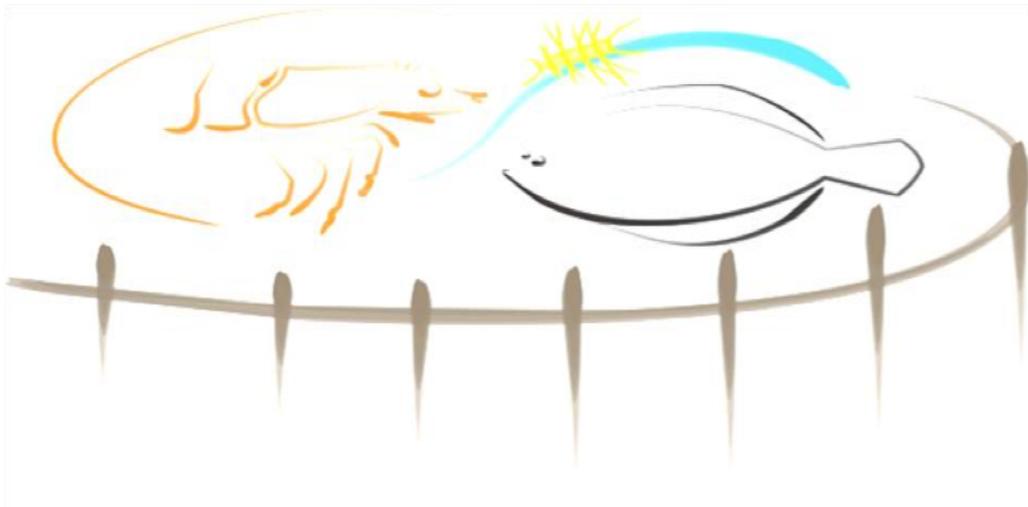




UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
INSTITUTO DE OCEANOGRAFIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA



**EFEITO DA MATÉRIA ORGÂNICA DISSOLVIDA NA
CONCENTRAÇÃO DA MICROALGA MARINHA *Nannochloropsis
oceanica***

MILENE CACCIAMANI TEIXEIRA ROSELET

RIO GRANDE, RS
Março de 2017

Universidade Federal do Rio Grande – FURG
Programa de Pós-Graduação em Aquicultura

**Efeito da matéria orgânica dissolvida na concentração da
microalga marinha *Nannochloropsis oceanica***

Milene Cacciamani Teixeira Roselet

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do grau de mestre em Aquicultura no Programa de Pós-Graduação em Aquicultura da Universidade Federal do Rio Grande.

Orientador: Dr. Paulo Cesar Abreu

Rio Grande – RS - Brasil

Março de 2017

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	iv
LISTA DE ABREVIATURAS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
Introdução	vii
1. RESUMO GERAL	1
2. ABSTRACT	3
3. INTRODUÇÃO GERAL	5
4. OBJETIVOS	12
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	13
CAPÍTULO I	16
Resumo	17
Abstract	18
1. Introdução	19
2. Material e Métodos	22
2.1. Local e período	22
2.2. Cultivo das microalgas	22
2.3. Desenho Experimental	23
2.3.1. Efeito da matéria orgânica particulada (MOP) e dissolvida (MOD) na floculação de <i>N. oceanica</i>	23
2.3.2. Efeito da afinidade da MOD na floculação de <i>N. oceanica</i>	24
2.3.3. Remoção da MOD por “skimmer” e seu efeito na floculação de <i>N. oceanica</i>	26
2.4. Análises	27
2.4.1. Abundância, biomassa e densidade ótica	27
2.4.2. Temperatura, salinidade e pH	27
2.4.3. Carbono Orgânico Dissolvido (COD)	27
2.4.4. Absorbância em 254 nm (UV ₂₅₄)	28
2.4.5. Carboidratos dissolvidos	28
2.4.6. Proteínas dissolvidas	28
2.4.7. Frações Hidrofóbica, Hidrofílica e Transfílica	28
2.4.8. Eficiência de concentração	29
2.4.9. Análise de Viabilidade celular	30
2.5. Análise Estatística	30
3. Resultados	31
3.1. Abundância das microalgas e dinâmica da MOD ao longo do cultivo	31
3.2. Resultados dos Experimentos	32
3.2.1. Efeito da matéria orgânica particulada (MOP) e dissolvida (MOD) na floculação de <i>N. oceanica</i>	32
3.2.2. Efeito da afinidade da MOD na floculação de <i>N. oceanica</i>	33
3.2.2.1. Fase Exponencial	33
3.2.2.2. Fase Estacionária	36
3.2.3. Remoção da MOD por “skimmer” e seu efeito na floculação de <i>N. oceanica</i>	38
4. Discussão	40
5. Conclusões	45
Referências	47
CONCLUSÕES GERAIS	52
PERSPECTIVAS DE FUTUROS ESTUDOS	53

AGRADECIMENTOS

No desenvolvimento de um trabalho, muitas são as dificuldades enfrentadas para se chegar ao momento de concluí-lo, e cada uma dessas dificuldades é recompensada pela satisfação de se chegar ao fim de cada pequena etapa. Dentre todas as realizações, talvez a maior de todas é saber que nada seria possível sem todos os envolvidos, profissional, emocionalmente, ou ambos, e que eles sempre estiveram ao meu lado.

Em primeiro lugar, sou grata ao meu orientador Paulo por ser um exemplo para mim, por me inspirar a seguir minha carreira como pesquisadora, e dar o meu melhor. Obrigada pela paciência, por dizer o que eu precisava ouvir, pelo apoio sempre, por sempre dar o exemplo e ter meu respeito e admiração por isso, pelas correções e pelos quindins nas reuniões. Obrigada por ser uma das melhores pessoas que eu conheço e estar ao meu lado nesta caminhada.

Aos meus colegas Bruno Kubelka e Bruno Cruz pela ajuda na manutenção dos cultivos e pela parceria. Às gurias Jana e Fran, por adoçarem as reuniões e o nosso cotidiano com as delícias do Nordeste. Agradeço também à Patrícia Costa, pelo auxílio com as leituras de carbono e a paciência de realizá-las inúmeras vezes até me convencer. Ao Mario Davi por realizar comigo as análises de proteínas, também “algumas vezes”, até eu me convencer que estava tudo certo, e por tornar leves as tardes de análises, por ser um guri muito “afú!”, sempre solícito em ajudar a qualquer momento.

Ao pessoal do Laboratório de Fitoplâncton e Microrganismos Marinhos (Ana, Savênia e Faby) por cederem material e espaço para a realização das análises de carboidratos.

Ao Sandro, por me auxiliar nas leituras de UV, pelo preparo de soluções para os experimentos e pelas conversas sempre agradáveis.

Agradeço à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Aquicultura, em especial aos professores Marcelo e Luis Henrique e à Andressa, por sempre ajudarem nas dificuldades cotidianas. A todos os professores do curso, pela experiência e

ensinamentos transmitidos durante as disciplinas. Agradeço também à CAPES pela bolsa de mestrado.

Aos meus pais Nei e Maria Luiza, pelo amor, educação, exemplo, inspiração em ser melhor a cada dia e por compreenderem a minha ausência em muitos momentos. Aos meus irmãos Giovani e Berenice por me proporcionarem o suporte e apoio necessário quando eu não pude estar presente.

À minha sobrinha Júlia por existir e me fazer querer ser um exemplo para ela, quando na verdade ela é o orgulho da tia.

Ao meu marido Lipe, por todo o apoio, por ser um incentivador da minha vida pessoal e profissional, sendo um exemplo, e por me fazer querer casar e valer a pena. Pelos diversos dias de ajuda nos experimentos, pelos conselhos e por estar comigo em todos os momentos, me proporcionando a experiência de amar e ser amada todos os dias. Aos nossos filhos Banzé e Dinossauro pelo amor incondicional, pelas brincadeiras, carinho e por nos receberem todos os dias como se o mundo fosse acabar. E por último, *in memoriam*, à filhota gatuna Mimi, Bibi, Branquinha... que passou 16 anos me ensinando o que é amor próprio e a respeitar a individualidade, e que se pode amar à distância na mesma intensidade que se ama de pertinho.

