais (QUEIROZ et al., 2007; ZEPKA et al., 2008; HORNES et al., 2010; ZEPKA et al., 2010; PEREZ-GARCIA et al., 2010; VIEIRA et al., 2012; QUEIROZ et al., 2013).

Nos últimos anos tem crescido notadamente o interesse pelo tratamento de água residuária por microalgas e cianobactérias, com foco não só na solução de crises energéticas, como na aplicação de formas renováveis de biocombustíveis, como também no desenvolvimento de novas tecnologias que proporcione a utilização de biomoléculas (XIN et al., 2010; PIGNOET et al., 2013; BASTOS et al., 2014). No entanto, o aproveitamento de compostos celulares só será economicamente viável, se a totalidade das frações microalgais forem valorizadas em uma estratégia de biorrefinaria (PIGNOLET et al., 2013).

O conceito de biorrefinaria é análogo a refinaria de petróleo, em que vários produtos e combustíveis são produzidos a partir do petróleo fóssil (SLEGERS et al., 2013; VANTHOOR-KOOPMAANS et al; 2013). Como processo totalmente integrado e multifuncional, biorrefinaria aplica uma gama diversificada de matérias primas de forma sustentável e simultaneamente gerar um espectro de diferentes produtos

intermediários e finais, incluindo alimentos, rações, produtos farmacológicos e combustíveis (UGWU; OGBONNA; TANAKA; 2013; ZHU, 2013).

A cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli, tem sido amplamente estudada, quanto ao desempenho da remoção de nutrientes de efluentes agroindustriais, em especial o fósforo, bem como quanto a produção de compostos celulares (QUEIROZ et al., 2001; QUEIROZ et al., 2004; BASTOS et al., 2004; QUEIROZ et al., 2006; QUEIROZ et al., 2007; ZEPKA et al., 2008; HORNES et al., 2010; QUEIROZ et al., 2011; VIEIRA et al., 2012a; VIEIRA et al., 2012b; QUEIROZ et al., 2013; MARONEZE et al., 2014; BASTOS et al., 2014; JACOB-LOPES et al., 2014).

Em face disto, o objetivo do trabalho foi avaliar a eficiência de remoção de nutrientes do efluente da indústria de laticínio por *Aphanothece microscopica* i Nägeli em especial o fósforo, bem como a aplicação da biomassa gerada para análise da perspectiva de implementação de uma biorrefinaria microalgal.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a dinâmica do fósforo em cultivo heterotrófico e produção de compostos celulares por *Aphanothece microscopica* Nägeli utilizando o efluente de laticínio, visando avaliar a perspectiva de implementação de uma biorrefinaria microalgal.

2.2 Objetivos específicos

1. Caracterizar o efluente da indústria de laticínio;
2. Caracterizar o fósforo total presente no efluente de laticínio quanto as diferentes frações;
3. Avaliar o efeito das mínimas e máximas concentrações de nutrientes, em especial o fósforo dissolvido reativo, na remoção de nutrientes, bem como o efeito da temperatura de cultivo;
4. Avaliar a dinâmica de distribuição de fósforo na fase líquida e sólida do reator heterotrófico, nas condições de concentração de fósforo dissolvido reativo e temperatura otimizadas;
5. Avaliar a produção de compostos celulares por *Aphanothece microscopica* Nägeli, nas condições otimizadas;

6. Avaliar o perfil lipídico da *Aphanothece microscopica* Nägeli desenvolvida em meio autotrófico e heterotrófico;
7. Avaliar o efeito da redução da temperatura de cultivo na produção de lipídios;
8. Avaliar o efeito da redução de temperatura, no perfil de ácidos graxos da biomassa gerada;
9. Definir um reator heterotrófico descontínuo.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Cianobactéria

Cianobactérias são organismos cosmopolitas, procariotos, Gran-negativos, de metabolismo preferencial fotoautotrófico os quais realizam fotossíntese com produção de oxigênio como os vegetais superiores, podendo assumir formas uni, multicelulares ou filamentosas (LEE, 2008; HERRERO, 2010). Genericamente estes micro-organismos são também denominados microalgas, que podem ser definidas como seres unicelulares capazes de converter a energia solar em energia química, via fotossíntese (BRENNAN; OWEND, 2010; HARUN et al., 2010; CHEN et al., 2011; SINGH et al., 2011; ALPRYADARSHANI; RATH, 2012). Vivem em ambientes marinhos ou de águas doce, incluindo dois tipos de estrutura celular: procariótica e eucariótica. As cianobactérias e a divisão *Procheorophyta* representam os procariotos (HOEK, 1995).

Estes micro-organismos são os mais importante grupo autotrófico, quer sob o ponto de vista filogenético ou autotrófico (KNOOL, 2008; KOMAREK, 2014).

O termo cianobactéria é atribuído a estrutura procariótica bacteriana Gran-negativa, como também a sua composição de pigmentos fotossintéticos. A composição pigmentar destes micro-organismos é variável, no entanto se caracterizando por apresentar clorofila *a* e ficobiliproteínas em especial a ficocianina (λ_{\max} 610-620 nm) por ser um pigmento azul, além de conter ficoeritrina (λ_{\max} 540-570 nm), com coloração rosa/vermelho e aloficocianina (λ_{\max} 650-655nm), coloração verde/azulada, os quais representam as maiores concentrações em pigmentos destes micro-organismos (RICHA et al., 2011; KUMAREK, 2014). Algumas espécies podem conter também clorofila *b* (CASTENHOLS, 2007).

A composição pigmentar das cianobactérias é constituída, por clorofila *a* e pigmentos acessórios, que são os carotenóides e as ficobiliproteínas. A maior parte da energia utilizada na fotossíntese é absorvida pelos pigmentos acessórios, uma vez que a clorofila *a* absorve a energia luminosa em uma limitada região do espectro solar. A energia de excitação é, então, transferida para os centros de reação, localizados na membrana fotossintética (SANTIAGO-SANTOS et al., 2004; YEN et al., 2013).

A clorofila *a*, é em grande parte, obtida através de fontes vegetais. Entretanto existe um crescente interesse na produção biotecnológica de fontes de corantes não vegetais. Nesse sentido, o uso de cianobactérias para a produção de corantes, possui

diversas vantagens, quando comparados às fontes vegetais, incluindo a possibilidade de cultivo contínuo, a rápida multiplicação dos micro-organismos, além do alto conteúdo de pigmentos presentes na biomassa (RANGEL-YAGUI et al., 2004). A maioria das algas cultivadas sob condições ótimas, apresentam aproximadamente 4 % do peso total em base seca deste pigmento (HARUN et al., 2010).

As ficobiliproteínas apresentam potencial para serem empregadas como corantes naturais, mas um aumento do número de investigações têm demonstrado que também podem ser promotoras da saúde, e ampla gama de aplicações farmacêuticas. Além disso, as ficobiliproteínas são amplamente utilizadas na indústria e laboratórios clínicos ou de investigação imunológica. Na verdade, as suas propriedades (elevado coeficientes molares de absorvância, alto rendimento quântico de fluorescência, grande deslocamento de Stokes e alta fotoestabilidade) torna-os muito poderosos e reagentes fluorescentes altamente sensíveis. Eles podem servir como marcadores para os anticorpos, receptores e outras moléculas biológicas em um classificador de células ativadas por fluorescência e que são usados em experiências de imunomarcção e microscopia de fluorescência ou de diagnóstico (SPOLAORE et al., 2006).

Lee (2008), classificou as cianobactérias em três diferentes ordens: *Oscillatoriales*, *Nostocales* e *Chroococcales*. A ordem *Oscillatoriales* apresentam cianobactérias organizadas em filamentos sem heterocistos, que são diferenciações celulares que conferem a propriedade de fixação de nitrogênio pelo micro-organismo (RASTOGI; SINHA, 2009). Nesta ordem, encontra-se um dos gêneros mais estudados, a *Spirulina*. As *Nostocales* caracterizadas por apresentarem heterocistos, podendo ser citado como exemplo o gênero *Anabaena*. As cianobactérias pertencentes a ordem *Chroococcales* são micro-organismos unicelulares de vida livre, podendo ocorrer em colônias envoltas por membranas mucilaginosas. A *Aphanothece microscopica* Nägeli, é um exemplar desta ordem que vem sendo estudado visando associar o tratamento de efluentes agroindustriais e produção de compostos celulares sob escopo de uma biorrefinaria. Este micro-organismo é uma *Chroococcales* da família *Synechococcaeaceae* e subfamília *Aphanotecoidease* (ANAGNOSTIDIS; KOMARE, 1998; BARSANTI; GUALTIERI, 2006). Esta espécie, independente do metabolismo fotoautotrófico é capaz de crescer em condições heterotróficas, em completa ausência de luz, utilizando substratos orgânicos como fonte de carbono (QUEIROZ et al., 2004, QUEIROZ et al., 2007; ZEPKA et al., 2008; BASTOS et al., 2010; SILVA-MANETTI et al., 2011; VIEIRA et al., 2012; QUEIROZ et al., 2013).

A aplicação deste modelo metabólico, passível de proporcionar o crescimento microalgal, tendo como fonte de carbono a matéria orgânica, e ausência de luz, vem sendo estudado, no sentido de associar o tratamento de efluentes industriais à produção de compostos de interesse comerciais (KAMM; KAM, 2004; WILLIAMS; LAURENS, 2010; ORCHAD et al., 2011; RODSRUD et al., 2012; QUEIROZ et al., 2013). Assim, vários trabalhos direcionados ao estudo do crescimento da espécie *Aphanothece microscopica* Nägeli em efluentes agroindústrias vêm sendo desenvolvidos, visando, principalmente, a aplicação da biomassa gerada na dieta alimentar, buscando com isto, caracterizar este micro-organismo quanto ao seu valor nutricional e viabilidade de utilização como alimento, bem como em paralelo o reúso de água no âmbito de uma biorrefinaria (QUEIROZ et al., 1998; QUEIROZ; KOETZ; TREPTOW, 2001; QUEIROZ et al., 2001; QUEIROZ et al., 2004; JACOB-LOPES et al., 2006; QUEIROZ et al., 2007; ZEPKA et al., 2007; ZEPKA et al., 2008; HORNES et al., 2010; ZEPKA et al., 2010; QUEIROZ et al., 2011; QUEIROZ et al., 2013).

Um dos maiores problemas que tem sido enfrentado quando se pensa na implementação de biorrefinarias microalgais é a separação da biomassa gerada do efluente tratado ou meio de cultivo utilizado (GRIMA et al., 2003; MARKOU; GEORGAKAKIS, 2011). A maioria das espécies possui a densidade específica ligeiramente maior do que a água, o que torna a sua separação difícil. Em adição muitas tem uma carga elétrica fortemente negativa na superfície, o que as mantém dispersas. O uso de coagulantes/floculantes permitem a separação por sedimentação ou floculação, sendo um dos processos mais utilizados pela indústria (HARUN et al., 2010). Nos processos de separação destacam-se ainda, os taninos, que apresentam a propriedade de atuarem em sistemas de partículas coloidais, neutralizando cargas e formando pontes, entre estas partículas, proporcionando a formação de flocos e consequente sedimentação (GRAHAN et al., 2008). Estes compostos, apresentam alta afinidade por proteínas e outras macromoléculas como carboidratos (BELTRAN-HEREDIA et al., 2010; SANCHES-MARTINS, 2012). Neste sentido Silva-Manetti et al. (2001), avaliaram o potencial de reúso da água residuária da indústria processadora de pescado, a partir do cultivo da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli, bem como o processo de separação da biomassa. Estes autores verificaram que a associação do tratamento biológico e químico é uma importante estratégia, quando se pensa em reúso de águas, considerando o uso de coagulantes, como cloreto de ferro e a propriedade de eficiência de remoção de matéria orgânica e nutrientes por este micro-organismo e em paralelo a

separação da biomassa. Nesta linha de trabalho Silva-Manetti et al., (2013), estudaram ainda a separação da biomassa de *Aphanothece microscopica* Nägeli, quando esta desenvolvida no efluente da indústria de laticínio a partir da utilização de cloreto de ferro seguido de Tanfloc, indicando que concentrações de 300 mg.L⁻¹ de cloreto de ferro a pH 6 e 300 mg.L⁻¹ de Tanfloc a pH 7, resultando ainda, eficiências de remoção de DQO, turbidez e sólidos suspensos na ordem de de 91 %, 96 % e 96 %, respectivamente. No que se refere a remoção de nutrientes pelo micro-organismo em estudo este tema tem sido bastante aprofundado em uma série de artigos, que envolvem a remoção de matéria orgânica, nitrogênio e fósforo de efluentes industriais (QUEIROZ et al., 2002, BASTOS et al., 2004; JACOB-LOPES et al., 2006, ZEPKA et al., 2007, HORNE et al., 2010; BASTOS et al., 2010; VIEIRA et al., 2012a; VIEIRA et al., 2012b; QUEIROZ et al., 2013).

Em se tratando do efluente de laticínio a remoção de fósforo por *Aphanothece microscopica* Nägeli, bem como a cinética de crescimento deste micro-organismo quando cultivado nesta água residuária, vem sendo estudada sob o ponto de vista do efeito da temperatura de cultivo em biorreatores heterotróficos (VIEIRA et al., 2012a; VIEIRA et al., 2012b).

Como suporte para implementação de uma biorrefinaria microalgal a partir do efluente de laticínio e do micro-organismo em análise é importante salientar o trabalho de Silva-Manetti (2011), que demonstrou potencial de produção de carboidratos extracelulares, sob manipulação das condições de cultivo, bem como o de Streit (2014), que avaliou a dinâmica de nitrogênio em cultivo heterotrófico a partir do efluente de laticínio, sob escopo de uma biorrefinaria, enfatizando a produção de pigmentos e de aminoácidos essenciais.

3.2 Efluente de Laticínios

O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de leite. Sua produção em 2013 foi de aproximadamente 35 milhões de litros de leite, atrás apenas da Índia e dos Estados Unidos. A produção brasileira, que em 2003 era de 22,2 bilhões de litros, cresceu 57 % na última década. Os aumentos da produtividade e do rebanho ordenhado auxiliaram esse crescimento. De acordo com o IBGE, em 1980 a produção média no Brasil era de 676 litros/vaca/ano passando para 1.381 litros/vaca/ano em 2011. Mesmo com o significativo aumento, a produtividade brasileira ainda é muito baixa em comparação a

grandes produtores mundiais, como os Estados Unidos, que chegam a produzir em média 9.590 litros/vaca/ano (FAO). O Brasil também se destaca na produção mundial de leite em pó e queijos. Minas Gerais é o maior produtor de leite do Brasil, com 27,6 % da produção nacional (IBGE, 2012), destacando-se os municípios de Patos de Minas, Ibiá, Unai, Patrocínio e Coromandel.

No passado as indústrias do ramo de laticínios tinham a atenção somente para a produção e o lucro. Porém, devido à sua importância no setor econômico brasileiro e o consequente surgimento de legislações ambientais específicas, surgiu a necessidade de buscarem novas tecnologias, principalmente visando ao aproveitamento de resíduos antes considerados desprezíveis, e que, por isso, eram descartados no meio ambiente (CASTRO, 2007; EMBRAPA, 2010).

O setor de laticínios, constitui, importante parcela da indústria alimentícia no mundo inteiro e sua contribuição em termos de águas poluidoras, é significativa e vem crescendo por conta da demanda de leite e dos produtos derivados (KUSHWAHA et al., 2010).

O aumento da população e da industrialização nos países em desenvolvimento como a Índia, geram grande quantidade de efluentes que devem ser tratados antes de serem descarregadas em corpos de água naturais. Indústria de laticínios é onipresente em todo o mundo, mas seus processos de fabricação variam enormemente. Assim, este setor gera grande volume de águas residuais e sua poluição é essencialmente orgânica (BRIÃO; TAVARES, 2007). Indústria de laticínios gera cerca de 0,2 a 10 L de efluente por litro de leite processado (VOURCH et al., 2008).

Na maioria dos casos, esses efluentes não são tratados com o objetivo de remover nutrientes, visto que os tratamentos convencionais eliminam apenas matéria carbonada, contribuindo assim com elevadas concentrações de fósforo e compostos nitrogenados (CHIMENOS et al., 2006; IRDEMEZ et al., 2006; GOLDER et al., 2006) acelerando o processo de eutrofização em seus corpos receptores, em função de suas elevadas taxas de DBO e DQO (BEEVI; SUKUMARAN, 2014).

As indústrias de laticínios são intensivas no consumo de água, necessitando de direcionamento de produção mais limpa, que melhore o balanço hídrico e recupere os nutrientes tratados, uma vez que podem gerar cerca de 0,2 a 10 L de efluente por litro de leite processado (VOURCH et al., 2008; MARKOU; GEORGAKAKIS, 2011). A medida que a água é utilizada nas diferentes linhas de processamento, vai incorporando várias substâncias, fazendo com que as características desta água sejam alteradas,

tornando-se um efluente, variando a qualidade do efluente de laticínio, em função dos produtos industrializados, capacidade de produção, *lay-out* industrial, técnicas de higienização das instalações e qualidade do leite industrializado (MARKOU; GEORGAKAKIS, 2011). Isso resulta em uma água residuária constituída por expressivas concentrações em matéria orgânica biodegradável à base de lactose, óleos, gorduras, proteínas, nitrogênio, fósforo, açúcar, nutrientes dissolvidos e sólidos suspensos (SARKAR et al., 2006; VOUCH et al., 2008; BANU et al., 2008; FARIZOGLU; UZUNER, 2011; CHEN; LIU, 2012).

Munavalli e Saler (2009) reportam que cerca de 2 % do total de leite processado é desperdiçado no sistema de esgotos. Este leite se mistura com as águas produzidas na partida, na lavagem de várias unidades de processamento, bem como com a água gerada durante a limpeza de pisos e operação do dia-a-dia das outras plantas.

As técnicas de tratamento para estes efluentes, geralmente estão associadas aos processos tradicionais que combinam tratamento físico ou físico-químico com tratamento biológico. No entanto, a moderada eficiência destes tratamentos para a remoção de compostos eutrofizantes, bem como as desvantagens específicas de cada tratamento levam à busca de sistemas que atendam às necessidades crescentes da qualidade do efluente tratado (SARKAR et al., 2006; VOURCH et al., 2008). Desta maneira, as opções para o tratamento ou recuperação do efluente de laticínio, envolvem inúmeras e diferentes alternativas, muitas delas onerosas e complexas, mas de qualquer forma, é um fator determinante não só para o ambiente, como também para fins de reciclagem de água para uso em processos industriais (HAMDANI et al., 2005) visando redução de custos na planta de operação.

Os métodos convencionais de tratamento de efluentes lácteos incluem a reciclagem direta e reaproveitamento de componentes de resíduos, por exemplo, a utilização de soro de queijo para alimentação de animais, remoção de seus componentes utilizando processos de tratamento biológico como descrito Perle et al., (1995). Entre outras técnicas, podem ser utilizados processos de precipitação química, osmose reversa e ultrafiltração, sendo estes pouco incorporados no processo de tratamento por possuírem custos elevados de implantação e manutenção (HARIDAS et al., 2005).

A associação de microalgas e cianobactérias ao tratamento convencional de efluentes, com intuito de reuso de água e produção de compostos celulares, é destacada em uma gama de trabalho, com importantes resultados (SARKAR et al., 2006; BELTRAN-HEREDIA, 2010; VIEIRA et al., 2012a; VIEIRA et al., 2012b; ZHU et al.,

2013; BEEVI; SUKUMARAN, 2014). Assim, os processos que utilizam estes micro-organismos são largamente aplicados para remoção de substâncias orgânicas e inorgânicas (SANCHO; CASTILLO; YOUSFI, 1997) pois atuam como agentes purificadores de alta eficiência, uma vez que utilizam os nutrientes presentes na composição do efluente para o seu desenvolvimento (SANCHO; CASTILLO; YOUSFI, 1999), sendo capazes de transformar resíduos em matérias-primas com alto valor agregado. Em face disto, vem sendo proposto o tratamento de águas residuárias por cianobactérias, motivado pelo metabolismo heterotrófico destes micro-organismos com o consumo de moléculas orgânicas e nutrientes inorgânicos no escuro (ARDELEAN; ZARNEA, 1998; TAM; WONG, 2000; JACOB-LOPES et al., 2006; ZEPKA et al., 2007; HORNE et al., 2010; MARKOU; GEORGAKAKIS, 2011; QUEIROZ et al., 2013). Neste contexto, os efluentes agroindustriais e as cianobactérias passam a representar altíssimo potencial biotecnológico, na obtenção de inúmeros produtos, tais como fármacos, biopigmentos, enzimas, antioxidantes, exopolissacarídeos, além de diversos nutrientes, como minerais, lipídios, carboidratos e proteínas (CEPOI et al.; 2009; ANUPAMA-RAVINDRA, 2000; ZEPKA et al., 2007; HORNE et al., 2010; MARKOU; GEORGAKAKIS, 2011; QUEIROZ et al., 2013; STREIT, 2014).

3.3 Proteínas

As proteínas são macromoléculas compostas por diferentes aminoácidos, sendo sua qualidade nutricional determinada basicamente pelo conteúdo, proporção e disponibilidade dos mesmos. A maior parte dos dados publicados na literatura sobre as concentrações de proteínas de algas baseiam-se em estimativas da chamada proteína bruta, comumente usada na avaliação alimentação humana e animal. Este valor é obtido por hidrólise da biomassa e estimativa do nitrogênio total. As microalgas e cianobactérias constituem uma fonte alternativa de proteína apresentando como maior constituinte estrutural as proteínas, desempenhando importante papel na biorrefinaria algal (BECKER, 2007; WILLIAMS; LAURENS, 2010).

A análise química de proteínas tendo como fonte cianobactérias, tem demonstrado conter todos aminoácidos essenciais em condições adequadas para consumo humano ou para animais, quando comparados com alguns itens alimentares básicos e tendo como padrão de referência a recomendação da OMS/FAO, com exceção dos aminoácidos que contêm enxofre (PINOTTI; SEGATO, 1991; OMS/FAO, 1995,

ALOMAR; FUCHSLOCHER; STOCKBRAND, 1999; ANUPAMA; RAVINDRA; 2000; BECKER, 2004; BECKER, 2007).

A produção de proteína unicelular utilizando resíduos como substrato fornece uma fonte economicamente viável de proteínas para uso em ração animal ou da transformação de produtos para o consumo humano, como muitas vezes atende necessidades dietéticas para a proteína. Muitos micro-organismos têm sido utilizados para converter vários substratos e produtos residuais industriais em biomassa (KUHAD et al., 1997; VOLTOLINA et al., 2005 JACOB-LOPES et al., 2007; JACOB-LOPES et al., 2010; ZEPKA et al., 2010; BASTOS et al., 2014).

A utilização de proteínas unicelulares como ingrediente de alimentos está condicionada a funcionalidade de seus constituintes. Neste sentido, a caracterização da fração protéica, é um fator relevante no desenvolvimento de ingredientes protéicos a serem utilizados nas formulações de alimentos (ANUPAMA; RAVINDRA, 2000; CHNAKIS, 2001; GHI-GUERRERO et al., 2004). A cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli quanto as suas propriedades funcionais foi caracterizada por Jacob Lopes et al., 2006 por apresentar máximos de 48,6 e 3,16 mL.g⁻¹ para solubilidade protéica e capacidade emulsificante, respectivamente.

A utilização de cianobactérias como uma fonte de proteína de célula única tem certas vantagens sobre a utilização de outros micro-organismos devido ao seu rápido crescimento, com elevado teor de proteína, a proteína de qualidade (GRIMA et al., 2003).

De acordo com Ávila-Leon et al., (2012), a cianobactéria *Arthrospira platensis* é considerada uma fonte alternativa de proteína muito promissora, a ser utilizada como suplemento alimentar ou aditivo. Sua biomassa contém, em média, 50 % em peso seco, e tem sido destacada por apresentar elevada qualidade nutricional. Este autores reportam, para este micro-organismo, valores de utilização líquida de proteína, valor biológico e coeficiente de eficiência proteica na ordem de 83,9 %, 65,0 % e 2,10, respectivamente (DILLON; PHAN, 1993). No entanto, estes valores podem variar, entre outros fatores, com a espécie, o meio de cultivo e a temperatura de secagem da biomassa. Zepka et al., (2010) encontraram valores superiores aos registrados para a *Arthrospira platensis*, quando avaliaram a biomassa da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli, desenvolvida no efluente da parboilização do arroz, na ausência de luz e seca 60°C. São reportados valores de 95,0 %, 73,3 % e 2,40 para os parâmetros

nutricionais utilização líquida de proteína, valor biológico e coeficiente de eficiência proteica, respectivamente.

A fração protéica de cianobactérias tem sido caracterizada por eletroforese indicando intervalos de peso moleculares que caracterizam sua fração proteica. Ventakaraman et al., (1992) encontraram para a *Spirulina* intervalos de peso moleculares de 14,3 a 66,0 KDa. A *Aphanothece microscopica* Nägeli teve o perfil eletroforético das proteínas que compoem a sua biomassa, quando cultivada no efluente da parboilização do arroz, distribuidas em uma faixa de peso molecular entre 15,0 e 62,5 KDa. Frações protéicas eletroforeticas foram também encontradas para *Chondrus crispus*, *Palmaria palmata* e *Porphyra umbicalis* utilizadas na alimentação humana, também obtiveram perfis semelhantes ao da *Aphanothece microscopica* Nägeli (ROUXEL et al., 2001).

Os teores de proteína na cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli desidrata a diferentes temperaturas e cultivada no efluente da parboilização do arroz foram avaliados por Zepka et al., (2008), com registros de mínimos e máximos na ordem de 41,3 % e 49,3 %. Estes resultados foram muito próximos aos obtidos por Streit (2014), para este micro-organismo.

Jacob-Lopes (2006), determinaram o teor de proteína e caracterizaram os aminoácidos da *Aphanothece sp* desidratada cultivada no efluente da parboilização do arroz. O perfil de aminoácidos essenciais comparativamente com os padrões da FAO demonstrou deficiência apenas quanto aos sulfurosos e lisina. Os autores sugerem que a baixa concentração de lisina possa estar associada ao processo de desidratação ao qual foram submetidas as amostras, uma vez que dependendo da temperatura a lisina poderia complexar-se com açúcares livres ou com a parede celular. O padrão de aminoácidos essenciais descritos, com as devidas variações em função dos meios de cultivos são constatados para diferentes perfis aminoacidicos deste micro-organismo, quer desenvolvido no meio ambiente (QUEIROZ et al., 1998), cultivada no efluente da parboilização do arroz (ZEPKA et al., 2007), cultivada no efluente da indústria de pescado (QUEIROZ et al., 2013), cultivada em meio sintético (BG11) ou, no efluente de laticínio (STREIT, 2014). Embora a concentração de aminoácidos possa se tornar amplamente variável, independente da espécie, guardam, no entanto, características no que se refere a predominância de alguns aminoácidos, como ácido glutâmico e aspártico (ROMANO, 2000; DANESI et al., 2004; QUEIROZ et al., 2013). Estes aminoácidos compoem o perfil da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli, quer

desenvolvida no meio ambiente (QUEIROZ et al., 1998), desenvolvida no efluente da parboilização do arroz (ZEPKA et al., 2008), em meio sintético BG11 e efluente de laticínio (STREIT, 2014).

A composição química da biomassa microalgal é altamente influenciada pelo meio de cultivo (ZEPKA et al., 2008; LAI et al., 2011; DEVI et al., 2012). Tem sido reportado que a disponibilidade de nitrogênio favorece a síntese e o acúmulo de proteínas enquanto em baixas concentrações deste nutriente os micro-organismos tendem a acumular carboidratos (PEREIRA-GARCIA et al., 2011; LAI et al., 2011; DEVI et al., 2012).

3.4 Carboidratos

A produção de carboidratos serve a dois propósitos principais para as microalgas; eles agem como componentes estruturais nas paredes celulares, e como componentes de armazenamento no interior da célula. Os carboidratos, como compostos de armazenamento, fornecem a energia necessária para os processos metabólicos dos organismos e permitir, se necessário, sobrevivência temporária em ambientes escuros (GEIDER; LA ROCHE, 2002; CORVO; BEARDALL, 2004). Em geral, os compostos de armazenamento, tais como proteínas, lípidos e carboidratos, permitem que as microalgas ajustem o seu crescimento às mudanças ambientais (KROMKAMP, 1987). Os carboidratos são uma categoria ampla que engloba açúcares (monossacarídeos) e seus polímeros (di-, oligo-, e polissacáridos). Os carboidratos mais abundantes são glicose, ramnose, xilose e manose. A biomassa de microalgas carece de hemicelulose e lignina, e algumas espécies carecem também de celulose ou eles não têm paredes celulares (MUSSGNUMG et al., 2010). Esta estrutura é composta principalmente por longas cadeias polimerizadas de açúcares simples ou aminados, expressos por acetil glicosamina e ácido acetil murâmico (BOROWITZA et al., 1994).

Os carboidratos de microalgas são facilmente digeridos (BABADZHANOV et al., 2004; CARRIERI et al., 2010), fato este que leva a biomassa microalgal a ser uma boa escolha como tecnologia de conversão visando eliminar ou restringir a necessidade de pré-tratamento em comparação com o processo convencional (JOHN et al., 2011).

O conteúdo de carboidratos nas microalgas depende da espécie, do cultivo e das condições ambientais. Várias espécies de microalgas, tais como *Porphyridium cruentum* (40 - 57 %), *Spirogyra sp.* (33 - 64 %), têm um alto teor de carboidratos (HARUN et

al., 2010). Zepka et al., (2008), avaliaram o perfil bioquímico da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli, desenvolvida no efluente da parboilização do arroz registrando concentrações de 13,4 % a 17,7 %, demonstrando o potencial de produção de carboidratos deste micro-organismo. Os carboidratos de microalgas pode ser utilizado por várias tecnologias de conversão de biomassa para a produção de biocombustíveis (MARKOU; ANGELIDAKI; GEORGAKAKIS, 2012). No entanto, para a produção de biocombustíveis ser otimizada, o alto teor de carboidratos tem que ser combinada com a capacidade da espécie de microalgas em produzir biomassa. Portanto, as espécies de microalgas conhecido por possuem altas taxas de crescimento podem ter suas condições de cultivo manipuladas para a produção de altos teores de carboidratos.

Os fatores ambientais mais relatados, que afetam o teor de carboidratos, são: limitação de nutrientes/ estresse salino, a intensidade da luz e temperatura. Além disso, a escolha do metabolismo (autotrófico, heterotrófico, e mixotrófico) pode afetar a composição da biomassa. A capacidade de preservação das cianobactérias reflete a estabilidade intrínseca do seu polissacarídeo extracelular (EPS) e a habilidade deste de ligar-se a metais pesados assim como resistir à degradação (HELM et al., 2000).

Cianobactérias como a *Nostoc muscorum* e *Tolypothrix tenuis* são capazes de produzir enzimas extracelulares que decompõem resíduos orgânicos. Elas também são usadas como inoculantes em solos para aumentar o conteúdo de polissacarídeos e a atividade microbiana dos mesmos. Tanto a biomassa dessas cianobactérias quanto seus EPS, quando inoculados no solo, aumentaram a atividade de várias enzimas extracelulares presentes neste. Dessa forma, o que se tem é a utilização de EPS como inoculante para solo com o objetivo de aumentar a atividade de exoenzimas. Estas, por sua vez, têm como finalidade decompor resíduos orgânicos, o que provoca um aumento final da fertilidade (DE CAIRE et al., 2000).

Muitas cianobactérias, em condições adversas, são capazes de sintetizar um envoltório mucilaginoso, ou formarem cápsulas, que são estruturas compactas associadas à superfície celular, bem como liberarem no meio, polissacarídeos que constituem estas estruturas, durante o crescimento celular. Estes compostos são facilmente recuperados do meio e, em função de suas propriedades físico-químicas apresentam grandes perspectivas de aplicação industrial, quer na área têxtil, farmacêutica ou de alimentos, bem como agentes de despoluição (DONOT et al., 2012).

Silva-Manetti 2012, ressalta que a cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli apresenta grande tendência a produção de carboidratos extracelulares quando este micro-organismo é cultivado no efluente de laticínio. Este autor observou que com uma produção anual de 460 t.ano^{-1} de carboidratos totais, 74 % correspondem aos carboidratos extracelulares e 27 % da parede celular, podendo estes serem facilmente recuperados e utilizados pela indústria farmacêutica, cosmética e alimentícia como estabilizantes, emulsificantes e espessantes (DE PHILIPPIS; VINCENZINI, 1998). Além das propriedades nutricionais e biotecnológicas, certos polissacarídeos oriundos de cianobactérias apresentam propriedades biomédicas, pois estimulam sistemas de reparo do DNA (FALQUET, 1997) e possuem propriedades imuno-estimuladoras e imunoreguladoras (EVETS, 1994), podendo inibir vários tipos de tumores e vírus (DE PHILIPPIS; VINCENZINI, 1998). Apesar do referido potencial, poucas empresas fazem o uso dos EPS no momento atual, estando a maioria das pesquisas em fase de desenvolvimento. De qualquer forma, no que tange a produção de compostos celulares, através da manipulação de fatores de crescimento inúmeros trabalhos tem sido focado na otimização destes fatores visando favorecer o aumento de produção, como por exemplo através de estresse nutricional promovendo o aumento de componentes celulares de reserva como carboidratos e lipídios (CHEN et al., 2011; SIAUT et al., 2011).

3.5 Lipídios

Os micro-organismos como fungos, bactérias, microalgas e cianobactérias tem sido utilizado na alimentação humana durante séculos .Nas últimas décadas, novos processos de Engenharia Bioquímica estão sendo utilizados na produção de alimentos destinados ao consumo humano. Alguns produtos obtidos a partir destas técnicas, tem sido designados como proteínas unicelulares, que se referem as células desidratadas de determinados micro-organismos utilizados como alimento ou aditivos. Além disso,os carboidratos, vitaminas, sais minerais e lipídios estão inclusos no termo proteína celular (ANUPAMA; RAVINDRA, 2000).

A fração lipídica das microalgas podem conter quantidades significantes de constituintes de composição semelhantes a óleos vegetais. O potencial de aplicação da fração lipídica extraída destes micro-organismos, é muito amplo, podendo ser utilizados na extração de ácidos graxos essenciais para alimentação humana e para industria de

manufatura de surfactantes e cosméticos (BOROWITZA; BOROWITZA, 1988). De acordo com estes autores os compostos lipídicos que geralmente constituem as cianobactérias são ésteres de glicerol e ácidos graxos com cadeias entre 14 e 24 átomos de carbono, apresentando entre eles 25 a 60 % de ligações insaturadas.

As cianobactérias contêm quantidades significantes de lipídeos e algumas são ricas em ácidos graxos essenciais como os ácidos linoleico (18:2 ω 6) e γ -linolênico (18:3 ω 3) (LI; WATANABE, 2001). Nos seres humanos, o γ -linolênico é sintetizado a partir do ácido linoleico proveniente da dieta, mas fontes extras desse ácido graxo são necessárias para compensar a deficiência da síntese, induzida por doenças ou envelhecimento (DUBACQ; QUOC, 1993).

Queiroz et al., (2007), obtiveram para a cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli cultivada no efluente da parboilização e desidratada a diferentes temperaturas, teores de lipídios que variaram de 7,2 a 7,9 %. Os autores reportam para o perfil lipídico deste micro-organismo uma predominância em ácidos graxos polinsaturados, com destaque para o ácido graxo γ -linolênico. Zepka et al., (2010), avaliaram as características nutricionais deste micro-organismo. Foi observado, que os níveis de colesterol total em ratos alimentados com esta cianobactéria mostrou-se significativamente menor que o registrado para o plasma de ratos alimentados com dieta padrão, sugerindo o uso desta cianobactéria como fonte potencial de proteína unicelular. Os baixos níveis de colesterol, foram atribuídos a composição em ácidos graxos destes micro-organismos.

A cianobactéria *Spirulina platensis* é considerada uma fonte potencial do γ -linolênico, o qual representa cerca de 20 % do total de ácidos graxos presentes (COHEN et al., 1987; DESHNIUM et al., 2000). Algumas espécies de cianobactérias possuem grandes quantidades (25 a 60 % do total) de ácidos graxos poli-insaturados (HOLTON; BLECKER, 1970; KENYON et al., 1972; SINGH et al., 2002).

As cianobactérias sintetizam lipídeos sob condições ambientais adequadas, sendo uma excelente fonte de matéria-prima para a produção de biodiesel (DENG et al., 2009) podendo ser ainda utilizadas como alimento e fármacos. A quantidade de óleo produzido pela microalga varia conforme a composição bioquímica da microalga e espécie, e também está relacionada ao tipo de cultivo utilizado. Por exemplo, as microalgas *Tetraselmis suecicae*, *Botryococcus braunii*, possuem diferentes concentrações de lipídios, 15 e 75 %, respectivamente (KHAN et al., 2009). Diversos fatores podem influenciar a produção de lipídios e ácidos graxos por cianobactérias,

como a intensidade luminosa, a temperatura e os nutrientes adicionados. Dentre os nutrientes que podem influenciar a produção de lipídios e ácidos graxos, estão as fontes de nitrogênio e de enxofre, as quais são utilizadas pelas cianobactérias na síntese de aminoácidos e ácidos graxos. Piorreck et al., (1984) verificaram que cianobactérias cultivadas em baixas concentrações de nitrogênio tiveram seu conteúdo lipídico incrementado sem, no entanto, alterar o perfil lipídico e de ácidos graxos. Muradyan et al., (2004) constataram que a concentração em ácidos graxos triplicou com aumento da concentração de 2 a 10 % de CO₂ nos cultivos de *Dunaliella salina*.

As microalgas constituem uma fonte alternativa potencial na obtenção de ácidos graxos essenciais, sendo estes precursores de uma grande variedade de metabólitos bioativos, que estão envolvidos em diversas funções fisiológicas no organismo humano. O consumo de ω -3 obtido de microalgas é benéfico para o desenvolvimento neural, além de prevenir problemas coronários, cancro, hipertensão, diabetes, fibrose cística, artrites, asma, esquizofrenia e depressão. As microalgas marinhas são capazes de sintetizar o ácido graxo eicosapentaenoico (EPA, C20:5). Este ácido graxo é considerado importante no desenvolvimento do tecido cerebral e na função visual (COSTA; SOUZA-SOARES; FERREIRA, 2013).

3.5.1 Metabolismo de ácidos graxos

As microalgas vêm sendo cultivadas visando a obtenção de biocompostos, como os ácidos graxos poli-insaturados. A maior parte das algas, fungos, bactérias, insetos e alguns invertebrados possuem as dessaturases e elongases exigidas para a síntese de vários ácidos graxos poli-insaturados (CHIOU et al., 2001). Plantas e animais superiores têm deficiências das enzimas necessárias e, raramente, apresentam ácidos graxos poli-insaturados acima de 18 carbonos (GILL; VALIVETY, 1997).

A síntese dos ácidos graxos ocorre no citosol dos organismos, mas nos vegetais fotossintéticos e microalgas ela ocorre no estroma do cloroplasto. Todos os sistemas biológicos, incluindo os micro-organismos, insetos, plantas superiores e animais, são capazes de fazer a “síntese de ácidos graxos, partindo do acetato formando uma cadeia curta de ácidos graxos, com o ácido oléico (C18:1n9). A biossíntese tem início com a carboxilação de acetil CoA para formar acetato ou piruvato pela ação de enzimas glicolíticas. Então, a acetil CoA é convertida a malonil CoA, sendo esta reação catalisada pela enzima acetil-CoA carboxilase, a qual é utilizada a fim de direcionar a

reação de condensação para estender os grupos acil a ácido esteárico (C18:0) e uma dessaturase forma o ácido oléico (C18:1n9) (WEN; CHEN, 2003).

Os vegetais têm outros meios de obter o acetil CoA necessário para a síntese de ácidos graxos. Eles produzem acetil CoA a partir do piruvato, empregando uma isoenzima estromal da piruvato desidrogenase. A composição de ácidos graxos difere muito entre os micro-organismos. Nos tecidos animais, prevalecem os ácidos graxos, ácido linoléico e ácido araquidônico. Nos organismos aquáticos, ocorre a predominância dos ácidos graxos da família ω -3 (TARLEY et al., 2004). Na biossíntese dos ácidos graxos, um intermediário de três átomos de carbono, o malonil-CoA é sintetizado a partir do acetil-CoA sendo esta reação catalisada pela enzima acetil-CoA carboxilase. Os ácidos graxos são sintetizados por uma sequência repetitiva de reações. As longas cadeias carbônicas dos ácidos graxos são montadas em uma sequencia repetitiva de reações com quatro passos. Cada grupo malonil e acetil é ativado por um tio-éster que se une ao ácido graxo sintase (complexo multienzimático).

O primeiro passo é a condensação de um grupo acil ativado (um grupo acetil é o primeiro grupo acil) com dois átomos de carbono derivados do malonil-CoA, com a eliminação do CO₂ do grupo malonil; o resultado final é o aumento de dois átomos de carbono na cadeia do grupo acil. O produto β -ceto dessa condensação é então reduzido em três passos subsequentes muito idênticos às reações da β -oxidação, mas na sequência inversa. No segundo passo, o grupo β -ceto é reduzido a um álcool. No terceiro passo, a eliminação de H₂O cria uma dupla ligação e no quarto e último passo, a dupla ligação é reduzida para formar o grupo acil-graxo saturado correspondente. O grupo acil saturado produzido durante este conjunto de reações se transforma no substrato de uma nova condensação com o grupo malonil ativado. Cada uma das passagens através do ciclo aumenta a cadeia do grupo acil graxo de dois átomos de carbono. Quando o comprimento da cadeia atinge 16 carbonos, o produto formado (o palmitato, C16:0) abandona o ciclo. Os átomos de carbono constituindo os grupos metila e carboxila do grupo acetil tornam-se, respectivamente, C-16 e C-15 do palmitato; os átomos de carbono restantes são derivados da acetil-CoA via malonil-CoA. Os ácidos graxos saturados de cadeia longa são sintetizados a partir do palmitato. Este pode ser aumentado, tanto para formar o estearato (C18:0) quanto ácidos graxos saturados ainda menores, por adições posteriores de grupos acetil, por meio da ação dos sistemas de alongamento dos ácidos graxos presentes no retículo endoplasmático liso e na mitocôndria. O sistema de alongamento mais ativo do retículo endoplasmático

aumenta a cadeia de 16 carbonos do palmitoil-CoA de dois carbonos, formando estearoil-CoA. Embora diferentes sistemas enzimáticos estejam envolvidos, e a coenzima A, e não a ACP (proteína transportadora de grupos acil), seja o transportador de acil diretamente envolvido na reação, o mecanismo de alongamento é idêntico àquele empregado na síntese do ácido palmítico: a doação de dois carbonos pelo malonil-ACP, seguida, por redução, desidratação e redução ao produto saturado com 18 átomos de carbono, o estearoil-CoA. O palmitato (C16:0) e estearato (C18:0) servem como precursores dos dois ácidos graxos monoinsaturados, o palmitoleato (C16:1 Δ 9) e o oleato (C18:1 Δ 9) (NELSON; COX, 2002).

Os ácidos graxos das famílias ω -9, ω -6 e ω -3 são formados a partir dos precursores oleato (ácido oléico, C18:1 Δ 9), linolenato (ácido linoléico C18:2, Δ 9,12) e α -linolenato (ácido α -linolénico, C18:3 Δ 9,12,15), respectivamente, e de uma série de reações de insaturação e alongamento. O ácido oléico (C18:1n-9) é dessaturado por uma dessaturase Δ 12 para formar o ácido linoléico (C18:2n-6) e uma dessaturase Δ 15 para formar o ácido α -linolénico (C18:3n-3). Em especial, a biossíntese dos ácidos graxos da família ω -3 tal como o EPA ocorre através de uma série de reações, as quais podem ser divididas em 2 etapas distintas. A primeira é a síntese “ do ácido oléico (C18:1n-9) a partir de acetato. Esta etapa é seguida pela conversão do ácido oléico em ácido linoléico (C18:2n-6) e ácido α -linolénico (C18:3n-3) (WEN; CHEN, 2003). Este último é dessaturado por uma dessaturase Δ 6, formando o ácido estearidônico (C18:4n-3). A seguir ocorre um alongamento da cadeia com adição de 2 átomos de carbono formando o ácido eicosatetraenoico (C20:4n-3). Este, então, é dessaturado por uma dessaturase Δ 5, formando o ácido eicosapentaenóico (C20:5n-3). Após nova reação de alongamento forma-se o ácido gordo docosapentaenoico (C22:5n-3) que é dessaturado por uma dessaturase Δ 4, formando o ácido docosaexanoico (C22:6n-3).

As três fontes de ácidos graxos (ácidos oléico, linoléico e linolênico) competem pela dessaturase Δ 6. A afinidade da enzima pelo substrato e o total de substrato disponível determina qual o caminho metabólico é predominante. Geralmente, a primeira insaturação Δ 6 é o passo limitante e o ácido linolénico tem alta afinidade pela dessaturase Δ 6 seguido por ácido linoléico e oléico (WEN; CHEN, 2003).

O alongamento da cadeia carbônica dos ácidos graxos é principalmente dependente na reação de dois sistemas de enzimas incluindo acetil-CoA enzima carboxílica e ácido gordo sintase, na maioria dos organismos. No processo de síntese dos ácidos graxos, acetil-CoA é o iniciador. A formação de ácidos graxos de cadeia

curta é semelhante nas células de plantas superiores, animais, fungos, bactérias e microalgas. Na célula de cianobactérias, as rotas de reação do iniciador, tal como o ácido palmitoléico, ácido oléico, ácido linoléico, ácido linolênico na síntese de ácidos graxos são semelhantes às reações que ocorrem nas células de plantas e leveduras.

Normalmente os ácidos graxos de cadeia curta (C14-C18) são maioria nos ácidos graxos de *Chlorella sp.*, mas elevado teor de ácidos graxos de cadeia longa e de hidrocarbonetos existem em algumas espécies específicas de microalgas (HUANG et al., 2010). Perez-Garcia et al., (2011) ressaltam que todos os micro-organismos usam as mesmas vias metabólicas para respiração.

3.6 Fósforo

O fósforo é um dos nutrientes básicos dos seres vivos, muitas vezes limitante para o crescimento de organismos, como também, na maioria dos ecossistemas (BISWAS et al., 2008). Nas águas residuárias apresenta-se basicamente na forma de ortofosfato, polifosfato e fósforo orgânico. Os ortofosfatos estão diretamente disponíveis à assimilação biológica. Os polifosfatos são moléculas mais complexas, normalmente constituídas de dois ou mais átomos de fósforo, que podem originar ortofosfatos através de reações de hidrólise. Em adição, o fósforo orgânico é considerado a forma fosforada mais complexa presente em águas residuárias, devendo sofrer múltiplas transformações até estar disponível ao metabolismo biológico (BENITEZ-NELSON, 2000; RINKER; POWELL, 2006; WORSFOLD et al., 2008).

O problema mais comum de compostos de fósforo é a aceleração do processo de eutrofização. Este fenômeno é responsável pelo crescimento excessivo de algas, o qual ocorre em águas interiores e costeiras, causado pela concentração de fósforo em excesso nos efluentes provenientes de plantas industriais ou municipais lançadas no meio ambiente (NOWACK, 2003; MULKERRINS et al., 2004; ÍRDEMEZ et al., 2006; YUAN; OLESZKIEWICZ, 2010). A floração de espécies de microalgas tóxicas, assim como de esgotamento de oxigênio resulta na eutrofização e também pode ter consequências danosas, além de efeitos aos organismos aquáticos podendo reduzir a biomassa bêntica e a biodiversidade (TOUCHETTE; BURKHOLDER, 2000; LI et al., 2003; WANG et al., 2007; XUECHU et al., 2009; YANG et al., 2010).

Os sistemas convencionais de remoção de fósforo consistem em processos químicos e biológicos. Os processos químicos são baseados na operação de

precipitação, através do uso de coagulantes à base, principalmente, de ferro e alumínio. É um método eficiente em termos de eficiência de remoção, embora a demanda por produtos químicos e a geração de um resíduo sólido sejam considerados as principais limitações desta tecnologia. Os processos biológicos convencionais consideram que as bactérias que removem matéria orgânica e nitrogênio nos processos anteriores necessitam de fósforo para a síntese celular, basicamente fosfolipídios (YE et al., 2010; POWELL et al., 2009; YANG et al., 2010).

A bioconversão de aproximadamente 30 % é normalmente obtida nesses sistemas, o que limita a aplicação com objetivo específico da eliminação de fósforo devido ao não cumprimento do padrão de emissão exigido pela legislação. Alternativamente a aplicação de sistemas fotossintéticos com microalgas para a eliminação de fósforo de águas residuárias é um processo com potencial de remoção. No entanto, limitações de ordem biológica, física e econômica têm restringido a implementação efetiva destes processos (MORSE et al., 1998; ZEPKA et al., 2010; PEREZ-GARCIA et al., 2011; QUEIROZ et al., 2011).

O desenvolvimento de tecnologias para a remoção de fósforo começou na década de 1950, em resposta ao problema da eutrofização e a necessidade de reduzir os níveis de fósforo nos corpos receptores (MORSE et al., 1998). As tecnologias convencionais para remoção de fósforo são os processos físicos (decantação, filtração e osmose reversa), químicos de precipitação (com alumínio, ferro e sais de cálcio), e processos biológicos que dependem do crescimento da biomassa (bactérias, algas, plantas) ou intracelulares pela incorporação de polifosfatos (BELLIER et al., 2006; BISWAS et al., 2008; POWELL et al., 2009).

A maioria dos métodos físicos são comprovadamente onerosos, como no caso da osmose reversa e da filtração o que dificulta a sua implantação em escala industrial. A precipitação química é em essência um processo físico-químico, compreendendo a adição de um sal de metal divalente ou trivalente em águas residuárias, resultando em uma forma insolúvel de fosfato que após a precipitação é removida por sedimentação. Os metais mais apropriados são o ferro e o alumínio, adicionados como cloretos ou sulfatos. Polímeros aniônicos podem ser utilizados para auxiliar a separação do sólido. Sistemas que utilizam um sal de metal (Al (III), Fe (III)) para remoção de fósforo podem atingir uma remoção de 80 % – 95 % em águas residuárias (FYTIANOS et al., 1998; DE-BASHAN; BASHAN, 2004; ZHOU, et al., 2008). Yamamoto-Ikemoto et al., (1998) avaliaram o efeito do coagulante de ferro no controle do intumescimento

filamentoso e na remoção de fosfato através de um processo de lodo ativado. A maior parte do fosfato foi removido após a adição de FeCl_2 ao tanque de aeração.

A precipitação de fosfato de cálcio é um método comum de remoção de fósforo, principalmente pelo baixo custo e facilidade de manuseio. A remoção é realizada por precipitação direta de fosfato de cálcio (BELLIER et al., 2006; ZHANG et al., 2010). Outro processo utilizado a partir dos anos 70 é a cristalização, o qual baseia-se na cristalização de fosfato de cálcio dentro de um leito fluidizado, sendo as condições de processo ajustadas para promover a cristalização de fosfato de cálcio por adição de soda ou leite de cal (MORSE et al., 1998; XUECHU et al., 2009; YE et al., 2010). O hidróxido de alumínio $\text{Al}(\text{OH})_3$ é utilizado para adsorver com eficiência ortofosfatos e polifosfatos. O fosfato orgânico é removido apenas em pH inferiores a 3,6 (GALARNEAU; GEHR, 1997). Os sais de magnésio são os menos utilizados para a precipitação de fósforo principalmente pela formação de estruvita. Esta precipitação é realizada para auxiliar na digestão de lodos levando à sua estabilização. A aplicação de hidróxido de magnésio em um digestor reduz os sólidos suspensos, DQO e resulta em um aumento na produção de biogás, além de reduzir os níveis de fosfato e amônia (WU et al., 2001; SEMERJIAN; AYOUB, 2003).

Silva et al., (2009) avaliaram o efeito do sulfato de alumínio e cloreto férrico na coagulação do efluente da indústria de pescado. Foram utilizados teste de jarros para avaliar o efeito de parâmetros como pH, tipo de coagulação e dosagem de coagulante. Um planejamento fatorial de $3^2 \times 2$ foi utilizado quando as variáveis independentes foram: tipo de coagulante (sulfato de alumínio e cloreto férrico), concentração (50 mg.L^{-1} ; 300 mg.L^{-1} ; 550 mg.L^{-1}) e pH do efluente (6,0, 7,0, 8,0). As respostas foram a remoção de sólidos voláteis, sólidos suspensos, turbidez, demanda química de oxigênio (DQO). As variáveis estudadas foram estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$) para todas as respostas. A exceção foi de sólidos voláteis, considerando concentração de coagulante. Um efeito significativo e negativo para a variável tipo de coagulante foi observado quando se considerou remoção de DQO e de turbidez. A melhor condição foi de cloreto férrico na concentração de 550 mg.L^{-1} , pH 8,0, cujos resultados indicaram máxima eficiência de remoção de 86 %, 96 %, 89 %, e 60 % para DQO, turbidez, sólidos suspensos e sólidos voláteis, respectivamente. Além disso, a maior remoção de fósforo foi utilizando o cloreto férrico chegando a 99 %.

Os banhados construídos, também chamados de wetland são de baixo custo e necessitam de baixa tecnologia para controlar a poluição ambiental. Basicamente, são

sistemas artificialmente projetados para utilizar plantas aquáticas (macrófitas) em substratos como areia, cascalhos ou outro material inerte, onde ocorre a proliferação de biofilmes que agregam populações variadas de micro-organismos os quais, por meio de processos biológicos, químicos e físicos, tratam águas residuárias. As raízes das plantas eliminam a matéria orgânica de todos os tipos. Ao mesmo tempo, os micro-organismos residentes nas raízes submersas na água residuária degradam outros poluentes que são posteriormente absorvidos pelas plantas. Posteriormente, o efluente tratado é comumente descartado em corpos d'água naturais ou usado para irrigação de plantas não comestíveis, sem qualquer tratamento adicional. Periodicamente, em algumas zonas úmidas construídas, as plantas precisam de substituição. Geralmente, as zonas húmidas não são projetadas para remoção de nutrientes, como fósforo, mas fazem isso indiretamente, porque os íons são nutrientes para as plantas (BROOKS et al., 2000; BASHAN; BASHAN, 2004; WESTHOLM, 2006; HEALY et al., 2007; LI et al., 2009).

Lee et al., (2010) avaliaram três sistemas de wetlands com diferentes tratamentos considerando a variação temporal na remoção de fósforo reativo, matéria orgânica, sólidos suspensos totais e amônia. A partir dos resultados de ANOVA todos os resultados foram eficientes na remoção dos compostos orgânicos.

A remoção biológica de nutrientes em biorreatores é, por definição, realizada por micro-organismos. No entanto, as espécies usadas não são específicas e enriquecidas como os processos atuais de remoção de fósforo. Várias tentativas de utilizar intencionalmente micro-organismos específicos como agentes de limpeza foram relatadas, como tem sido feito em décadas anteriores. Comparados aos processos físico-químicos os processos biológicos são indicados quando o objetivo é a remoção simultânea de nitrogênio e fósforo em águas residuárias (DE LA NOÛE; DE PAUW, 1988; SRIWIRIYARAT; RANDALL, 2005; TANWAR et al., 2007; KIM et al., 2009; GE et al., 2010). Nesse sentido, uma série de trabalhos tem sido desenvolvidos a partir da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli, envolvendo a remoção simultânea de matéria orgânica, nitrogênio e fósforo, na ausência de luz, com ênfase no estudo da cinética de crescimento deste micro-organismo em efluentes industriais (QUEIROZ et al., 2002; QUEIROZ et al., 2004; BASTOS et al., 2004; QUEIROZ et al., 2011; VIEIRA et al., 2012a; VIEIRA et al., 2012b; QUEIROZ et al., 2013; BASTOS et al., 2014).

As novas tecnologias de remoção biológica de fósforo são aceitas como processos mais econômicos e ambientalmente sustentáveis utilizados em águas

residuárias (BROUGHTON et al., 2008; YANG et al., 2010; ZHU et al., 2011), porém há um conhecimento limitado sobre a sua capacidade quando implantadas nos variados tipos de resíduos gerados nas atividades industriais. Sua remoção por meios biológicos pode ser realizada por dois mecanismos independentes: direta absorção de fósforo suspenso pelo crescimento de células e plantas, e o aumento da capacidade de armazenamento de fósforo como polifosfato pela biomassa microbiana em lodo ativado no tratamento. Este processo é caracterizado pelo seletivo enriquecimento de bactérias acumuladoras de polifosfato inorgânico como composição de suas células. Esta tecnologia é induzida em micro-organismos, alternando as condições de incubação das águas residuais entre uma fase inicialmente rica em carbono, estritamente anaeróbia, seguido de uma fase de incubação aeróbia. Em essência, durante a fase anaeróbia, os micro-organismos residentes no lodo degradam as fontes de matéria orgânica das águas residuais, acumulam armazenamento de polifosfato (BASHAN; BASHAN, 2004; OEHMEN et al., 2007; POWELL et al., 2008; POWELL et al., 2009; OEHMEN et al., 2010; FERNÁNDEZ et al., 2011).

Laliberte et al., (1997) estudaram a capacidade de remoção de nutrientes inorgânicos de águas residuárias pela cianobactéria *Phormidium bohneri* com e sem a adição de fosfato orgânico. Em todos os casos, o nitrogênio (amônia e nitrato) e fosfato foram removidos após 50 h e 75 h de crescimento, respectivamente.

Nagadomi et al., (2000) avaliaram o tratamento aeróbio simultâneo de DQO, fosfato, nitrato e H₂S em um efluente de esgoto sintético realizado por meio de cerâmica porosa com bactérias fotossintéticas imobilizadas, *Rhodobacter sphaeroides* S, *Rb. sphaeroides* NR-3 e *Rhodopseudomonas palustris*. No tratamento do lote, ocorreu uma remoção simultânea de 89 % de DQO, 77 % de fosfato, 99 % de nitrato e 99,8 % de H₂S, observada após 48 h. Em tratamentos semi-contínuos, esta remoção demorou cerca de um mês.

Martínez et al., (2000) estudaram a remoção de fósforo e nitrogênio pela microalga *Scenedesmus obliquus* no efluente doméstico em cultivos com e sem sistema de agitação e diferentes condições de temperatura (20 a 35°C), e verificaram que os melhores resultados ocorreram nos cultivos com agitação a 25°C, apresentando remoções de 98 % em 94,3 h e 100 % em 188,3 h para os parâmetros fósforo e amônia, respectivamente.

Adicionalmente, existe a possibilidade de aplicar cianobactérias em condições fotoautotróficas, fotoheterotróficas e mixotróficas visando à eliminação de fósforo de

águas residuárias. O cultivo fotoautotrófico possui características similares ao mencionado anteriormente para as microalgas. Por outro lado, nos sistemas fotoheterotróficos, o composto orgânico é usado somente como fonte de carbono, sendo necessária luz para o fornecimento de energia à célula. Em mixotrofia, formas inorgânicas e orgânicas de carbono são assimiladas simultaneamente (POWELL et al., 2008; POWELL et al., 2009).

O crescimento de microalgas consome fósforo como um elemento essencial necessário para seus componentes celulares, tais como fosfolipídios, nucleotídios e ácidos nucléicos. Um segundo mecanismo biológico é a adsorção de fósforo. Este consumo se deve ao armazenamento de fósforo na biomassa sob a forma de polifosfato que pode estar presente como ácidos-solúveis ou insolúveis em ácido polifosfato. O ácido-polifosfato solúvel está ativamente envolvido no metabolismo, enquanto que o ácido-polifosfato insolúvel é armazenado para quando a concentração externa de fosfato tornar-se limitante (POWELL et al., 2008; POWELL et al., 2009). Desta maneira, explorar a remoção biológica de fósforo utilizando microalgas capazes de absorvê-lo e incorporá-lo é uma forma de contribuir para a implantação deste processo em escala industrial minimizando os danos causados ao meio ambiente por ações antrópicas.

O cultivo de cianobactérias em condições quimioheterotróficas, no qual o crescimento ocorre em presença de carbono orgânico exógeno, em completo escuro, tem por finalidade suprir a célula com carbono e energia. Nestas condições elevadas concentrações de nitrogênio e fósforo são requeridas para síntese de compostos do metabolismo respiratório (SMITH, 1984). A relação custo-benefício e a relativa simplicidade de operação e manutenção diárias são as principais atrações da abordagem do crescimento heterotrófico. Além disso, é possível obter, heterotroficamente, alta densidade de células de microalgas o que fornece um método viável para produção de biomassa em grande escala (QUEIROZ et al., 2007; ZEPKA et al., 2008; HORNES et al., 2010; ZEPKA et al., 2010; PEREZ-GARCIA, 2011).

Lau et al., (1994) mostram que os tamanhos de inóculo inicial de algas influenciam significativamente a eficiência de remoção de nitrogênio e fósforo provenientes do tratamento primário de esgoto doméstico. Os resultados sugerem que é possível empregar um sistema de cultivo de algas no tratamento de esgoto, visto que apresenta significativa flexibilidade.

González et al., (1997) avaliaram a microalga *Chlorella vulgaris* e *Scenedesmus Dimorphus* na remoção de fósforo e amônia em dois tipos de biorreator. Ambas as

espécies mostraram uma elevada remoção de amônia e moderada de fósforo, comparáveis aos obtidos em outros estudos com cianobactérias como *Phormidium* e *Spirulina* (LALIBERTE et al., 1997; DUMAS et al., 1998) .

Aslan e Kapdan (2006) investigaram o desempenho da remoção de nutrientes pela *Chlorella vulgaris* em diferentes concentrações de nitrogênio e fósforo e determinaram coeficientes biocinéticos. Os resultados experimentais indicaram que a qualidade do efluente diminui com o aumento da concentração de nutrientes e cultura de algas pode remover o nitrogênio de forma mais eficaz em relação ao fósforo.

Mulbry et al., (2008) avaliaram o cultivo de algas no efluente de suinocultura com o objetivo de determinar valores para a produtividade e recuperação de nutrientes, a partir de algas verdes filamentosas. Ao final obteve-se uma biomassa rica em nitrogênio e fósforo, que pode ser utilizada em substituição aos fertilizantes inorgânicos em áreas urbanas e áreas suburbanas.

3.7 Biorrefinaria

As necessidades de reduzir as emissões de gases do efeito estufa e de buscar a sustentabilidade na produção de energia e combustíveis fazem com que a utilização de biomassa para esses fins se torne uma opção interessante, considerando-se que esta representa material rico em carbono abundante no planeta. Utilizar a biomassa eficientemente passa a ser de grande importância, e é neste âmbito que o conceito de biorrefinaria se aplica (GHATAK, 2011). O conceito de biorrefinaria consiste em um modelo integrado de produção de biocombustíveis, compostos químicos e energia a partir de biomassa (DEMIRBAS, 2009). Uma biorrefinaria pode ser uma instalação industrial ou até um mesmo um processo, que tem como característica o processamento de biomassa com a geração de produtos materiais e/ou energéticos (IEA, 2009). Operando objetivando o desenvolvimento sustentável haveria geração nula de resíduos, ou seja, o que seria resíduo de uma linha de processamento passa a ser matéria-prima para outros processos, permitindo a total utilização dos componentes da biomassa (CHERUBINI, 2010). Com as biorrefinarias, espera-se, além da obtenção de produtos de interesse, a geração de insumos diversos, com potencial econômico para diferentes setores da indústria, agregando valor às cadeias produtivas oriundas da biomassa (EMBRAPA, 2011)

De acordo com Cherubini (2010), as fontes renováveis de matérias-primas ricas em carbono para as biorrefinarias provêm de quatro setores diferentes: → agricultura – culturas dedicadas e resíduos; → indústria florestal; → resíduos domésticos e industriais; → aquicultura – algas (KAMM et al., 2006). Matérias-primas oriundas de um mesmo setor podem apresentar diversos constituintes, que na maioria das vezes serão separados para o processamento. Desta forma, a classificação destas matérias-primas deve estar de acordo com a o principal componente utilizado de sua composição.

As mais recentes tecnologias para obtenção de biocombustíveis, os chamados de terceira geração, utilizam como matérias-primas fontes antes nunca exploradas, como por exemplo, as microalgas. Microalgas são consideradas um dos organismos mais antigos do planeta, e estão dispersos em quase toda sua superfície, nos mais diversos ambientes e nas mais diversas condições (MATA, 2010). Algas apresentam três mecanismos de produção distintos para o crescimento: fotoautotrófico, heterotrófico e mixotrófico. Podendo assim fixar o carbono e produzir tanto lipídeos quanto açúcares, são ricas em proteínas, esse conjunto de características faz com que possam vir a ser utilizadas como fontes para fermentação e consequente produção de bioetanol. (SINGH, 2010) O uso desta biomassa desperta atenção, pois em teoria o uso de microalgas não compete com a disponibilidade das commodities alimentares e muitas acreditam que esta é uma fonte sustentável (GHATAK, 2011).

Biodiesel derivado de lipídios de microalgas tem recebido muita atenção, uma vez que mantém a promessa de proporcionar baixo carbono, matérias-primas renováveis sem prejudicar o abastecimento de alimentos ou o ambiente. Embora microalgas tenham muitas características desejáveis; taxas de crescimento mais rápidas, eficiências fotossintéticas mais altas, maiores de biomassa e lipídios produtividades, há, no entanto alguns desafios significativos que precisam ser superados. A produção em larga escala de biocombustíveis provavelmente irá requerer o uso de linhagens adaptadas às competitivos e em condições ambientais locais. Assim, há necessidade de isolamento rápido e eficaz de estirpes de microalgas com elevado teor de lipídios e intrínseca produtividade de biomassa (DEMIRBAS, 2011; ELLIOTT et al., 2012).

As microalgas, além de servir como matérias-primas de biocombustíveis são potenciais candidatos para tratamento de águas residuais. A descarga de águas residuais tratadas de forma incompleta pode levar a eutrofização das águas circundantes e danos aos ecossistemas devido às grandes quantidades de nitrogênio e fósforo (RAWAT et al.,

2011). Os requisitos de alta energia e os custos associados com o tratamento de águas residuais e remoção de nutrientes com as tecnologias físicas com base química existente e continua sendo um desafio para os municípios, governos e indústrias (CHRISTENSON; SIMS, 2011). Usando o tratamento de águas residuais com base em microalgas potencialmente tem uma série de benefícios; tratamento de águas residuais pode ser acoplado à produção de biomassa para a produção de biocombustíveis, compensando a utilização de valores insustentáveis de fertilizantes de água doce e comerciais, requerida para o cultivo de microalgas. Esta opção promete reduzir os custos de cultivo de microalgas e da energia necessária para o tratamento de águas residuais, bem como permitindo a recuperação e reciclagem dos recursos (CHO et al., 2011; PITTMAN et al., 2011; ABDELAZIZ et al., 2013). De acordo com Mohammadi e Aliabadi (2013), as microalgas apresentam um potencial de produção de biodiesel de 5.000 a 15.000 galões de biodiesel por acre/ano de cultivo.

Beevi e Sukumaran (2014), avaliaram a produção de lipídios da microalga *Chlorococcum sp.* RAP 13, quando desenvolvida em condições mixotrófica e heterotrófica, utilizando como meio de cultivo o efluente da indústria de laticínios, verificando que o micro-organismo em estudo acumula mais lipídios quando em heterotrofia. Deste modo, as condições de cultivo podem ser otimizadas de maneira a maximizar a síntese de compostos bioativos (RENAUD et al., 2002; RODOLFI et al., 2008; QUEIROZ et al., 2011).

Queiroz et al., (2011) estudaram a produção de lipídios por *Aphanothece microscopica* Nägeli, objetivando sua aplicação na produção de biodiesel, quando cultivada no efluente do processamento de pescado a diferentes níveis de temperatura. Os resultados demonstraram, a influência da temperatura, sendo registrados valores de 15,3; 13,8 e 7,1 % de lipídios para biomassas cultivadas a 10, 20 e 30°C, respectivamente. Independente da produção de lipídios, a biomassa algal representa uma fonte alternativa de uma variedade de compostos químicos, (MISHRA et al., 2012, CHEN; VAIDYANATHAN, 2013); de maneira que a composição bioquímica destes micro-organismos surge como uma resposta de sua imensa capacidade de se adaptar às condições ambientais, utilizando, adequadamente, sua versatilidade metabólica.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Micro-organismo e condições de crescimento

Uma monocultura de *Aphanothece microscopica* Nägeli (*RS Man 92*), originalmente isolada da Lagoa dos Patos, no estado do Rio Grande do Sul, Brasil (32° 01`S -52° 05` W) foi utilizada. As culturas foram propagadas e mantidas em meio sintético BG 11 (RIPKA et al., 1979), com a seguinte composição: $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ (0,040 g.L⁻¹), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,075 g.L⁻¹), Na_2CO_3 (0,020g.L⁻¹), $NaNO_3$ (0,15g.L⁻¹), $C_6H_8O_7$ (0,006 g.L⁻¹), $FeC_6H_5O_7(NH_4)_2HC_6H_5O_7$ (0,006g.L⁻¹), EDTA (0,001g.L⁻¹), H_3BO_3 (2,86g.L⁻¹), $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ (0,390g.L⁻¹), $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (0,079g.L⁻¹), $COCl_2 \cdot 6H_2O$ (0,040g.L⁻¹). Um reator de boro silicato tipo coluna de bolhas de 4 mm de espessura, diâmetro interno de 10 cm, altura de 100 cm e 4,5 L de volume de trabalho foi utilizado. O sistema de dispersão de gases do reator consistiu de um difusor de ar de 1,5 cm localizado no centro da base da coluna (Figura 1). As condições de manutenção foram 25°C, intensidade luminosa de 15 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{S}^{-1}$ e fotoperíodo de 12 horas.

O reator foi colocado no centro de uma caixa de madeira vazada com dimensões de 50 cm de largura, 50 cm de espessura e 1,7 m de altura. A intensidade luminosa foi determinada a partir de um conjunto de 12 lâmpadas fluorescentes de 32 W dispostas de 3 a 3 nos quatro lados da caixa. Para a manutenção das condições de luz e temperatura foram utilizados termostatos e lâmpadas fluorescentes, com temperatura e intensidade luminosa controlada. A intensidade luminosa foi otimizada em função do número de lâmpadas que foram mantidas acesas.

Figura 1. Reator autotrófico



4.2 Água residuária

O efluente do processamento de laticínio foi coletado no tanque de equalização do sistema de tratamento de uma indústria localizada na cidade de Pelotas, RS. As amostras foram coletadas por um período de 36 meses e caracterizadas quanto ao pH, demanda química de oxigênio (DQO), nitrogênio total (N-NTK), fósforo total (PT) e fósforo reativo dissolvido (PRD), segundo metodologia proposta por APHA, (2005).