LISTA DE ABREVIATURAS

MO – matéria orgânica
MOD – matéria orgânica dissolvida
MOP – matéria orgânica particulada
DO – densidade óptica
OD_i – densidade óptica antes da adição de floculante
OD_f – densidade óptica após a adição de floculante
 η_a – eficiência de concentração
COD – carbono orgânico dissolvido
UV – absorvância em ultravioleta
UV254 – absorvância em comprimento de onda 254 nm
TC – padrão de carbono total
IC – padrão de carbono inorgânico
HPO – fração hidrofóbica da matéria orgânica dissolvida
TPH – fração transfilica da matéria orgânica dissolvida
HPI – fração hidrofílica da matéria orgânica dissolvida

LISTA DE FIGURAS

Introdução

- Figura 1: Sistema de cultivo da microalga *N. oceanica* por fotobiorreatores em estufa do Laboratório de Produção de Microalgas na Estação Marinha de Aquacultura - FURG..... 5
- Figura 2: Centrífuga Westfalia de uso contínuo em escala industrial. (<http://www.separatorequipment.com/products/geawestfaliaseparator/oseeagleclass>). 6
- Figura 3: Flocculação de microalgas (foto da autora)..... 7
- Figura 4: Biomassa de *N. oceanica* coletada no Laboratório de Produção de Microalgas da Estação Marinha de Aquacultura – FURG por concentração (Foto: Fabio Roselet). 7
- Figura 5: “Skimmer” utilizado no Laboratório de Produção de Microalgas – FURG. (<http://www.aquaset.com.br/skimer-skimmer-boyu-dt-2516-scumador-filtragem-aquario-marinho-agua-salgada-salgado-filtro-250-litros.html>)..... 10
- Figura 6: Células da microalga marinha *N. oceanica* (http://cfb.unh.edu/phycokey/Choices/Eustigmatophyceae/NANNOCHLOROPSIS/Nannochloropsis_Image_page.html)..... 11

Capítulo I

- Figura 1: Sistema de remoção de MOD com “skimmer” DG-2516. Da esquerda para a direita os tratamentos: Descarte, “Skimmer” e Controle Positivo.26
- Figura 2: Sistema de fracionamento com colunas contendo resinas XAD-7HP e XAD-4.29
- Figura 3: Valores médios (\pm DP) de: a) Densidade celular (10^4 células mL⁻¹) e Peso seco (mg L⁻¹); b) Carbono Orgânico Dissolvido (mg L⁻¹) e Absorbância UV a 254nm (cm⁻¹); c) Proteínas dissolvidas (mg L⁻¹) e Carboidratos dissolvidos (mg L⁻¹) ao longo do cultivo (dias de cultivo) de *N. oceanica*.32
- Figura 4: Valores médios (\pm DP) de: Eficiência de concentração (%) em cultivo de *N. oceanica* comparando as frações de diferentes tamanhos da matéria orgânica: 1) Ctrl + (Controle positivo - meio de cultivo sem filtração); 2) > 0,7 μ m; 3) < 0,7 μ m; 4) 0,7 μ m < x < 0,45 μ m e 5) < 0,45 μ m. Diferentes letras indicam diferenças estatísticas significativas.33
- Figura 5: Valores médios (\pm DP) de: a) Eficiência de concentração (%); b) COD (mg L⁻¹) e Absorbância UV a 254nm (cm⁻¹); c) Proteínas dissolvidas (mg L⁻¹) e Carboidratos dissolvidos (mg L⁻¹) na MOD em 5 tratamentos (controle positivo, frações hidrofóbica, transfílica e hidrofílica e controle negativo), provenientes do cultivo da microalga *N. oceanica* em fase exponencial. Diferentes letras indicam diferenças estatísticas significativas.35
- Figura 6: Valores médios (\pm DP) de: a) Eficiência de concentração (%); b) COD (mg L⁻¹) e Absorbância UV a 254nm (cm⁻¹); c) Proteínas dissolvidas (mg L⁻¹) e Carboidratos dissolvidos (mg L⁻¹) na MOD em 5 tratamentos (controle positivo, frações hidrofóbica, transfílica e hidrofílica e controle negativo), provenientes do cultivo da microalga *N. oceanica* em fase estacionária. Diferentes letras indicam diferenças estatísticas significativas.37
- Figura 7: Avaliação dos tratamentos Controle Positivo, “skimmer”, descarte e Controle Negativo em 6 parâmetros na fase exponencial do cultivo de *N. oceanica*: Valores médios (\pm DP) de: a) Eficiência de concentração (%); b) COD (mg L⁻¹) e Absorbância UV a 254nm (cm⁻¹); c) Proteínas Dissolvidas (mg L⁻¹) e Carboidratos

Dissolvidos (mg L⁻¹). Diferentes letras indicam diferenças estatísticas significativas.....39

1. RESUMO GERAL

Microalgas marinhas do gênero *Nannochloropsis* são comumente utilizadas na aquicultura como alimento vivo e, atualmente, são reconhecidas como uma promissora fonte de biocombustível e bioprodutos com aplicações nas indústrias farmacêutica e alimentícia. No entanto, a produção em larga escala de microalgas encontra dificuldades principalmente na coleta e concentração destes microrganismos. O processo de concentração e sedimentação de células com o uso de flocculantes é mais eficiente e rentável do que outros. Entretanto, este método ainda apresenta muitos problemas técnicos que impedem sua plena operacionalização. Dentre os maiores problemas, a matéria orgânica dissolvida (MOD) produzida pelas microalgas é reconhecida como um grande interferente no processo de concentração das células, acarretando no aumento da demanda de flocculantes e até mesmo podendo inviabilizar o processo. Nesta Dissertação foi avaliado o efeito da matéria orgânica no processo de concentração através da quantificação e qualificação da mesma e também pela sua retirada do meio de cultura utilizando um “skimmer”. O crescimento das microalgas foi monitorado em dias alternados num sistema de cultivo de 250 L. Amostras de 100 mL de cultivo foram filtradas em filtros de membrana de 0,45 μm de poro para obtenção da MOD e sua posterior quantificação e caracterização pelo carbono orgânico dissolvido (COD), absorvância a 254 nm (UV), além de concentração de proteínas e carboidratos. Todos estes fatores aumentaram ao longo do cultivo. A eficiência de concentração para a microalga *N. oceanica* foi testada nas frações particulada (MOP - > 0,7 μm) e dissolvida (MOD - < 0,45 μm) separadas por filtros 0,7 μm e 0,45 μm . Como flocculante foi utilizado o polímero natural Tanfloc. As frações que continham apenas MOP resultaram em eficiência de concentração superior a 90%, enquanto que os tratamentos que continham MOD na sua composição não ultrapassaram 30% de eficiência, demonstrando que a MOD é a parte da matéria orgânica que mais interfere no processo. Num segundo experimento, ao atingir as fases de crescimento exponencial e estacionária, 2 litros de cultivo foram coletados. As amostras foram centrifugadas para remoção das microalgas e, em seguida, filtradas em filtro de membrana de 0,45 μm para coleta da MOD, posteriormente fracionada por hidrofobicidade através de resinas XAD 7HP e XAD 4. A eficiência de concentração foi testada em 3 frações de matéria orgânica dissolvida: hidrofóbica (HPO), transfílica (TPH) e hidrofílica (HPI), onde foram ressuspendidas células de *N. oceanica*. Nas fases exponencial e estacionária a

pior eficiência foi observada no Controle Positivo (cultivo), seguido pela fração HPI com as menores eficiências dentre as frações testadas. A fase estacionária apresentou a pior eficiência de concentração, tanto no Controle Positivo quanto na fração HPI. Leituras de UV e concentrações de COD e proteínas aumentaram de uma fase para outra no Controle Positivo, enquanto que a concentração de carboidratos diminuiu. Desta forma se conclui que a maior concentração de proteínas na MOD interfere negativamente na floculação. A eficiência da concentração também foi testada em um terceiro experimento com a retirada de MOD pelo uso de “skimmer” obtendo-se excelentes resultados (93%), não havendo diferença estatística em comparação com o tratamento Controle Negativo (97% - sem matéria orgânica). O “skimmer” foi eficiente na retirada principalmente de proteínas do cultivo. Além disso verificou-se que o seu uso não afetou a integridade das células de *N. oceanica*. Os experimentos foram realizados em triplicata. Como os dados nos 3 experimentos apresentaram distribuição normal e foram homocedásticos, foi usada ANOVA e teste post hoc de Tukey ($p < 0,05$). Este projeto foi desenvolvido no Laboratório de Produção de Microalgas da Universidade Federal do Rio Grande – FURG, no período outubro de 2015 a fevereiro de 2017.

Palavras-chave: Fracionamento; Resinas XAD; Skimmer; Tanfloc; Carbono Orgânico Dissolvido

2. ABSTRACT

Marine microalgae of the genus *Nannochloropsis* are commonly used in aquaculture as live food and are currently recognized as a promising source of biofuels and bioproducts for applications in the pharmaceutical and food industries. However, the large-scale production of microalgae finds difficulties mainly in the harvest of these microorganisms. The process of cell concentration by flocculation followed by sedimentation is more efficient and cost effective than others. However, this method still presents many technical problems that prevent its full operationalization. Among the major problems, the dissolved organic matter (DOM) produced by microalgae is recognized as a key interferent in the concentration and sedimentation process of the cells, causing an increase in the demand for flocculants and even rendering the process unfeasible. In this Dissertation the effect of organic matter in the flocculation process was evaluated by quantification and qualification of the same and also by its removal from the culture medium using a skimmer. The microalgae growth was monitored on alternate days in a 250 L culture system. Samples of 100 mL of culture were filtered through a 0.45 μm pore membrane filter to obtain the DOM and its subsequent quantification and characterization as dissolved organic carbon (DOC), absorbance at 254 nm (UV), as well as proteins and carbohydrates contents. All of these factors increased throughout the culture. The flocculation efficiency for *N. oceanica* microalgae was tested in the particulate (POM - $> 0.7 \mu\text{m}$) and dissolved (DOM - $< 0.45 \mu\text{m}$) fractions separated by 0.7 μm and 0.45 μm filters. The Tanfloc natural polymer was used as flocculant. Fractions containing only POM resulted in flocculation efficiency greater than 90%, whereas treatments containing DOM in their composition did not exceed 30% efficiency, demonstrating that the DOM is the part of the organic matter that most interferes in the process. In a second experiment, 2 liters of were collected when the culture reached the exponential and stationary growth phases,. The samples were centrifuged to remove the cells and then filtered through a 0.45 μm pore membrane filter to collect the DOM, which was subsequently fractionated by hydrophobicity through XAD 7HP and XAD 4 resins. The flocculation efficiency was tested in three fractions of dissolved organic matter: hydrophobic (HPO), transphilic (TPH) and hydrophilic (HPI), in which cells of *N. oceanica* were resuspended. In the exponential and stationary phases the smaler efficiency was observed in the Positive Control (culture) followed by the HPI fraction with the poorest result among the fractions tested. The stationary phase had the worst flocculation efficiency, both in the