4.3 Reator heterotrófico

O equipamento experimental utilizado foi constituído de um reator de coluna de bolhas (Figura 2) de PVC, de iguais dimensões do reator autotrófico utilizado para manutenção da cultura de *Aphanothece microscopica* Nägeli. A ausência de luminosidade e o controle de temperatura foram obtidos pela exposição do reator em uma incubadora da marca TECNAL modelo TE-401.

Figura 2. Reator heterotrófico



4.4 Experimentos

Os dados experimentais foram obtidos a partir de três etapas, que constituíram inicialmente na avaliação do efeito das concentrações máximas e mínimas de nutrientes encontrados no efluente de laticínio e da temperatura de cultivo na remoção de nutrientes por

Aphanothece microscopica Nägeli, mediante aplicação de um delineamento fatorial 2^4 . Uma segunda etapa que teve por base a avaliação das diferentes frações de fósforo nas fases líquida e sólida do reator na melhor condição avaliada. Por fim a avaliação da produção de compostos celulares na biomassa gerada visando avaliar a perspectiva de utilização do efluente de laticínio como plataforma de uma biorrefinaria microalgal.

4.4.1 Primeira etapa

4.4.1.1 Delineamento Experimental

Os experimentos foram conduzidos de acordo com um delineamento fatorial 2^4 em que foram analisados os efeitos concentração de fósforo dissolvido reativo (PDR), nos níveis 2,0 e 5,0 mg.L^{-1} , concentração de nitrogênio total Kjeldahl (N-NTK), nos níveis 26,4 e 55,6 mg.L^{-1} , concentração de matéria orgânica como (DQO), nos níveis 1300 e 1600 mg.L^{-1} e temperatura, nos níveis de 20 e 30°C sob as variáveis respostas remoção de fósforo, N-NTK e DQO, bem como da produtividade em biomassa. Os experimentos foram realizados em triplicata, as variáveis e níveis utilizados, são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Matriz do planejamento experimental com seus valores reais em mg.L^{-1} e codificados

Tratamento	PRD	N-NTK	DQO	Temperatura
1	-1(2)	-1(26,4)	-1(1300)	-1(20)
2	+1(5)	-1(26,4)	-1(1300)	-1(20)
3	-1(2)	+1(55,6)	-1(1300)	-1(20)
4	+1(5)	+1(55,6)	-1(1300)	-1(20)
5	-1(2)	-1(26,4)	+1(1600)	-1(20)
6	+1(5)	-1(26,4)	+1(1600)	-1(20)
7	-1(2)	+1(55,6)	+1(1600)	-1(20)
8	+1(5)	+1(55,6)	+1(1600)	-1(20)
9	-1(2)	-1(26,4)	-1(1300)	+1(30)
10	+1(5)	-1(26,4)	-1(1300)	+1(30)
11	-1(2)	+1(55,6)	-1(1300)	+1(30)
12	+1(5)	+1(55,6)	-1(1300)	+1(30)
13	-1(2)	-1(26,4)	+1(1600)	+1(30)
14	+1(5)	-1(26,4)	+1(1600)	+1(30)
15	-1(2)	+1(55,6)	+1(1600)	+1(30)
16	+1(5)	+1(55,6)	+1(1600)	+1(30)

Dados obtidos a partir de 3 experimentos; PRD: fósforo reativo dissolvido(mg.L^{-1}); N-NTK: nitrogênio total Kjeldahl (mg.L^{-1}); DQO: demanda química de oxigênio (mg.L^{-1}).

4.4.1.2 Eficiência de remoção de nutrientes e crescimento celular

A eficiência de remoção de nutrientes e o crescimento celular foram monitorados de 4 em 4 horas por um período de 24 horas.

A eficiência de remoção dos parâmetros considerados foram obtidos segundo a metodologia descrita em APHA (2005), mediante a avaliação das concentrações iniciais de nutrientes e as finais de acordo com o intervalo de tempo pré determinado.

As concentrações celulares, inicial e a cada intervalo de tempo considerado foram determinadas por gravimetria. A concentração inicial foi obtida de uma cultura da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli na fase exponencial de crescimento, desenvolvida em condições autotróficas, conforme descrito no item 4.1. Para tal, um volume conhecido da cultura foi filtrado em membrana millipore (0,45 µm) e a biomassa retida levada a peso constante a 60°C. A cada intervalo de tempo igual procedimento ao efetuado para obtenção da concentração inicial era realizado, posto que a partir de alíquotas do efluente usado com meio de cultivo.

4.4.1.3 Avaliação da cinética de crescimento

As variáveis cinéticas, velocidade específica de crescimento máxima ($\mu_{\text{máx}}$), tempo de geração (tg) e fator de conversão de substrato em células ($Y_{x/s}$), foram determinadas conforme indicado por Beltran-Heredia et al., (2000). O procedimento de avaliação teve como base as Equações 1, 2, 3, 4 e 5.

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad \text{Eq.1}$$

onde:

$\mu_{\text{máx}}$: velocidade específica de crescimento do micro-organismo (h^{-1});

dx: variação da concentração celular (mg.L^{-1});

dt: variação do tempo (h);

X: concentração celular (mg.L^{-1}).

Integrando-se a equação 1 obtém-se a Equação 2.

$$X = X_0 e^{\mu_{\text{máx}}(\Delta t)} \quad \text{Eq.2}$$

X: concentração celular no final da fase exponencial (mg.L^{-1});

Xo: concentração celular no início da fase exponencial (mg.L^{-1});

$\mu_{\text{máx}}$: máxima velocidade específica de crescimento do micro-organismo (h^{-1});

Δt : intervalo de tempo do crescimento exponencial (h).

$$tg = \frac{\ln 2}{\mu_{\max}} \quad \text{Eq.3}$$

onde:

tg: tempo de geração (h);

μ_{\max} : máxima velocidade específica de crescimento (h^{-1}).

$$Y_{X/S} = -\frac{dX}{dS} \quad \text{Eq.4}$$

onde:

$Y_{X/S}$ = fator de conversão substrato em células (mg biomassa.mg.S⁻¹)

dX = variação da concentração celular (mg.L⁻¹)

dS = variação da concentração de substrato (mg.L⁻¹)

$$P_x = \frac{\Delta X}{\Delta t} \quad \text{Eq.5}$$

onde:

P_x : produtividade (mg.L⁻¹h⁻¹);

ΔX : variação da concentração final e inicial (mg.L⁻¹);

Δt : diferença entre o tempo final e inicial (h).

4.4.1.4 Avaliação da cinética de remoção de nutrientes

Para cada temperatura avaliada um modelo cinético de ordem zero foi ajustado aos dados experimentais, segundo a Equação 6.

$$C = C_0 - kt \quad \text{Eq.6}$$

Onde C_0 é a concentração do nutriente ação inicial do nutriente considerado (mg.L⁻¹), C é a concentração final (mg.L⁻¹). k é a constante da velocidade de reação (h^{-1}) e t é o tempo de reação (h).

4.4.1.5 Determinação das razões C/N e N/P

As razões C/N e N/P foram determinadas a partir dos valores de DQO, N-NTK e PDR.

4.4.2 Segunda etapa

4.4.2.1 Experimentos

Os dados experimentais foram obtidos a partir de seis experimentos, três em condições heterotróficas e três autotróficas. Os experimentos autotróficos seguiram as mesmas condições utilizadas para a geração do inoculo (item 4.1). Os experimentos heterotróficos

foram conduzidos segundo as melhores condições indicadas na primeira etapa. A concentração celular foi determinada por gravimetria conforme descrito em 4.4.1.2. Os reatores autótrofos e heterótrofos são descritos nos itens 4.1 e 4.3.

O crescimento celular e a eficiência de remoção de diferentes frações de fósforo, foram monitorados de 4 em 4 horas por um período de 24 horas, no sistema heterotrófico. No cultivo autótrofo, somente o fósforo dissolvido reativo (PDR), foi avaliado na fase líquida do reator. Na fase sólida, para ambos sistemas determinou-se as frações de fósforo reativo dissolvido (PRD), fósforo dissolvido por hidrólise ácida (PDHA) e fósforo total (PT) na biomassa seca, bem como fósforo reativo dissolvido intersticial (PRDI), fósforo dissolvido por hidrólise ácida intersticial (PDHAI) e fósforo total intersticial (PTI).

A obtenção dos dados cinéticos teve como base a metodologia descrita na primeira etapa, segundo as Equações 1,2,3,4 e 5.

4.4.2.2 Avaliação das frações de fósforo

4.4.2.2.1 Frações fosforadas na fase líquida

As frações de fósforo foram avaliadas segundo o esquema de análise padrão descrito em standard methods, APHA (2005), que classifica analiticamente o fósforo presente em águas, em três categorias: não filtrado, filtrado e suspenso.

Assim, na fase líquida não filtrada do reator heterotrófico foram avaliadas as concentrações de ortofosfato total expresso como fósforo total reativo (PTR), polifosfato, por hidrólise ácida (PTHA), fósforo total (PT) e fósforo total orgânico (PTO). A fração PTR, foi obtida diretamente em uma alíquota amostrada do meio de cultivo, analisada por colorimetria, utilizando como reagente de vanadatomolibdato. Em presença de ortofosfato em meio ácido o molibdato de amônio reage formando o ácido molibidofosfórico, o qual reage com o vanadato formando o ácido vanadomolibdofosfórico gerando cor amarela, com absorção a 400nm. Para leitura das absorbâncias foi utilizado um espectrofotômetro mod.700.S UV-VIS 200-1100 NM FEMTO. Uma segunda alíquota foi digerida com persulfato de potássio e o produto de digestão, submetido à análise colorimétrica, obtendo-se a concentração da fração PT. Uma terceira alíquota foi hidrolisada com os ácidos nítrico e sulfúrico e o produto de hidrólise (PTHA), igualmente analisado por colorimetria. A fração POT foi determinada segundo a Equação 7.

$$POT = PT - (PRT + PTHA) \quad \text{Eq.7}$$

O fósforo filtrado foi avaliado a partir de amostras filtradas em filtro Millipore (0,45µm), obtendo-se desta maneira as frações dissolvidas: fósforo reativo dissolvido (PRD),

fósforo dissolvido por hidrólise ácida (PDHA), fósforo dissolvido total (PDT) e fósforo orgânico dissolvido (POD).

A partir das frações de fósforo não filtradas e filtradas, foram calculadas as frações de fósforo suspenso, segundo as Equações, 8, 9, 10 e 11.

$$\text{PST} = \text{PT} - \text{PDT} \quad \text{Eq.8}$$

onde:

PST : fósforo suspenso total.

$$\text{PSR} = \text{PTR} - \text{PDR} \quad \text{Eq.9}$$

onde:

PSR: fósforo suspenso reativo.

$$\text{PSHA} = \text{PTHA} - \text{PDH} \quad \text{Eq.10}$$

PSHA: fósforo suspenso por hidrólise ácida;

$$\text{POS} = \text{PTO} - \text{PDO} \quad \text{Eq.11}$$

onde:

POS: fósforo orgânico suspenso.

4.4.2.2 Frações fosforadas na fase sólida

A biomassa gerada em condições autótrofas e heterótrofas foi separada do meio de cultivo por decantação, seguido de centrifugação. A pasta obtida da etapa de separação foi desidratada em um secador de bandejas, nas condições de velocidade de escoamento do ar de $1,5\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$, temperatura de 60°C e espessuras de bandeja de 6 mm (JACOB-LOPES et al., 2007). Na fase sólida foram avaliados na biomassa seca e intersticialmente na biomassa úmida as frações PRD e PT, com amostragens no início do cultivo, na fase logarítmica e estacionária de crescimento. A fração PRD foi determinada em biomassa seca por extração com os ácidos tricloroacético e sulfúrico, de acordo com Miyachi; Tamyia (1961). A fração PT foi determinada por extração com ácido tricloroacético, etanol/éter (volume 3:1), conforme descrito por Aitchhison; Butt (1973) e a fração PT de fósforo total foi determinada por extração e digestão com os ácidos sulfúrico e nítrico frações PDR e PT intersticial, foram obtidas a partir de alíquotas filtrada em Millipore ($0,45\ \mu\text{m}$). O filtro contendo a biomassa foi imerso em água destilada por um período de 15 h. Após este período a amostra foi filtrada determinando-se no filtrado PDR e PT, então denominados PDRI e PTI. As amostras assim obtidas foram avaliadas por colorimetria segundo metodologia descrita em APHA (2005).

4.4.3 Terceira etapa

4.4.3.1 Experimentos

Nesta etapa três experimentos foram realizados visando avaliar o potencial de produção de proteínas, carboidratos, lipídios e cinzas quando a *Aphanothece microscopica* Nägeli é cultivada nas condições heterotróficas consideradas, bem como o efeito da redução temperatura de cultivo no teor de lipídios no momento em que a máxima concentração é obtida.

O crescimento celular e a eficiência de remoção de nutrientes foram monitorados de 4 em 4 horas por um período de 24 horas.

O crescimento celular e eficiências de remoções de N-NTK, DQO, e PT, foram avaliadas segundo o exposto nas etapas anteriores.

4.4.3.2 Caracterização da Biomassa

A biomassa obtida nas diferentes fases de crescimento foi submetida a secagem conforme indicado por Jacob-Lopes et al., (2006). Foi utilizado um secador descontínuo de bandejas com escoamento paralelo ($1,5 \text{ m.s}^{-1}$) e temperatura do ar 60°C , resultando teores de umidade finais médios na ordem de 8,5 a 8,7 %.

4.4.3.2.1 Determinação de proteína

O teor de proteína na biomassa foi determinado a partir da concentração em nitrogênio total obtido mediante aplicação do método micro-Kjeldahl. O fator 6,25 foi utilizado para a conversão do nitrogênio em proteína (A.O.A.C, 2005).

4.4.3.2.2 Determinação de carboidratos

Os carboidratos foram calculados por diferença, a partir das concentrações obtidas para proteínas, lipídios e cinzas.

4.4.3.2.3 Determinação de lipídios

Os lipídios foram determinados segundo o método de Bligh; Dyer (1959), obtendo-se um sistema monofásico a partir da adição a uma alíquota, de uma mistura de metanol, clorofórmio e água. Uma vez formado o sistema monofásico, este foi disperso em duas fases mediante a adição de clorofórmio e água. A fase contendo clorofórmio e lipídios foi submetida a evaporação do clorofórmio em atmosfera de nitrogênio com subsequente secagem até peso constante e o teor de lipídio gravimetricamente determinado.

4.4.3.2.4 Determinação de Cinzas

O teor de cinzas foi determinado conforme descrito em A.O.A.C (2005), por incineração da amostra a 550 °C

4.4.3.2.5 Determinação do perfil de ácidos graxos

4.4.3.2.5.1 Extração da gordura da biomassa

A extração da gordura foi realizada através do método de Folch et al., (1957) por meio da extração de lipídios na proporção 2:1 clorofórmio/metanol e determinação do teor de lipídios por gravimetria.

4.4.3.2.5.2 Esterificação dos ácidos graxo

Os ácidos graxos foram eluídos a partir da coluna, onde foi utilizado 0,5 g de biomassa, de acordo a adaptação de Metcalfe et al., 1966 por Feddem et al., (2010), adicionando 5 mL de uma solução alcoólica de KOH 0,5 N, sob refluxo durante 15 min. Após arrefecimento, 7,5 mL de BF₃ e 7,5 mL de metanol foram adicionados e a mistura aquecida a refluxo durante 7 min. Depois disso, a amostra foi transferida para o funil de separação, onde 10 mL de éter de petróleo foram adicionados mais 15 mL de solução salina saturada. A fração éter foi reservada (fração superior). Na outra fração, extraiu-se mais 2 x com 25 mL de éter de petróleo. A fração éter obtida das 3 extrações com foi lavada com 25 mL de água destilada. Filtrou-se a fração éter em sulfato de sódio anidro. Evapora-se o solvente em rotaevaporador ou banho a 70 °C. Solubilizou-se com éter de petróleo. Evaporou-se o residual sob nitrogênio. Solubilizou-se o resíduo com 1000 µL de diclorometano.

4.4.3.2.5.3 Identificação dos metil ésteres de ácidos graxos

A separação e quantificação dos metil ésteres dos ácidos graxos foi realizada utilizando um cromatógrafo a gás GC-2010AF Shimadzu equipado com detector de ionização de chama (FID-2010), sistema de injeção Split-Splitless (razão de Split 1:100) e coluna capilar de sílica fundida com dimensões: 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura de filme modelo RTx-5 (Restek Corporation, Pensilvânia, Estados Unidos). Hélio foi utilizado como fase de arraste a uma vazão de 0,6 mL.min⁻¹. O injetor e o detector foram mantidos a 260°C. As razões de Hidrogênio, Ar sintético e Nitrogênio foram 30 mL.min⁻¹, 300 mL.min⁻¹ e 30 mL.min⁻¹, respectivamente. A temperatura da coluna foi programada para 140°C por 2 minutos, seguindo de um aumento a 6°C.min⁻¹ até 200°C,

permanecendo nesta temperatura por 5 minutos, e posteriormente aumentando a $2^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ até 240°C e finalmente mantendo a esta temperatura por 8 minutos. O volume de injeção foi de 1 μL .

Os ácidos graxos individuais foram identificados por comparação com os tempos de retenção das amostras com padrões, nas mesmas condições experimentais. Foram utilizados dois padrões: um mix com 37 ácidos graxos (Supelco 47885).

4.4.3.2.5.4 Quantificação dos metil ésteres dos ácidos graxos

A quantificação dos ácidos graxos foi feita através da normalização das áreas dos picos descritos nos cromatogramas. Os resultados foram expressos como porcentagem do total de ácidos graxos.

4.4.3.2.6 Manipulação da temperatura de reação biológica

Culturas de *Aphanothece microscopica* Nägeli na fase de maior produção em lipídio, quando cultivadas a 20°C no efluente de laticínio na ausência de luz, foram submetidas a um período de estabilização correspondentes a 6, 10 e 11 h, para que atingissem as temperaturas de 10, 5 e 0°C respectivamente. Foram avaliados três tempos de reação 20, 30 e 40 h. A biomassa foi recolhida, seca e o teor de lipídios determinado por Bligh; Dyer (1959). Os experimentos foram conduzidos de acordo com um delineamento fatorial 3^2 em que foram analisados os efeitos temperatura (10, 5 e 0°C) e tempo de reação, (20, 30 e 40 h), sob a variável resposta produção de lipídios. Os experimentos foram realizados em triplicata. As variáveis e níveis utilizados estão expressos na Tabela 2.

Tabela 2. Matriz do planejamento experimental com seus valores reais e codificados

Tratamento	X ₁	X ₂
1	-1(20)	-1(0)
2	-1(20)	0(5)
3	-1(20)	+1(10)
4	0(30)	-1(0)
5	0(30)	0(5)
6	0(30)	+1(10)
7	+1(40)	-1(0)
8	+1(40)	0(5)
9	+1(40)	+1(10)

Dados obtidos a partir de 9 repetições; X₁: Tempo de reação (h); X₂: Temperatura (°C).

Uma superfície de resposta foi obtida segundo o modelo empírico expresso pela Equação 12 (NETO; SCARMÍNIO; BRUM, 1995).

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{12} X_1 X_2 \quad \text{Eq.12}$$

Onde: Y é a resposta predita para a variável dependente; X₁ e X₂ são os níveis codificados das variáveis independentes; β é o coeficiente de regressão (β₀: interceptação; β₁ e β₂: linear; β₁₂: interação e β₁₁, β₂₂: coeficientes quadráticos).

4.4.3.2.7 Avaliação dos resultados do planejamento experimental

Os resultados avaliados foram mediante análise de regressão múltipla. Os efeitos das variáveis independentes, tempo de reação (X₁) e temperatura de reação (X₂) na resposta produção de lipídios bem como o efeito interação entre estas variáveis foram avaliados segundo análise de variância utilizando o software statistica 7.0 (StatsoftTulsa-0K,USA).

4.4.3.2.8 Definição de um reator heterotrófico descontínuo visando avaliar a perspectiva de implementação de uma biorrefinaria microalgal

O calculo do volume do reator heterotrófico descontínuo, teve como base a vazão de efluente de laticínio correspondente a unidade industrial da Empresa COSULATI (Companhia Sul Rio Grandense de Laticínio), situada na cidade de Pelotas RS, correspondente a 950 m³, bem como a velocidade de crescimento (μ) da cianobactéria *Aphanothece microscopica*

Nägeli, quando desenvolvida nesta água residuária nas condições experimentais supracitadas. O volume do reator foi obtido segundo a Equação 13, conforme descrita em Schmal (2013).

$$V = \frac{F}{\mu}$$

Eq.13

onde:

Q = vazão de efluente da unidade industrial considerada (m^3);

μ = velocidade máxima de crescimento do micro-organismo no meio considerado (d^{-1}).

4.4.3.2.9 Avaliação estatística dos resultados

Os dados foram estatisticamente avaliados mediante os módulos de Análise de Variância e módulo básico do software estatística 7.0 (StatsoftTulsa-OK, USA).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização do efluente

Dentre as atividades agroindustriais o setor alimentício destaca-se por maior consumo de água e maior geração de efluentes por unidade produzida, constituído por compostos facilmente biodegradáveis como carboidratos, proteínas e lipídios. Este efluente sofre variações qualitativas e quantitativas de indústria para indústria, dependendo de fatores como: materiais usados, aspectos sazonais e processos empregados. Fato que pode acarretar a redução na eficiência das plantas de tratamento de efluentes (JANCZUKOWICZ et al., (2008).

A água residuária da indústria de laticínio é caracterizada por altas concentrações de matéria orgânica, perfazendo valores que segundo a literatura situam-se no intervalo de 1195 a 5000 $mg.L^{-1}$, bem como por ampla faixa de N-NTK (16,5 – 118 $mg.L^{-1}$), de fósforo total na ordem de 2,4 a 38,6 $mg.L^{-1}$ e pH de 6,3 a 10,6. (SARKAR et al., 2006; VOURCH et al., 2008; BANU et al., 2008, KUSHWAHA et al., 2010; HUO et al., 2012; CHEN; LIU et al., 2012; BEEVI; SUKUMARAN, 2014).

Os resultados de caracterização do efluente da indústria de laticínios obtidos em um período de 36 meses, utilizado como meio de cultivo neste trabalho estão registrados na Tabela 3.

Tabela 3. Caracterização do efluente da indústria de laticínios.

Parâmetros	Mínimo	Máximo	Média	CV (%)
pH	6,5	9,7	8,6	11,6
N-NTK	26,0	57,4	38,3	31,0
DQO	400	2663	1578	30,9
N-NH ₄ ⁺	3,6	8,0	5,4	28,7
P-PO ₄ ⁻³	2,3	6,3	4,8	28,7

Amostragem mensal, por um período de 36 meses; pH: potencial hidrogênio; N-NTK: nitrogênio total Kjeldahl (mg.L⁻¹); DQO: demanda química de oxigênio (mg.L⁻¹); N-NH₄⁺: nitrogênio amoniacal (mg.L⁻¹); P-PO₄⁻³: fósforo reativo dissolvido (mg.L⁻¹).

Os valores médios encontrados para os parâmetros de caracterização do efluente, situam-se no intervalo descrito na literatura, em concentrações inferiores aos máximos reportados por diferentes autores. De acordo com Handani et al., (2005), a composição desta água residuária varia de acordo com o tipo de atividade, sendo dependente da produção e do processo em execução. No entanto, sua característica comum é uma mistura de matéria orgânica, nitrogênio e fósforo, apresentando variações de vazão horárias e sazonais de acordo com o ciclo de produção (JANCZUKOWICZ et al., 2008). Esta constatação se reflete nos coeficientes de variação obtidos, apresentando altas dispersões em torno da média. Segundo Contreras et al., (2000) e Mulkerrins et al., (2000), esta é uma característica comum em efluentes agroindustriais. As relativas baixas concentrações de constituintes tornam-se interessantes, uma vez que a manipulação via Engenharia Bioquímica ocorre através do controle das condições de cultivo e nutricionais. Fatores como limitação de nutrientes, luz, salinidade e temperatura, são determinantes na síntese de compostos químicos celulares (RODOLFI et al., 2008). A limitação nutricional das culturas tem sido a técnica mais comumente empregada para a maximização da síntese de lipídeos. Usualmente o nitrogênio, é o fator limitante (RATLEDGE; COHEN; 2008; TETAVIA; DEMIRED; BLUM, 2012). Os dados da Tabela 3 evidenciam baixas concentrações de nitrogênio total (máximos de 57,4 mg.L⁻¹). Este valor, não só é duas vezes menor que o máximo teor registrado para o efluente de laticínios de uma forma geral, como também estas concentrações são baixas quando comparadas a outros efluentes agroindustriais como o efluente da parboilização do arroz (QUEIROZ; KOETZ, 1997; BASTOS et al., 2004; JACOB-LOPES et al., 2006; ZEPKA et al., 2007; QUEIROZ et al., 2011). No que se refere aos teores de DQO, a água residuária em análise caracterizou-se por apresentar menores concentrações em matéria orgânica, quando comparada a outros efluentes agroindustriais gerados por indústrias regionais, fator este de importância sob o ponto de vista de impacto ambiental, considerando que a DQO é um parâmetro fundamental para estimar o potencial poluidor de água residuária (ZUCCARI,

GRANER; LEOPOLDO; 2005). Zepka et al., (2008), obtiveram para o efluente da parboilização do arroz, valores médios de DQO, na ordem de 4206 mg.L^{-1} . Esta concentração é aproximadamente 2,7 vezes superior ao registrado para o efluente de laticínio. É importante salientar ainda, quanto aos dados registrados na Tabela 3, os teores de N-NH_4^{+1} (mínimo de $3,6 \text{ mg.L}^{-1}$ e máximo de 8 mg.L^{-1}). Estes valores são notadamente inferiores aos reportados por Queiroz; Koetz (1997), para o efluente da parboilização do arroz (mínimo de $11,27 \text{ mg.L}^{-1}$ e máximo de $34,57 \text{ mg.L}^{-1}$). Isso faz desta água residuária, um meio de cultivo em potencial para o cultivo de cianobactérias, visando a síntese de compostos de interesse, uma vez que altas concentrações de nitrogênio amoniacal são inibidores do crescimento destes micro-organismos (PRZTOCKA-JUSIAK, 1976; SUNG; LIU, 2003). Przytocka-Jusiak (1976), reporta que um dos maiores problemas para o cultivo de microalgas é a baixa resistência destes micro-organismos a amônia, situando como 50 mg.L^{-1} , a concentração não tóxica ao desenvolvimento destes micro-organismos. Por outro lado, é importante considerar quando se constata as baixas concentrações de nutrientes que caracterizam este efluente, que o tratamento convencional de águas residuárias de laticínios resultam, após o tratamento secundário, uma água residuária com concentrações de nitrogênio na ordem de $20 - 40 \text{ mg.L}^{-1}$ (MC GINN et al., 2001). Estas concentrações são superiores aos valores médios registrados para o efluente em análise que se caracteriza por valores médios de N-NTK $38,3 \text{ mg.L}^{-1}$ (Tabela 3). Esta constatação viabiliza a aplicação direta de reatores heterotróficos microalgais para o tratamento do efluente gerado por empresas processadoras de laticínios com as características operacionais equivalentes a Empresa fornecedora de efluente para execução deste trabalho.

Avaliando o comportamento dos valores de pH registrados no período amostral, observa-se uma ampla variação (6,5 a 9,7). Beevi; Sukumaran (2014), estudando a remoção de poluentes orgânicos do efluente de laticínios por microalgas relatam valores de pH para esta água residuária, altamente alcalino na ordem de 10,6. É importante salientar, que se faz necessário aferir o pH do efluente a 7,6, quando se visa a utilização desta água residuária como meio de cultivo de cianobactérias, conforme indicado por Ripka et al., (1979). A Figura 3 expressa a variação de pH com o tempo de cultivo, para todas condições consideradas. Em todos os casos, observa-se um gradativo acréscimo nos valores desta variável, independente dos tratamentos utilizados, atingindo valores superiores a 8,0 durante o experimento. De acordo com Richmond; Grobbelaar (1986), o aumento de pH com o crescimento até alcançar a fase estacionária é resultante do acúmulo de OH^- no meio de cultivo. O aumento de pH com o tempo de residência celular em crescimento heterotrófico, pode ser atribuído aos mecanismos de transporte de matéria orgânica para o interior da célula, variando a

permeabilidade das membranas em função das características quali e quantitativas das moléculas orgânicas. Cultivos com adequada concentração e tipo de compostos orgânicos, promovem a alcalinização do meio, através do movimento de prótons acompanhados do consumo de moléculas orgânicas (HONG; LEE, 2007). O pH é um dos parâmetros físicos utilizados para referenciar a qualidade da água. De acordo com a Legislação Brasileira, (Rio Grande do Sul, Secretaria do meio Ambiente, Conselho Estadual do Meio Ambiente – COSEMA), resolução n°128, que dispõe sobre a fixação de padrões de emissão de efluentes líquidos para fontes de emissão que lancem seus efluentes em águas superficiais, indica o intervalo de pH de 6,0 a 9,0 para água residuária a ser lançada nos corpos hídricos receptores. Este intervalo contempla o pH do efluente tratado por *Aphanothece microscopica* Nägeli, independente da condição estudada. No final dos experimentos o pH do efluente de laticínio situou-se no intervalo de 6,8 a 7,6 (Figura 3).

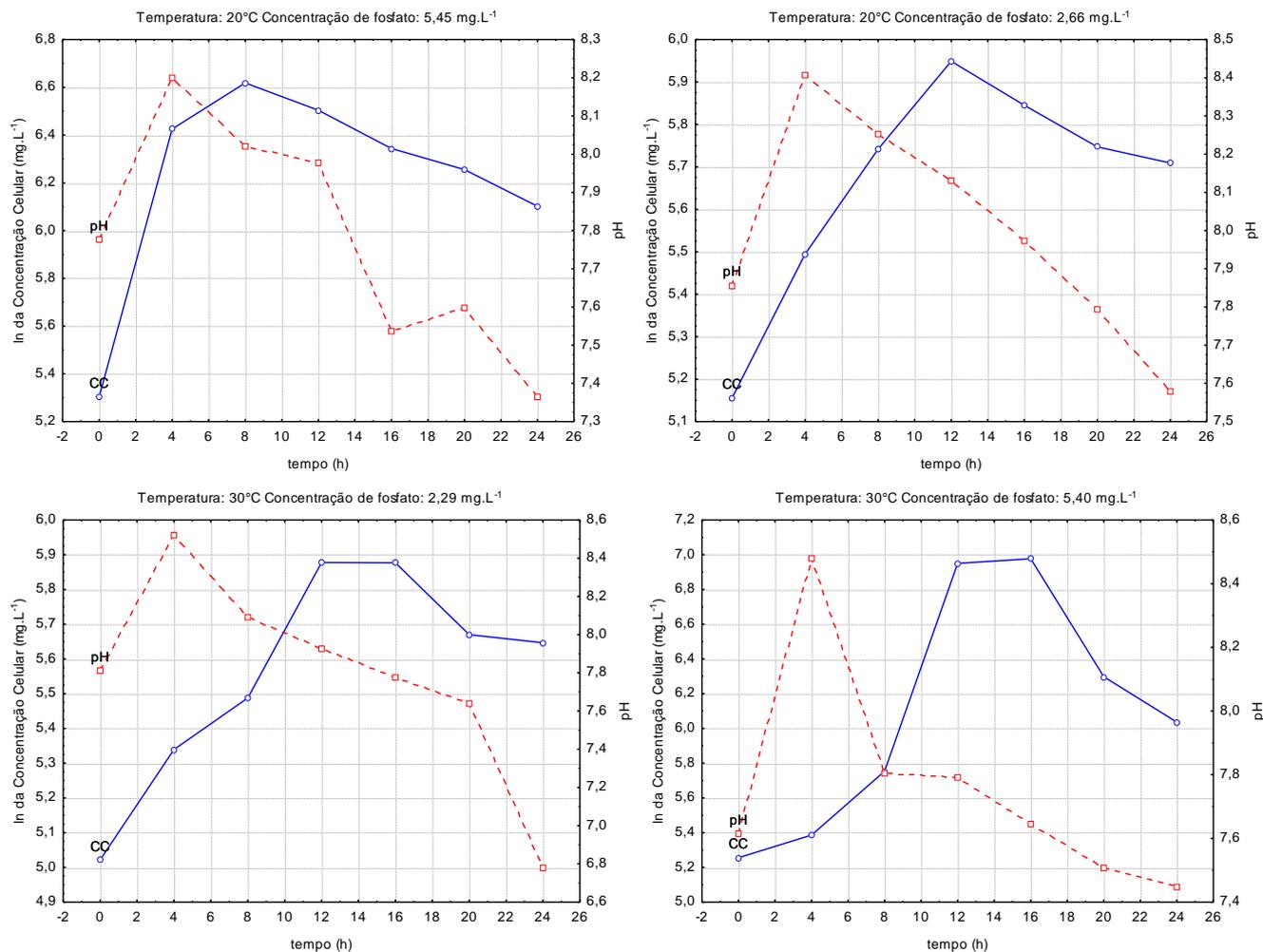
5.2 Avaliação do crescimento da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli desenvolvida no efluente de laticínio e remoção de nutrientes

5.2.1 Crescimento celular

O efeito das concentrações iniciais de nitrogênio e fósforo e temperatura de cultivo na remoção de nutrientes e no crescimento microalgal, tem sido objeto de estudo para diferentes microalgas, tais como, *Scenedesmus*, *Scenedesmus obliquus* e *Chlorella vulgaris*, bem como de populações microalgais de lagoas de estabilização (MARTÍNEZ; JIMÉNEZ; YOUSFI; 1998; ASLAN; KAPDAN, 2006; POWELL et al., 2009, SAHOO, 2010; XIN; HONG-YING; KE; YING-XUE; 2010). É importante salientar no que se refere ao crescimento heterotrófico a capacidade de remoção simultânea em uma única etapa de matéria orgânica e nitrogênio (QUEIROZ et al., 2013), bem como do potencial de aproveitamento da biomassa gerada na forma de compostos intermediários e ou produtos finais e valores agregados (SPOLAORE et al., 2006).

A Figura 3 apresenta o comportamento do crescimento celular em condições heterotróficas da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli com o tempo de cultivo e variação de pH para diferentes concentrações iniciais de $P-PO_4^{-3}$ (aproximadamente 2 e 5,4 $mg.L^{-1}$) e temperatura (20 e 30°C).

Figura 3. Crescimento celular e variação do pH com o tempo de cultivo para diferentes concentrações de fosfato.



pH: potencial hidrogeniônico; CC: curva de crescimento ; dados obtidos a partir de 9 repetições.

O crescimento celular de cianobactérias é altamente dependente das condições ambientais, como presença ou ausência de luz, temperatura, pH e nutrientes, entre outros fatores.(MARTÍNEZ; JIMÉNEZ; YOUSFI, 1998; BASTOS et al., 2004; TRAVIESO et al., 2006; ZEPKA et al; 2008; CONVERTI et al., 2009; QUEIROZ al., 2010; SAHOO; 2010; PEREZ-GARCIA et al., 2011; DEVI et al., 2012). Dentre todos fatores a temperatura tem sido considerada, como o fator que exerce maior efeito no crescimento e atividades metabólicas microalgais (CONVERTI et al., 2009). No entanto, estes micro-organismos são facilmente adaptáveis às condições do meio, respondendo as modificações do ambiente com adaptações fisiológicas geneticamente programadas (HARUM, et al., 2010, BEEVI; SUKUMARAN, 2014).

A *Aphanothece microscopica* Nägeli, tem demonstrado grande capacidade de adaptação para crescimento no escuro e em efluentes industriais (QUEIROZ et al., 2002;

BASTOS et al., 2004; QUEIROZ et al., 2007; ZEPKA et al., 2008; BASTOS et al., 2009; HORNE et al., 2010; VIEIRA et al., 2012; QUEIROZ et al., 2013). A Figura 3 e Tabela 4 expressam o comportamento do crescimento celular deste micro-organismo quando cultivado no efluente de laticínio em condições de temperatura de 20 e 30°C e concentrações médias (mínima e máxima) de $P-PO_4^{-3}$, registradas na água residuária utilizada neste trabalho (Tabela 3).

O comportamento das curvas de crescimento, onde é registrado no eixo das abcissas o tempo de cultivo em horas, e nas ordenadas o logaritmo da concentração celular, reflete um desenvolvimento diferenciado quanto ao crescimento celular, com nítida influência da concentração de fósforo e temperatura de cultivo. No entanto, independente das diferenças, para todas as condições, observa-se a ausência da fase lag. Zhou et al., (2012), atribui a ausência da fase lag no crescimento algal heterotrófico como completa adaptação do micro-organismo ao meio de cultivo. A curva de crescimento obtida para a cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli cultivada em efluentes industriais, tem sido caracterizada pela ausência da fase lag (BASTOS et al., 2004; QUEIROZ et al., 2006; ZEPKA et al., 2007 HORNE et al., 2010). Comparando-se as curvas de crescimento entre si, é possível verificar que as concentrações celulares máximas foram obtidas em tempos diferentes em função da temperatura, 12 h (20°C) e 16 h (30°C) para as menores concentrações de fósforo e 8 h (20°C) e 16 h (30°C) para as maiores concentrações. As diferenças de duração das fases logarítmicas podem ser atribuídas a temperatura de crescimento e manutenção do inóculo o qual foi desenvolvido e mantido em meio BG11 a 20° C. Assim, quando cultivado a 30°C, um maior período de adaptação se fez necessário, para atingir maior densidade celular, quando comparado ao cultivo a 20°C. Este comportamento mais lento a 30°, para atingir a maior densidade celular é reportado por outros autores, para outros micro-organismos. Renaud et al. (2002), constataram crescimento lento para *Cryptomonas* sp e *Rhodomonas* sp a 30°C, quando avaliadas comparativamente o efeito da temperatura a 25 e 30°C. Desta maneira, as maiores concentrações em biomassa, são registradas quando o micro-organismo se desenvolve nas maiores concentrações de fósforo (5,4 e 5,5 mg.L⁻¹), com o maior valor em concentração de biomassa (1072 mg.L⁻¹) a 30°C, concentração esta significativamente diferente ($p \leq 0,05$), quando comparada aos máximos de biomassa gerados nas demais condições. No entanto, quando o micro-organismo é desenvolvido a 20°C, menor tempo de geração (4,2 h), maior consumo de substrato ($Y_{PO_4^{-3}} = 74,9$ mg PO_4^{-3} /mg de biomassa; $Y_{N-N-NTK} = 9,2$ mg N-N-NTK/mg de biomassa e $Y_{DQO} = 0,23$ mg DQO/mg de biomassa) e maior produtividade (68,5

$\text{mg.L}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$) é evidenciado (Tabela 4) e melhor elucidado pelos resultados obtidos mediante aplicação do planejamento experimental (Tabela 5).

Tabela 4. Avaliação da cinética de crescimento.

Parâmetro	20°C		30°C	
	P-PO ₄ ⁻³ (mg.L ⁻¹)			
	2,7	5,5	2,3	5,4
X ₀ (mg.L ⁻¹)	173±38	201±2	152±23	192±10
X _{máx} (mg.L ⁻¹)	383±50	749±17	362±3	1072±13
TDH (h)	12	8	16	16
μ _{máx} (h ⁻¹)	0,0670±0,0078	0,1644±0,0038	0,0539±0,0114	0,1076±0,0030
tg (h)	10,4±1,2	4,2±0,1	13,1±2,5	6,4±0,2
Y _{X/S} (mg _{biomassa} /mg _{PO₄⁻³})	124,8±11,5	100,7±15,0	108,0±2,4	55,0±5,4
Y _{X/S} (mg _{biomassa} /mg _{DQO})	0,35±0,06	0,32±0,04	0,22±0,02	0,17±0,02
Y _{X/S} (mg _{biomassa} /mg _{N-NTK})	15,2±3,6	12,1±1,0	7,0±2,6	5,4±0,5
P _X (mg.L ⁻¹ .dia ⁻¹)	18,0±1	68,0±2	13,0±2	55,0±1

X₀: concentração celular inicial (mg.L⁻¹); X_{máx}: concentração celular máxima (mg.L⁻¹); TDH: tempo de detenção hidráulica (h); μ_{máx}: velocidade específica de crescimento máxima (h⁻¹); tg: tempo de geração (h); Y_{X/S} (mg_{biomassa}/mg_{PO₄⁻³}): conversão de fósforo em célula; Y_{X/S} (mg_{biomassa}/mg_{N-NTK}): conversão de nitrogênio em célula; Y_{X/S} (mg_{biomassa}/mg_{DQO}): conversão de matéria orgânica (DQO) em célula; P_X: produtividade em biomassa (mg.L⁻¹.dia⁻¹). Dados obtidos a partir de 9 repetições.

Os fatores de conversão de nitrogênio em células obtidos são superiores aos registrados para este micro-organismo crescendo em outros efluentes agroindustriais. Horne et al. (2010), obtiveram para a *Aphanothece microscopica* Nägeli cultivada no efluente da indústria da pesca a 20° e 30°C, coeficientes de conversão em biomassa de 4,2 e 4,7 mg biomassa.mg⁻¹ de N-NTK respectivamente. Os maiores fatores de conversão de N-NTK em biomassa obtidos quando se utiliza o efluente de laticínio, para as mesmas temperaturas avaliadas (5,4 a 15 mg de biomassa.mg⁻¹ de N-NTK), pode ser atribuído às baixas concentrações de N-NH⁺⁴ registradas para este efluente (Tabela 3), que oscilaram de 3 a 8 mg.L⁻¹ durante todo período amostral. Quando se avaliam os fatores de conversão de fosfato em células, verifica-se que os valores obtidos (55 a 124 mg de biomassa/mgPO₄⁻³), são notadamente superiores aos encontrados para os fatores de conversão se N-NTK e DQO, apesar das baixas concentrações iniciais de P-PO₄⁻³ presentes no efluente (2,3, 2,7, 5,4 e 5,5 mg.L⁻¹). Martinez; Jimenez; Yousfi (1998) avaliaram a influência da temperatura (20, 25, 30 e 35°C) no crescimento e remoção de fósforo por *Scenedesmus obliquus*. Os autores reportam que o fator de conversão de substrato em biomassa varia com a temperatura, sendo registrados os maiores valores a 20°C. Este comportamento, pode ser verificado na Tabela 4 em que são registrados, os maiores valores de fator de conversão de P-PO₄⁻³ em células (107,7 e 124,8 mg

de biomassa/mg de $P-PO_4^{-3}$, para o cultivo desenvolvido a 20°C. Este comportamento é descrito também para os fatores de conversão de N-NTK e de DQO em células.

Avaliando ainda, os dados cinéticos para as menores concentrações, observa-se comportamento cinético similar ao verificado para o crescimento com maiores concentrações de fósforo, ficando demonstrado o efeito da temperatura no consumo de substrato em células. Estes resultados evidenciam o efeito da temperatura e das concentrações iniciais de fósforo na conversão dos nutrientes do efluente em biomassa. O efeito da temperatura no crescimento de cianobactérias tem sido estudado por outros autores, que reportam melhor crescimento em temperaturas de 30 a 35°C (MATHIENSEN et al., 2000; MARTINÉZ et al., 2010; BASTOS et al., 2002; VIEIRA et al., 2012). Bastos et al., (2002), avaliou o crescimento da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli no efluente da parboilização do arroz, sendo registrado maior crescimento celular a 35°C.

5.2.2 Remoção de nutrientes

O efeito da temperatura, concentração inicial de nutrientes e interação destes fatores na remoção destes nutrientes, bem como na produtividade celular são evidenciados na Tabela 5 que nos fornece os resultados obtidos a partir do delineamento fatorial (Tabela 1).

Tabela 5. Valores de p obtidos a partir da análise de variância para eficiências de remoção de nutrientes, produtividade (Px) e interações

Variável	$P-PO_4^{-3}$	N-NTK	DQO	Px
$P-PO_4^{-3}$ (mg.L ⁻¹)	0,000	0,000	0,000	0,000
N-NTK(mg.L ⁻¹)	1,000	1,000	1,000	1,000
DQO (mg.L ⁻¹)	1,000	1,000	1,000	1,000
Temperatura (°C)	0,000	0,000	0,000	0,000
$P-PO_4^{-3}$ *N-NTK	1,000	1,000	1,000	1,000
$P-PO_4^{-3}$ * DQO	1,000	1,000	1,000	1,000
$P-PO_4^{-3}$ * Temperatura	0,354	0,027	0,000	0,000
N-NTK*DQO	1,000	1,000	1,000	1,000
N-NTK*Temperatura	1,000	1,000	1,000	1,000
DQO*Temperatura	1,000	1,000	1,000	1,000

Dados obtidos a partir de 9 repetições. p < 0,05. As interações são demonstradas pelos asteriscos. $P-PO_4^{-3}$: concentração de fósforo; N-NTK: concentração de nitrogênio total Kjeldahl; DQO: demanda química de oxigênio; Px: produtividade em biomassa (mg.L⁻¹.h⁻¹).

A análise destes dados demonstram que tanto a temperatura como a concentração de fósforo e suas interações, são altamente significativas ($p \leq 0,05$) para as eficiências de remoção de nutrientes e produtividade. Não sendo, no entanto verificado, este efeito para nitrogênio total e DQO, indicando que as concentrações estudadas não foram limitantes. Isso é melhor elucidado pela análise da Tabela 6 que apresenta os resultados de remoção de nutrientes para as diferentes concentrações iniciais de fósforo e temperaturas de cultivo.

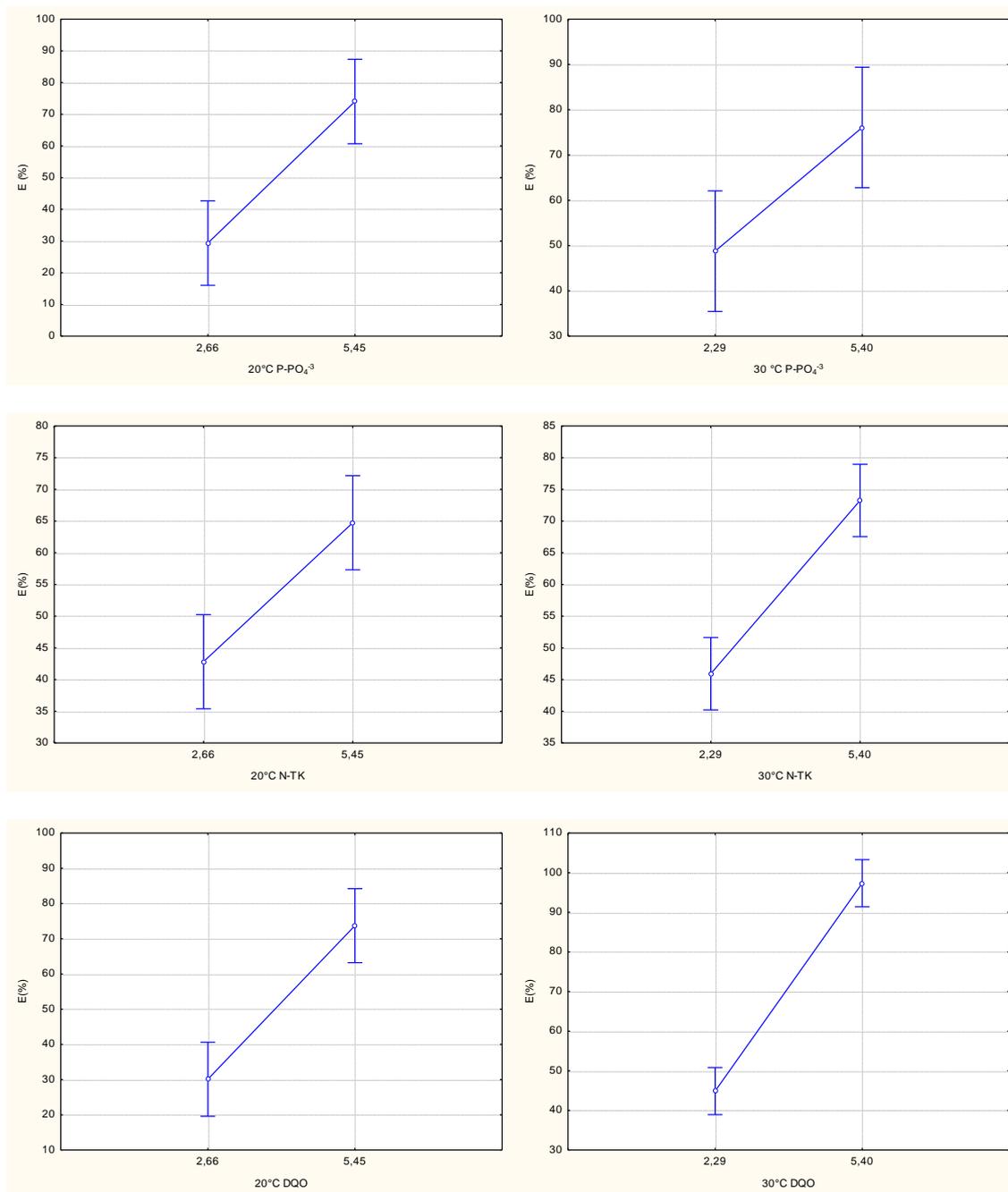
Tabela 6. Remoção de nutrientes para as diferentes concentrações iniciais de fósforo e temperaturas de cultivo.

Temperatura (°C)	TDH (h)	P-PO ₄ ³⁻					N-NTK					DQO					C/N	N/P
		C _o (mg.L ⁻¹)	C _{TDH}	E	K (h ⁻¹)	R ²	C _o (mg.L ⁻¹)	C _{TDH} (mg.L ⁻¹)	E	k (h ⁻¹)	R ²	C _o (mg.L ⁻¹)	C _{TDH} (mg.L ⁻¹)	E	k (h ⁻¹)	R ²		
20	12	2,7±0,3	2,2±0,3	18,4±7,6	0,04±0,02	0,94±0,04	26,4±3,6	22,6±0,0	14,4±7,3	0,54±0,06	0,98±0,01	1313,5±97,0	1044,3±10,0	20,2±6,1	27,16±0,16	0,94±0,01	49,8	9,8
	24		1,8±0,2	33,5±7,1	0,04±0,01	0,94±0,01		16,2±0,6	38,8±4,5	0,42±0,01	0,80±0,06		883,5±81,7	38,6±4,5	19,74±0,69	0,95±0,01	54,5	9,9
	8	5,5±0,2	4,7±0,1	13,4±1,4	0,09±0,01	0,84±0,04	42,2±0,3	30,0±0,2	28,9±0,9	1,52±0,05	0,92±0,02	1416,3±81,1	1124,5±26,4	20,4±5,9	29,09±0,46	0,96±0,05	33,6	9,0
	24		2,2±0,1	60,2±0,6	0,12±0,01	0,95±0,01		15,4±0,4	63,6±0,9	1,15±0,02	0,98±0,01		353,9±10,4	75,0±1,1	48,57±1,96	0,98±0,01	23,0	7,8
30	16	2,3±0,1	1,1±0,1	52,9±8,6	0,04±0,00	0,92±0,03	28,2±1,4	25,4±1,4	31,4±6,3	0,82±0,09	0,92±0,04	1560,7±166,7	995,4±58,1	36,2±3,2	35,41±5,37	0,97±0,02	55,3	11,7
	24		1,2±0,1	49,2±4,6	0,04±0,01	0,94±0,02		18,5±1,1	50,1±2,7	0,87±0,01	0,97±0,01		806,4±78,4	48,3±1,2	32,47±3,27	0,95±0,04	43,6	11,6
	16	5,4±0,4	2,4±0,2	55,2±1,6	0,19±0,02	0,95±0,02	55,6±0,5	23,1±0,3	58,4±0,4	2,21±0,06	0,98±0,01	1374,8±28,9	576,8±18,5	58,1±1,1	55,77±1,36	0,90±0,01	24,7	15,4
	24		1,3±0,1	76,5±0,6	0,16±0,01	0,96±0,01		13,9±0,2	75,1±0,5	1,83±0,02	0,97±0,01		39,8±7,4	97,0±0,5	57,89±1,05	0,96±0,01	3,1	10,3

TDH: Tempo de detenção hidráulica (h); C_o: Concentração inicial (mg.L⁻¹); C_{TDH}: Concentração no tempo de residência (h); E: eficiência de remoção (%); k: constante de velocidade (h⁻¹); R²: coeficiente de determinação P-PO₄³⁻: fósforo reativo dissolvido; N-NTK: nitrogênio total Kjeldahl; DQO: demanda química de oxigênio; C/N: razão carbono e nitrogênio; N/P: razão nitrogênio e fósforo. Dados obtidos a partir de 9 repetições.

A análise dos dados expressa que as máximas eficiências de remoção são registradas em 24 h, independente da condição de cultivo e onde ocorrem as menores densidade celulares (Figura 4). Observa-se gradativa redução nas concentrações de nutrientes com o tempo de residência, independente da concentração inicial de P-PO_4^{-3} , o que é corroborado pelos valores dos coeficientes de determinação obtidos para as taxas de consumo de substrato. No entanto, mesmo com a disponibilidade de baixas concentrações de nutrientes, principalmente no que se refere a fósforo reativo dissolvido, (máximos de $5,5 \text{ mg.L}^{-1}$), no final do tempo experimental (24 h), não foi registrado consumo total de substrato. Sahoo (2010), estudando a dinâmica de remoção de P-PO_4^{-3} por fitoplâncton, verificou que as concentrações residuais de P-PO_4^{-3} , tendem a zero com o tempo, mas nunca atingem zero. Para o tempo de residência celular de 24 h, os valores residuais de N-NTK e P-PO_4^{-3} registrados para todas as condições avaliadas, resultam em concentrações iguais ou inferiores ao indicado pela legislação (LO N.º 1898/2009-DL), que contempla a operação todas atividades de beneficiamento de leite e seus derivados da empresa fornecedora do efluente utilizado neste trabalho. No entanto quanto a remoção de DQO, as maiores eficiências de remoção (75 % a 20°C e 97 % a 30°C), em 24 horas, nas maiores concentrações de fósforo. Estes resultados indicam o efeito da concentração de fósforo e da temperatura na eficiência de remoção de matéria orgânica. Isso é melhor elucidado, quando se avalia os dados expressos pela Figura 4, que apresentam uma avaliação comparativa das eficiências de remoção em função da temperatura de cultivo e das concentrações iniciais de fósforo. São registradas diferenças significativa ($p \leq 0,05$), de remoção de N-NTK, P-PO_4^{-3} e DQO por *Aphanothece microscopica* Nägeli independente da temperatura utilizada.

Figura 4. Avaliação comparativa das remoções de fosfato, nitrogênio total e matéria orgânica do efluente de laticínio por *Aphanothece microscopica* Nägeli, em função das concentrações de fosfato e temperatura de crescimento.



E: eficiência de remoção expressa em porcentagem; 2,7 e 5,5: concentrações de fosfato (mg.L⁻¹) a 20°C; 2,3 e 5,4: concentrações de fosfato (mg.L⁻¹) a 30°C; As eficiências de remoção diferem significativamente ($p \leq 0,05$).

De acordo, com o padrão de emissão a ser atendido, pela Empresa Cooperativa Sul Riograndense (LO N^o 1898/2009-DL), a concentração em DQO deve ser até 300

mg.L⁻¹. Os teores de DQO residual registrados foi de 354 e 40 mg.L⁻¹ a 20 e a 30°C respectivamente.

Aslan; Kapdan (2006), avaliaram a influência das concentrações iniciais de P-PO₄⁻³, na remoção de nutrientes por *Chlorella vulgaris*, trabalhando com concentrações de 7,7 a 119 mg.L⁻¹. Os resultados experimentais demonstraram, que a qualidade do efluente tratado, reduziu com o aumento da concentração de fósforo e que as eficiências de remoção de nitrogênio eram maiores que as de fósforo. A menor concentração por estes autores utilizada (7,7 mg.L⁻¹ de P-PO₄⁻³), é em valor absoluto próxima (5,4 e 5,5 mg.L⁻¹) aos máximos utilizados neste trabalho, condição que resultou em um efluente com características adequadas segundo a legislação vigente. Observa-se ainda, quando se comparam os resultados encontrados neste trabalho com os obtidos por estes autores que não há uma predominância dos índices de remoção de nitrogênio em relação ao fósforo, mas uma equivalência em remoção, principalmente no que se refere as maiores concentrações iniciais de fosfato. A eficiência de remoção de P-PO₄⁻³ (78 %) por *Chlorella vulgaris* reportada por Aslan; Kapdan (2006), para concentrações iniciais de P-PO₄⁻³ de 7,7 mg.L⁻¹, é muito próxima (76,5 %) a obtida por *Aphanothece microscopica* Nägeli, quando cultivada a 30°C com concentração inicial de 5,4 mg.L⁻¹ de P-PO₄⁻³ (Tabela 5). No que se refere às remoções de nitrogênio estes autores reportam remoções de 21,2 mg.L⁻¹ por *Chlorella vulgaris*. Este desempenho, é menor que o obtido neste trabalho, em que são registrados índices de remoções de 27e 42,3 mg.L⁻¹ de remoção de N-NTK nas maiores concentrações de fósforo a 20 e 30°C respectivamente.

5.3 Influência da razão C/N e N/P na remoção de nutrientes e crescimento celular

Muitos trabalhos enfatizam que as microalgas apresentam grande potencial para remover nitrogênio e fósforo simultaneamente, sendo apontado como principal mecanismo de remoção de nutrientes a incorporação destes constituintes na biomassa gerada (MARTÍNEZ; JIMÉNEZ; YOUSFI, 1998; BASTOS et al., 2004; ASLAN; KAPDAN, 2006, GARCIA et al., 2006; ZEPKA et al., 2007; HORNE et al., 2010; SAHOOO, 2010; QUEIROZ et al., 2013).

A disponibilidade em nutrientes em cultivos heterotróficos microalgais é o principal fator de controle do bioprocessamento (JACOB-LOPES et al., 2013).

As concentrações de nitrogênio e fósforo presentes no meio de cultivo influenciaram diretamente sobre a cinética de crescimento, geração de biomoléculas e

remoção de nutrientes. No entanto, estes elementos, podem ser utilizados simultaneamente e removidos eficientemente apenas se a relação N/P da água residuária estiver em uma faixa adequada (XEN et al., 2010). Na Tabela 6, pode ser avaliado o comportamento das razões N/P no meio de cultivo a 20 e 30°C até o final experimental (24 h), a partir da máxima produção celular. Observa-se, que não houve grandes variações quanto a relação N/P. As maiores concentrações celulares são registradas, para o valor de N/P de 7,8 e 10,3 a 20 e 30°C respectivamente. As maiores remoções são obtidas em 24 h, quando as menores concentrações celulares são registradas, nas N/P 10,7 (20°C) e 11,7 (30°C). Estes valores de N/P encontram-se no intervalo de máximos (13,3) e mínimos (9,1) registrados para o efluente de laticínio (Tabela 1). No entanto, no que se refere as razões C/N, maiores variações foram observadas com o tempo de cultivo, caracterizando-se a água residuária por apresentar mínimos de C/N 15,4 e máximos de 39,4. Segundo Chamberlain et al., (2011), misturas balanceadas de carbono e nitrogênio em uma relação C/N 20, são mais facilmente assimiladas. A literatura reporta que a relação C/N ideal para crescimento em meio heterotrófico, deve situar-se entre 14 e 30 (WASIELESKY et al., 2006; EMERECIANO et al., 2007).

Viñas (1998), reporta que os valores de nitrogênio e fósforo recomendados em processos biológicos variam com a concentração de DQO do efluente. A influência da DQO representada na razão C/N (Tabela 6) na remoção de nutrientes é notória. Observa-se que as maiores eficiências remoção, são registradas quando o efluente atinge as menores C/N registradas no processo. Carrera et al., (2004), relatam que há uma razão ótima entre carbono e nitrogênio para proporcionar o crescimento, as quais devem ser obedecidas, uma vez que concentrações inferiores ao ótimo podem ser limitantes ao crescimento e superiores podem causar efeitos inibitórios, dificultando a atuação de enzimas em substratos de interesse.

A manutenção deste parâmetro na faixa ótima de crescimento está relacionada intimamente com a ação das enzimas glutamina sintetase e glutamato sintetase na assimilação do nitrogênio (MURO-PASTOR; FLORENCIO, 2003). Os altos valores de coeficiente de transformação de nitrogênio, fósforo e matéria orgânica em biomassa (Tabela 3), sugerem que as razões C/N e N/P registradas neste trabalho situaram-se em um intervalo adequado para proporcionar o crescimento do micro-organismo em estudo. Esta constatação é corroborada pelos resultados obtidos por Silva-Manetti et al., (2012), que indicam a razão C/N 20 e NP 10, como a melhor condição para a produtividade em biomassa de *Aphanotece microscopica* Nägeli em cultivos heterotróficos, utilizando o

efluente de laticínio como meio de cultivo. Razões C/N 20 e N/P 10 foram também indicadas como melhor condição para produção de clorofila *a* para este micro-organismo cultivado no efluente de laticínio (STREIT, 2014).

5.4 Avaliação de fósforo nas fases líquida e sólida do reator

Neste item é avaliada a distribuição de fósforo na fase líquida e sólida do reator operando a 20 °C, quando o efluente de laticínio contendo em média 6,3 mg.L⁻¹ de fósforo reativo dissolvido (Tabela 7) foi tratado por *Aphanothece microscopica* Nägeli. As condições temperatura e concentração de fósforo reativo dissolvido utilizadas foram selecionadas segundo os dados expressos nas Tabelas 5 e 6.

Tabela 7. Caracterização do efluente da indústria de laticínios.

Parâmetros	Média
pH	7,8±0,2
N-N-NTK	63,5±1,7
DQO	1441±57,5
PRD mg.L ⁻¹)	6,3±0,3
Razão C/N	22,7±1,5
Razão N/P	10±0,4

pH: potencial hidrogeniônico; N-NTK: nitrogênio total Kjeldahl (mg.L⁻¹); DQO: demanda química de oxigênio (mg.L⁻¹); PRD: fósforo reativo dissolvido (mg.L⁻¹). Razão C/N: obtido através da razão entre demanda química de oxigênio e nitrogênio. Razão N/P: obtido através da razão entre nitrogênio e fósforo reativo dissolvido. Dados obtidos a partir de 9 repetições.

5.4.1 Avaliação das diferentes frações de fósforo na fase líquida do reator

As diferentes frações de fósforo analiticamente indicadas em APHA (2005), bem como as eficiências de remoção por *Aphanothece microscopica* Nägeli podem ser avaliadas na Tabela 8.

Poweel et al., (2009), avaliaram a utilização de fósforo por microalgas, tendo base a microalga *Scenedesmus*, sob as condições existentes em uma lagoa de decantação, contendo concentrações iniciais de fósforo reativo dissolvido (PRD) na faixa de 3,5 a 8,8 mg.L⁻¹. No final do experimento, verificaram uma eficiência de remoção de 57 % flutuando a concentração em fósforo residual no efluente, na ordem de 2 a 5 mg.L⁻¹. Importante salientar, que a concentração inicial de fósforo reativo dissolvido (6,3 mg.L⁻¹) no efluente da indústria de laticínio utilizado neste trabalho, situa-se no intervalo de concentrações reportado por estes autores (Tabela 7).

Avaliando os dados expressos na Tabela 8, observa-se um desempenho para a *Aphanothece microscopica* Nägeli muito próximo ao reportado por Powell et al.,

(2009). As remoções de PRD de 53,7 %, com residual na fase líquida de 2,9 mg.L⁻¹ é equivalente ao obtido na primeira fase do trabalho (Tabela 6). Este resultado é bastante promissor quando se objetiva o gerenciamento do fósforo em resíduos industriais mediante a utilização de cianobactérias e microalgas em geral. Para todas as frações de fósforo, com exceção do fósforo suspenso (PSR, PSHA, PST, POS), foi registrado, um comportamento linear nas reduções das concentrações na fase líquida com o tempo de cultivo, a julgar pelos valores dos coeficientes de determinação (Tabela 8). A análise dos dados evidenciam altas eficiências de remoção, principalmente no que se refere as formas dissolvidas, com destaque para o fósforo dissolvido total (PDT), e fósforo orgânico dissolvido (POD) na ordem de 84,3% e 76,3 % para PDT e POD respectivamente. Ekholm, et al., (2006), trabalhando com a diatomácea *Phaeodactylum tricornutum* reportam consumo de fósforo suspenso e PDT do efluente da indústria de celulose, salientando remoções maiores que 50 %, para o PDT. Desempenho, bem superior a este (84,3 %), foi obtido por *Aphanothece microscopica* Nägeli quando cultivada em condições heterotróficas.

Tabela 8. Eficiência de remoção das frações de fósforo em sistema heterotrófico para um período experimental de 24 h.

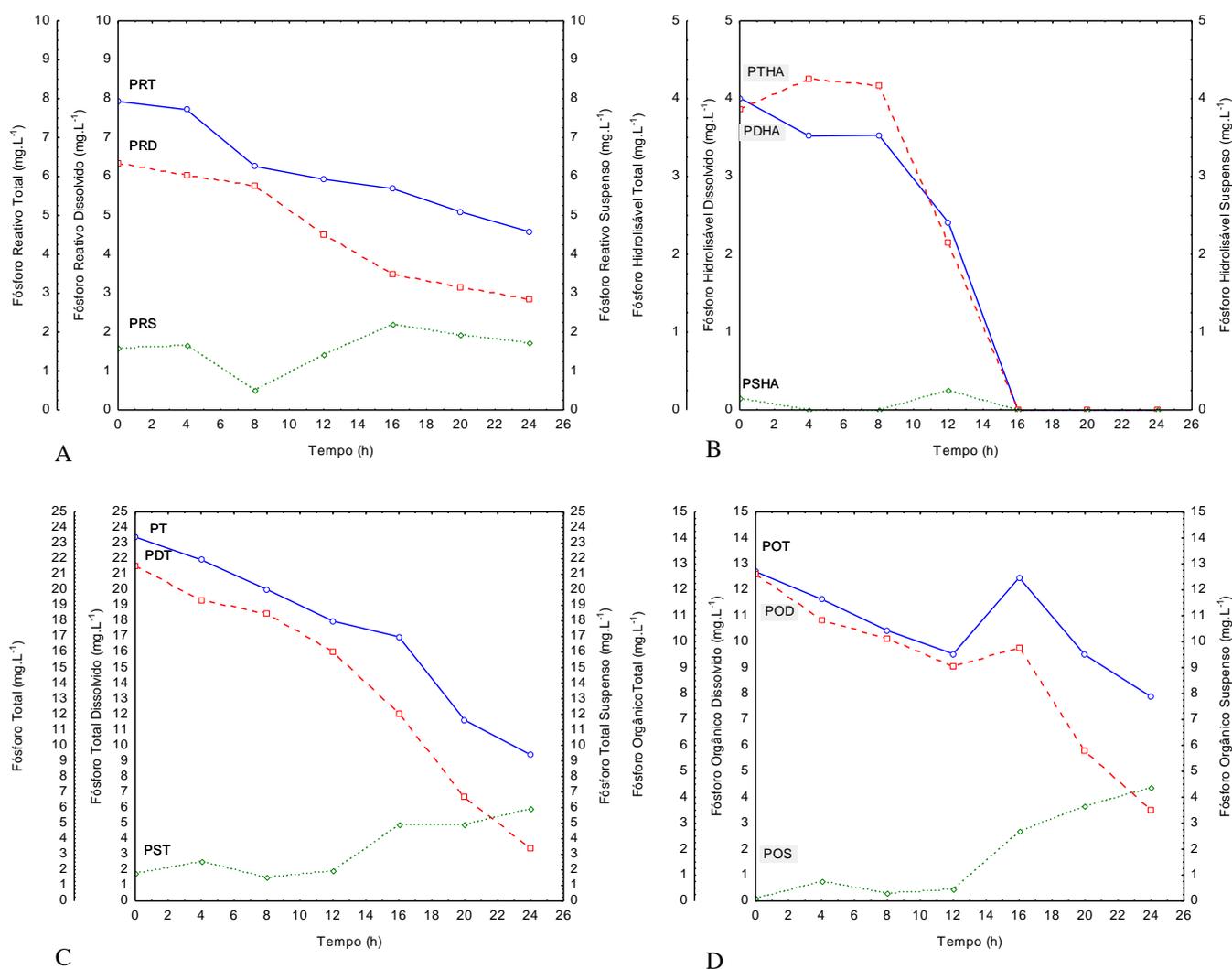
Frações de fósforo	C _o	C _f	E	R ²
PRT	7,9	4,6	41,8	0,95
PRD	6,3	2,9	53,7	0,95
PSR	1,6	1,7	-6,3	0,13
PTHA	4,0	0,0	100,0	0,87
PDHA	3,9	0,0	100,0	0,83
PSHA	0,2	0,0	100,0	0,10
PT	23,4	9,4	59,9	0,95
PDT	21,6	3,4	84,3	0,95
PST	1,8	6,0	-226,2	0,75
POT	11,5	4,8	58,3	0,53
POD	11,4	2,7	76,3	0,86
POS	0,1	2,1	-2000,0	0,83

PRT: fósforo reativo total (mg.L⁻¹); PRD: fósforo dissolvido reativo (mg.L⁻¹); PRS: fósforo suspenso reativo (mg.L⁻¹); PTHA: fósforo total por hidrólise ácida (mg.L⁻¹); PDHA: fósforo dissolvido por hidrólise ácida (mg.L⁻¹); PSHA: fósforo suspenso por hidrólise ácida (mg.L⁻¹); PT: fósforo total (mg.L⁻¹); PTD: fósforo dissolvido total (mg.L⁻¹); PTS: fósforo suspenso total (mg.L⁻¹); POT: fósforo orgânico total (mg.L⁻¹); POD: fósforo orgânico dissolvido ((mg.L⁻¹); POS: fósforo orgânico suspenso (mg.L⁻¹); C_o: concentração inicial de fósforo; C_f: concentração final de fósforo; E: eficiência de remoção (%); R²: coeficiente de determinação.

Na Tabela 8 são destacadas ainda, as concentrações iniciais das diferentes frações fosforadas que compõem o efluente de laticínio. A análise destes dados revelam

uma predominância das frações dissolvidas sobre as suspensas. No entanto, quando verificamos as concentrações das frações de fósforo suspenso no final do tempo experimental observa-se um substancial aumento de fósforo em suspensão na fase líquida. Por outro lado, ao avaliarmos o comportamento dos gráficos expressos na Figura 1, que descrevem a variação das frações de fósforo com o tempo, é possível verificar uma remoção (22,2 %) de PRS em 8 horas de cultivo, ponto da curva de crescimento (Figura 3), que correspondente a fase logarítmica, com relativo aumento de concentrações residuais à medida que se aproxima da fase estacionária. Comportamento similar é registrado para PTS e POS, atingindo em 24 h uma concentração na fase líquida do reator de 6,0 e 2,1 mg.L⁻¹ respectivamente (Tabela 2). Igual comportamento foi obtido para a fração PSHA, inda que não tão acentuado.

Figura 5. Variação das frações de fósforo com o tempo de cultivo, em sistema heterotrófico.