Positive Control and in the HPI fraction. UV readings and concentrations of DOC and protein increased from one phase to another in the Positive Control, while the carbohydrate concentration decreased. In this way it is concluded that the higher concentration of proteins in the DOM interferes negatively in the flocculation. The flocculation efficiency was also tested in a third experiment with the removal of DOM by the use of skimmer. The flocculation in the skimmer treatment presented excellent results (93%), and there was no statistical difference in relation to the negative control treatment (97% - no organic matter). The skimmer was efficient in the removal of proteins from the culture. In addition, it was found that its use did not affect the integrity of the *N. oceanica cells*. The experiments were performed in triplicate. As the data in the 3 experiments had normal distribution and were homocedastic, ANOVA and *post hoc* Tukey test ($p < 0.05$) were used. This project was developed in the Microalgae Production Laboratory of the Federal University of Rio Grande - FURG, from October 2015 to February 2017.

Keywords: Fractionation; XAD resins; Skimmer; Tanfloc; Dissolved Organic Carbon

3. INTRODUÇÃO GERAL

As microalgas possuem um enorme potencial comercial como fonte de biomassa para a produção de alimentos, rações, cosméticos, fármacos e biocombustíveis (Borowitzka, 2013). Por exemplo, o seu teor de óleo é superior ao da soja, contendo também altos níveis de proteínas (Becker, 2007). O teor médio de lipídios nas microalgas varia entre 1% e 70% (Metting, 1996), dos quais ácidos graxos poli-insaturados como o docosaexaenoico (DHA) e o eicosapentaenoico (EPA), que possuem efeitos benéficos no combate a doenças, estão presentes em grandes quantidades. Além disto, microalgas produzem carboidratos como amido, glucose e outros polissacarídeos, além de vitaminas, sendo indicadas para a alimentação humana (Becker, 2007). Também são ricas em pigmentos como clorofila, carotenoides e ficobiliproteínas que podem ser empregados em medicamentos e alimentos (Metting, 1996).

Para que a produção de microalgas atenda a crescente demanda de bioprodutos, é necessária a realização de cultivos em larga escala (Figura 1) (Borowitzka, 1999). No entanto, o processo de coleta das microalgas é reconhecido como uma das principais restrições para o seu desenvolvimento comercial (Vandamme et al., 2013), contribuindo com até 50% dos custos de produção (Gudin e Thepenier, 1986; Greenwell et al., 2010). Como as microalgas são organismos unicelulares, microscópicos (3–30 μm) e atingem concentrações relativamente baixas (0,05%), uma grande quantidade de água deve ser manipulada para se obter uma biomassa suficientemente concentrada (Vandamme et al., 2013). Atualmente, a coleta de microalgas é realizada principalmente por centrifugação (Figura 2) (Wijffels e Barbosa, 2010).



Figura 1: Sistema de cultivo da microalga *N. oceanica* por fotobiorreatores em estufa do Laboratório de Produção de Microalgas na Estação Marinha de Aquacultura - FURG.



Figura 2: Centrífuga Westfalia de uso contínuo em escala industrial. (<http://www.separatorequipment.com/products/geawestfaliaseparator/oseagleclass>).

No entanto, esta tecnologia é muito dispendiosa devido ao alto consumo de energia (Rawat et al., 2013), sendo empregada apenas para a obtenção de produtos de alto valor comercial como β -caroteno, astaxantina, DHA e EPA, entre outros elementos para uso em cosméticos, fármacos e alimentos cujos preços podem ultrapassar US\$ 1.000,00 g⁻¹ (Borowitzka, 2013).

Para produtos de baixo valor comercial, seja para alimentação humana e animal, ou para produção de biocombustíveis, os custos devem diminuir drasticamente. A concentração seguida de sedimentação através do uso de floculantes (Figura 3 e 4) é uma tecnologia de baixo custo comumente empregada para a retirada de pequenas concentrações de partículas em suspensão a partir de grandes volumes de líquido. Basicamente é um processo onde as partículas em suspensão são agregadas por agentes químicos (floculantes), formando partículas maiores que sedimentam e são mais fáceis de coletar (Gregory, 2013).



Figura 3: Concentração de microalgas (foto da autora).



Figura 4: Biomassa de *N. oceanica* coletada no Laboratório de Produção de Microalgas da Estação Marinha de Aquacultura – FURG por concentração (Foto: Fabio Roselet).

No entanto, devido às propriedades químicas da água marinha, a concentração de microalgas enfrenta várias limitações (Sukenik et al., 1988). Por exemplo, a alta

salinidade, força iônica e concentrações de íons como ferro, magnésio, cálcio e fosfato podem acarretar a redução da atividade química dos floculantes, além do mascaramento dos sítios ativos e a alteração da sua estrutura química, resultando na queda da eficiência do processo (Vandamme et al., 2013). Além disso, a água do mar natural apresenta elevadas concentrações de matéria orgânica dissolvida, que é bastante prejudicial para o processo de concentração (Ogawa e Tanoue, 2003; Roselet et al., 2015).

A matéria orgânica dissolvida (MOD) constitui o mais amplo “pool” de carbono orgânico nos oceanos (Passow, 2002). A MOD é constituída por ácidos orgânicos, aminoácidos, peptídeos, proteínas e carboidratos (Hellebust, 1974), e é definida como a fração que passa por um filtro de 0,45 µm de poro (Edzwald, 2010). A MOD produzida pelas algas é assimilada por bactérias e convertida em matéria orgânica particulada (MOP), a qual torna-se, então, novamente disponível para as cadeias alimentares. A disponibilização do carbono por essa rota, para os níveis tróficos superiores se caracteriza como a “Alça Microbiana” (ou “Microbial Loop”), o que contribui para modificar a quantidade e características da matéria orgânica no ambiente (Azam et al., 1993).

A MOD é composta por substâncias que podem ser agrupadas como: substâncias não-húmicas – aquelas com características químicas definidas, tais como carboidratos, proteínas, lipídeos, aminoácidos e ácidos orgânicos de baixo peso molecular; e substâncias húmicas (SH), classificadas como substâncias orgânicas biogênicas, polieletrólíticas com propriedades similares à de biocolóides, de coloração escura, natureza heterogênea, elevada massa molecular, estrutura complexa e indefinida. Verificou-se que o peso molecular e a concentração da matéria orgânica peptídica e não peptídica é altamente variável dependendo das espécies e da idade da cultura de microalgas (Henderson et al., 2008b). Por exemplo, a MOD de *Microcystis aeruginosa* compreende cerca de 60% de peptídeos/proteínas, enquanto que 40% é composta principalmente por matéria que é de carácter não peptídico (polissacarídeos, oligossacarídeos e monossacarídeos) (Pivokonsky et al., 2006).

Takaara et al. (2007, 2010) focaram no efeito inibitório de proteínas na coagulação e verificaram que, devido à sua alta afinidade com íons metálicos, várias proteínas inibem

a coagulação pela formação de complexos de proteína e coagulante altamente solúveis. Verificou-se que a formação destes complexos resulta no aumento da dose de coagulante necessária (Pivokonsky et al., 2006). Mais de 50% da MOD proveniente de microalgas é de caráter hidrofílico, formando complexos altamente solúveis de proteínas e carboidratos (Pivokonska et al., 2008).

O fracionamento da MOD permite determinar a sua composição baseada na hidrofobicidade (Pivokonsky et al., 2014). O fracionamento da MOD por resinas XAD baseia-se nas diferentes capacidades de sorção das resinas sob condições ácidas ou básicas. Esse tipo de fracionamento separa a MOD em três grandes frações definidas operacionalmente como: hidrofóbica, anfifílica e hidrofílica e é considerado um fracionamento químico. O método referenciado mundialmente para isolamento das substâncias húmicas por XAD-8 foi proposto pelo grupo de pesquisa do United States Geological Survey (Thurman & Malcolm, 1981). Desde então, vários pesquisadores aperfeiçoaram e testaram este método para melhorar a eficiência de recuperação e pureza da MOD, com uso das resinas XAD-8 e XAD-4 (Malcolm & MacCarthy, 1992; Croué et al., 1999; Chang, 2000; Goslan et al., 2002; Wei, 2008).