A (PRT: fósforo reativo total; PRD: fósforo dissolvido reativo; PRS: fósforo suspenso reativo); B (PTHA: fósforo total por hidrólise ácida; PDHA: fósforo dissolvido por hidrólise ácida; PSHA: fósforo suspenso por hidrólise ácida); C (PT: fósforo total; PDT: fósforo dissolvido total; PTS: fósforo suspenso total); D (POT: fósforo orgânico total; POD: fósforo orgânico dissolvido; POS: fósforo orgânico suspenso).

As baixas remoções das frações de fósforo suspenso evidenciadas em 8 h de cultivo (Figura 5), são consequência da baixa disponibilidade deste substrato, a julgar pelas concentrações iniciais presentes no efluente. Em adição, os acréscimos de fósforo suspenso na fase estacionária, podem ser atribuídos à capacidade que podem apresentar as cianobactérias e microalgas de armazenar fósforo, o qual é liberado para o meio quando a célula morre (JANSON, 1988; CAMERO; JULIAN, 1988). Como consequência, um pico em 16 horas é registrado para a fração fósforo orgânico total (POT).

A literatura reporta que as algas e microalgas podem utilizar uma variedade de compostos de caráter orgânico e inorgânico para síntese de seus componentes celulares. É enfatizada a utilização do fósforo para ser usado nos processos celulares relacionados nas transferências de energia e síntese de ácidos nucleicos, preferencialmente nas formas de $\text{H}_2\text{PO}_4^{-1}$ e HPO_4^{-2} (KAPLAN et al., 1986; BENITTES-NELSON, 2000; KINKER; POWELL, 2006; EKHOLM et al., 2006; WORSFOLD et al., 2008; BISWAS et al., 2008). De acordo com Ekholmet al., (2006), PDR, parece ser a fração de fósforo mais facilmente disponível para as microalgas, mas que no entanto, outras frações fosforadas, são também removíveis biologicamente.

O fósforo orgânico é uma das formas mais complexas presentes nas águas residuária, se fazendo necessário, sofrer múltiplas transformações até estar disponível ao metabolismo biológico (KAPLAN et al., 1986; BENITTE-NELSON, 2000; EKHOLM et al., 2007). No entanto, os resultados encontrados demonstram que a *Aphanothece microscopica* Nägeli é capaz de transformar estas formas orgânicas fosforadas complexas em fósforo assimilável em um curto período de tempo. Foi obtido em 12 horas de cultivo uma eficiência de remoção de 31,8 % de POT (Figura 5), correspondendo em 24 h de tempo de detenção hidráulica em torno de 21 % da remoção do fósforo total (PT).

A assimilação destas formas orgânicas é possível mediante fosfatases que catalisam reações químicas que liberam fósforo inorgânico como ortofosfato (WORSFOLD et al., 2008). Em muitas cianobactérias esta atividade é ótima no intervalo de pH de 8 a 10 a temperatura de 20 a 30°C (KUENZ; PERRAZ, 1965). Estas condições de temperatura e pH são equivalentes a do efluente de laticínio durante o crescimento celular (Figura 5), o que justifica o desempenho das remoções de fósforo orgânico por *Aphanothece microscopica* Nägeli. Por outro lado, Hong; Lee (2007), reportam que o aumento de pH com o tempo de residência celular em crescimento

heterotrófico, pode ser atribuído aos mecanismos de transporte de matéria orgânica para o interior da célula. Comportamento este que corrobora com as remoções de fósforo orgânico obtida.

5.4.2 Avaliação das frações de fósforo na fase sólida do reator

Os mecanismos de remoção de fósforo são basicamente centralizados na precipitação química e na remoção biológica (DE-BASHAN; BASHAN, 2004; POWEEL et al., 2009; RITTMAN et al., 2011; PRATT et al., 2012). Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que a remoção biológica de fósforo é a principal rota de remoção deste elemento por *Aphanthece microscopica* Nägeli. Esta constatação é elucidada pelos dados da Tabela 9, onde estão registradas as concentrações em fósforo que compõe a fração PT (PDT e PST) na fase líquida do reator heterotrófico e consumo destas frações em 8 horas, momento que corresponde à fase logarítmica de cultivo (Figura 8), bem como o comportamento da fração PT na fase sólida (biomassa seca) do reator.

Tabela 9. Variações das concentrações de fósforo total, fósforo dissolvido total e fósforo total suspenso na fase líquida do reator heterotrófico e de fósforo total na fase sólida em 8 horas de cultivo.

	Fase líquida (mg.L ⁻¹)			Fase sólida (g.100g ⁻¹)
	PDT	PST	PT	PT
Início	21,6±0,7	1,8±0,2	23,4±0,8	1,6±0,1
8h	18,5±0,5	1,5±0,2	20,0±0,7	4,8±0,2
Consumo	3,0±0,1	0,3±0,0	3,4±0,2	3,2±0,2

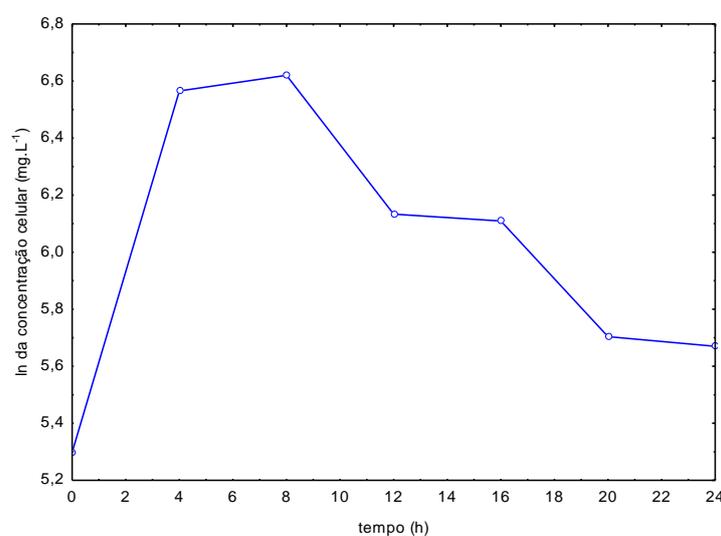
PDT: fósforo dissolvido total; PST: fósforo suspenso total; PT: fósforo total.

Várias espécies de algas têm mostrado uniformidade em sua composição química no que diz respeito ao conteúdo de fósforo, apresentando basicamente em torno de 1 % de seu peso seco, expresso como fósforo total (MIYACHI et al., 1964; KAPLAN et al., 1986; KAPLAN et al., 1989; POWEEL et al., 2008; POWELL et al., 2009; GROBBLAAR, 2004; GIORGOS MARKOU; VANDAME; MUYLAERT, 2014; ROOPNARAIN; GRAY; SYM; 2014).

Avaliando o comportamento destes dados, observa-se no início do experimento uma concentração de 1,6 g.100g⁻¹ em PT, a qual sofre um acréscimo de 3,2 g.100g⁻¹ em 8 horas de cultivo. Este valor é 4,8 vezes maior que o fósforo requerido para o crescimento algal. Isso sugere um acúmulo de fósforo com o crescimento celular, com notório consumo no evoluir das fases de crescimento, atingindo no final do período experimental (Tabela 10) 3,3 g.100g⁻¹ de fósforo. Por outro lado, é notório também, que

o acréscimo de PT na biomassa não foi decorrente da remoção de fósforo do efluente, uma vez que no período considerado apenas $3,4 \text{ mg.L}^{-1}$ de PT foram removidas (Tabela 9). Isso é evidenciado pelo comportamento da Figura 6, que descreve a curva de crescimento obtida pelo ajuste dos logaritmos neperianos das concentrações de biomassa geradas com o tempo de cultivo. A existência da fase linear, para o crescimento revela, que o micro-organismo foi capaz de crescer as custas de fósforo interno.

Figura 6. Curva de crescimento da *Aphanothece microscopica* Nägeli desenvolvida no efluente da indústria de laticínio nas condições experimentais.



De acordo com diferentes autores (BROUGHON; PATT; SHILTON et al., 2006; KINKER; POWELL, 2006; POWELL et al., 2006), o crescimento microalgal consome fósforo, para formar os constituintes celulares. No entanto sob certas condições as microalgas podem consumir mais fósforo que o necessário para sobreviver. Este fósforo extra, é armazenado, para utilização como um recurso interno, quando as concentrações externas é limitante para o crescimento.

Ao avaliarmos os dados das Tabelas 10 e 11, que nos fornecem o comportamento das frações de fósforo na fase sólida dos reatores autótrofo e heterótrofo, como PDR e PT na biomassa seca e fósforo dissolvido reativo intersticial (PDRI), bem como fósforo total intersticial (PTI) intersticialmente, é possível verificar reduções nos teores destas formas fosforadas nas biomassa geradas no final do experimento. Isso se justifica, uma vez que o ortofosfato (PDR) é a fração fosforada comumente assimilada por cianobactérias (HEALEY, 1982, KAPLAN et al., 1986; EKHOLM et al., 2006; POWEEL et al., 2008; POWEEL et al., 2009). Isso resulta em

consumo de PDR e consequentemente de PT, para manutenção das divisões celulares no final do tempo experimental. Este fato é altamente evidenciado quando avaliamos as frações fosforadas em análise na biomassa de *Aphanothece microscopica* Nägeli gerada em condições autotróficas, bem como o consumo de PDR, oriundo do meio de cultivo BG11 (RIPKA et al., 1979), conforme expresso na Tabela 11. É notório o consumo de fósforo com o crescimento celular.

Tabela 10. Concentração de fósforo reativo na fase líquida do reator heterotrófico, e teores de fósforo reativo e fósforo total na biomassa seca e intersticial

Tempo (h)	Fase líquida (mg.L ⁻¹)		Fase sólida (g.100g ⁻¹)		
	PDR	PDR	PDRI	PT	PTI
Início	6,3±0,4	5,4±0,3	0,8±0,0	1,6±0,1	1,2±0,1
8 h	4,5±0,2	2,5±0,2	0,8±0,0	4,8±0,2	1,2±0,1
24 h	2,9±0,2	1,7±0,1	1,1±0,1	3,2±0,2	1,6±0,1

PDR: fósforo dissolvido reativo; PDRI: fósforo dissolvido reativo intersticial; PT: fósforo total; PTI: fósforo total intersticial.

Tabela 11. Concentração de fósforo reativo na fase líquida do reator autotrófico, e teores de fósforo reativo e fósforo total na biomassa seca e intersticial

Tempo (h)	Fase líquida (mg.L ⁻¹)		Fase sólida (g.100g ⁻¹)		
	PDR	PDR	PDRI	PT	PTI
Início	2,8±0,2	5,4±0,3	0,8±0,0	1,6±0,1	1,2±0,1
140 h	1,7±0,1	0,7±0,1	0,1±0,0	0,9±0,0	0,2±0,0
300 h	0,3±0,0	0,2±0,0	0,0±0,0	1,1±0,1	0,1±0,0

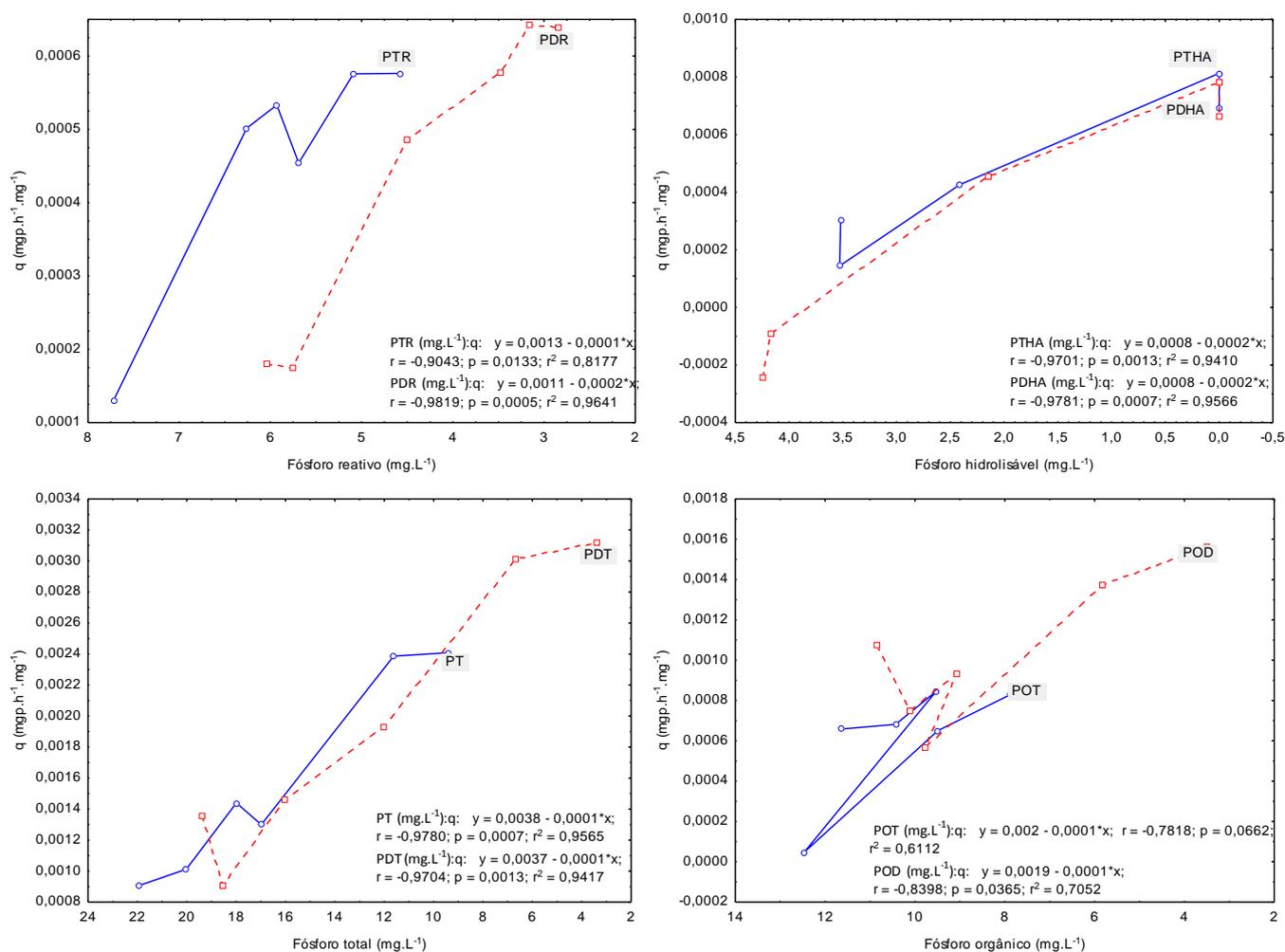
PDR: fósforo dissolvido reativo; PDRI: fósforo dissolvido reativo intersticial; PT: fósforo total; PTI: fósforo total intersticial.

A análise dos dados da Tabela 11, salienta que em 140 h de cultivo, cerca de 81 % de PDR originalmente adicionado no meio BG11 foi removido. No entanto, as divisões celulares tem continuidade por um longo período de tempo, com toda carência deste elemento no meio externo. Isso sugere que o crescimento celular tenha sido suportado pelas frações fosforadas da biomassa, as quais todas tendem a zero no final do tempo experimental, correspondente a 300 h de cultivo.

As populações naturais ou cultivadas de microalgas em estados fisiológicos frequentemente bastante desiguais refletem significativas variações nos componentes intracelulares, os quais se acumulam intracelularmente, independente da composição química expressa pela síntese das estruturas celulares (LOURENÇO et al., 2002; LAVIN; LOURENÇO, 2005; HORNES et al., 2010). Observa-se nas Tabelas 10 e 11, que tanto para o cultivo heterotrófico como autotrófico, as diferentes frações de fósforo avaliadas sofrem influencia do tempo de reação biológica. Para o sistema autotrófico

este consumo é comparativamente muito mais acentuado. Isso sugere que o crescimento tenha sido sustentado por frações de fósforo previamente acumuladas. Esta constatação é corroborada pelo comportamento da Figura 7, tomando como exemplo o crescimento heterotrófico, que descreve o comportamento das taxas de consumo de fósforo (q) segundo os intervalos de tempo avaliados, calculados a partir do quociente entre a velocidade máxima de crescimento (μ_{max}) e o coeficiente de conversão de fósforo em biomassa (Y) obtido a partir das Equações 1 e 4.

Figura 7. Variação das taxas de consumo das frações de fósforo com as concentrações na fase líquida do reator heterotrófico.



PRT: fósforo re/ativo total; PRD: fósforo dissolvido reativo; PTHA: fósforo total por hidrólise ácida; PDHA: fósforo dissolvido por hidrólise ácida (mg.L⁻¹); PT: fósforo total (mg.L⁻¹); PDT: fósforo dissolvido total (mg.L⁻¹); POT: fósforo orgânico total (mg.L⁻¹); POD: fósforo orgânico dissolvido ((mg.L⁻¹); POS: fósforo orgânico suspenso (mg.L⁻¹); q : taxa de consumo de fósforo (mgp.h⁻¹.mg⁻¹); r^2 : coeficiente de determinação; r : coeficiente de correlação; p : probabilidade de diferença entre médias. $p \leq 0,05$ apresenta diferença significativa entre os valores médios.

Os valores de q são plotados para o intervalo das concentrações das diferentes frações de fósforos presentes na fase líquida, exceto para o fósforo em suspensão. A análise do comportamento deste gráfico demonstra que há um aumento do consumo de fósforo com a redução das concentrações na fase líquida, tendendo a estabilização no final do tempo experimental de cultivo, quando são registradas as menores concentrações das diferentes formas fosforadas (Tabela 8 e Figuras 7). Comportamento similar é reportado por outros autores para o Gênero *Scenedesmus* (MARTINÉZ; JIMÉNEZ; YOUSFI, 2006). O aumento do consumo de fósforo por microalgas quando este elemento é limitado no meio, tem sido mencionado na literatura (HEALEY; HENDZEL, 1975; FITZGERALD; NELSON, 1966), e parece estar relacionado com um aumento na produção de fosfatase (MARTINÉZ; JIMENÉZ; YOSFI, 2006).

O comportamento metabólico da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli frente às diferentes frações de fósforo que compõem o efluente da indústria de laticínios além dos aspectos de contenção ambiental, torna este micro-organismo estrategicamente útil em termos de tratamento desta água residuária, uma vez que é desejável que os processos de tratamento permitam a recuperação e o reuso de nutrientes (SPOLARE et al., 2006; MARONEZE et al., 2014).

5.5 Estimativa de custos operacionais de tratamento de fósforo oriundo do efluente da indústria de laticínios

A conversão simultânea de matéria orgânica, nitrogênio e fósforo em uma única etapa estão relacionados com o uso de reatores heterotróficos microalgais, reduzindo custos capitais e operacionais comumente associados às formas convencionais de tratamentos (QUEIROZ et al., 2007; QUEIROZ et al., 2013).

O mercado econômico associado à biotecnologia marinha, a qual diz respeito também ao aproveitamento de microalgas, movimentava milhões de dólares por ano, estando previsto nos Estados Unidos, cerca de 4,6 bilhões de dólares até o ano de 2017. Os principais fatores que impulsionam o crescimento deste mercado incluem o crescente interesse de médicos, farmacêuticos, aquicultores, nutracêuticos e vários outros setores industriais (GIA, 2012). Neste contexto, é importante considerar o custo insignificante a ser gasto para tratar o efluente e para obter a biomassa gerada. De acordo com a Agência de Proteção ambiental Americana (USEPA, 2013), são estimados valores entre US\$ 50 a 212 por quilograma de fósforo removido de águas residuárias através de técnicas de precipitação química, o que reflete em substanciais aportes financeiros requeridos pelas estações de tratamento de efluentes.

A Tabela 12 apresenta a estimativa dos custos operacionais de tratamento de fósforo presente no efluente de laticínio em análise, tomando como base a Licença operacional (LO N°1898/2009-DL), para empresa fornecedora do efluente utilizado neste trabalho.

Tabela 12. Estimativa de custo para tratar o fósforo oriundo do efluente da indústria de laticínio.

Parâmetros	Estimativa
Volume de efluente (L.dia ⁻¹)	950.000
Período operacional (dias.ano ⁻¹)	336
Volume anual (L)	319.200.00
Concentração de fósforo total no efluente (mg.L ⁻¹)	23,39
Concentração anual de P-PO ₄ ⁻³ gerada (kg.ano ⁻¹)	746.609
Valor em dólares por kg de P-PO ₄ ⁻³ tratado (212 US\$)	158.281.108

Como base de cálculo foi considerada a vazão máxima de 950 m³.dia⁻¹, tempo de operação industrial de 336 dias.dia⁻¹, concentração de PT de 23,39 mg.L⁻¹ e o valor estipulado pela USEPA, para remover o fósforo de águas residuária. Com base nestes dados é estimado um montante de US\$ 158.281.108.ano⁻¹, que poderia ser reduzido no custo do sistema de tratamento do efluente de uma indústria com as características consideradas.

5.6 Cultivo de *Aphanothece microscopica* Nägeli em condições heterotróficas sob escopo de uma biorrefinaria

Biorrefinarias industriais tem sido identificadas como a forma mais promissora para geração de produtos de consumo com base em biomassa. A definição do termo biorrefinaria, conforme reportado por, Queiroz et al., (2013), é atribuído a IEA (International Energy Agency), conforme descrito em IEA (2009), documento 42, que define biorrefinaria como a transformação sustentável de biomassa em um espectro de produtos comercializáveis e de energia. Desta maneira, os desafios atuais em aplicações de microalgas, sob o ponto de vista da sustentabilidade, propõe uma estrutura inovadora para a biorrefinaria microalgal, que pode realizar a produção de vários produtos de interesse comercial (ZHU et al., 2015). Assim, a remoção de nutrientes e como consequência a biomassa gerada deve ser investigada no contexto de implementação de uma biorrefinaria. Neste sentido a produção de compostos celulares como proteínas, carboidratos e lipídios por *Aphanothece microscopica* Nägeli quando cultivada em condições heterotróficas a 20°C, são discutidas neste item, a partir do desenvolvimento

de três experimentos em batelada visando avaliar a produção de proteína, lipídios e minerais quando este micro-organismo é desenvolvido no efluente de laticínio. O efluente utilizado apresentou características similares ao efluente utilizados nas fases anteriores do trabalho. Os dados de caracterização do efluente para esta fase do trabalho são expressos na Tabela 13.

Tabela 13. Caracterização do efluente da indústria de laticínio.

Parâmetros	mg.L ⁻¹
pH	8,4±0,9
N-N-NTK	32,6±9,0
DQO	760±169
PT	19,8±3,2
PRD	6,0±0,1

pH: potencial hidrogeniônico; N-N-NTK: nitrogênio total Kjeldahl (mg.L⁻¹); DQO: demanda química de oxigênio (mg.L⁻¹); PT: fósforo total (mg.L⁻¹); PRD: fósforo reativo dissolvido (mg.L⁻¹). Dados obtidos a partir de 9 repetições.

5.6.1 Composição química da biomassa de *Aphanothece microscopica* Nägeli desenvolvida em condições heterotróficas

A composição bioquímica de cianobactérias e microalgas é significativamente variável em função de diferentes fatores, como meio de cultivo, condições ambientais, espécie e fase de crescimento, entre outros (FIDALGO et al., 1998; ROMANO et al., 2000; OMAR et al., 2001; ZEPKA et al., 2007; CHISTI, 2007; HU et al., 2008; HORNES et al., 2010; ZHU et al., 2015). A Tabela 14 apresenta as variações das concentrações de proteínas, carboidratos, lipídeos e cinzas na biomassa de *Aphanothece microscopica* Nägeli, quando o micro-organismo é cultivado no efluente da indústria de laticínio na ausência de luz.

Tabela 14. Concentrações de proteínas, carboidratos, lipídios e cinzas em biomassas de *Aphanothece microscopica* Nägeli extraídas em diferentes fases de crescimento.

Fases de crescimento	Parâmetro				
	Proteína (g.100g ⁻¹)	Carboidratos (g.100g ⁻¹)	Lipídios (g.100g ⁻¹)	Cinzas (g.100g ⁻¹)	Umidade (%)
Início	46,8 ^a ±0,2	31,4 ^a ±0,2	2,3 ^a ±0,04	11,1 ^a ±0,04	8,5 ^a ±0,03
Meio	41,8 ^b ±0,1	28,5 ^b ±0,7	10,4 ^b ±0,3	10,8 ^a ±0,7	8,6 ^a ±0,2
Fim	46,8 ^a ±0,2	25,8 ^c ±0,2	8,9 ^c ±0,2	9,8 ^b ±0,2	8,7 ^a ±0,1

Letras diferentes indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$), segundo o teste de Tukey, entre as concentrações de proteína, carboidratos, lipídios e cinzas. Dados obtidos a partir de 9 repetições.

Analisando os dados expressos na Tabela 14, observa-se que é notória a diferença em teor de lipídio no início do cultivo em relação a fase exponencial e ao final dos

experimentos. É importante salientar, que no início da fase de crescimento a biomassa corresponde a uma cultura desenvolvida em condições autotróficas, uma vez que o inóculo utilizado foi desenvolvido em meio BG11 a 20°C. A baixa concentração registrada se justifica, uma vez que a produção de lipídios é inversamente proporcional a atividade fotossintética (BECKER, 1994). Observa-se, que independente da fase de crescimento, os teores de lipídios são registrados em menor concentração, com a predominância em proteínas seguido de carboidratos.

De acordo com Parsonet al., (1984) e Fogg; Thake (1987), a proteína é o constituinte mais abundante em todas as classes de microalgas. Os valores obtidos encontram-se na faixa de concentração (40-60 %), citada por diversos autores para diferentes espécies (ANUPAMA; RAVINDRA, 2000; MORIST et al., 2001; DANESI et al., 2002; ZEPKA et al., 2008). Estes valores estão dentro, também, do intervalo de concentrações descritos para esta espécie, quer coletada diretamente do meio ambiente (30,29 - 43,71 %), conforme descrito por Queiroz et al., (1998) ou desenvolvido no efluente da parboilização do arroz, com mínimos e máximos de 41,3 e 46,8 %, respectivamente (ZEPKA et al., 2008). Estas expressivas concentrações em proteína, fazem desta biomassa importante elemento para a implementação de uma biorrefinaria microalgal a partir deste micro-organismo, não só pelo aspecto quantitativo como qualitativo. Streit (2014) avaliou o perfil aminoacídico da *Aphanothece microscopica* Nägeli desenvolvida em iguais condições de cultivo utilizada neste trabalho verificando que a composição em aminoácidos essenciais, encontravam-se em concentrações superiores ao preconizado pela FAO/WHO (1995).

Fidalgo et al., (1998) estudando o efeito de diferentes fontes de nitrogênio no crescimento de microalgas, verificaram que a concentração de biomoléculas nas células, são mais afetadas pela idade da cultura, do que pela fonte de nitrogenado. Comparando-se os valores registrados para as diferentes fases de crescimento, observa-se no final do experimento, um aumento nas concentrações em proteína e redução de lipídio e carboidratos em relação a fase exponencial, com concentrações significativamente diferentes ($p \leq 0,05$). Lourenço et al., (2007) trabalhando com *Isochrysisgalbana* obteve comportamento similar na distribuição de proteínas, carboidratos e lipídios. De qualquer forma, o comportamento fisiológico da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli desenvolvida no efluente de laticínio na ausência de luz é caracterizado pelo acúmulo de lipídios em maior concentração quando comparado ao crescimento autotrófico (Tabela

13) a julgar pelo teor em lipídios registrado na fase inicial do experimento, a qual corresponde ao inoculo na fase exponencial em crescimento autotrófico.

A literatura reporta que para diferentes espécies de microalgas a diferentes temperaturas (20-30°C) a concentração de carboidratos a 30°C é inferior que a obtida a 20°C, (ARAÚJO; GARCIA, 2005; RENAUD et al., 2002). Zepka et al., (2008), encontraram para a biomassa da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli cultivada a 30°C no efluente da parboilização do arroz, valores médios de carboidratos de 17,7 %, para as mesmas condições de secagem submetida a biomassa neste trabalho. Neste sentido, verifica-se que a condição de isoterma (20°C), utilizada no crescimento heterotrófico em efluente de laticínio favoreceu a produção não apenas de proteína, como também de carboidratos.

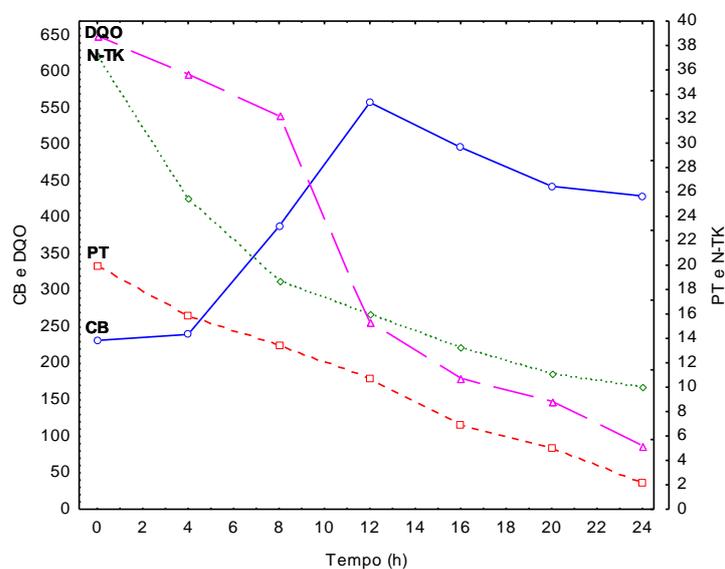
O intervalo de concentração em carboidrato (25,8 a 31,4 %) situa-se na variação registrada na literatura para microalgas e cianobactérias, em que são reportados valores de 10 a 40 % em peso seco (ANUPAMA; RAVINDRA; 2000; ZEPKA et al., (2008).

Estudos recentes indicam, que existe uma relação específica entre limitação de nutrientes intracelulares e a composição da biomassa gerada. Assim, é defendida a hipótese de que há uma concentração mínima de nutrientes intracelulares, na qual um determinado componente da biomassa encontra-se em sua concentração máxima, a qual é gradualmente reduzida, quando a concentração de nutrientes intracelulares aumenta (MARKOU, 2012; ADAMS et al., 2013; STENHOFF et al., 2014). De acordo com Adams et al., (2013) este efeito da limitação de nutriente para a microalga parece estar relacionado com a espécie. Desta maneira, a escolha de uma espécie depende fortemente dos compostos desejados, cada espécie tem como se fosse uma impressão digital, que identifica seu perfil bioquímico, que pode ser modificado pelas condições de cultivo (STEINHOFF et al., 2014). De acordo com Castro (2007), o nitrogênio é elemento fundamental para o crescimento, sua escassez no meio, causa um estresse nutricional afetando o fluxo metabólico de formação de determinados compostos bioquímicos, sendo a síntese proteica, severamente afetada, bem como a síntese celular. Considerando-se a concentração de proteína registrada neste trabalho é possível sugerir que o teor de compostos nitrogenados disponíveis no efluente da indústria de laticínio (Tabela 12) foi suficiente para suportar o crescimento e a produção de compostos celulares.

A associação de produção de compostos celulares com a disponibilidade de nutrientes do efluente da indústria de laticínio, pode resultar em importante critério para produção de compostos de interesse sob escopo de uma biorrefinaria. A carência de

nitrogênio no meio de cultivo, bem como controle de temperatura, podem estimular a síntese de compostos não nitrogenados conduzindo ao aumento de lipídios e carboidratos. Por outro lado, em meio com alta concentração de nitrogênio dissolvido há o favorecimento à síntese e ao acúmulo de proteínas (LOURENÇO et al., 1997; OLGUIN et al., 2001). No entanto, de acordo com diferentes autores (LOURENÇO et al., 2007; CHEN et al., 2011; SIAUT et al., 2011), em condições de deficiência de nitrogênio, ocorre uma redução nos teores de proteínas, tendo em contra partida um aumento em componentes celulares ricos em energia, como carboidratos e proteínas. Siaux et al., (2011), reportam que a biossíntese de carboidrato ocorre primeiro, e posteriormente, os lipídios são produzidos como compostos de reserva de longo prazo, em caso de estresse ambiental prolongado. Assim o aumento substancial (4,6 vezes) em lipídios (Tabela 13) na biomassa do início do cultivo para a fase logarítmica, pode estar associado a disponibilidade de nitrogênio no meio. Esta constatação é corroborada pelo comportamento da Figura 8 que descreve o crescimento celular e a variação das concentrações de nutrientes no meio com o tempo de cultivo.

Figura 8. Variação da concentração de nutrientes e de biomassa com o tempo de cultivo.



CB: concentração em biomassa (mg.L⁻¹); DQO: demanda química de oxigênio (mg.L⁻¹); N-N-TK: nitrogênio total Kjeldahl (mg.L⁻¹); PT: fósforo total (mg.L⁻¹).

Avaliando o comportamento da Figura 8, verifica-se no início do cultivo concentrações em N-N-TK na ordem de 32,6 mg.L⁻¹. De acordo com Tevatia; Demires; Blum (2012), o esgotamento de nitrogênio em culturas microalgais, aumentam a produção de lipídios e está indiretamente relacionado ao crescimento da biomassa. Os resultados demonstram que a maior concentração em lipídio (10,4 %) é obtida quando a

máxima concentração em biomassa (558 mg.L^{-1}) é registrada, em 12 h de cultivo (Fig. 8 e Tabela 14) na fase exponencial de crescimento, quando 63 % de N-NTK foi removido.

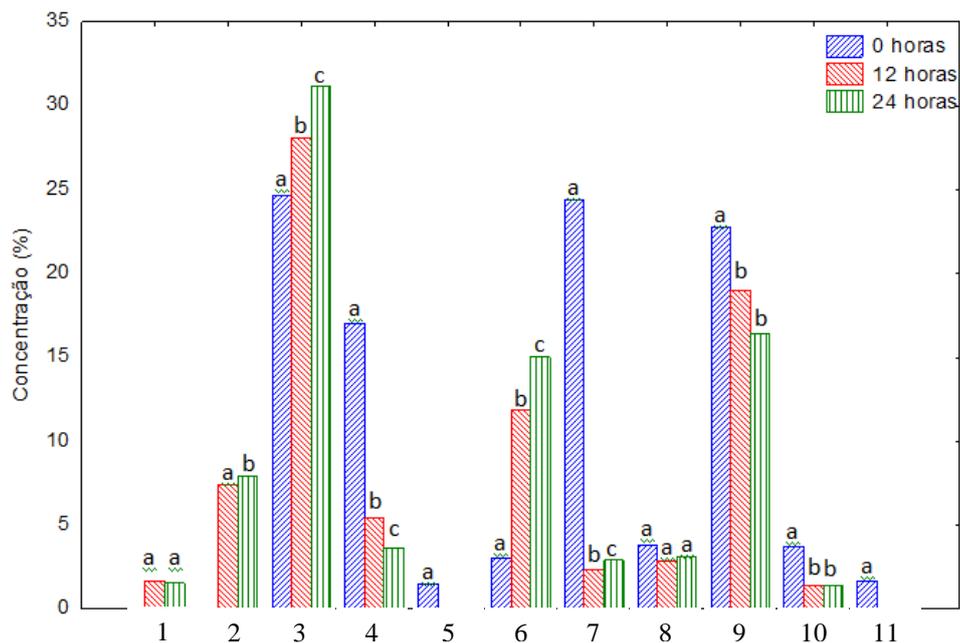
No que se refere aos teores de cinzas, observam-se reduções estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$ %) entre os valores obtidos para a biomassa gerada na fase exponencial e a gerada no final do experimento. Fuentes et al., (2000) reportam uma relação inversa dos teores de cinzas com o tempo de residência em microalgas, atribuindo este fato ao acúmulo de nutrientes minerais no interior da célula, visando compensar a alta pressão osmótica do meio de cultivo. É sabido, que microalgas e cianobactérias podem acumular reservas intracelulares de fósforo e compostos nitrogenados inorgânicos como nitrato, nitrito e amônia (BOLSUNOVSKII; KOSINERO; 2000; POWEEL et al., 2009; HORNES et al., 2010; POWEEL et al., 2011). É importante salientar que foi registrado para biomassa de *Aphanothece microscopica* Nägeli, cultivada a 20°C , no efluente de laticínio, acúmulo de fósforo total na fase exponencial de crescimento, com reduções na final do experimento (Tabela 10), comportamento este, similar ao registrado neste trabalho, para os teores de cinzas. Isso pode justificar a distribuição dos teores de cinzas obtidos em função do crescimento do micro-organismo em análise. Estas concentrações registradas são superiores ao obtidas por outros autores para diferentes microalgas e condições de cultivo (BOROWITZA, 1994; LOURENÇO et al., 1997; ANUPAMA; RAVINDRA, 2000; GRIMA et al., 2003). No entanto, Fuentes et al., (2000), reportam valores no intervalo de 16,8 a 23,6 % para *Phyridium cruentum*, quando cultivado a 20°C a diferentes intensidades de luz. Valores elevados de cinzas foram também encontrado por Fidalgo et al., (1998) em *Isochrysisgalbana*, cultivada a 18°C em diferentes fontes de nitrogênio.

5.7 Avaliação do perfil lipídico da *Aphanothece microscopica* Nägeli

Uma série de fatores são capazes de alterar significativamente a composição das cianobactérias, tais como intensidade luminosa temperatura e disponibilidade de nutrientes, bem como as técnicas de preservação as quais são submetidas (MORRIS et al., 2001; MURADYAN et al., 2004; ZEPKA et al., 2007).

A Figura 9 apresenta o perfil de ácidos graxos da *Aphanothece microscopica* Nägeli na fase exponencial de crescimento quando desenvolvida em condições autótrofas (inóculo) e em crescimento heterotrófico, na fase exponencial (12 h) e no final do experimento (24 h).

Figura 9. Perfil de ácidos graxos da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli, desenvolvida no efluente de laticínio a 20°C.



C12:0: ácido láurico (1); C14:0: ácido mirístico (2); C16:0: ácido palmítico (3); C16:1: ácido palmitoléico (4); C17:0: ácido heptadecanoico (5); C18:0: ácido esteárico (6); C18:1: ácido oleico (7); C18:2: ácido linoléico (8); C18:3n3: ácido α -linolênico (9); C18:3n6: ácido γ -linolênico (10) e C20:5n3: ácido eicosapentaenóico. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$), segundo o teste de Tukey. Dados obtidos a partir de 9 repetições.

A literatura reporta que os lipídios das microalgas são constituídos por diferentes ácidos graxos saturados e insaturados, alguns deles da família ω -3 e ω -6 (HU et al., 2008; Huang et al.; 2010). Apresentando como ácido graxo majoritário entre os saturados o ácido palmítico (C16:0) e entre os insaturados oleico (C18:1:), linoleico (C18:2) e γ -linolênico (C18:3) (REZANKA et al., 2003; HU et al., 2008). No geral, os saturados e monosaturados perfazem a maior fração nas microalgas (BOROWITZA, 1988). Este comportamento pode ser visualizado para a *Aphanothece microscopica* Nägeli analisando a Figura 9 e Tabela 14.

Avaliando o comportamento do perfil de ácidos graxos obtido para o inóculo (crescimento celular em condições autótrofas), e o perfil de ácidos graxos encontrados para a biomassa desenvolvida no efluente da indústria de laticínio na ausência de luz, verifica-se que os ácidos graxos caracterizam-se por apresentarem de 16 a 20 átomos de carbono na cadeia. Comparando o perfil de ácidos graxos do inóculo com o registrado para biomassa cultivada em condições heterotróficas, observa-se segundo o teste de diferença de médias de Tukey, diferenças significativas ($p \leq 0,05$) para todos ácidos graxos detectados, independente do tamanho da cadeia, o que evidencia a influência do meio de cultivo. Observa-se a predominância em ácidos graxos poli-insaturados, destacando-se a

presença do ácido graxo essencial γ -linolênico (C18:3), que independente da condição de cultivo e da fase de crescimento foi o ácido graxo poli-insaturado majoritário. Esta constatação é corroborada por diferentes autores (BOROWITZA et al., 1984; BOROWITZA; BOROWITZA, 1988; MORIST et al., 2001; LI; WATANABE, 2001; LOURENÇO et al., 2007), que reportam que as cianobactérias podem ser consideradas fonte potencial de γ -linolênico.

No homem o γ -linolênico é sintetizado a partir do linoleico proveniente da dieta, mas fontes externas deste ácido graxo são necessárias para compensar a deficiência da síntese induzida por doenças ou envelhecimento (DUBACQ; QUOC, 1993). A cianobactéria *Spirulina platensis* é considerada uma fonte potencial em γ -linolênico o qual representa cerca de 20 % do total de ácidos graxos presentes (DESHNIUM et al., 2000). A Figura 9 expressa concentrações na ordem de 22,8 % e 19,0 % deste poli-insaturado, para o inoculo e biomassa na fase exponencial de crescimento em cultivo heterotrófico, em condições isotérmicas de 20°C. Em termos de ácidos graxos majoritários o perfil de ácidos graxos da *Aphanothece microscopica* Nägeli é caracterizado pelo ácido palmítico, com aumentos significativos ($p \leq 0,05$), com as fases de crescimento, ácido oléico (C18:1), com reduções em torno de 90 % com o tempo de cultivo, ácido γ -linolênico, com reduções de 16,7 % na fase exponencial e palmitoleico com reduções de 67,6 % na fase exponencial. Esta constatação torna-se importante, uma vez que a temperatura é um dos fatores que influenciam no tipo de ácido graxo produzidos pelas microalgas.

As cianobactérias com base no seu perfil de ácidos graxos e padrão de dessaturação, podem ser classificadas em 4 grupos (MURATA et al., 1992; TOCHER; LEAVER; HODGSON, 1998). De acordo com estes autores, as cianobactérias do grupo 2 sintetizam lipídios que contem ácidos graxos C18, com nenhuma, uma, duas ou três duplas ligações no $\Delta 9$ e $\Delta 12$ e $\omega 3$ ou $\Delta 15$ nas posições sn-1 e ácidos graxos C16 com nenhuma ou uma dupla ligação na posição $\Delta 9$ na posição sn-2. Em face do exposto tomando como base o perfil lipídico expresso na Figura 9, é possível classificar a *Aphanothece microscopica* Nägeli como pertencente ao grupo 2.

A estratégia de mudança de temperatura tem sido empregada para melhorar a produção de ácidos graxos em microalgas, uma vez que a temperatura ideal para o crescimento é muitas vezes maior que para a formação de determinados ácidos graxos, como os da família $\omega 3$ (JING; CHEN; 2000; WHEN; CHEN; 2015). Zepka et al., (2007), encontraram para o perfil em ácidos graxos da cianobactéria *Aphanothece microscopica*

Nägeli desenvolvida no efluente da parboilização do arroz a 30°C, o ácido γ -linolênico como majoritário, em concentrações superiores a 30 %, seguido por palmítico (> 30 %) e linolênico (14 %). Comparando estes dados com os obtidos no presente trabalho, verifica-se em 12 horas de cultivo para a biomassa desenvolvida a 20°C no efluente de laticínio concentrações menores, na ordem de 22,8 %, 24,6 % e 3,8 % para γ -linolênico, palmítico e linolênico respectivamente. Esta constatação demonstra notória influência do meio e da temperatura de cultivo no perfil de ácidos graxos.

Sharathchandra; Rajashekhar (2011), avaliando 13 espécies de cianobactérias, na fase exponencial de crescimento, cultivadas em meio BG11 quanto ao perfil de ácidos graxos. Os autores registraram como ácidos graxos principais, palmítico, oleico, linoléico, com predominância de oleico entre os insaturados. O perfil expresso na Figura 9 para o inoculo também desenvolvido em meio BG 11, é similar ao descrito para as 13 espécies avaliadas, diferindo no entanto quanto a concentração de ácidos graxos saturados e em especial ao poli-insaturado γ -linolênico, em que concentrações de 22,8 % do total de ácidos graxos foi registrado para a *Aphanothece microscopica* Nägeli. Das 13 espécies avaliadas, apenas uma indicou a presença de γ -linolênico. Quanto aos ácidos graxos saturados láurico (C12:0), mirístico (C14:0), heptadecanoico (C17:0) e esteárico (C18:0), concentrações abaixo de 10 %, foram encontradas para diferentes cianobactérias avaliadas. Este perfil quali-quantitativo em ácidos graxos saturados se reflete também para as biomassas da cianobactérias em análise neste trabalho, no entanto, com ausência de láurico e mirístico na biomassa desenvolvida em meio BG11.

A análise da Figura 9 revela ainda, expressivo aumento nas concentrações em ácidos graxos saturados às expensas de reduções de insaturados. De acordo com diferentes autores, o conteúdo de lipídios em cianobactérias, tende a ser inversamente proporcional a taxa de crescimento, com indução das células a acumularem reservas de lipídios ricos em ácidos graxos saturados, para armazenamento de carbono em culturas com maior tempo de residência (BOROWITZA et al., 1984; ROMANO et al., 2000; FUENTES et al., 2000; KHOZIN-GOLDBERG; COHEN, 2006). Este comportamento é evidenciado, quando se avalia a distribuição dos ácidos graxos expressos na Figura 9 e os teores de lipídios obtidos para as diferentes fases de crescimento (Tabela 14). É possível verificar que a menor concentração em lipídio ($8,91\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$), é registrada no ponto da curva de crescimento (Figura 8), em que foram obtidos os maiores teores de ácidos graxos saturados, em destaque C16:0 (31,1 %) e C18:0 (15 %).

A Tabela 15 expressa às concentrações em ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poli-insaturados, assim como as relações entre poli-insaturados e saturados nas diferentes fases de crescimento.

Tabela 15. Porcentagens em ácidos graxos saturados, insaturados e razões AGPI/AGS em biomassas de *Aphanothece microscopica* Nägeli.

Ácidos graxos	0 h	12 h	24 h
Saturados	29,2±0,9	49,8±0,6	55,7±3,2
Monoinsaturados	41,4±1,2	7,9±0,1	6,7±0,4
Poli-insaturados	32,0±4,1	23,3±0,1	21,0±1,8
AGPI/AGS*	1,1±0,2	0,5±0,0	0,4±0,0

*AGPI/AGS: razão ácidos graxos poli-insaturados e saturados. Dados obtidos a partir de 9 repetições.

A análise dos dados da Tabela 15, revela que o perfil lipídico do inóculo de *Aphanothece microscopica* Nägeli cultivada em condições autótrofas, resulta em uma alta relação de ácidos graxos poli-insaturados em função do conteúdo de saturados. No entanto, observa-se também a influencia do meio de cultivo quando comparamos as razões AGPI/AGS encontradas a 12 e 24 h de cultivo. Zepka et al., (2007), obtiveram para o micro-organismo em análise razões AGPI/AGP na ordem de 1,48, valor este três vezes maior que o estipulado pela FAO, quando a biomassa foi desenvolvida no efluente da parboilização do arroz a 30°C. Segundo a FAO/WHO, (1998) o valor AGPI/AGS recomendado para a dieta humana é de relações superiores a 0,45.

5.7.1 Influência da redução de temperatura e tempo de reação na produção de lipídios por *Aphanothece microscopica* Nägeli

Uma série de trabalhos são focados na questão da influencia do estresse das microalgas visando a produção de lipídios (RENAULD et al., 1995; RENAULD et al., 2002; ARAÚJO; GARCIA, 2005, LI; WU; LAN; 2008; HU et al., 2008; RODOLFI et al., 2009; XIN et al., 2010; CHEN et al., 2011; HO et al., 2014). Hu et al., (2008), reportam que a temperatura apresenta-se como importante fator que influencia o teor de lipídios em microalgas. Embora a composição e armazenamento de lipídios sejam específicos da espécie e controlado pela constituição genética individual do organismo, existem mecanismos intrínsecos na maioria das espécies de micro-organismos produtores de lipídios que sob determinado estresse atuando individualmente ou em sinergia fazem com que a produção de lipídios aumente (CHEN et al., 2011; HO et al., 2014).

Avaliando o comportamento da Figura 8, verifica-se que a maior concentração de lipídio obtida (10,8 g.100g⁻¹), corresponde a maior concentração de biomassa (558 mg.g⁻¹

¹) registrada em todo período experimental, demonstrando que o acúmulo de lipídios é dominado pela taxa de crescimento da população cianobacteriana.

O acúmulo de compostos celulares ricos em energia geralmente ocorrem em condições de estresse. Assim uma estratégia otimizada a fim de aumentar o teor de lipídios é desejável (XIN et al., 2010; SAN PEDRO et al., 2013; HU et al., 2014). Uma forma de aumentar a produção de lipídios seria cultivar o máximo de biomassa em uma primeira etapa e em seguida induzir o acúmulo de lipídios (XIN et al., 2010; SAN PEDRO et al., 2013). Isso sugere, que o consorcio entre o tratamento de efluente da indústria de laticínio na ausência de luz por *Aphanothece microscopica* Nägeli a temperatura de cultivo de 20°C utilizada neste trabalho, seguida de um choque térmico por redução de temperatura no ponto de maior produção de lipídios, poderia resultar em um duplo propósito de tratamento de efluente e produção de matéria-prima sob escopo de uma biorrefinaria.

A temperatura é fator fundamental no desenvolvimento de bioprocessos, devido seus efeitos nas atividades metabólicas de cianobactérias e micro-organismos em geral . Assim, a temperatura pode ser manipulada a fim de maximizar a produção de biocompostos (PARMAR et al., 2011; DONOT et al., 2012).

Observa-se (Figura 8), em 12 h de cultivo, quando o máximo de lipídios é produzido nas condições experimentais , concentrações 14 mg.L⁻¹e 257 mg.L⁻¹ N-NTK e DQO respectivamente na fase líquida do reator. Estes valores estão dentro dos padrões de emissão para líquidos estipulados pela legislação brasileira (COSEMA, 2006), que dispõe sobre a fixação de padrões para fontes de emissões que lancem seus efluentes em águas superficiais no Estado do Rio Grande do Sul. Neste sentido, experimentos foram desenvolvidos mediante reduções de temperatura de culturas em crescimento heterotróficos a 20°C no efluente da indústria de laticínio após atingirem o máximo crescimento celular (12 h).

A Tabela 16 apresenta os efeitos das estimativas para as variáveis independentes tempo e temperatura de reação, assim como a interação destes fatores para a resposta produção de lipídios, quando culturas de *Aphanothece microscopica* Nägeli é submetida a reduções de temperatura.

Tabela 16. Análise dos efeitos para a resposta produção de lipídios por *Aphanothece microscopica* Nägeli.

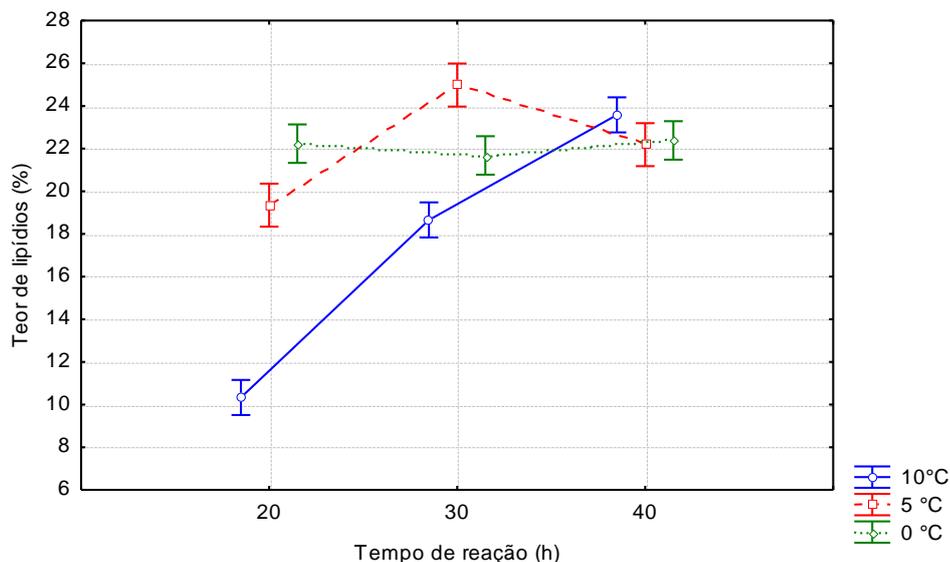
Fatores	Efeito	Erro
X _{1(L)}	5,4	0,3
X _{1(Q)}	1,8	0,3
X _{2(L)}	-4,6	0,3
X _{2(Q)}	2,4	0,3
X _{1(L)} X _{2(L)}	6,6	0,4

X₁: tempo de reação (h); X₂: temperatura (°C); X₁X₂: interação entre a razão tempo de reação e temperatura; Dados obtidos a partir de 9 repetições. $p \leq 0,05$.

A análise dos dados revela que os efeitos principais das variáveis independentes (X₁ e X₂), foram significativos ($p \leq 0,05$) para a resposta produção de lipídios. Observa-se efeitos positivos tanto para a variável tempo de reação como interação entre as variáveis avaliadas. O efeito negativo registrado para a variável temperatura de reação (X₂), evidencia a tendência do aumento da produção lipídica com a redução de temperatura. Isso justifica as maiores concentrações em lipídios para as biomassas geradas nas culturas submetidas a menores temperaturas, o que pode ser corroborado pelo comportamento das Figuras 10 e 11.

A Figura 10 apresenta as diferenças de média ($p \leq 0,05$), segundo o teste de comparação de média de Tukey para os teores de lipídios das biomassas em função das variáveis avaliadas. É notória a influência do tempo de reação, quando se utiliza as maiores temperaturas (10 e 5°C), com aumentos significativos em 30 h de cultivo, sendo a maior concentração registrada (25,44 %) quando a cultura é submetida a 5°C. No entanto a 0°C, não é evidenciada qualquer influência do tempo de reação. Salienta-se que para o tempo de reação correspondente a 40 h não houve diferenças significativas entre os teores de lipídios das biomassas submetidas a diferentes temperaturas.

Figura 10. Avaliação do teor de lipídios em função do tempo e da temperatura de reação.



Traços na vertical expressam diferenças significativas ($p \leq 0,05$), segundo o teste de comparação de médias de Tukey

A Equação 12 apresenta o modelo codificado gerado a partir da análise de regressão para a variável resposta produção de lipídios, considerando os efeitos significativos e interações dos fatores avaliados (tempo de reação e temperatura de reação biológica).

$$\text{Lipídios (g.100.g)} = 9,14463 + 0,99867x_1 - 0,17594x_1^2 - 1,47867x_2 - 0,09438x_2^2 + 0,0655x_1 \cdot x_2$$

Equação 12

$$R^2 = 0,90$$

O modelo obtido apresenta bom ajuste, a julgar pelo valor do coeficiente de determinação validando o modelo como significativo ao nível de confiança de 95 %. O coeficiente de determinação obtido demonstra que 90 % da variabilidade das respostas se ajustam aos dados experimentais.

A eficiência estatística do polinômio é validada pelo teste de Fisher. É possível verificar que a 95 % de confiança, de acordo com a análise de variância expressa na Tabela 17 que o valor do $F_{\text{calculado}}$ é 14,7 vezes maior que o $F_{\text{crítico}}$. De acordo com Box; Witz (1973), para que uma regressão seja não apenas estatisticamente significativa, mas também útil para fins preditivos a razão entre os quadrados médios da regressão e do resíduo deve ser no mínimo de 4 a 5 vezes o valor do $F_{\text{crítico}}$.

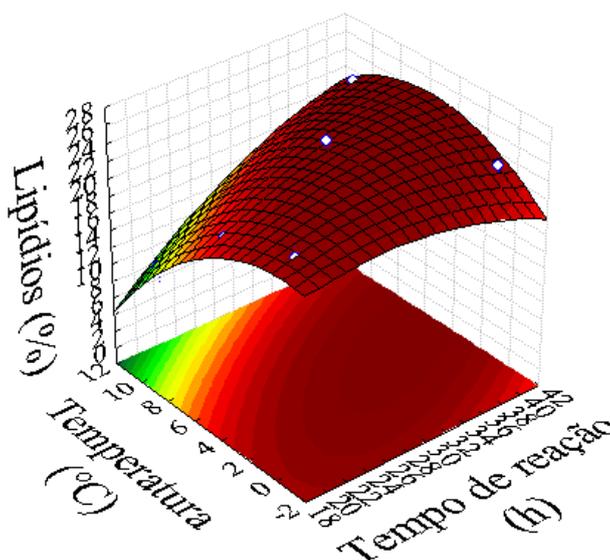
Tabela 17. Análise de variância para o ajuste do modelo polinomial, segundo o planejamento experimental utilizado.

Fonte de Variação	Lipídios				
	SQ	GL	MQ	F _{Calc}	F _{Tab}
Regressão	406,6	5	81,3	36,95	2,51
Resíduo	45,9	21	2,2		
Falta de ajuste	38,4	3			
Erro puro	7,5	18			
Total	452,5	26			

SQ: soma dos quadrados; GL: graus de liberdade; MQ: quadrados médios; F_{Calc}: F calculado; F_{Tab}: F tabelado. Dados obtidos a partir de 9 repetições.; $p < 0,05$.

A avaliação segundo o teste de Fisher, permite afirmar que o modelo descrito pela Eq.12 é significativo e preditivo, podendo ser utilizado para gerar o diagrama expresso na (Figura 11).

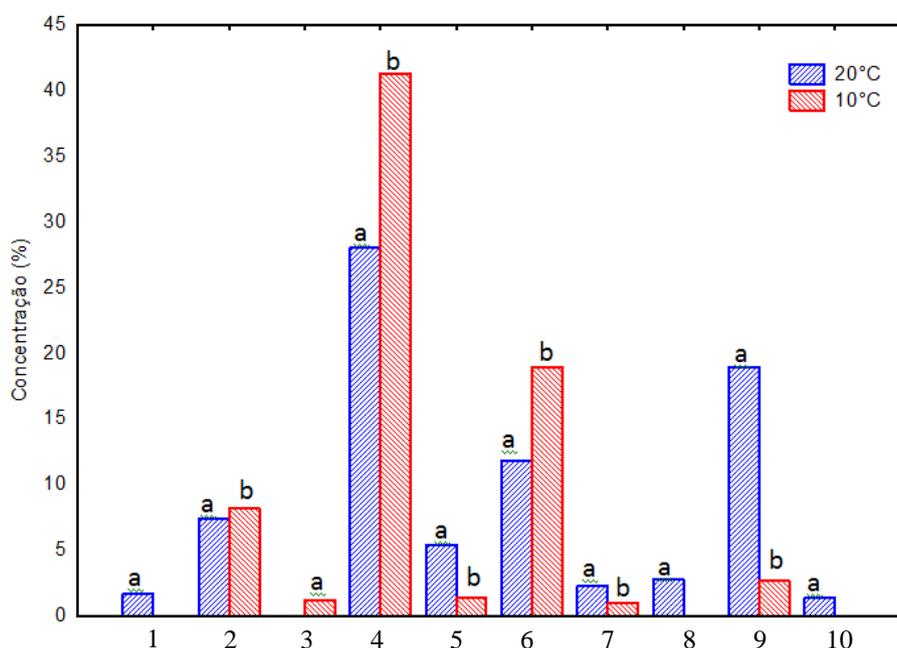
Figura 11. Superfície de resposta para produção de lipídios por *Aphanothece microscopica* Nägeli.



A superfície de resposta gerada elucidada, que tanto a temperatura como o tempo de reação exercem influencia na produção de lipídios. Contudo, a trajetória em que a resposta requerida varia de forma mais pronunciada corresponde a submissão da cultura a 5°C por 30 minutos. No entanto, observa-se ainda, que não são detectadas diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre os teores de lipídios nas biomassas submetidas a diferentes temperaturas para o tempo de reação de 40 h. São registrados acréscimos de lipídios na ordem de 2,13; 2,10 e 2,10 vezes maior que o obtido a 20°C, que foi de 10,8 g.100g⁻¹

(Tabela 14) em 12 h de cultivo, a 10;5 e 0°C respectivamente. Embora uma análise econômica se faça necessária, para avaliar a questão do gasto energético para execução do processo, os dados obtidos sugerem que reduções de temperatura a 10°C pode ser uma estratégia viável para produção de lipídios por *Aphanothece microscopica* Nägeli. Neste sentido, a Figura 12 nos fornece uma análise comparativa entre os perfis de ácidos graxos da biomassa de *Aphanothece microscopica* Nägeli desenvolvida no efluente de laticínio a 20°C e a 10°C.

Figura 12. Comparação entre a composição de ácidos graxos em cultivo heterotrófico a 10°C e 20°C.



C12:0: ácido láurico (1); C14:0: ácido mirístico (2); C15:0: ácido pentanodecanoico (3); C16:0: ácido palmítico (4); C16:1: ácido palmitolêico (5); C18:0: ácido esteárico (6); C18:1: ácido oleico (7); C18:2: ácido linolênico (8); C18:3n3: ácido α -linolênico (9); C18:3n6: ácido γ -linolênico (10). Letras diferentes indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$), segundo o teste de Tukey. Dados obtidos a partir de 3 experimentos.

O efeito da temperatura tem sido considerado um dos fatores de maior importância nos tipos de ácidos graxos produzidos por microalgas (ACKMAN et al., 1968; JATU; MURATA, 1980; THOMPSON et al., 1992; HU et al., 2008). A temperatura pode afetar marcadamente o perfil lipídico com relação a proporção entre saturados e insaturados (SAKAMOTO et al., 1997; KISELEVA et al., 1999; HU et al., 2008; XIN et al., 2011). As cianobactérias de uma maneira geral dessaturam os ácidos graxos da membrana, como resposta a baixa temperatura, uma vez que o acréscimo de insaturados ajuda a manter a fluidez da membrana, que é reduzida sob condições de baixa temperatura (KISELEVA et al., 1999). No entanto, quando se avalia o comportamento da Figura 12, verifica-se que os dados obtidos não seguem a tendência descrita por estes

autores. São registrados substanciais aumentos nos teores de ácidos graxos saturados e reduções em poli-insaturados, para o perfil descrito para biomassa obtida a 10°C, quando comparado ao perfil registrado a 20°C. Em cianobactérias os lipídios são encontrados nas membranas, assim a insaturação dos lipídios a baixa temperatura deve representar uma aclimação ambiental desencadeada para melhor fluidez da membrana (KISELEVA et al., 1999; SINGH; SINHA; HADER, 2002). Neste contexto, é possível que a membrana proteja a inativação das desaturases quando submetidas à baixa temperatura. No entanto tem sido demonstrado que baixas temperaturas e escuro são fatores passíveis de causar danos irreversíveis nas membranas de cianobactérias (SINGH; SINHA; HADER, 2002). Em adição, o estresse osmótico que conduz a desidratação provoca alterações na composição lipídica, podendo diminuir drasticamente o grau de insaturação (NAVARI et al., 1993). Por outro lado, é consenso entre os pesquisadores que muitas microalgas, respondem a redução de crescimento em resposta ao estresse com o aumento da taxa de insaturados/saturados variando no entanto, este comportamento de espécie para espécie (AEKMAN et al., 1968; THOMPSON et al., 1992; RENAULD et al., 1995; OLIVEIRA et al., 1999; CHEN et al., 2008). Xin et al., (2011), encontraram para *Scenedesmus sp* cultivada a 10° C em meio *BG11* uma composição em ácidos graxos constituída de quase 100 % de ácidos graxos de cadeia longa (C16-C18). Observa-se para a biomassa de *Aphanothece microscopica* Nägeli a 10°C um total de 65,5 % de ácidos graxos C16 e C18, com a predominância de C16:0 (41,35 %) e C18:0 (19,02 %). Por outro lado, um importante fator que influencia a composição em ácidos graxos durante os cultivos em batelada de microalgas é a fase de crescimento (MANSOUR et al., 2003; KAUR et al., 2011). Kaur et al., (2011), estudaram a composição em ácidos graxos de *Scenedesmus sp* nas diferentes fases de crescimento, verificando importante acréscimos correspondentes a 2 vezes e 1,4 vezes mais na fase estacionária do que o registrado na logarítmica de crescimento em palmítico e esteárico respectivamente. O maior tempo experimental submetida biomassa a 10°C, pode justificar as altas concentrações em palmítico e esteárico registradas para a *Aphanothece microscopica* Nägeli. Estas constatações, demonstram a influencia da espécie, do tempo de cultivo, bem como do meio de cultivo no perfil lipídico das cianobactérias. Assim, o perfil lipídico obtido para cada micro-organismo, pode ser de importância específica para algumas aplicações, quer para a saúde, alimentação ou produção de combustível (PULZ; GROSS; 2004; SATO; MORIYAMA, 2007).

O biodiesel de microalgas vem sendo considerado a opção de energia alternativa mais promissora entre a energia eólica, solar e geotérmico (CHISTI, 2007; MATA et al., 2010), considerado única fonte renovável que possa atender a demanda mundial de combustíveis de transporte (CHISTI, 2008, STEINHOFF et al., 2014).

O tipo e a quantidade dos lipídios produzidos por espécies de microalgas influenciam diretamente a qualidade do biodiesel a ser obtido (KNOTHE, 2008; KUR et al., 2011; TALEBI et al., 2013). Os ácidos graxos mais encontrados em biodiesel têm sido descrito como o palmítico, esteárico, oleico, linoleico e linolênico (KNOTHE, 2008). Este perfil se ajusta ao encontrado para biomassa de *Aphanothece microscopica* Nägeli a 10°C e 20°C (Figura 9 e Figura 12), com destaque para os ácidos graxos palmítico e esteárico independente da temperatura e em γ -linolênico a 20°C. Estes resultados corroboram a perspectiva de aplicação do consorcio entre o tratamento do efluente de laticínio e produção de compostos celulares como estratégia de biorrefinaria microalgal.

5.8 Avaliação da perspectiva de implementação de uma biorrefinaria microalgal por *Aphanothece microscopica* Nägeli cultivada em condições heterotróficas

O uso de microalgas para produção de produtos celulares tem se destacado por apresentarem um potencial de produção facilmente integrado em uma biorrefinaria (ESPINOZA et al., 2014). Em especial, os sistemas heterotróficos trazem consigo vantagens tecnológicas, abrangendo processos homogêneos reprodutíveis, com taxas globais elevadas de biomassa e conseqüentemente compostos celulares (BUMBACK et al., 2011; PEREZ-GARCIA et al., 2011). Neste contexto biorreatores heterotróficos microalgais tem sido propostos como uma alternativa para contornar as limitações dos sistemas autotróficos (PEREZ-GARCIA et al., 2011). Assim neste item, é definido o volume útil de um biorreator heterotrófico, passível de tratar o efluente gerado pela indústria fornecedora da água residuária utilizada neste trabalho por *Aphanothece microscopica* Nägeli, bem como discutir as diferentes possibilidades de integrar a biomassa gerada no conceito de biorrefinaria.

5.8.1 Extrapolação dos dados obtidos em batelada para operação contínua

Os biorreatores heterotróficos microalgais tem sido propostos como um alternativa para contornar as limitações dos sistemas autotróficos (PEREZ-GARCIA et al., 2011), são de fácil escalonamento, eliminam a necessidade de utilização da luz oferecendo a possibilidade de aumentar significativamente a densidade celular em

culturas contínuas (CHEN, 1996). Os reatores em batelada são geralmente operados em condições isotérmicas a volumes constantes o que gera a praticidade de interpretação dos resultados. Assim é indicado para processos em pequena escala e usados sempre que possível para obter dados de cinética (LEVENSPIEL, 2011; FOGLER, 2012; SCHMAL, 2013). Dentre os dados cinéticos, a taxa de crescimento específico é uma medida de quão rapidamente a população microbiana está crescendo. Este parâmetro determina a cinética de manutenção do estado estacionário em reatores biológicos, operando com um volume constante.

A transposição teórica de reatores em batelada para contínuos é uma etapa fundamental para o projeto de reatores (PRAT et al., 2006). Este procedimento está baseado no conhecimento da cinética do bioprocessamento (MULLER-FUERGA et al., 2003). Assim, neste item é avaliada a extrapolação dos dados obtidos em reator descontínuo para operação contínua, visando estabelecer os parâmetros de projeto para o escalonamento do processo de remoção de nutrientes do efluente de laticínios e geração de compostos celulares sob escopo de uma biorrefinaria.

Valores elevados de velocidade específica de crescimento indicam altas taxas de crescimento (LACERDA et al., 2006). Nas condições otimizadas, máximas concentrações de fósforo e temperatura de 20°C, o valor de velocidade específica de crescimento de 3,95 d⁻¹ foi registrado (Tabela 4). Este valor foi superior ao obtido por outros autores para espécies de *Scenedesmus* e *Chlorella*, cultivadas em efluentes e meios sintéticos (TAM; WONG, 1996; MARTINEZ et al., 2000). Este valor (3,9 d⁻¹) é substancialmente superior ao obtido para esta cianobactéria em análise, quando cultivada no efluente da indústria da pesca (HORNE et al., 2010) e do efluente da parboilização do arroz (JACOB-LOPES et al., 2008). Tomando como base a velocidade específica de crescimento e a vazão de efluente gerado pela empresa fornecedora da água residuária utilizada neste trabalho, a partir da Equação 6 podemos calcular o volume útil de um reator heterotrófico contínuo para tratar o efluente e produzir compostos celulares, visando a implementação de uma biorrefinaria microalgal. Na Tabela 18 é possível verificar a discriminação e detalhamento do reator definido.

Tabela 18. Discriminação e detalhamento do biorreator heterotrófico

Parâmetros	Descrição
Vazão ($\text{m}^3 \cdot \text{d}^{-1}$)	950
Velocidade específica de crescimento (d^{-1})	3,9
Volume de trabalho do reator (m^3)	240,5

Os dados da Tabela 18 nos indicam, que a transposição da operação em batelada para operação contínua indicou a necessidade de um biorreator microalgal de $240,5 \text{ m}^3$ de volume útil de trabalho.