A matéria orgânica, dependendo de sua composição, pode ser retirada da água por diferentes métodos, como filtração e coagulação (Rubio et al., 2002; Edzwald, 2010). Além destes, os “skimmers”, comumente usados em aquicultura para manutenção da qualidade da água em tanques de cultivo, retiram proteínas, mas também, gorduras, carboidratos, bactérias, fenóis, iodo, metais e matérias em partículas em suspensão na água. Esse equipamento funciona através da produção de microbolhas, que quando inseridas na água estas atraem a matéria orgânica que se fixa nas mesmas por ação eletrostática. As bolhas impregnadas de matéria orgânica vão à superfície, onde a matéria orgânica coletada é descartada em um copo coletor (Barrut et al., 2013) (Figura 5). Os “skimmers” são mais utilizados em cultivos de mariscos, onde a presença de proteínas e polissacarídeos na água de cultivo é alta (Muniain-Mujikaa et al., 2002).



Figura 5: “Skimmer” utilizado no Laboratório de Produção de Microalgas – FURG. (<http://www.aquaset.com.br/skimer-skimmer-boyu-dt-2516-scumador-filtragem-aquario-marinho-agua-salgada-salgado-filtro-250-litros.html>).

Neste estudo foi utilizada a microalga marinha *Nannochloropsis oceanica* (previamente classificada como *Nannochloropsis oculata*) (Eustigmatofícea) (Figura 6), que é caracterizada por células esféricas de pequeno tamanho (2-4 μm) com uma morfologia simples (Andersen et al., 1998). Esta microalga apresenta altas taxas de crescimento, tolera uma ampla faixa de condições ambientais e acumula mais de 50% do seu peso seco na forma de lipídio (Moazami et al., 2012). Esta espécie é geralmente cultivada para uso na aquicultura, para alimentação de Artemia e rotíferos, além de larvas de camarões e peixes (Benemann, 1992). Recentemente, espécies do gênero *Nannochloropsis* tornaram-se conhecidas como uma potencial fonte de lipídios para a produção de biodiesel (Moazami et al, 2012), além de produzir carotenoides como astaxantina, cantaxantina e zeaxantina para uso farmacêutico e alimentar (Lubián et al., 2000).

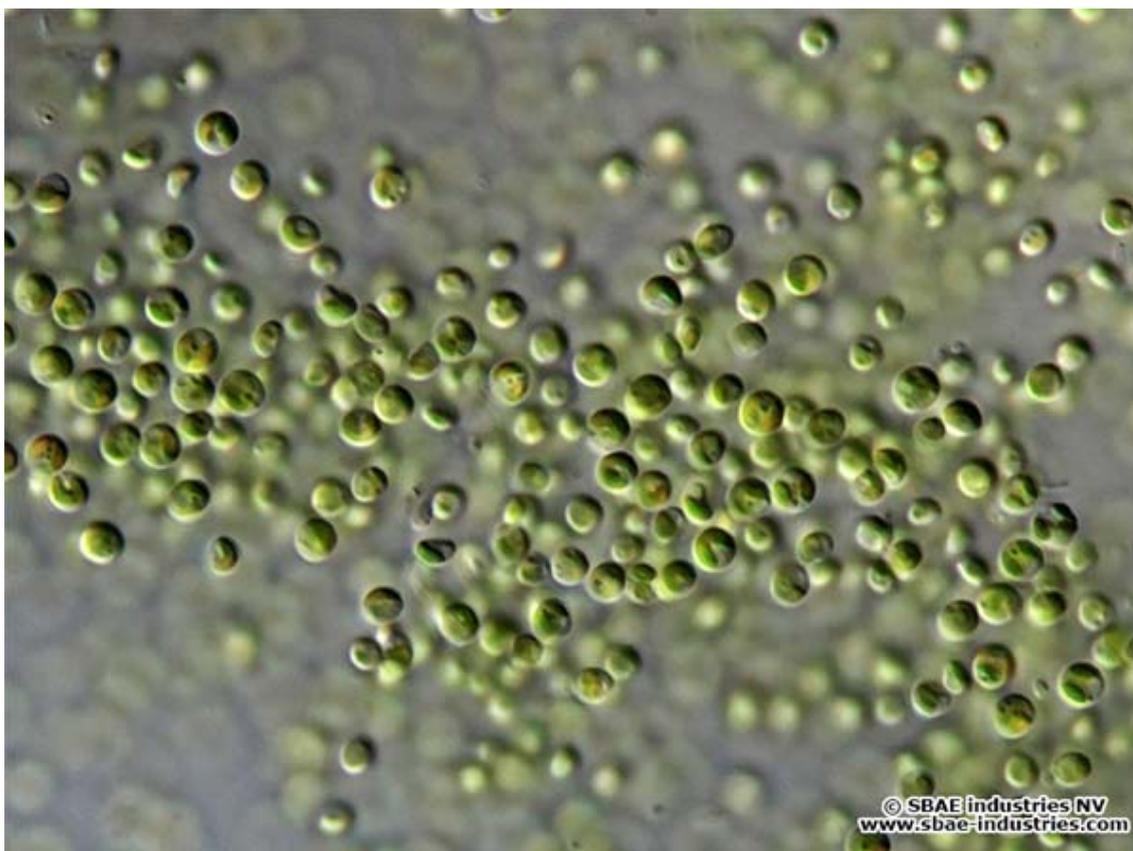


Figura 6: Células da microalga marinha *N. oceanica* (http://cfb.unh.edu/phycokey/Choices/Eustigmatophyceae/NANNOCHLOROPSIS/Nannochloropsis_Image_page.html).

Em suma, o efeito da matéria orgânica dissolvida produzida pela microalga marinha *Nannochloropsis oceanica* foi avaliado em três experimentos desenvolvidos no Laboratório de Produção de Microalgas da Universidade Federal do Rio Grande – FURG, no período outubro de 2015 a fevereiro de 2017, que procuraram atender e esclarecer os seguintes objetivos:

4. OBJETIVOS

Geral:

Estudar o efeito da matéria orgânica dissolvida (MOD) na concentração da microalga marinha *Nannochloropsis oceanica*.

Específicos:

- a) Acompanhar a dinâmica da MOD ao longo do cultivo de *N. oceanica* através de sua quantificação (carbono orgânico dissolvido, absorvância UV₂₅₄, proteínas e carboidratos).
- b) Testar a eficiência de floculação nas frações particulada (MOP - > 0,7 µm) e dissolvida (MOD - < 0,45 µm) de matéria orgânica do cultivo de *N. oceanica*.
- c) Caracterizar a MOD de um cultivo de *Nannochloropsis oceanica* após fracionamento de acordo com sua hidrofobicidade (hidrofóbica-HPO, transfilica-TPH e hidrofílica-HPI) através das análises de UV, COD, proteínas e carboidratos.
- d) Determinar qual das frações específicas de MOD (HPO, TPH ou HPI) influenciam negativamente a concentração de *Nannochloropsis oceanica*.
- e) Testar a eficiência da concentração em tratamentos com e sem a remoção de matéria orgânica pelo uso de “skimmer”, e verificar se seu uso afeta a integridade celular de *N. oceanica*.
- f) Determinar quais componentes da MOD (proteínas ou carboidratos) do cultivo de *N. oceanica* são removidos pela ação do “skimmer”.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andersen, R.A., Brett, R.W., Potter, D., Sexton, J.P., 1998. Phylogeny of the Eustigmatophyceae based upon 18S rDNA, with emphasis on Nannochloropsis. *Protist* 149, 61–74.
- Azam F., Smith, D.C., Steward, G.F, Hagstron, A., 1993. Bacteria – Organic matter coupling and its significance for oceanic carbon cycling. *Microbial Ecology*, 28:167-179.
- Barrut, B., Blancheton, J. P., Callier, M., Champagne, J.Y., Grasmick, A., 2013. Separation efficiency of a vacuum gas lift for microalgae harvesting. *Bioresour Technol*, v. 128, n. 0, p. 235-240. ISSN 0960 – 8524.
- Becker, E.W., 2007. Micro-algae as a source of protein. *Biotechnol Adv* 25, 207–210.
- Benemann, J.R., 1992. Microalgae aquaculture feeds. *J Appl Phycol* 4, 233–245.
- Borowitzka, M.A., 1999. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. *J Biotechnol* 70, 313–321.
- Borowitzka, M.A., 2013. High-value products from microalgae—their development and commercialisation. *J Appl Phycol* 25, 743–756.
- Chang, C., 2000. Characterization and isolation of natural organic matter from a eutrophic reservoir. *Journal of Water Supply and Technology – AQUA*. 49(5), 269-280.
- Croué, J. P. et al. Natural organic matter: structural characteristics and reactive properties. In: Singer, P. C. (ed). *Formation and Control of Disinfection By-products in Drinking Water*. American Water Works Association, Denver, Colorado, pp. 65-94, 1999.
- Edzwald, J.K., 2010. Coagulation in Drinking Water Treatment: Particles, Organics and Coagulants. *Water Sci Technol* 27, 21–35.
- Goslan, E. H., 2002. Seasonal variations in the disinfection by-product precursor profile of a reservoir water. *Journal of Water Supply and Technology – AQUA*. 51(8), 475-482.
- Greenwell, H.C., Laurens, L.M.L., Shields, R.J., Lovitt, R.W., Flynn, K.J., 2010. Placing microalgae on the biofuels priority list: a review of the technological challenges. *Journal of The Royal Society Interface* 7, 703–726.
- Gregory, J., 2013. Flocculation Fundamentals, in: *Encyclopedia of Colloid and Interface Science*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 459–491.