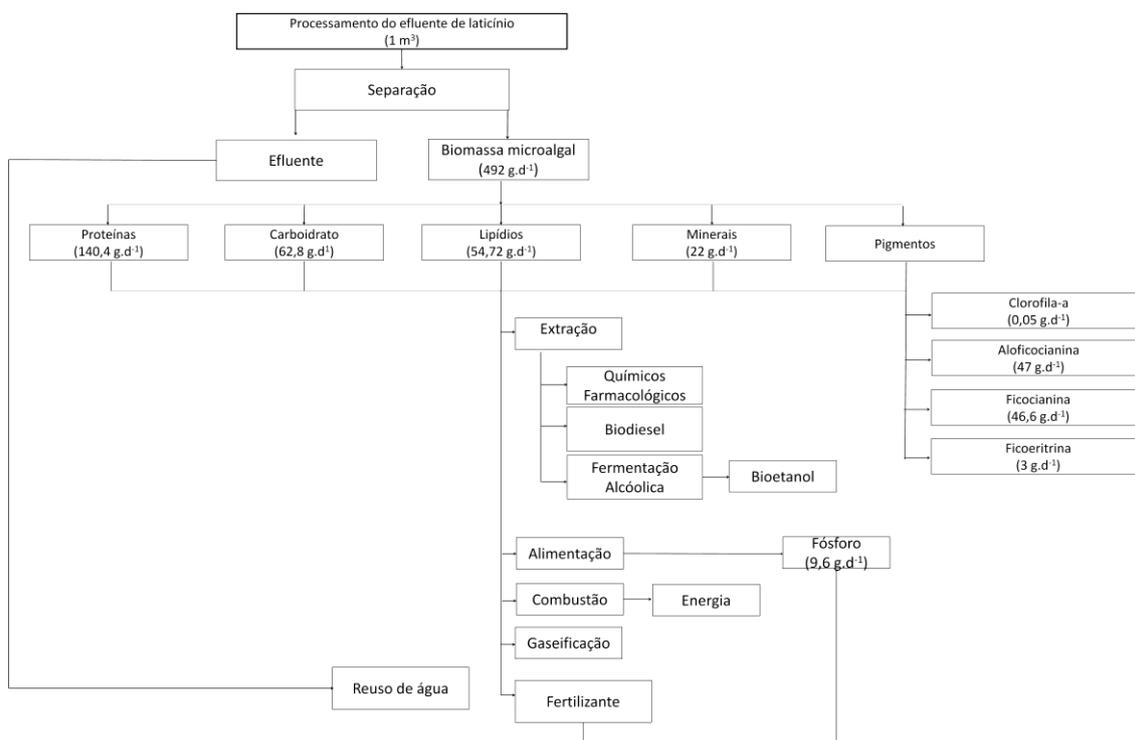
5.8.2 Possibilidades de integração da biomassa de *Aphanothece microscopica* Nägeli gerada no efluente de laticínio, no conceito de biorrefinaria

Muitos trabalhos têm sido focados no sentido do uso de produtos microalgais em uma diversidade de aplicações sucessivas (CHEN et al., 2011; VANTHOOR-KOOPMANS, 2013). Neste sentido, considerando que a associação do tratamento de efluentes agroindustriais com a produção de insumos de valor comercial tem sido considerada como iniciativa efetiva sob o ponto de vista do desenvolvimento sustentável industrial (QUEIROZ et al., 2013), a utilização do biorreator heterotrófico proposto para o tratamento do efluente de laticínio por *Aphanothece microscopica* Nägeli aponta a possibilidade do estabelecimento de uma biorrefinaria integrada ao processamento de laticínios. A Figura 1 expressa uma proposta de biorrefinaria algal, a partir da biomassa gerada no efluente de laticínio pela cianobactéria em análise. Analisando-se o diagrama, observa-se que pode ser gerado por *Aphanothece microscopica* Nägeli, quando desenvolvida em condições heterotróficas no efluente de laticínio, proteínas, carboidratos, lipídios e minerais (Tabela 14).

De acordo com Pignolet et al., (2013), os principais produtos microalgais que tem sido descrito se referem ao biodiesel, aos destinados a dieta humana e animal, suplementos alimentícios, aplicações farmacêuticas, nutraceuticos, e cosméticos.

Destacam-se entre os produtos celulares de microalgas, os pigmentos, os quais são empregados como corantes naturais em indústrias farmacêuticas e de alimentos, além de estarem vinculados a propriedades nutraceuticas em atividades funcionais de promoção a saúde, como ação anti-inflamatória, auxiliar de cicatrização e controle de cristais de oxalato de cálcio (FERRUZI; BLAKESLEE, 2007). Streit (2014), avaliou a produção de clorofila *a* e ficobiliproteínas por *Aphanothece microscopica* Nägeli sob o escopo de uma biorrefinaria para as condições experimentais estudadas neste trabalho, obtendo importantes resultados.

Figura 13. Proposta de uma plataforma de biorrefinaria microalgal, a partir da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli desenvolvida no efluente de laticínio.



Por outro lado, uma outra questão a ser considerada, é que as microalgas vem sendo apontadas como alternativa sustentável para demanda de combustíveis (LEVINE et al., 2010; QUEIROZ et al., 2013; MARKOU; VANDAMME; MUYLAERT, 2014). O perfil de ácidos graxos é adequado para a síntese de biodiesel (GOUVEIA; OLIVEIRA; 2009; CHEN et al., 2011). O perfil lipídico da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli desenvolvida em condições heterotrófica no efluente da indústria de laticínio, verificando que sua composição em ácidos graxos quando este micro-organismo é cultivado a 20°C, atende as características requeridas para produção de biodiesel. Embora as condições ambientais possam ser manipuladas visando a otimização de um determinado constituinte, a composição bioquímica é quali e quantitativamente dependente da espécie (PIGNOLET et al., 2013). Isso faz desta cianobactéria um micro-organismo em potencial para a produção de biodiesel. Com base no potencial biodiesel microalgal, Queiroz et al., (2013), reportam que diferentes possibilidades de biorrefino podem ser consideradas, quando se pensa na produção de biodiesel. É importante considerar que a produção de biodiesel a partir de microalgas, uma vez que na produção de biodiesel por microalgas é utilizado apenas parte da biomassa e, portanto grande quantidade de biomassa residual é gerada no processo e é uma fonte viável de suplementação protéica

em formulações de ração, extração de químicos, produção de bioetanol, energia térmica e fertilizantes.

Nos últimos anos tem crescido um grande interesse na produção de etanol a partir dos carboidratos, presentes microalgas (HARUN et al., 2009; BRENNAN; OWEND, 2010, SINGH; GU; 2010). Nas condições experimentais os carboidratos são registrados em segundo lugar quanto aos teores de compostos celulares na biomassa gerada (Tabela 14). Por outro lado, Silva-Manetti, 2012, avaliou o perfil de carboidratos intra e extracelular produzido pelo micro-organismo em análise, quando cultivado no efluente de laticínio na ausência de luz, verificando que biomassa obtida representa importante fonte de produção de carboidratos.

No que se refere produção de fertilizantes os teores de cinzas obtidos (Tabela 14) e em especial o fósforo, embora tecnologicamente o gerenciamento do fósforo das águas industriárias não esteja completamente estabelecido, o reuso do fósforo com o intuito da valorização dos resíduos agroindustriais é a fronteira do conhecimento dos sistemas emergentes de tratamento. Isso faz com que o fósforo torne-se um recurso renovável passível de exploração tecnológica. Entre as diferentes aplicações deste elemento inclui o uso como insumo na produção de aditivos, ração animal e fertilizantes (MARONEZE et al., 2014). Por outro lado, além da elevada remoção de fósforo, deve-se considerar a possibilidade que fornece o crescimento heterotrófico de remoção simultânea de matéria orgânica e nitrogênio em uma única etapa (QUEIROZ et al., 2013), bem como do potencial de aproveitamento da biomassa gerada na forma de compostos intermediários e /ou produtos finais e valores agregados (SPOLAORE et al., 2006). Neste sentido, considerando que as cianobactérias podem acumular fósforo (GROBBELAAR, 2004; POWELL et al., 2009; MARKOU; VANDAMME; MUYLAERT, 2014), o conteúdo de fósforo da biomassa de *Aphanothece microscopica* Nägeli, cultivada no efluente de laticínio, é contemplada no conceito de biorrefinaria. Queiroz et al., (2014) reportam uma produção de fósforo total $4,8 \text{ g} \cdot 100\text{g}^{-1}$ de fósforo total na biomassa de *Aphanothece microscopica* Nägeli, quando cultivada nas condições experimentais consideradas neste trabalho. A partir desta informação, a Tabela 19 apresenta uma estimativa da produção não só de compostos celulares, mas também de fósforo, tomando como base a vazão de efluente de $950 \text{ m}^3 \cdot \text{d}^{-1}$ da empresa em análise, em um período operacional de 336 dias.ano⁻¹, bem como a máxima produção de biomassa obtida (0,492 g), conforme expresso na Tabela 3. Observa-se que é possível obter uma produção anual de fósforo de

7,51 ton, a qual poderia ser utilizada, quer como fertilizante, ou na alimentação humana ou animal.

Tabela 19. Estimativa de produção de fósforo por *Aphanothece microscopica* Nägeli a partir da geração anual de efluentes pela Companhia Sul Rio Grandense de laticínios, Pelotas RS.

Parâmetros	Estimativas
Volume de efluente.dia ⁻¹ (L)	950.000
Período operacional (dia.ano ⁻¹)	336
Volume anual de efluente (L)	319.200.000
Produção de biomassa (g.L ⁻¹)	0,492
Produção de biomassa anual (ton)	157,0
Produção de fósforo total (g.100g ⁻¹)	4,78
Produção de fósforo total anual (ton)	7,51

Um dos problemas operacionais que tem sido discutido no que se refere ao tratamento de efluentes por microalgas, bem como na implementação de biorrefinarias microalgais, é a separação da biomassa gerada (BASHAN et al., 2002; GRIMA et al., 2003; MOHAN; RAO; PRASSAD, 2005; SILVA-MANETTI et al., 2009; SILVA-MANETTI et al., 2011; SILVA-MANETTI, 2012).

De acordo com Grima et al., (2003) o custo da separação da biomassa da fase líquida do reator influencia fortemente no custo dos produtos finais originados da biomassa, podendo representar 60 % do custo total de biodiesel e de outros produtos químicos extraídos.

As microalgas cianobactérias apresentam um pequeno diâmetro e muitas espécies possuem a densidade específica ligeiramente maior que a água o que dificulta sua separação (PAPASI et al., 2010). No entanto, a existência de uma carga superficial negativa, resulta em alta afinidade com íons de metais pesados, o que torna estes microorganismos especialmente efetivos na remoção destes componentes (BASHAN et al., 2002; GRIMA et al., 2003; MOHAN; RAO; PRASSARD; 2005). Silva-Manetti (2012) estudou o processo da separação da *Aphanothece microscopica* Nägeli desenvolvida no efluente de laticínio demonstrando a eficiência da utilização de Tanfloc na concentração de 300 mg.L⁻¹ e pH 7. Por outro lado neste mesmo trabalho ficou demonstrado que a água residual resultante da separação da biomassa apresentou características passíveis de reuso no próprio setor industrial. Estas constatações demonstram a viabilidade da associação do tratamento de efluente e a implementação de uma refinaria microalgal a

partir do crescimento da *Aphanothece microscopica* Nägeli na água residuária oriunda do processamento de laticínio.

6 CONCLUSÃO

A composição do efluente de laticínio caracterizou-se por apresentar baixas concentrações em matéria orgânica, nitrogênio e fósforo, quando comparada ao perfil de composição geralmente descrita para esta água residuária. No entanto, com concentrações passíveis de suportar o crescimento da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli e consequente produção de compostos celulares de interesse comercial;

A concentração inicial de fósforo reativo dissolvido (PRD) exerce influencia no crescimento celular e na eficiência de remoção de nutrientes;

Os máximos de biomassa quando se utiliza as menores concentrações de PRD são registradas em 12 horas de cultivo, independente da temperatura. Para as máximas concentrações, os maiores registros de biomassa ocorrem em 16 h, com concentrações significativamente superiores ($p \leq 0,05$), quando o micro-organismo é cultivado a 30°C;

O cultivo da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli em meio heterotrófico na temperatura de 20°C e concentração de inóculo de 200 mg.L⁻¹ é uma alternativa eficaz para remoção de nutrientes do efluente da indústria de laticínios;

Os resultados apontam que a remoção de fósforo pela *Aphanothece* é dependente tanto da sua concentração no meio, quanto da temperatura empregada no cultivo;

As maiores remoções de nutrientes foram registradas para as maiores concentrações de PRD e maiores temperaturas;

Nas condições experimentais as maiores remoções são registradas nas razões N:P (7,8-10,3) e C/N (3,1-23);

A análise dos dados cinéticos de crescimento celular e consumo de substrato evidenciaram o efeito da temperatura da reação biológica, na conversão dos poluentes em biomassa, sendo registrados maiores valores para os cultivos realizados a 20°C;

Em função das elevadas eficiências de remoções este processo pode ser considerado uma alternativa aos convencionais sistemas de despoluição usados em indústrias processadoras de leite;

As formas fosforadas no efluente de laticínio se caracterizaram por uma predominância na fração dissolvida sob a particulada e por apresentar como maior fração a de fósforo orgânico;

Nas condições experimentais foi constatado um acúmulo de fósforo notadamente quando o cultivo ocorre em condições autotróficas;

O acúmulo de fósforo, é a principal rota de remoção deste elemento do efluente;

A cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli quando cultivada em sistemas heterotrófico apresentou 3,8 vezes mais fósforo que o requerido para o crescimento. Isso representa importante concentração de fósforo que poderá ser utilizada tanto para alimentação humana ou animal como na forma de fertilizantes;

A remoção biológica de fósforo por *Aphanothece microscopica* Nägeli, pode resultar em substanciais aportes financeiros requeridos para as estações de tratamentos de efluentes para a contenção de fósforo;

No que se refere a produção de compostos celulares por *Aphanothece microscopica* Nägeli cultivada na ausência de luz, a 20°C no efluente da indústria de laticínio, em ordem de concentração dos compostos celulares estudados foi registrado maior concentração em proteínas, seguido de carboidratos;

As concentrações dos compostos celulares avaliados são influenciados pela fase de crescimento, sendo registradas diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre as concentrações obtidas nas biomassas extraídas na fase logarítmica e no final do período experimental;

O acúmulo de lipídeos nas condições experimentais ocorre na fase logarítmica de crescimento;

Os resultados demonstraram que é possível aumentar o teor de lipídeos da biomassa de *Aphanothece microscopica* Nägeli mediante redução da temperatura, após o máximo de crescimento celular a 20°C;

O maior rendimento na produção de lipídios por redução da temperatura foi registrado a 5°C em 30 h (25,4 %);

Não foram indicadas diferenças significativas ($p \leq 0,05$) em função da temperatura entre as concentrações de lipídios obtidas para as biomassas em 40 h;

O perfil de ácidos graxos do micro-organismo em análise cultivado a 20°C apresentou como ácidos graxos majoritários em ordem de concentração: palmítico, oleico, γ -linolênico, palmitolêico e esteárico, independente da fase de crescimento e condição de cultivo (autótrofo ou heterótrofo);

Com base no perfil de ácidos graxos obtido, esta cianobactéria pode caracterizar-se por conter em sua composição lipídica, ácidos graxos C18 com nenhuma, uma, duas ou três duplas ligações, bem como ácidos graxos C16 com nenhuma ou uma dupla ligação;

O perfil lipídico da *Aphanothece microscopica* Nägeli cultivada em condições autotróficas indica alta relação de ácidos graxos saturados/poli-insaturados (1,1). Em condições heterotróficas, caracterizou-se por apresentar uma relação/poli-insaturados levemente superior (0,5) ao recomendado pela FAO (0,45);

O efeito da redução de temperatura resultou no aumento da concentração de ácidos graxos saturados às expensas dos insaturados;

A transposição da operação em batelada para contínua requer um biorreator heterotrófico com volume útil de trabalho de 240,51 m³, permitindo tratar 950 m³ diários de efluente, gerando 11,8 kg.d⁻¹ de biomassa;

A associação do tratamento de efluente da indústria de laticínio e produção de compostos celulares em biorreatores heterotróficos por *Aphanothece microscopica* Nägeli, demonstrou ser uma tecnologia em potencial, de aplicação, visando á estabilização simultânea de matéria orgânica, nitrogênio total e fósforo total, gerando simultaneamente insumos que podem suportar a implementação de uma biorrefinaria microalgal.

7 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

ABDELAZIZ, A.E., LEITE, G.B. E HALLENBECK, P.C. Addressing the challenges for sustainable production of algal biofuels: I. Algal strains and nutrient supply; **Environmental Technology**, v. 34, p.1783-1805, 2013.

ALOMAR, D.; FUCHSLOCHER, R.; STOCKBRANDS, S. Effects of oven or freeze-drying on chemical composition and NIR spectra of pasture silage. **Animal Feed Science and Technology**. v. 80, p. 309-319, 1999.

ANAGNOSTIDIS, K.; KOMÁREK, J. Modern Approach to the classification system of cyanophytes 3 - Oscillatoriales. **Archiv für Hydrobiologie Algological Studies**, v. 80, p. 327-472, 1988.

ANUPAMA, P.; RAVINDRA, L. Value-added food: Single cell protein. **Biotechnology Advances**, v. 18, p. 459-479, 2000.

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

ARAÚJO, S.C.; GARCIA, V.M.T. Growth and biochemical composition of the diatom *Chaetoceros* cf. *wighamii* brightwell under different temperature, salinity and carbon dioxide levels. I. Protein, carbohydrates and lipids. **Aquaculture**, v. 246, p. 405-412, 2005.

ARDELEAN, I., ZARNEA, G., Photosynthesis respiration interplay in cyanobacteria: fundamentals and application. In: Subramanian, G., Kaushik, B.D., Venkataraman, G.S. (Eds.), *Cyanobacterial Biotechnology*. **Science Publishers Inc.**, USA, p. 103–107, 1998.

ASLAN, S.; KAPDAN, I. K. Batch kinetics of nitrogen and phosphorus removal from synthetic wastewater by algae. **Ecological Engineering**, v. 28, p. 64-70, 2006.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official Methods of Analysis**, 15th ed. Washington, DC, 2000.

ÁVILA-LEON, I.; CHUEI MATSUDO, M.; SATO, S.; DE CARVALHO, J. C. M. *Arthrospira platensis* biomass with high protein content cultivated in continuous process using urea as nitrogen source. **Journal Applied Microbiology**, v. 112, p. 1086–1094, 2012.

BANU, R.; ANANDAN, S.; KALIAPPAN, S.; YEOM, I.-T. Treatment of dairy wastewater using anaerobic and solar photocatalytic methods. **Solar Energy**, v. 82, p. 812–819, 2008.

BARBOSA, M.J., HOOGAKKER, J., WIJFFELS, R.H. Optimization of cultivation parameters in photobioreactors for microalgae cultivation using the A-stat technique. **Biomolecular Engineering**, v. 20, p. 115-123, 2003.

BARSANTI, L.; GUALTIERI, P. Algae: Anatomy. **Biochemistry and Bioengineering**, p. 1-34, 2006.

BASHAN, L. E.; BASHAN, Y. Recent advances in removing phosphorus from wastewater and its future use as fertilizer (1997–2003). **Water Research**, v. 38, 2004, p. 4222–4246.

BASHAN, L. E.; BASHAN, Y. Recent advances in removing phosphorus from wastewater and its future use as fertilizer (1997–2003). **Water Research**, v. 38, p. 4222–4246, 2004.

BASHAN, L. E.; et al. Removal of ammonium and phosphorus ions from synthetic wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* coimmobilized in alginate beads with the microalgae growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. **Water Research**, v. 36, p. 2941-2948, 2002.

BASTOS, R. G. et al. Remoção de nitrogênio e matéria orgânica do efluente da parboilização do arroz por *Aphanathece microscopica* Nägeli na ausência de luminosidade. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 9, p. 112-116, 2004.

BASTOS, R. G.; BONINI, M. A.; ZEPKA, L. Q.; JACOB-LOPES, E.; QUEIROZ, M. I. Treatment of rice parboiling wastewater by cyanobacterium *Aphanathece microscopica* Nägeli with potential for biomass products. **Desalination and Water Treatment**, p. 1-7, 2014.

BASTOS, R. G.; QUEIROZ, M. I.; BENERI, R. L.; ALMEIDA, R. V. Evaluación del Crecimiento de la *Aphanathece microscopica* Nägeli en las Aguas Residuales de la

Parboilización del Arroz. **Información Tecnológica**, La Serena, Chile, v. 13, n.1, p. 61-65, 2002.

BASTOS, R. G.; ZEPKA, L.; LOPES, E.; SEVERO, M.; VOLPATO, G.; QUEIROZ, M. I. Bioconversão do nitrogênio do efluente da parboilização do arroz por incorporação em biomassa da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli. **Revista Ambiente & Água**, v. 5, p. 258-264, 2010.

BECKER, E. W. Micro-algae as a source of protein. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 2, p. 207-210, 2007.

BECKER, W. Microalgae in human and animal nutrition. In: RICHMOND, A. (Ed). **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. London: Blackwell Science, 2004. p.312-351.

BEEVI, U. S.; SUKUMARAN, R. K. Cultivation of microalgae in dairy effluent for oil production and removal of organic pollution load. **Bioresource Technology**, v. 165, p. 295–301, 2014.

BELLIER, N.; BELLIER, F.; COMEAU, Y. Phosphorus removal from wastewater by mineral apatite. **Water Research** vol. 40, p. 2965 – 2971, 2006.

BELTRÁN-HEREDIA, J.; SÁNCHEZ-MARTÍN, J.; GÓMEZ-MUÑOZ, M.C. New coagulant agents from tannin extracts: Preliminary optimisation studies. **Chemical Engineering Journal**, v. 162, p. 1019–1025, 2010.

BELTRAN-HEREDIA, J.; TORREGROSA, J.; DOMINGUEZ, J. R.; GARCÍA, J. Aerobic biological treatment of black table olive washing wastewaters: effect of an ozonation stage. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 1183–1190, 2000.

BENITEZ-NELSON, C. R. The biogeochemical cycling of phosphorus in marine systems. **Earth-Science Reviews** v.51 p.109–135, 2000.

BISWAS, B. K.; INOUE, K.; GHIMIRE, K. N.; HARADA, H.; OHTO, K.; KAWAKITA, H. Removal and recovery of phosphorus from water by means of adsorption onto orange waste gel loaded with zirconium. **Bioresource Technology** v.99 p.8685–8690, 2008.

BOROWITZKA, M. In: Borowitzka, M. & Borowitzka, L. **Micro-algal Biotechnology**. 2. ed. Sydney: p. 477, 1994.

BOROWITZKA, M.A.; BOROWITZKA, L.J. (Eds). **Microalgal biotechnology**. Cambridge: Cambridge University, 1988. 477p.

BRIAO, V.B.; TAVARES, C.R.G. Ultrafiltração como processo de tratamento para o reuso de efluentes de laticínios. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 12, p. 134-138, 2007.

BROOKS, A. S.; ROZENWALD, M. N.; GEOHRING, L. D.; LION, L. W. STEENHUIS, T. S. (2000) Phosphorus removal by wollastonite: A constructed wetland substrate. **Ecological Engineering** v.15 p.121–132, 2000.

CAMERON, H. J.; JULIAN, G. R. (1988). Utilization of hydroxyapatite by cyanobacteria as their sole source of phosphate and calcium. **Plant and Soil**. v.109, p.123-124, 1988.

CARRERA, J.; VICENT, T.; LAFUENTE, J. Effect of influent COD/N ratio on biological nitrogen removal (BNR) from high-strength ammonium industrial wastewater. **Process Biochemistry**. In Press - Corrected Proof - Available online, 2004.

CEPOI, L.; RUDI, L.; MISCU, V.; COJOCARI, A.; CHIRIAC, T.; SADOVNIC, D. Antioxidative activity of ethanol extracts from *Spirulina platensis* and *nostoc linckia* measured by various methods. **Analele Universitatii din Oradea, Fascicula Biologie**, n. 2, p. 43-48, 2009.

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

CHEN, F., JOHNS, M.R. Heterotrophic growth of *Chlamydomonas reinhardtii* on acetate in chemostat culture. **Process Biochem.** v.31, p.601-604, 1996.

CHEN, W.; LIU, J. The possibility and applicability of coagulation-MBR hybrid system in reclamation of dairy wastewater. **Desalination** , v. 285, p. 226–231, 2012.

CHEN, X.; YVONNE GOH, Q.; TAN, W.; HOSSAIN, I.; CHEN, W.; LAU, R. Lumostatic strategy for microalgae cultivation utilizing image analysis and chlorophyll a content as design parameters. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 6005–6012, 2011.

CHEN, Y.; VAIDYANATHAN, S. Simultaneous assay of pigments, carbohydrates, proteins and lipids in microalgae. **Analytica Chimica Acta**, v. 776, p. 3–40, 2013.

CHIMENOS, J.M.; FERNANDEZ, A.I.; HERNANDEZ, A.; HAURIE, L.; ESPIELL, F.; AYORA, C. (2006). Optimization of phosphate removal in anodizing aluminum wastewater. **Water Research**. vol. 40; p.137–43, 2006.

CHIOU, S.Y.; SU, W.W. E SU, Y.C.– Optimizing production of polyunsaturated fatty acids in *Marchantia polymorpha* cell suspension culture. **Journal of Biotechnology**, v.85, p. 247– 257, 2001.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**. vol. 25, p. 294-306, 2007.

CHO, S.; LUONG, T.T.; LEE, D.; OH, Y.; LEE, T. Reuse of effluent water from a municipal wastewater treatment plant in microalgae cultivation for biofuel production. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 8639–8645, 2011.

CHRISTENSON, L.; SIMS, R. Production and harvesting of microalgae for wastewater treatment, biofuels, and bioproducts. **Journal Biotechnology Advances**, v. 29, p.686-702, 2011.

COHEN, Z.; VONSHAK, A.; Richmond, A. Fatty acid composition of *Spirulina* strains grown under various environmental conditions. **Phytochemistry**, v. 26, n. 8, p. 2255-2258, 1987.

CONTRERAS, E. M.; GIANNUZZI, L.; ZARITZKY, N. E. Growth kinetics of the filamentous microorganism *Sphaerotilus natans* in a model system of a food industry wastewater. **Water Research**, v. 34, p. 4455-4463, 2000.

CONVERTI, A., J.M. Dominguez, Influence of temperature and pH on xylitol production from xylose by *Debaryomyces hansenii*, **Biotechnology Bioengineer** v.75, p.39–45, 2001.

CONVERTI, A.; SCAPAZZONI, S.; LODI, A.; CARVALHO, J. C. M. Ammonium and urea removal by *Spirulina platensis*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 33, n. 1, p. 8-16, 2006.

DANESI, E. D. G.; RANGEL-YAGUI, C. O.; CARVALHO, J. C. M.; SATO, S. Effect of reducing the light intensity on the growth and production of chlorophyll by *Spirulina platensis*. **Biomass and Bioenergy**, v. 26, n. 4, p. 329-335, 2004.

DANESI, E. D. G.; RANGEL-YAGUÍ, C. O.; CARVALHO, J. C. M.; SATO, S. An investigation of the effect of replacing nitrate by urea in the growth and production of chlorophyll by *Spirulina platensis*. **Biomass Bioenergy**, v. 23, p. 261-269, 2002.

DE CAIRE, G. Z. Changes in soil enzyme activities following additions of cyanobacterial biomass and exopolysaccharide. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v.32, p.985-1987, 2000.

DE LA NOÛE, J., DE PAUW, N., The potential of microalgal biotechnology: a review of production and uses of microalgae. **Biotechnol. Adv.** v.6, p.725–770, 1988.

De La NOÛE, J.; LALIBERTÉ, G.; PROULX, D. Algaeandwastewater. **Journal Applied Phycology**, v. 4, p. 247-254, 1992.

DE PHILIPPIS, R.; VINCENZINI, M. Exocellular polysaccharides from cyanobacteria and their possible applications. **FEMS Microbiology Reviews**, v.22, p.151-175, 1998.

DE-BASHAN, L. E., BASHAN, Y. Immobilized microalgae for removing pollutants:review of practical aspects. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 1611–1627, 2010.

DE-BASHAN, L. E.; BASHAN, Y. Recent advances in removing phosphorus from wastewater and its future use as fertilizer (1997–2003). **Water Research**, v. 38, p. 4222-4246, 2004.

DENG, X.; LI, Y.; FEI, X. Microalgae: a promising feedstock for biodiesel. **African Journal of Microbiology Research**, v. 3, n. 13, p. 1008-1014, 2009.

DESHNIUM, P.; PAITHOONRANGSARID, K.; SUPHATRAKUL, A.; MEESAPYODSUK, D.; TANTICHAROEN, M.; CHEEVADHANARAK, S. Temperature-independent and-dependent expression of desaturase genes in filamentous

cyanobacterium *Spirulina platensis* strain C1 (*Arthrospira* sp. PCC 9438). **FE MS microbiology letters**, v. 184, n. 2, p. 207-213, 2000.

DEVI, M. P.; SUBHASH, G. V.; MOHAN, S. V. Heterotrophic cultivation of mixed microalgae for lipid accumulation and wastewater treatment during sequential growth and starvation phases: effect of nutrient supplementation. **Renewable Energy**, v. 43, p. 276-283, 2012.

DILLON, J. C.; PHAN, P. A. *Spirulina* as a source of proteins in human nutrition. In: Doumengue, F.; Durand-Chastel, H.; Toulemont, A. (eds) *Spiruline algue de vie* Musée Océanographique, v. 12. **Bulletin de l'Institut Océanographique**, Monaco, p. 103-107, 1993.

DONOT, F.; FONTANA, A.; BACCOU, J.C.; SCHORR-GALINDO, S. Microbial exopolysaccharides: Main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, p. 951-962, 2012.

DUBACQ, J. P.; QUOC, K. P. Biotechnology of *Spirulina* lipids: a source of gamma-linolenic acid. In: *Spiruline, algue de vie*. **Bulletin de l'Institut océanographique**, v. 12, p. 59-64, 1993.

DUMAS, A.; LALIBERÉ, G.; LESSARD, P.; DE LA NOÛE, J. Biotreatment of fish farm effluents using the cyanobacterium *Phormidium bohneri*. **Aquacultural Engineering**, v. 17, p. 57-68, 1998.

ELSER, J. J. Phosphorus: a limiting nutrient for humanity? **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, p. 933-938, 2012.

FALQUET, J. The nutritional aspects of *Spirulina*. **Ant Technology**, 1997.

FAO/WHO. **Report of ad Hoc Expert Committee on energy and protein requirements**. Tech. Report. Series 522. WHO, Roma, 1995.

FARIZOGLU, B.; UZUNER, S. The investigation of dairy industry wastewater treatment in a biological high performance membrane system. **Biochemical Engineering Journal**, v. 57, p. 46-54, 2011.

FERNÁNDEZ, F.J.; CASTRO, M.C.; VILLASENOR, J., RODRÍGUEZ, L. Agro-food wastewaters as external carbon source to enhance biological phosphorus removal. **Chemical Engineering Journal**. v.166 p.559-567, 2011.

FERRUZI, M. G.; BLAKESLEE, J. Digestion, absorption, and cancer preventive activity of dietary chlorophyll derivatives. **Nutrition Research**, v. 27, p. 1-12, 2007.

FIDALGO, J.P.; CID, A.; TORRES, E.; SUKENIK, A.; HERRERO, C. Effects of nitrogen source and growth phase on proximate biochemical composition, lipid classes and fatty acid profile of the marine microalga *Isochrysis galbana*. **Aquaculture**, v. 166, p. 105-116, 1998.

FUENTES, M.M.R.; FERNÁNDEZ, G.G.A.; PÉREZ, J.A.S.; GUERRERO, J.L.G. Biomass nutrient profiles of the microalga *Porphyridium cruentum*. **Food Chemistry**, v. 70, p. 345-353, 2000.

FYTIANOS, K.; VOUDRIAS, E.; RAIKOS, N. Modelling of phosphorus removal from aqueous and wastewater samples using ferric iron. **Environmental Pollution**, v. 101, p. 12-130, 1998.

GALARNEAU, E., GEHR, R., (1997). Phosphorus removal from wastewaters: experimental and theoretical support for alternative mechanisms. **Water Research** v.31, p.328–338, 1997.

GARCÍA-FERNANDÉZ, J. M.; DIEZ, J. Adaptive mechanisms of nitrogen and carbon assimilatory pathways in the marine cyanobacteria *Prochlorococcus*. **Research in Microbiology**, v. 155, n. 10, p. 795-802, 2006.

GILL, I. E VALIVETY, R. Polyunsaturated fatty acids, part 1: occurrence, biological activities and applications. **Trends in Biotechnology**, v.15, p. 401-409, 1997.

GOLDER, A.K.; SAMANTA, A.N.; RAY, S. Removal of phosphate from aqueous solutions using calcined metal hydroxide sludge wastewater generated from electrocoagulation. **Separation and Purification Technology**. vol. 52, p. 102–9, 2006.

GONZÁLEZ, L. E.; CAÑIZARES, R. O.; BAENA, S. Efficiency of ammonia and phosphorus removal from a colombian agroindustrial wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus dimorphus*. **Bioresource Technology**. v.60 p.259-262, 1997.

GRAVER HOLT, O. S.; ERIKSEN, N. T. Heterotrophic high-cell-density fed-batch and continuous-flow cultures of *Galdieria sulphuraria* and production of phycocyanin. **Appl Microbiol Biotechnol**. v.77, p.69–75, 2007.

GRIMA, E.H., BELARBI, E.H., FERNÁNDEZ F.G., MEDINA, A.R. E CHISTI, Y. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics; **Biotechnology Advances**, v. 20: p. 491–515, 2003.

GROBBELAAR, J.U. Algal biotechnology: real opportunities for Africa. **South African Journal of Botany**, v.70, n.1, p.140-144, 2004.

GUIL-GUERRERO, J. L; NAVARRO-JUAREZ, A.; LÓPEZ-MARTINEZ, J. C.; CAMPRAMADRID, P.; REBOLLOSO-FUENTES, M. M. Functional properties of the biomass of three microalgal species. **Journal of Food Engineering**, n. 30, p. 312-318, 2004.

HAMDANI, A.; MOUNTADAR, M.; ASSOBHEI, O. (2005) Comparative study of the efficacy of three coagulants in treating dairy factory waste water. **International Journal of Dairy Technology**. v. 58, p. 83-88, 2005.

HARUN, R.; SINGH, M.; FORDE GARETH, M.; DANQUAH MICHAEL, K. Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. **Renewable Sustainable Energy Review**, v.14, p. 1037–47, 2010.

- HEALEY, F.P. Phosphate. In: Carr, N.G. and Whitton, B.A. Editors, **The Biology of Cyanobacteria**. University of California Press, Berkeley, 1982.
- HEALY, M.G.; RODGERS, M.; MULQUEEN, J. Treatment of dairy wastewater using constructed wetlands and intermittent sand filters. **Bioresource Technology**. v.98 p. 2268–2281, 2007.
- HELM, R. F. Structural Characterization of the released Polysaccharide of Desiccation-Tolerance *Nostoc commune* DRH-1. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 182, p. 974-982, 2000.
- HERRERO, E. F. A. Compartmentalized function through cell differentiation in filamentous cyanobacteria. **Nature Reviews Microbiology** v. 8, p. 39-49, 2010.
- HOEK, C. V.; MANN, D. G.; JAHNS, H. M. **Algae: An introduction to phycology**. Oakleigh: Cambridge University Press, 1995.
- HOLTON, R. W.; BLECKER, H. H. Fatty acids of blue-green algae *Properties and Products of Algae*: Springer, 1970. p. 115-127.
- HORNES, M.; SILVA, A.G; MITTERER, M.L; QUEIROZ, M.I. Influência dos compostos nitrogenados na concentração de proteína da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, p. 1-371, 2010.
- HU, Q.; SOMMERFELD, M.; JARVIS, E.; GHIRARDI, M.; POSEWITZ, M.; SEIBERT, M.; DARZINS, A. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. **Plant Journal**, v. 54, p. 621-639, 2008.
- HUANG, G.; CHEN, F.; WEI, D.; ZHANG, X. E CHEN, G. Biodiesel production by microalgal biotechnology. **Applied Energy**, v.87, p. 38-46, 2010.
- IEA, World Energy Outlook, International Energy Agency. **Biorefineries: Co-production of food, feed, chemicals, materials, fuels, power and heat from biomass 2009**.
- IRDEMEZ, S.; DEMIRCIOGLU, N.; SEVKI, Y.; BINGUL, Z. The effects of current density and phosphate concentration on phosphate removal from wastewater by electrocoagulation using aluminum and iron plate electrodes. **Separation and Purification Technology**. v. 52, p. 218–23, 2006.
- JACOB-LOPES, E.; ZEPKA, L. Q.; QUEIROZ, M. I.; NETTO, F.M. Influência das condições de secagem nas propriedades funcionais da *Aphanothece microscopica* Nägeli cultivada no efluente da parboilização do arroz. **Boletim CEPPA**, Curitiba, v. 25, n. 2, p. 275-284, 2007a.
- JACOB-LOPES, E., ZEPKA, L. Q., PINTO, L. A. A., QUEIROZ, M. I. Characteristics of thin-layer drying of the cyanobacterium. **Chemical Engineering and Processing**, v.46, p.63 – 69, 2007b.
- JACOB-LOPES, E.; SANTOS, A. M.; RODRIGUES, D. B.; LUI, M. C. Y.; SOUZA, C.; PRUDENTE, D.; ZEPKA, L. Q. **Bioprocesso de conversão de efluentes híbridos, biorreator heterotrófico, bioprodutos e seus usos**. 2013, Brasil. BRPI 10 2013 020471 4, 2013.