- Gudin, C., Thepenier, C., 1986. Bioconversion of solar energy into organic chemicals by microalgae. *Adv Biotechnol Processes* 6, 73–110.
- Hellebust, J.A. An extracellular products. In: Stewart, W.D.P., 1974. (Ed.) *Algal Physiology and Biochemistry*. Botanical Monographs, 10: 838863.
- Henderson, R.K., Baker, A., Parsons, S.A., Jefferson, B., 2008b. Characterisation of algogenic organic matter extracted from cyanobacteria, green algae and diatoms. *Water Res* 42, 3435–3445.
- Lubián, L.M., Montero, O., Moreno-Garrido, I., Huertas, E., Sobrino, C., González-del Valle, M., Parés, G., 2000. Nannochloropsis (Eustigmatophyceae) as source of commercially valuable pigments. *J Appl Phycol* 12, 249–255.
- Malcolm, R.L., MacCarthy, P., 1992. Quantitative evaluation of XAD-8 and XAD-4 resins used in tandem for removing organic solutes from water. *Environ. Int.* 18 (6), 597-607.
- Metting, F.B., 1996. Biodiversity and application of microalgae. *J Ind Microbiol*, 17:477–89.
- Muniain-Mujikaa, I., Gironesa, R., Tofiño-Quesadaa G., Calvob, M., Lucenaa F., 2002. Depuration dynamics of viruses in shellfish. *International Journal of Food Microbiology* 77 (1–2), 125–133.
- Moazami, N., Ashori, A., Ranjbar, R., Tangestani, M., Eghtesadi, R., Nejad, A.S., 2012. Large-scale biodiesel production using microalgae biomass of Nannochloropsis. *Biomass Bioenerg* 39, 449–453.
- Ogawa, H., Tanoue, E., 2003. Dissolved Organic Matter in Oceanic Waters. *J Oceanogr* 59, 129–147.
- Passow, U., 2002. Transparent exopolymer particles (TEP) in aquatic environments. *Progress in Oceanography* 55(34): 287283.
- Pivokonska, L., Pivokonsky, M., and Tomaskova, H., 2008. Optimization of NOM removal during water treatment. *Separation Science and Technology* 43(7), 1687 - 1700.
- Pivokonsky, M., Kloucek, O., and Pivokonska, L., 2006. Evaluation of the production, composition and aluminum and iron complexation of algogenic organic matter. *Water Research* 40(16), 3045 – 3052.
- Pivokonsky, M., Safarikova, J., Baresova, M., Pivokonska, L., Kopecka, I., 2014. A comparison of the character of algal extracellular versus cellular organic matter produced by cyanobacterium, diatom and green alga. *Water Res* 51, 37–46.

- Rawat, I., Ranjith Kumar, R., Mutanda, T., Bux, F., 2013. Biodiesel from microalgae: A critical evaluation from laboratory to large scale production. *Appl Energ* 103, 444–467.
- Roselet, F., Vandamme, D., Roselet, M., Muylaert, K., Abreu, P.C., 2015. Screening of commercial natural and synthetic cationic polymers for flocculation of freshwater and marine microalgae and effects of molecular weight and charge density. *Algal Res* 10, 183-188.
- Rubio, J., Souza, M.L., Smith, R.W., 2002. Overview of flotation as a wastewater treatment technique. *Minerals Engineering* 15, 139–155.
- Sukenik, A., Bilanovic, D., Shelef, G., 1988. Flocculation of microalgae in brackish and sea waters. *Biomass* 15, 187–199.
- Takaara, T., Sano, D., Konno, H., and Omura, T., 2007. Cellular proteins of *Microcystis aeruginosa* inhibiting coagulation with polyaluminum chloride. *Water Research* 41(8), 1653 - 1658.
- Takaara, T., Sano, D., Masago, Y., and Omura, T., 2010. Surface-retained organic matter of *Microcystis aeruginosa* inhibiting coagulation with polyaluminium chloride in drinking water treatment. *Water Research* 44(13), 3781 – 3786.
- Thurman, E.M., Malcolm, R.L., 1981. Preparative isolation of aquatic substances. *Environmental Science Technology*, v.15, p.463-6.
- Vandamme, D., Foubert, I., Muylaert, K., 2013. Flocculation as a low-cost method for harvesting microalgae for bulk biomass production. *Trends Biotechnol* 31, 233–239.
- Wijffels, R.H., Barbosa, M.J., 2010. An outlook on microalgal biofuels. *Science* 329, 796–799.
- Wei, L., 2008. Removal and transformation of dissolved organic matter in secondary effluent during granular activated carbon treatment. *Journal of Zhejiang Univ. Sci.* 9 (7): 994-1003.

CAPÍTULO I

Efeito da matéria orgânica dissolvida na concentração da microalga marinha *Nannochloropsis oceanica*

Milene Roselet^a, Fabio Roselet^a, Paulo Cesar Abreu^a

^a Laboratório de Produção de Microalgas, Instituto de Oceanografia, Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Av. Itália, Km 8, Rio Grande, RS 96201-900, Brasil

Este artigo será submetido à Algal Research e foi escrito de acordo com o formato estabelecido pela revista

Resumo

A microalga marinha *Nannochloropsis oceanica* é comumente utilizada na aquicultura como alimento vivo e, atualmente, é reconhecida como uma promissora fonte de biocombustível e bioprodutos de uso comercial. No entanto, a produção em larga escala de microalgas encontra dificuldades no processo de concentração da biomassa. A concentração de microalgas seguida de sedimentação através do uso de flocculantes é um processo mais rentável do que a centrifugação, que possui alto consumo de energia. Entretanto, este processo não é largamente empregado devido à muitos problemas técnicos. Por exemplo, a matéria orgânica dissolvida (MOD) produzida pelas microalgas é reconhecida como um grande interferente neste processo, acarretando o aumento da demanda de flocculantes. Neste estudo foi avaliado o efeito da matéria orgânica no processo de concentração. Para isso, o crescimento das microalgas foi monitorado em dias alternados num sistema de cultivo e amostras foram filtradas em filtros de membrana de 0,45 μm de poro para obtenção da MOD e sua posterior quantificação e caracterização, como carbono orgânico dissolvido (COD), absorvância a 254 nm (UV), proteínas e carboidratos. As leituras de UV, concentrações de COD, proteínas e carboidratos aumentaram ao longo do cultivo. Utilizando filtros 0,7 μm e 0,45 μm de poro, a eficiência de floculação foi testada nas frações particulada (MOP - > 0,7 μm) e dissolvida (MOD - < 0,45 μm) de matéria orgânica. As frações que continham apenas MOP resultaram em eficiência de concentração superior a 90%, enquanto que os tratamentos que continham MOD na sua composição não ultrapassaram 30% de eficiência, demonstrando que a MOD é a parte da matéria orgânica que mais interfere no processo. Ao atingirem as fases de crescimento exponencial e estacionária, a MOD do cultivo foi fracionada por características de hidrofobicidade através de resinas XAD 7HP e XAD 4. A eficiência de concentração foi testada nas frações hidrofóbica (HPO), transfílica (TPH) e hidrofílica (HPI), onde posteriormente foram ressuspensas células de *N. oceanica*. A menor eficiência foi observada na fração HPI, entretanto as menores eficiências de floculação ocorreram nos Controles Positivos (água do cultivo com MOD total), indicando que outros fatores além da hidrofobicidade afetam a concentração de microalgas. A concentração de proteínas foi maior na fase estacionária, que apresentou floculação ainda menos eficiente de que seu Controle Positivo na fase exponencial. Isto indica que a maior concentração de proteína na MOD prejudica fortemente a concentração, mais intensamente do que os carboidratos. A eficiência da concentração também foi testada

em dois tratamentos, com e sem o uso de “skimmer”. No tratamento com uso de “skimmer”, o processo apresentou excelentes resultados (93%), não havendo diferença estatística em relação ao tratamento Controle Negativo (97% - sem matéria orgânica). O “skimmer” foi eficiente principalmente na retirada de proteínas, e seu uso não afetou a integridade das células de *N. oceanica*.

Palavras-chave: Fracionamento; Resinas XAD; Skimmer; Tanfloc; Carbono Orgânico

Abstract

The marine microalgae *Nannochloropsis oceanica* is commonly used in aquaculture as a live feed and is currently recognized as a promising source of biofuels and bio-products for commercial uses. However, the large-scale production of microalgae faces difficulties in the biomass concentration process. Microalgae concentration through flocculation and sedimentation is a more cost-effective process than centrifugation, which presents high energy consumption. However, this process is not widely employed due to many technical problems. For example, the dissolved organic matter (DOM) produced by microalgae is recognized as a major interferant in this process, leading to an increase in the demand for flocculants. In this study, the effect of organic matter in the flocculation process was evaluated. For this, the growth of the microalgae was monitored in a culture system and samples were filtered through a 0.45 μm pore membrane filter to obtain the DOM. Subsequently the DOM was quantified and characterized for dissolved organic carbon (DOC), absorbance at 254 nm (UV), proteins and carbohydrates contents. UV readings, COD, proteins and carbohydrates concentrations increased throughout the microalga growth. Using 0.7 μm and 0.45 μm pore filters, the flocculation efficiency was tested in particulate (POM - $> 0.7 \mu\text{m}$) and dissolved (DOM - 0.45 μm) fractions of organic matter. Fractions containing only POM resulted in flocculation efficiency greater than 90%, whereas treatments that had DOM did not exceed 30% efficiency, demonstrating that the DOM is the part of the organic matter that most interferes in the process. After reaching the exponential and stationary growth phases, the DOM was fractionated by hydrophobicity characteristics using XAD 7HP and XAD 4 resins. The flocculation efficiency was tested in the hydrophobic (HPO), transphilic (TPH) and hydrophilic (HPI) fractions, where *N. oceanica* cells were resuspended. The lower efficiency was observed in the HPI fraction, however the flocculation efficiencies in these fractions were higher than the original culture (Positive

Control), indicating that other factors besides hydrophobicity may affect the flocculation process. The protein concentration was higher in the cultures from the stationary phase, which resulted in a lower flocculation efficiency when compared with cultures from the exponential phase. This indicates that the higher protein concentration in DOM strongly impairs flocculation more than carbohydrates. The flocculation efficiency was also tested in two treatments, with and without the use of skimmer. Flocculation in the treatment with skimmer showed excellent results (93%), with no statistical difference in relation to a culture control without organic matter (97%). The skimmer was mainly efficient in removing protein, and its use did not affect the integrity of *N. oceanica* cells.

Keywords: Fractionation; XAD resins; Skimmer; Tanfloc; Organic Carbon

1. Introdução

Nos últimos anos, muito interesse tem sido dado ao potencial biotecnológico das microalgas, principalmente devido à identificação de diversas substâncias sintetizadas por estes organismos [1]. Algumas microalgas do gênero *Nannochloropsis* e *Phaedactylum tricornutum* apresentam altas concentrações de lipídios e de ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) de cadeia longa, essenciais para a saúde humana e animal [2]. Devido ao seu perfil de ácidos graxos, *Nannochloropsis oceanica* é reconhecida como fonte promissora de EPA (C20:5) [3]. Esta espécie tem células pequenas (2 a 4 µm de diâmetro), possui formato esférico e não apresenta flagelos [4]. Na aquicultura, ela é utilizada como alimento para rotíferos ou larvas de peixes e camarões. Outra vantagem é o fato de ser uma microalga marinha, pois para cultivos em larga escala, é importante que se utilize o menor volume possível de água doce, evitando a concorrência com a produção de alimentos e com o próprio consumo humano [5].

Apesar destas vantagens, a produção comercial de microalgas encontra dificuldades, uma vez que a sua coleta é reconhecida como uma das principais restrições para a sua comercialização em larga escala [6]. De acordo com Greenwell et al. [7], a coleta pode representar até 50% do custo total da produção. Atualmente, para microalgas pequenas a coleta é realizada principalmente por centrifugação, no entanto, esta tecnologia é muito dispendiosa devido ao alto consumo de energia [8], sendo aceitável apenas para

produtos de alto valor comercial como pigmentos (β -caroteno, astaxantina), ácidos graxos (DHA, EPA) e outros elementos para uso em cosméticos e fármacos, cujos preços podem ultrapassar US\$ 1.000,00 g⁻¹ [1]. Portanto, para tornar a produção de microalgas economicamente viável, principalmente para produtos de baixo valor comercial, é imprescindível que os custos sejam consideravelmente reduzidos.

A concentração seguida de sedimentação através do uso de floculantes é uma tecnologia de baixo custo empregada no tratamento de água para a retirada de partículas suspensas em grandes volumes de líquido. Basicamente, é um processo onde a carga elétrica das partículas é desestabilizada, induzindo a coagulação e, posteriormente, a formação de aglomerados maiores, os flocos, que sedimentam [9]. No entanto, a eficiência do processo é regulada por vários fatores. Por exemplo, o pH do cultivo interfere na concentração devido a alterações nas cargas superficiais das microalgas, no envelhecimento e na ionização dos polímeros [10, 11]. Da mesma forma, a salinidade reduz a atividade química dos polímeros [12]. Além destes fatores, a matéria orgânica produzida pelas microalgas também interfere na concentração, devido a sua carga negativa, aumentando a demanda de floculantes [13]. Garzon-Sanabria et al. [14], em experimentos com *N. salina*, concluíram que a presença de matéria orgânica dissolvida (MOD) aumentou a demanda de floculante em até 10 x. Vandamme et al. [15], testaram cinco diferentes tipos de floculantes em *Chlorella vulgaris* e concluíram que a presença de MOD aumentou a dose de floculante entre 2 e 9 x, para se atingir 85% de eficiência. Roselet et al. [11] obtiveram resultados similares para *Nannochloropsis oculata*.

A MOD é definida como a fração da matéria orgânica que passa através de um filtro de 0,45 μ m de poro. Essa parcela é a de maior interesse, uma vez que a matéria orgânica particulada é facilmente removida por processos convencionais e, por isso, não afeta tanto a concentração [16]. Já a MOD, que é uma mistura complexa de substâncias de diferentes composições estruturais, apresenta dificuldades para a sua remoção. Segundo Leloup et al. [17], algumas propriedades da MOD, como a quantidade de carbono orgânico total, absorvância específica no UV, hidrofobicidade e relação proteína/carboidrato, são amplamente estudadas, na tentativa de se solucionar os problemas relacionados com tratamento de água.

Coagulantes de biopolímeros catiônicos podem interagir com componentes de MOD,

tais como carboidratos e proteínas, que levam à dispersão das células [18]. Pivokonsky et al. [19] determinaram que o principal componente de MOD provenientes do cultivo de cianobactérias que interferem negativamente no processo de coagulação é a proteína dissolvida. Por outro lado, Pivokonsky et al. [20] observaram que sem a presença de floculante, ao se submeter o cultivo de cianobactérias a um pH baixo (4) as proteínas podem promover a concentração das células. Em comparação com outros componentes da MOD, como polissacarídeos, as proteínas são removidas com maior eficiência e, nestes casos, a concentração é facilitada. Isto comprova que proteínas interagem facilmente com floculantes, competindo por eles com as microalgas [21].

O fracionamento da MOD permite determinar a sua composição baseada na hidrofobicidade [22]. As resinas macroporosas iônicas de éster acrílico XAD 7 e XAD 8 são as mais utilizadas para a extração de substâncias húmicas da água (fração hidrofóbica). Essas resinas apresentam área superficial elevada e, em geral, a adsorção dos ácidos orgânicos é determinada pela solubilidade e pH da solução, além da hidrofobicidade da MOD. Em baixos valores de pH os ácidos fracos são protonados e adsorvidos na resina; em pH elevado os ácidos são ionizados e a desorção é favorecida. Diferenças no tamanho dos poros, área superficial e composição química da resina levam a diferentes resultados para um mesmo soluto. Por exemplo, a fração hidrofóbica (HPO) é adsorvida pela resina XAD 8 ou XAD 7HP, a fração transfílica (TPH), na resina XAD 4 e podem ser extraídas por solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹. Já a fração hidrofílica (HPI) não é adsorvida nas resinas XAD 8, 7HP e 4, sendo a solução restante da percolação pelas duas resinas [23].

Com o objetivo de melhorar a eficiência do processo de concentração, buscam-se formas de retirar a MOD dos meios de cultivo. Por exemplo, Henderson et al. [24] utilizaram sulfato de alumínio para remoção de MOD por coagulação, obtendo resultados positivos (até 71%). No entanto, o sulfato de alumínio apresenta toxicidade, comprometendo a biomassa produzida. Na aquicultura, é comum utilizar “skimmers” para a remoção de matéria orgânica, para a melhoria da qualidade da água nos cultivos [25]. Estes aparelhos funcionam através da produção de microbolhas na água, que servem de superfície de adsorção da matéria orgânica. As bolhas de ar com matéria orgânica adsorvida formam uma espuma, subindo à superfície onde é descartada em um copo coletor [26], retirando a matéria orgânica da água, podendo ser uma ferramenta

complementar para auxiliar na concentração de microalgas.

O presente trabalho tem como objetivo estudar o efeito da matéria orgânica particulada e dissolvida na concentração da microalga marinha *Nannochloropsis oceanica*, e também caracterizar a MOD ao longo do cultivo, avaliando o efeito de suas diferentes frações por afinidade com a água na atuação do flocculante. Além disso, buscando otimizar a concentração, foi também testada a eficiência deste processo após a remoção de matéria orgânica através do uso de “skimmer”.

2. Material e Métodos

2.1. Local e período

Este estudo foi desenvolvido no Laboratório de Produção de Microalgas do Instituto de Oceanografia da Universidade Federal do Rio Grande – FURG, no período entre dezembro de 2015 a fevereiro de 2017.