- JACOB-LOPES, E.; SCOPARO, C. H. G.; FRANCO, T. T. Rates of CO₂ removal by *Aphanothece microscopica* Nägeli in tubular photobioreactors. **Chemical Engineering and Processing**, v.47 p.1365–1373, 2008.
- JACOB-LOPES, E.; SCOPARO, C. H.; QUEIROZ, M. I.; FRANCO, T. T.. Biotransformations of carbon dioxide in photobioreactors. **Energy Conversion and Management**, v. 51, p. 894-900, 2010.
- JACOB-LOPES, E.; ZEPKA, L. Q.; NETTO, F. M.; QUEIROZ, M. I. Caracterização da fração protéica da cianobactéria cultivada no efluente da parboilização do arroz. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, p. 482-488, 2006.
- JANCZUKOWICZ, W.; ZIELIN, M.; DE BOWSKI, M. Biodegradability evaluation of dairy effluents originated in selected sections of dairy production. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 4199-4205, 2008.
- JANSSON, M. Phosphate uptake and utilization by bacteria and algae. **Hydrobiologia**, v.170, p.177-189, 1988.
- KAMM, B.; KAMM, M. Principles of biorefineries. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, p. 137-145, 2004.
- KAPLAN, D., RICHMOND, A. E., DUBINSKY, Z., AARONSON, S. Algal nutrition. In: Richmond, A.E. (Ed.), *CRC Handbook of Microalgal Mass Culture*. CRC Press, Boca Raton, 1986.
- KENYON, C. N.; RIPPKA, R.; STANIER, R. Y. Fatty acid composition and physiological properties of some filamentous blue-green algae. **Archiv für Mikrobiologie**, v. 83, n. 3, p. 216-236, 1972.
- KHAN, S. A.; RASHMI; HUSSAIN, M. Z.; PRASAD, S.; BANERJEE, U. C. Prospects of biodiesel production from microalgae in India. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 13, n. 9, p. 2361-2372, 2009.
- KIM, D.; KIM, K.-Y.; RYU, H.-D.; MIN, K.-K.; LEE, S.-I. Long term operation of pilot-scale biological nutrient removal process in treating municipal wastewater. **Bioresource Technology**, v.100 p. 3180–3184, 2009.
- KNOLL, A. H. **Cyanobacteria and Earth history, in The Cyanobacteria**. In: Herrero, A.; Flores, E. (Eds.). *Molecular Biology, Genomics and Evolution*, Caister Academic Press, Norfolk, p. 1-19, 2008.
- KOMÁREK, J. **Modern classification of cyanobacteria**. In: Sharma, N. K.; Rai, A. K.; Stal, L. J. (eds.). *Cyanobacteria: An Economic Perspective*, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK., 2014.
- KUENZLER E. J.; PERRAS, J. P. Phosphateses of marine algae. *The Biological. Bulletin by Marine Biological Laboratory.*, v.128, p. 271-284, 1965.

KUSHWAHA, J. P.; SRIVASTAVA, V.; MALL, I. D. Treatment of dairy wastewater by commercial activated carbon and bagasse fly ash: parametric, kinetic and equilibrium modelling, disposal studies. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 3474-3483, 2010.

LAI, J.; YU, Z.; SONG, X.; CAO, X.; HAN, X. Responses of the growth and biochemical composition of *Prorocentrum donghaiense* to different nitrogen and phosphorus concentrations. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 405, p. 6–17, 2011.

LALIBERTE, G., LESSARD, P., DE LA NOÛE, J., SYLVESTRE, S. Effect of phosphorus addition on nutrient removal from wastewater with the cyanobacterium *Phormidium bohneri*. **Bioresource Technology**, v.59, p.227–233, 1997.

LAU, P. S.; TAM, F. Y.; WONG, Y. S. Effect of algal density on nutrient removal from primary settled wastewater. **Environmental Pollution**. v.89 p. 59-66, 1994.

LAVÍN, P. L.; LOURENÇO, S. O. An evaluation of the accumulation of intracellular inorganic nitrogen pools by marine microalgae in batch cultures. **Brazilian journal of oceanography**, v. 53, n. ½,55-68, 2005.

LEE, B.K.; KIM, J.K. Production of *Candida utilis* biomass on molasses in different culture types. **Aquacultural Engineering**, v. 25, p.111-124, 2001.

LEE, M. S.; DRIZO, A.; RIZZO, D. M.; DRUSCHEL, G.; HAYDEN, N.; TWOHIG, E. Evaluating the efficiency and temporal variation of pilot-scale constructed wetlands and steel slag phosphorus removing filters for treating dairy wastewater. **Water Research**. v.44, p.4077-4086, 2010.

LEVENSPIEL, O. **Engenharia das Reações Químicas**. 3. ed. São Paulo: Edgard Blücher, pp 34-120, 2000.

LEVINE, R. B.; COSTANZA-ROBINSON, M. S.; SPATAFORA, G. A. *Neochloris oleoabundans* grown on anaerobically digested dairy manure for concomitant nutrient removal and biodiesel feedstock production. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, n. 1, p. 40-49, 2011.

LI, J.; XING, X.-H.; WANG, B.-Z. Characteristics of phosphorus removal from wastewater by biofilm sequencing batch reactor (SBR). **Biochemical Engineering Journal**. v.16 p.279–285, 2003.

LI, R.; WATANABE, M. M. Fatty acid profiles and their chemotaxonomy in planktonic species of *Anabaena* (Cyanobacteria) with straight trichomes. **Phytochemistry**, v. 57, n. 5, p. 727-731, 2001.

LI, S.; LIA, H.; LIANGA, X.Q.; CHENA, Y.X.; WANGA, S.X.; WANGA, F.E. Phosphorus removal of rural wastewater by the paddy-rice-wetland system in Tai Lake Basin. **Journal of Hazardous Materials**. v.171 p. 301–308, 2009.

LI, Y.; WANG, B.; WU, N.; LAN, C. Q. Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid production of *Neochloris oleoabundans*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 81, n. 4, p. 629-6, 2008.

LOURENÇO, S. O.; BARBARINO, E.; DE-PAULA, J. C.; PEREIRA, L. O. S.; MARQUEZ, U. M. L. Amino acid composition, protein content and calculation of nitrogen-to-protein conversion factors for 19 tropical seaweeds. **Phycological Research**, v. 50, p. 233–241, 2002.

LOURENÇO, S. O.; MARQUEZ, U.; FILHO, J. M.; BARBARINO, E.; AIDAR, E. Changes in biochemical profile of *Tetraselmis gracilis*. I. Composition of two culture media. **Aquaculture**, v.148, p. 153–168, 1997.

MARKOU G, GEORGAKAKIS D Cultivation of filamentous cyanobacteria (blue-green algae) in agro-industrial wastes and wastewaters: A review. **Apple Energy**, v. 88 p. 3389- 3401, 2011.

MARKOU, G. I. CHATZIPAVLIDIS, D. GEORGAKAKIS, Cultivation of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* in olive-oil mill wastewater treated with sodium hypochlorite, **Bioresour.Technol.** v. 112, p., 234–241, 2012.

MARONEZE, M. M.; MENEZES, C. R.; BARIN, J.S.; QUEIROZ, M. I.; ZEPKA, L.Q.; JACOB-LOPES, E. Treatment of cattle-slaughterhouse wastewater and the reuse of sludge for biodiesel production by microalgal bioreactors. **Scientia Agricola** (USP Impreso), v. 1, p. 53, 2014.

MARTÍNEZ, M. E.; SÁNCHEZ, S.; JIMÉNEZ, J. M.; YOUSFI, F. El.; MUÑOZ, L. Nitrogen and phosphorus removal from urban wastewater by the microalga *Scenedesmus obliquus*. **Bioresource Technology**. v. 73, p. 263-272, 2000.

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

MATTHIENSEN, A.; BEATTIE, K. A.; YUNES, J. S.; KAYA, K.; CODD, G. A. [D-Leu1] Microcystin-LR, from the cyanobacterium *Microcystis* RST 9501 and from a *Microcystis* bloom in the Patos Lagoon estuary, Brazil. **Phytochemistry**, v. 55, n. 5, p. 383-387, 2000.

MISHRA, S. K.; SHRIVASTAV, A.; MAURYA, R. R.; PATIDAR, S. K.; HALDAR, S.; MISHRA, S. Effect of light quality on the C-phycoerythrin production in marine cyanobacteria *Pseudanabaena* sp. isolated from Gujarat coast, India a. **Protein Expression and Purification**. v. 81, p. 5–10, 2012.

MIYACHI, S.; KANAI, R.; MIHARA, S.; MIYACHI, S.; AOKI, S. Metabolic roles of inorganic polyphosphates in *Chlorella* cells. **Biochimica et Biophysica Acta**. v.93, p. 625–634, 1964.

MOHAMMADI, M.; AHIALIABADI, M. A. Biodiesel Production from Microalgae. **Journal of Biology and today's world**, v. 2, n. 2, p. 76-84, 2013.

MOHAN, S. V.; RAO, N. C.; PRASAD, K. K. Treatment of complex chemical wastewater in a sequencing batch reactor (SBR) with an aerobic suspended growth configuration. **Process Biochemistry**. v. 40, p. 1501- 1508, 2005.

MORIST, A.; MONTESINOS, J. L.; CUSIDÓ, J. A.; GÓDIA, F. Recovery and treatment of *Spirulina platensis* cells cultured in a continuous photobioreactor to be used as food. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 535-547, 2001.

MORRIS, G. A. Hydrodynamic characterisation of the exopolysaccharide from the halophilic cyanobacterium *Aphanothece halophytica* GR02: a comparison with xanthan. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 44, p. 261-268, 2001.

MORSE, G. K.; BRETT, S. W.; GUY, J. A.; LESTER, J. N. Review: phosphorus removal and recovery technologies. **The Science of the Total Environment**, v. 212, p. 69-81, 1998.

MULBRY, W.; KONDRAD, S.; PIZARRO, C.; KEBEDE-WESTHEAD, E. Treatment of dairy manure effluent using freshwater algae: Algal productivity and recovery of manure nutrients using pilot-scale algal turf scrubbers. **Bioresource Technology**. v.99 p. 8137–8142, 2008.

MULKERRINS, D.; DOBSON, A. D. W.; COLLERAN, E. Parameters affecting biological phosphate removal from wastewater. **Environment International**, v. 30, p. 249-259, 2004.

MUNAVALLI, G.R.; SALER, P.S. Treatment of dairy wastewater by water hyacinth. **Water Science Technology**. v. 59, p.713–722, 2009.

MURADYAN, E. A.; KLYACHKO-GURVICH, G. L.; TSOGLIN, L. N.; SERGEYENKO, T. V.; PRONINA, N. A. Changes in Lipid Metabolism during Adaptation of the *Dunaliella salina* Photosynthetic Apparatus to High CO₂ Concentration. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 51, n. 1, p. 53-62, 2004.

MURO-PASTOR, M. I.; FLORENCIO, F. J. Regulation of ammonium assimilation in cyanobacteria. **Plant Physiology and Biochemistry**. v. 41, p. 595-603, 2003.

NAGADOMI, H., KITAMURA, T., WATANABE, M., SASAKI, K. Simultaneous removal of chemical oxygen demand (COD), phosphate, nitrate and H₂S in the synthetic sewage wastewater using porous ceramic immobilized photosynthetic bacteria. **Biotechnol. Lett.** v.22, p.1369–1374, 2000.

NOWACK, B. Environmental chemistry of phosphonates. **Water Research**. v. 37, p. 2533–2546, 2003.

OEHMEN, A.; LEMOS, P. C.; CARVALHO, G.; YUAN, Z.; KELLER, J.; BLACKALL, L. L. et al. Advances in enhanced biological phosphorus removal: from micro to macro scale. **Water Research**, v. 41, p. 2271-2300, 2007.

OEHMEN, A.; LOPEZ-VAZQUEZ, C.M.; CARVALHO, G.; REIS, M.A.M.; VAN LOOSDRECHT, M.C.M. Modelling the population dynamics and metabolic diversity of organisms relevant in anaerobic/anoxic/aerobic enhanced biological phosphorus removal processes. **Water research**, v.44 p.4473-4486, 2010.

OLGUÍN, E.; GALICIA, S.; ANGULO-GUERRERO, O.; HERNÁNDEZ, E. The effect of low light flux and nitrogen deficiency on the chemical composition of *Spirulina* sp. (*Arthrospira*) grown on digested pig waste. **Bioresource Technology**, v. 77, p. 19-24, 2001.

OMAR, H. H. Bioremoval of zinc ions by *Scenedesmus obliquus* and *Scenedesmus quadricauda* and its effects on growth and metabolism. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 5, p. 95-100, 2002.

PARMAR, A.; SINGH, N. K.; PANDEY, A.; GNANSOUNOU, E.; MADAMWAR, D. Cyanobacteria and microalgae: A positive prospect for biofuels. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 10163-10172, 2011.

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

PIGNOLET, O.; JUBEAU, S.; VACA-GARCIA, C.; MICHAUD, P. Highly valuable microalgae: biochemical and topological aspects. **Journal of Industrial Microbiology Biotechnology**, v. 40, p. 781–796, 2013.

PINOTTI, M. H. P.; SEGATO, R. Cianobactérias: importância econômica. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 12, n. 4, p. 275-280, 1991.

PIORRECK, M.; BAASCH, K.-H.; POHL, P. Biomass production, total protein, chlorophylls, lipids and fatty acids of freshwater green and blue-green algae under different nitrogen regimes. **Phytochemistry**, v. 23, n. 2, p. 207-216, 1984.

PITTMAN, J. K.; DEAN, A. P.; OSUNDEKO, O. The potential of sustainable algae biofuel production using wastewater resource. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 1, p. 17-25, 2011.

PIZARRO, C.; MULBRY, W.; BLERSCHA, D.; KANGASA, P. An economic assessment of algal turf scrubber technology for treatment of dairy manure effluent. **Ecological engineering**, v.26 p.321–327, 2006.

POWELL, N.; SHILTON A.; CHISTI Y.; PRATT, S. Towards a luxury uptake process via microalgae – Defining the polyphosphate dynamics. **Water Research**, v. 43, p. 4207 – 4213, 2009.

POWELL, N.; SHILTON, A.N.; PRATT, S.; CHISTI Y. Factors influencing luxury uptake of phosphorus by microalgae in waste stabilization ponds. **Environmental Science & Technology**, v.. 42, p. 5958–5962, 2008.

PRATT, C.; PARSONS, S. A.; SOARES, A.; MARTIN, B. D. Biologically and chemically mediated adsorption and precipitation of phosphorus from wastewater. **Current opinion in Biotechnology**, v. 23, p. 890-896, 2012.

PRZYTOCKA-JUSIAK, M. Growth and Survival of *Chlorella vulgaris* in high concentrations of nitrogen. **Actamicrobiol**, v. 25, p. 287-289, 1976.

PULZ, O.; GROSS, W. Valuable products from biotechnology of micro algae. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 65, p. 635–648, 2004.

QUEIROZ, M. I. ; LOPES, E. J. ; ZEPKA, L. Q. ; NETTO, F. M. . Caracterização da Fração Protéica da Cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli Cultivada no

Efluente da Parboilização do Arroz. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 26, p. 482-488, 2006.

QUEIROZ, M. I., JACOB-LOPES, E., ZEPKA, L. Q., BASTOS, R.; GOLDBECK, R. The kinetics of the removal of nitrogen and organic matter from parboiled rice effluent by cyanobacteria in a stirred batch reactor. **Bioresource Technol**, v.98, p.2163-2169 2007a.

QUEIROZ, M. I.; BASTOS, R. G.; BENERI, R. L.; ALMEIDA, R. G. Evaluación del crecimiento de la *Aphanothece microscopica* Nägeli em las aguas residuales de la parbolización del arroz. **Revista Información Tecnológica**, v. 13, p. 61-66, 2002.

QUEIROZ, M. I.; BENERI, R.; BASTOS, R.; ALMEIDA, R. Single-cell protein production by *Aphanothece microscopica* Nägeli in rice parboiled effluent. **Food Science and Biotechnology**. v. 13, n. 1, p. 142-150, 2004.

QUEIROZ, M. I.; HORNES, M. O.; MANETTI, A. G. S.; ZEPKA, L. Q.; JACOB-LOPES, E. Fish processing wastewater as a platform of the microalgal biorefineries. **Biosystems engineering**, v. 115, p. 195-202, 2013.

QUEIROZ, M. I.; HORNES, M. O.; SILVA-MANETTI, A. G.; JACOB-LOPES, E. Single-cell oil production by cyanobacterium *Aphanothece microscopica* Nägeli cultivated heterotrophically in fish processing wastewater. **Applied Energy**, v. 88, p. 3438-3443, 2011.

QUEIROZ, M. I.; KOETZ, P. Caracterização do efluente da parboilização do arroz. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.3, n. 3, p. 139-143, Set.-Dez., 1997.

QUEIROZ, M. I.; KOETZ, P. R.; TREPTOW, R. O. Caracterização sensorial do odor da *Aphanothece microscopica* Nägeli visando sua utilização na dieta alimentar. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, Curitiba, PR, v. 16, p. 55-70, 1998.

QUEIROZ, M. I.; KOETZ, P. R.; TREPTOW, R. O. The Nägele microscocal *Aphanothece* potential in the production of the single-cell protein from the remaining water. In: CHAMES, S.W., CÁNOVAS-BARBOSA, G.V. and AGUILERA, J.M. (Ed.) Proceedings of the eighth International Congress on Engineering and Food (ICEF 8), Pennsylvania, USA, 2027-2031, 2001.

QUEIROZ, M. I.; LOPES, E. J.; ZEPKA, L. Q. Efecto del procesamiento térmico en el perfil de ácidos grasos de la microalga *Aphanothece microscopica* Nägeli. **Ciencia y Tecnología Alimentaria**, v. 22, p. 10-16, 2007b.

QUEIROZ, M. I.; LOPES, E. J.; ZEPKA, L. Q.; PINTO, L. A. A. Characteristics of Thin-Layer Drying of the Cyanobacterium *Aphanothece microscopica* Nägeli. **Chemical Engineering and Processing**, v. 46, p. 63-69, 2007.c

QUEIROZ, M. I.; SOARES, L. A. S.; KOETZ, P. R.; TREPTOW, R. O.; YUNES, J. S. **Avaliação do teor de proteína da *Aphanothece sp.*** Caracterização de aminoácidos. In: Anais do XVI. Congresso Brasileiro de Ciência e tecnologia de Alimentos, v. 2, n. 1, p. 1089-1091, 1998.

QUEIROZ, M. I.; TREPTOW, R. O.; KOETZ, P.; YUNES, J. S.; SOUSASOARES, L. Avaliação do Teor de Proteínas da *Aphanothece* sp e caracterização em aminoácidos. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 2, p. 1089-1092, 1998.

QUEIROZ, M. I.; ZEPKA, L. Q.; LOPES, E. J.; BASTOS, R. Evaluation of single cell protein production by *Aphanothece microscopica* Nägeli in batch reactor. **Food Science and Biotechnology**, v. 13, p. 130-141, 2004.

RANGEL-YAGUI, C. O.; DANESI, E. D. G.; CARVALHO J. C. M.; SATO, S. Chlorophyll production from *Spirulina platensis*: cultivation with urea addition by fed-batch process. **Bioresource Technology**, v.92, n.2, p.133–141, 2004.

RASTOGI, R. P.; SINHA, R. P. Biotechnological and industrial significance of cyanobacterial secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 4, p. 521-539, 2009.

RAWAT, I.; KUMAR, R. R.; MUTANDA, T.; BUX, F Dual role of microalgae: Phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production. **Applied Energy**, v. 88, p. 3411–3424, 2011.

RENAUD, S. M.; THINH, L. V.; LAMBRINIDIS, G.; PARRY, D. L. Effect of temperature on growth, chemical composition and fatty acid composition of tropical Australian microalgae grown in batch cultures. **Aquaculture**, v. 211, p. 195-214, 2002.

RENAUD, S.M., H.C. ZHOU, D.L. PARRY, Effect of temperature on the growth, total lipid content and fatty acid composition of recently isolated tropical microalgae *Isochrysis* sp., *Nitzschia closterium*, *Nitzschia paleacea*, and commercial species *Isochrysis* sp. (clone T.ISO), **Journal Appl. Phycol.** v.7 p.595–602, 1995.

RICHA, R. P.; RASTOGI, S.; KUMARI, K. L.; SINGH, V. K.; KANNAUJIYA, G.; SINGH, M.; KESHERI, R. P. Biotechnological Potential of Mycosporine-like Amino Acids and Phycobiliproteins of Cyanobacterial. **Biotechnology, Bioinformatics and Bioengineering.**, v. 1, n. 2, p. 159-171, 2011.

RINKER, K. R.; POWELL, R. T. Dissolved organic phosphorus in the Mississippi River plume during spring and fall 2002. **Marine Chemistry.** v.102 p.170–179, 2006.

RIPPKA, R.; DERUELLES, J.; WATERBURY, J.B.; HERDMAN, M.; STANIER, R.Y. Generic assignments strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. **Journal of General Microbiology.** v.111, p.01-61, 1979.

RITTMANN, B. E.; MAYER, B.; WESTERHOFF, P.; EDWARDS, M. Capturing the lost phosphorus. **Chemosphere**, v. 84, p. 846-853, 2011.

RODOLFI, L.; ZITTELLI, G. C.; BASSI, N.; PADOVANI, G.; BIONDI, N.; BONINI, G.; TREDICI, M. R. Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 102, p. 100-112, 2008.

RODSRUD, G.; LERSCH, M.; SJÖDE, A. History and future of world's most advanced 212 biorefinery in operation. **Biomass and Bioenergy**, v. 46, p. 46-59, 2012.

ROMANO, I.; BELLITTIR, R.; NICOLAUS, B.; LAMA, N.; MANCA, C.; PAGNOTA, E.; GAMBACORTA, A. Lipid profile: a useful chemotaxonomic marker for classification of a new cyanobacterium in *Spirulina* genus. **Phytochemistry**, v. 50, p. 560-568, 2000.

SAKAMOTO, T.; SHEN, G.; HIGASHI, S.; MURATA, N.; BRYANT, D. A. Alteration of low-temperature susceptibility of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7002 by genetic manipulation of membrane lipid unsaturation. **Archives of Microbiology**, v. 169, n. 1, p. 20-28, 1997.

SÁNCHEZ-MARTÍN, J.; BELTRÁN-HEREDIA, J. Nature Is the Answer: Water and Wastewater Treatment by New Natural-Based Agents. **Advances in Water Treatment and Pollution Prevention**, p. 337-375, 2012.

SANCHO, M. E. M.; CASTILLO, J. M. J.; YOUSFI, F. Photoautotrophic consumption of phosphorus by *Scenedesmus obliquus* in a continuous culture. Influence of light intensity. **Process Biochemistry**, v. 34, p. 811-818, 1999.

SANCHO, M.; CASTILLO, J. M. J.; YOUSFI, F. E. Influence of phosphorus concentration on the growth kinetics and stoichiometry of the microalga *Scenedesmus obliquus*. **Process Biochemistry**, v. 32, p. 657-664, 1997.

SANTIAGO-SANTOS, M. C.; PONCE-NOYOLA, T.; OLVERA-RAMÍREZ, R.; ORTEGA-LOPES, J.; CAÑIZARES-VILLANUEVA, R. O. Extraction and purification of phycocyanin from *Calotrix* sp. **Process Biochemistry**, v.39, 2047-2052, 2004.

SARKAR, B., CHAKRABARTI, P.P., VIJAYKUMAR A., KALE, V. Wastewater treatment in dairy industries — possibility of reuse. **Desalination**, v. 195, p. 141-152, 2006.

SEMERJIAN, L.; AYOUB, G.M. High-pH–magnesium coagulation–flocculation in wastewater treatment. **Advances in Environmental Research**, v.7 p.389–403, 2003.

SHARATHCHANDRA, K.; RAJASHEKHAR, M. Total lipid and fatty acid composition in some freshwater cyanobacteria. **J Algal Biomass Util**, v. 2, p. 83-97, 2011.

SILVA, A. G.; HORNES, M.; MITTERER, M. L.; QUEIROZ, M. I. Application of coagulants in pretreatment of fish wastewater using factorial design. **Desalination**, v. 1, p. 208-214, 2009.

SILVA-MANETTI, A. G.; HORNES, M. O.; MITTERER, M. L.; QUEIROZ, M. I. Fish processing wastewater treatment by combined biological and chemical processes aiming at water reuse. **Desalination and Water Treatment**, v. 29, p. 196- 212, 2011.

SILVA-MANETTI, A.; STREIT, N. M.; VIEIRA-VIEIRA, J.; QUEIROZ, M.I. Efeito das razões C/N e N/P e concentração de inóculo na cinética de crescimento de *Aphanothece microscopica* i Nägeli. In: XIX Congresso brasileiro de engenharia química. Buzios, Rio de Janeiro, 2012.

SINGH, J.; GU, S. Commercialization potential of microalgae for biofuels production. **A Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, p. 2596–2610, 2010.

SINGH, N. K.; PARMAR, A.; SONANI, R. R.; MADAMWAR, D. Isolation, identification and characterization of novel thermotolerant *Oscillatoria* sp. N9DM: change in pigmentation profile in response to temperature. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 2472–2479, 2012.

SINGH, S. C.; SINHA, R. P.; HADER, D. P. Role of lipids and fatty acids in stress tolerance in cyanobacteria. **Acta protozoologica**, v. 41, n. 4, p. 297-308, 2002.

SMITH, M. ;CURE,J.; THOMAS J. Influence of Elevated CO₂ on Growth of Soybean Plants. **Crop Scienc.** v.24, p. 361-366, 1984.

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

SRIWIRIYARATA, T.; RANDALL, C.W. Performance of IFAS wastewater treatment processes for biological phosphorus removal. **Water Research** v.39, p.3873–3884, 2005.

STREIT, N. Dinâmica de nitrogênio em cultivo heterotrófico a partir de cianobactéria sob o escopo de biorrefinarias agroindustriais. **Tese**. Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos. Furg, Rio Grande, 2014.

SUNG, S.; LIU, T. Ammonia inhibition on thermophilic anaerobic digestion. **Chemosphere**, v. 53, p. 43-52, 2003.

TAM, N.F.Y., Y.S. WONG. Effect of ammonia concentrations on growth of *Chlorella vulgaris* and nitrogen removal from media, *Bioresource Technology* v.57, p.45–50, 1996.

TAM, N.F.Y.; WONG, Y.S. Effect of immobilized microalgal bead concentrations on wastewater nutrient removal. **Environmental Pollution**, v. 107, p. 145-151, 2000

TANWAR, P.; NANDY, T.; KHAN, R.; BISWAS, R. Intermittent cyclic process for enhanced biological nutrient removal treating combined chemical laboratory wastewater. **Bioresource Technology**. v.98 p.2473–2478, 2007.

TARLEY, C.R.; VISENTAINER, J.V.; MATSUSHITA, M. E SOUZA, N.E. Composição em ácidos graxos de lípidos de cobertura de sardinhas (*Sardinella brasiliensis*) em conserva. **Acta Scientiarum. Technology**, v.26, n.1, p. 7-10, 2004.

TOUCHETTE, B. W.; BURKHOLDER, J. M. Review of nitrogen and phosphorus metabolism in seagrasses. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 250, p. 133–167, 2000.

TRAVIESO, L.; BENÍTEZ, F.; SÁNCHEZ, E.; BORJA, R.; MARTÍN, A.; COLMENAREJO, M.F. Batch mixed culture of *Chlorella vulgaris* using settled and diluted piggery waste. **Ecological Engineering**, v. 28, p. 158-165, 2006.

VANTHOOR-KOOPMANS, M.; WIJFFELS, R. H.; BARBOSA, M. J.; EPPINK, M. H. M. Biorefinery of microalgae for food and fuel. **Bioresource Technology**, v. 135 p. 142–149, 2013.

VIEIRA, J. G.; JACOB-LOPES, E.; MANETTI, A. G. S.; QUEIROZ, M. I. Influência da temperatura na remoção de fosfato por microalgas em biorreatores heterotróficos. **Revista Ambiente & Água**, v. 7, p. 101-109, 2012a.

VIEIRA, J.; SILVA-MANETTI, A. G.; JACOB-LOPES, E.; QUEIROZ, M. I. Uptake of phosphorus from dairy wastewater by heterotrophic cultures of cyanobacteria. **Desalination and Water Treatment**, v. 40, n. 1-3, p. 224-230, 2012b.

VOLTOLINA, D.; GÓMEZ-VILLA, H.; CORREA, G. Nitrogen removal and recycling by *Scenedesmus obliquus* in semicontinuous cultures using artificial wastewater and a simulated light and temperature cycle. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 359-362, 2005.

VOURCH, M., BALANNEC, B., CHAUFER B., DORANGE G. Treatment of dairy industry wastewater by reverse osmosis for water reuse. **Desalination**. v. 219, p. 190-202, 2008.

WANG, S.-L.; CHENG, C.-Y.; TZOU, Y.-M.; LIAW, R.-B.; CHANG, T.-W.; CHEN, J.-H. Phosphate removal from water using lithium intercalated gibbsite. **Journal of Hazardous Materials**. v.147, p.205–212, 2007.

WEN, Z.Y. E CHEN, F. Heterotrophic production of ecosapentaenoic acid by microalgae. **Biotechnology Advances**, v.21, p. 273–294, 2003.

WESTHOLM, L. J. Substrates for phosphorus removal—Potential benefits for on-site wastewater treatment? **Water Research**. v.40 p.23 – 36, 2006.

WILLIAMS, P. J. B.; LAURENS, L. M. L. Microalgae as biodiesel and biomass feedstocks: review and analysis of the biochemistry, energetics and economics. **Energy and Environmental Science**, v. 3, p. 554–590, 2010.

WORSFOLD, P. J.; MONBET, P.; TAPPIN, A. D.; FITZSIMONS, M. F.; STILES, D. A.; MCKELVIE, I. D. Characterisation and quantification of organic phosphorus and organic nitrogen components in aquatic systems: A Review. **Analytica chimica acta**. v.624 p.37–58, 2008.

WU, Q., BISHOP, P.L., KEENER, T.C., STALLARD, J., STILE, L., Sludge digestion enhancement and nutrient removal from anaerobic supernatant by Mg(OH)₂ application. **Water Sci. Technol**. v.44, p.161–166, 2001.

XIN, L.; HONG-YING, H.; YING-XUE, S. Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 5494–5500, 2010.

XIN, L.; HONG-YING, H.; KEB, G.; JIA, Y. Growth and nutrient removal properties of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. LX1 under different kinds of nitrogen sources. **Ecological Engineering**.v. 36 p.379–38.1, 2010.

- XUECHU, C.; HAINAN, K.; DEYI, W.; XINZE, W.; YONGYONG, L. Phosphate removal and recovery through crystallization of hydroxyapatite using xonotlite as seed crystal. **Journal of Environmental Sciences**. v.21 p.575–580, 2009.
- YANG, S.; YANG, F.; FU, Z.; WANG, T.; LEI, R. Simultaneous nitrogen and phosphorus removal by a novel sequencing batch moving bed membrane bioreactor for wastewater treatment. **Journal of Hazardous Materials**. v.175 p.551–557, 2010.
- YE, Z.-L.; CHEN, S.-H.; WANG, S.-M.; LIN, L.-F.; YAN, Y.-J.; ZHANG, Z.-J.; CHEN, J.-S. Phosphorus recovery from synthetic swine wastewater by chemical precipitation using response surface methodology **Journal of Hazardous Materials**. v.176 p.1083–1088, 2010.
- YEN, H. W.; HU, I. C.; CHEN, C. Y.; HO, S. H.; LEE, D. J.; CHANG, J. S. Microalgae-based biorefinery-From biofuels to natural products. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 166–174, 2013.
- YUAN, Q.; OLESZKIEWICZ, J.A. Biomass fermentation to augment biological phosphorus removal. **Chemosphere**. v.78 p.29–34, 2010
- ZEPKA, L. Q. ; JACOB-LOPES, E. ; GOLDBECK, R. ; QUEIROZ, M. I. . Production and biochemical profile of the microalgae *Aphanothece microscopica* Nägeli submitted to different drying conditions. **Chemical Engineering and Processing**, v. 47, p. 1305-1310, 2008.
- ZEPKA, L. Q. ; JACOB-LOPES, E. ; QUEIROZ, M. I. Efecto del procesamiento térmico en el perfil de ácidos grasos de la microalga *Aphanothece microscopica* Nägeli. **Ciencia y Tecnología Alimentaria**, v. 5, p. 368-371, 2007.
- ZEPKA, L. Q., JACOB-LOPES, E., SOUZA-SOARES, L. A., QUEIROZ, M. I. Nutritional evaluation of single-cell protein produced by *Aphanothece microscopica* Nägeli. **Bioresource Technology**, v.101, p.7118-7122, 2010.
- ZEPKA, L. Q.; JACOB-LOPES, E.; GOLDBECK, R.; SOUZA-SOARES, L. A.; QUEIROZ, M. I. Nutritional evaluation of single-cell protein produced by *Aphanothece microscopica* Nägeli. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 7107–7111, 2010.
- ZHANG, T.; DING, L.; REN, H.; GUO, Z.; TAN, J. Thermodynamic modeling of ferric phosphate precipitation for phosphorus removal and recovery from wastewater. **Journal of Hazardous Materials**. v.176 p.444–450, 2010.
- ZHOU, W.; LIANG, H.; ZHANG, X. Erythrocyte damage of crucian carp (*Carassius auratus*) caused by microcystin-LR: in vitro study. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 38, p. 849–858, 2012.
- ZHOU, Y.; XING, X.; LIU, Z.; CUI, L.; YU, A.; FENG, Q.; YANG, H. Enhanced coagulation of ferric chloride aided by tannic acid for phosphorus removal from wastewater. **Chemosphere** v. 72, p. 290–298, 2008.
- ZHU, L.; WANG, Z.; SHU, Q.; TAKALA, J.; HILTUNEN, E.; FENG, P.; YUAN, Z. Nutrient removal and biodiesel production by integration of freshwater algae cultivation with piggery wastewater treatment. **Water Research**, v. 47, p. 4294–4302, 2013.

ZHU, R.; WU, M.; ZHU, H.; WANG, Y.; YANG, J. Enhanced phosphorus removal by a humus soil cooperated sequencing batch reactor using acetate as carbon source. **Chemical Engineering Journal**. v.166 p.687–692, 2011.