2.2. Cultivo das microalgas

A microalga utilizada neste estudo, *Nannochloropsis oceanica* (*Eustigmatophyceae*), é uma espécie marinha e sua cepa foi obtida da coleção do Laboratório de Fitoplâncton e Microrganismos Marinhos, da Universidade Federal do Rio Grande (Brasil). Anteriormente esta cepa foi classificada como *Nannochloropsis oculata* (Cepa NANN OCUL – 1). Esta microalga foi cultivada em fotobiorreatores tubulares de 250 L (55 cm de diâmetro) com água do mar filtrada e esterilizada (salinidade 30 e pH 7,5) por 33 dias em temperatura ambiente, enriquecida com meio fertilizante (1^o, 10^o e 22^o dias de cultivo) composto de sulfato de amônio, uréia, superfosfato de cálcio, cloreto férrico e suplementado com vitaminas B₁, B₆ e B₁₂. As 3 adições de meio fertilizante tiveram como objetivos aumentar o período de crescimento das microalgas e conseqüentemente obter uma maior concentração de matéria orgânica proveniente deste crescimento. O cultivo foi homogeneizado por injeção contínua de ar atmosférico (20 L min⁻¹) e mantido sob luz natural em um fotobiorreator de 250L. Os cultivos foram monitorados até atingirem a fase estacionária.

A biomassa de microalgas destinada ao Controle Negativo (sem matéria orgânica) em todos os experimentos foi preparada da seguinte maneira: O volume desejado de cultivo foi centrifugado, sendo descartado o sobrenadante contendo a matéria orgânica. Em

seguida, a biomassa foi ressuspendida em água salgada sintética (salinidade 30) preparada com água deionizada e sal marinho da marca *Blue Treasure*. Após agitação para “lavagem” da biomassa foi feita nova centrifugação e descarte do sobrenadante. O processo de ressusensão e centrifugação foi repetido mais uma vez, totalizando duas “lavagens” da biomassa em água sintética. A biomassa em pasta resultou em um concentrado, feito para ser ressuspendido nos tratamentos e Controle Negativo dos experimentos.

O Controle Positivo consistiu na coleta e teste do cultivo, contendo todas as frações de matéria orgânica.

Durante o cultivo foram analisados os seguintes parâmetros a cada 48h:

- a) Abundância, biomassa e densidade ótica (750 nm) (veja item 2.4.1 abaixo);
- b) Temperatura, salinidade e pH (veja item 2.4.2 abaixo);
- c) Carbono orgânico dissolvido (COD) (veja item 2.4.3 abaixo);
- d) Absorbância de luz ultravioleta (UV₂₅₄) (veja item 2.4.4 abaixo);
- e) Carboidratos Dissolvidos (veja item 2.4.5 abaixo);
- f) Proteínas Dissolvidas (veja item 2.4.6 abaixo);
- g) Fracionamento da MOD (veja item 2.4.7 abaixo);
- h) Medida de eficiência de floculação (veja item 2.4.8 abaixo).

2.3. Desenho Experimental

2.3.1. Efeito da matéria orgânica particulada (MOP) e dissolvida (MOD) na floculação de *N. oceanica*

Esse experimento comparou o efeito de diferentes frações de tamanhos de MOP e MOD na concentração. Foram testados 5 tratamentos, com três repetições cada: 1) Controle Positivo (cultivo); 2) matéria orgânica >0,7 µm; 3) matéria orgânica <0,7 µm; 4) matéria orgânica <0,7 e >0,45 µm e 5) matéria orgânica <0,45 µm (MOD).

Para a realização deste experimento foram centrifugados 2 litros de cultivo da microalga marinha *N. oceanica* em fase exponencial. Dos dois litros de sobrenadante provenientes da centrifugação, 1 L foi filtrado em filtro de fibra de vidro (GF/F) de 0,7 µm. O filtro foi invertido e recolocado no aparato de filtração, e o material nele retido foi lavado

(filtração reversa) e ressuspendido em 1 L de água com salinidade 30, preparada com água deionizada e sal marinho.

Dessas filtrações, resultaram duas frações de matéria orgânica, uma $>0,7 \mu\text{m}$ e outra $<0,7 \mu\text{m}$. Em seguida, mais um litro do centrifugado foi filtrado em filtro de fibra de vidro de $0,7 \mu\text{m}$, e posteriormente refiltrado em filtro de membrana Nuclepore de $0,45 \mu\text{m}$, para obtenção da matéria orgânica dissolvida (MOD). Da mesma forma como na filtração anterior, o material retido no filtro $0,45 \mu\text{m}$ foi retirado do filtro por filtração reversa e ressuspenso em 1 L de água com salinidade 30. Desta forma, da segunda filtração se obteve mais duas frações de matéria orgânica, uma composta por matéria orgânica entre $0,7$ e $0,45 \mu\text{m}$ ($<0,7$ e $>0,45$) e outra representando a MOD $<0,45 \mu\text{m}$, i.e., que passou pelo filtro $0,45 \mu\text{m}$.

Ao final das filtrações sucessivas, obtivemos 4 frações de matéria orgânica ($>0,7 \mu\text{m}$, $<0,7 \mu\text{m}$, $<0,7$ e $>0,45 \mu\text{m}$, e $<0,45$), em 1 L de água salgada, onde foram ressuspendidas células de *N. oceanica* livres de matéria orgânica.

Para obtenção de células sem matéria orgânica foi feita a centrifugação do cultivo, descartado o sobrenadante e a biomassa concentrada foi ressuspenso em água deionizada com salinidade 30, seguida de nova centrifugação. O processo foi repetido duas vezes, totalizando duas lavagens da biomassa com água deionizada salgada. Em seguida, as células livres de matéria orgânica foram ressuspendidas em cada uma das 4 frações de matéria orgânica que foram separadas por filtração. Todos os tratamentos receberam a mesma concentração de microalgas, determinada pela densidade óptica (DO) do cultivo inicial a 750nm , ficando todas as frações com a mesma DO de 1,351.

Todas os tratamentos tiveram o pH ajustado para 7 sendo, posteriormente, submetidas à concentração com adição de floculante nos 5 tratamentos (veja item 2.4.8 abaixo) (4 frações de MO e o controle positivo). Este experimento teve duração de 30 dias, incluindo-se o crescimento do cultivo.

2.3.2. Efeito da afinidade da MOD na floculação de *N. oceanica*

O presente experimento buscou identificar qual fração da matéria orgânica, caracterizada por sua afinidade (hidrofóbica, hidrofílica e transfilica), que mais

influencia negativamente o processo de concentração. Para atingir esse objetivo, foram testados 5 tratamentos, com três repetições cada: 1) Controle Positivo, composto de todas as frações de matéria orgânica, particulada e dissolvida (cultivo sem filtração ou tratamento algum); 2) HPO – Com adição da fração Hidrofóbica; 3) HPI – Com adição da fração Hidrofílica; 4) TPH – Com adição da fração Transfílica e 5) Controle Negativo, com água do mar sintética, sem qualquer fração de MOD.

Durante o experimento, o crescimento das microalgas foi monitorado por contagem celular, densidade óptica e peso seco (veja item 2.4.1 abaixo) em dias alternados num sistema de cultivo de 250 L. Ao atingirem as fases de crescimento exponencial e estacionária, no 13º e 29º dias de cultivo, respectivamente, 2 L de cultivo foram coletados. Essas duas fases foram utilizadas para as coletas pois, dependendo do produto final desejado a partir da biomassa de microalgas, se realiza a coleta em fase exponencial (proteínas e pigmentos) ou em fase estacionária (lipídios). As amostras foram centrifugadas para remoção das microalgas e, em seguida, filtradas em filtro de membrana de 0,45 µm, para remoção do material particulado. Desta forma, o filtrado contém apenas matéria orgânica dissolvida (MOD). Diversas alíquotas foram separadas para a realização das seguintes análises:

- a) Carbono orgânico dissolvido (COD) (veja item 2.4.3 abaixo);
- b) Absorbância de luz ultravioleta (UV₂₅₄) (veja item 2.4.4 abaixo);
- c) Carboidratos Dissolvidos (veja item 2.4.5 abaixo);
- d) Proteínas Dissolvidas (veja item 2.4.6 abaixo);
- e) Fracionamento da MOD (veja item 2.4.7 abaixo);
- f) Medida de eficiência de concentração (veja item 2.4.8 abaixo).

O restante do filtrado foi utilizado para fazer o fracionamento da MOD de acordo com a sua hidrofobicidade (Hidrofóbica - HPO; Hidrofílica - HPI; Transfílica - TPH) (veja item 2.4.7 abaixo). As diferentes frações de MOD obtidas foram adicionadas a culturas de *N. oceanica* com 300 mg L⁻¹ de biomassa. Posteriormente esta biomassa foi submetida a concentração como descrito no item 2.4.8 a seguir. A duração total do experimento, incluindo crescimento do cultivo, concentração e análises foi de 45 dias.

2.3.3. Remoção da MOD por “skimmer” e seu efeito na flocculação de *N. oceanica*

Nesse experimento verificou-se se a remoção da matéria orgânica pelo uso de “skimmer” melhora o processo de concentração. Para atingir esse objetivo, foram testados 4 tratamentos com três repetições cada: 1) Controle Positivo (cultivo); 2) “skimmer” (cultivo com skimmer acoplado por 24h).; 3) descarte (água do cultivo rica em matéria orgânica proveniente da saída do “skimmer”); e 4) Controle Negativo (sem matéria orgânica).

Para realização do experimento, o crescimento das microalgas foi monitorado em dias alternados num sistema de cultivo de 250 L (2.4.1). Ao atingir a fase de crescimento exponencial, 100 L de cultivo foram coletados. Foi montado um sistema de remoção de MOD (Figura 1), constituído por 3 tanques (11 L) e 1 “skimmer” (DG – 2516; North City. China). Em cada unidade de tratamento foram adicionados 11 L de cultivo de *N. oceanica*. O “skimmer” permaneceu em operação nos tanques durante 24 horas.



Figura 1: Sistema de remoção de MOD com “skimmer” DG-2516. Da esquerda para a direita os tratamentos: Descarte, “Skimmer” e Controle Positivo.

Para cada tratamento, foram analisados os seguintes parâmetros em período inicial e após 24 horas de uso do “skimmer”:

- a) Carbono orgânico dissolvido (COD) (veja item 2.4.3 abaixo);
- b) Absorbância de luz ultravioleta (UV_{254}) (veja item 2.4.4 abaixo);

- c) Carboidratos Dissolvidos (veja item 2.4.5 abaixo);
- d) Proteínas Dissolvidas (veja item 2.4.6 abaixo);
- e) Medida de eficiência de concentração (veja item 2.4.8 abaixo);
- f) Análise de Viabilidade celular (veja item 2.4.9 abaixo).

Ao final do experimento foram coletados 300 mL de cada unidade experimental para a determinação da concentração (veja item 2.4.8 abaixo). O experimento teve duração de 30 dias, incluso crescimento do cultivo e análises.

2.4. Análises

2.4.1. Abundância, biomassa e densidade ótica

A abundância das microalgas foi monitorada por contagem celular e medição da absorbância em 750 nm [27]. A densidade ótica foi calibrada contra o peso seco, determinado por filtração em filtros de fibra de vidro GF/F previamente pesados [27]. A biomassa filtrada foi lavada com formiato de amônio (3%) para a remoção de sais [28, 29].

2.4.2. Temperatura, salinidade e pH

Os parâmetros abióticos na fase inicial do cultivo, como salinidade (30), temperatura (24°C) e pH (7,5) foram medidos utilizando-se um medidor multi-parâmetros YSI 556 (Yellow Springs Instrument, OH, USA).

2.4.3. Carbono Orgânico Dissolvido (COD)

Um analisador Shimadzu TOC–CVSP (Tóquio, Japão) foi usado para a análise de COD. O instrumento foi calibrado com hidrogenofalato de potássio (padrão de carbono total – TC) e hidrogenocarbonato de sódio e carbonato de sódio anidro (padrão de carbono inorgânico – IC). Os padrões de TC e IC variaram de 0 a 100 mg L⁻¹. A concentração de DOC foi calculada como a diferença entre as medições de TC e IC. As amostras de matéria orgânica dissolvida (MOD) foram previamente filtradas em filtro de membrana de 0,45 µm e mantidas congeladas até a análise. Todas as medições foram realizadas em triplicata. Padrões de TC e IC com concentrações de 10 e 50 mg L⁻¹ foram empregados como controles. Estas análises foram realizadas no Instituto de Ciências Biológicas da FURG.

2.4.4. Absorbância em 254 nm (UV₂₅₄)

A determinação da absorbância em 254 nm (UV₂₅₄) foi também utilizada como uma análise de COD, identificando os elementos aromáticos do conteúdo carbônico [30]. Essas medidas foram realizadas em triplicata. As amostras para análise de absorbância em 254 nm foram filtradas em membrana de acetato de celulose 0,45. Após filtração, as amostras foram analisadas em espectrofotômetro KASUAKI, em 254 nm, em cubeta de quartzo com caminho ótico de 10 mm, na Estação Marinha de Aquicultura, do Instituto de Oceanografia da FURG.

2.4.5. Carboidratos dissolvidos

Os carboidratos dissolvidos nas amostras de MOD foram quantificados pelo método do fenol-ácido sulfúrico [31]. Para esta análise, foram adicionados 0,5 ml de fenol 4% e 2,5 mL de H₂SO₄ a 1 ml de amostra, agitando-se durante 30 segundos e, após 30 min em banho-maria a 80°C, a absorbância em 490 nm foi medida em espectrofotômetro. A absorbância foi convertida em mg L⁻¹ utilizando uma curva padrão de glucose. Esta análise foi realizada em triplicata, no Laboratório de Fitoplâncton e Microrganismos Marinhos, do Instituto de Oceanografia da FURG.

2.4.6. Proteínas dissolvidas

O teor total de proteínas foi determinado através do método do Biureto [32] usando albumina de soro bovino como padrão, para conversão da absorbância (550 nm) em mg L⁻¹. A análise foi realizada utilizando-se um kit comercial (Doles Reagentes Ltda. Goiânia, GO, Brasil), e para sua execução, foi utilizada uma alíquota de cada amostra de MOD previamente armazenadas em Eppendorf (2 mL) e congeladas em triplicatas.

2.4.7. Frações Hidrofóbica, Hidrofílica e Transfílica

Para este procedimento foi utilizada a técnica de fracionamento da MOD descrita por Malcolm e MacCarthy [33]. A MOD foi separada em frações hidrofílica (HPI), hidrofóbica (HPO) e transfílica (TPH). Amostras de MOD de 2 L, com pH ajustado para 2 (HCl 0,1 M) foram percoladas através de duas colunas de vidro preenchidas com 25 cm de resinas XAD-7HP e XAD-4, respectivamente (Figura 2).

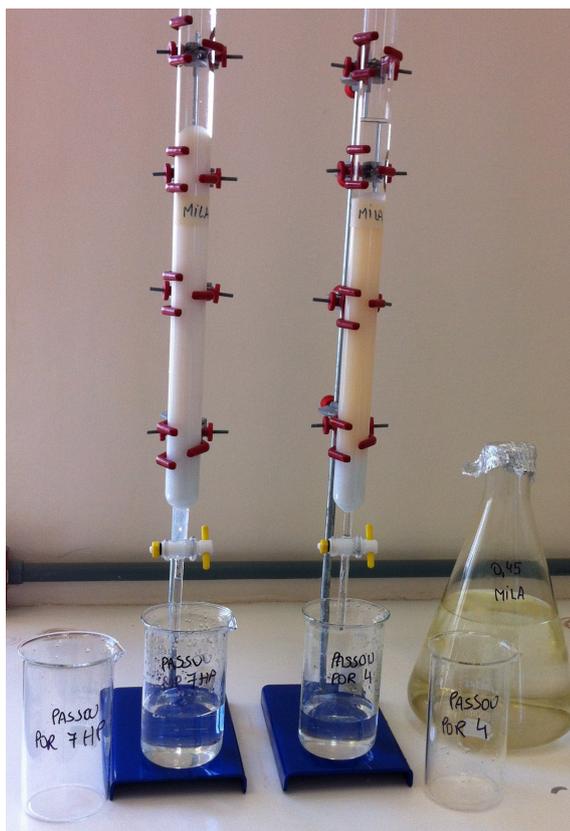


Figura 2: Sistema de fracionamento com colunas contendo resinas XAD 7HP e XAD 4.

A fração HPO foi adsorvida pela resina XAD 7HP, a fração TPH, adsorvida pela resina XAD 4, e a fração HPI foi a que restou em solução após a amostra passar pelas duas colunas. As frações HPO e TPH foram eluídas das resinas com 150 ml de NaOH 0,1 M, para ressuspensão das frações HPO e TPH. As taxas de filtração e de eluição foram, respectivamente, de 10 e 5 mL min⁻¹. O pH das três frações foi corrigido e padronizado em 7 após eluição. As concentrações de cada fração de MOD foram determinadas por medições de COD, proteínas totais e carboidratos dissolvidos, como descrito nos itens anteriores. O fracionamento da MOD foi realizado no Laboratório de Produção de Microalgas, do Instituto de Oceanografia da FURG. As análises foram realizadas em triplicata.

2.4.8. Eficiência de concentração

Foi utilizado o floculante catiônico Tanfloc SG [34]. Após preparada uma solução estoque de 1 g L⁻¹ de floculante, homogeneizada por 1 hora, foi realizado o experimento de concentração com a adição de 10 mg L⁻¹ desta solução estoque. Durante a adição do floculante, as suspensões de microalgas foram intensivamente homogeneizadas (350 rpm) durante 10 min, para permitir a dispersão uniforme do floculante, seguido por

mistura suave (250 rpm) durante 20 min para permitir a formação de flocos (concentração e floculação). Posteriormente, as suspensões de microalgas permaneceram em repouso por 30 minutos, para sedimentação. A densidade óptica a 750 nm foi medida antes da adição de flocculante (OD_i) e após a sedimentação (OD_f), 60 minutos após a primeira medição. A eficiência de concentração (η_a) foi calculada como:

$$\eta_a = \frac{(OD_i - OD_f)}{OD_i} \times 100$$

2.4.9. Análise de Viabilidade celular

A viabilidade das células foi testada utilizando 1% de corante azul de Tripán, que não é absorvido por células viáveis, com membrana íntegra. Amostras de 1 mL de cultivo de *N. oceanica* foram coletadas em dias alternados e durante o experimento com “skimmer”, e armazenados em Eppendorf. Em seguida, 1mL de solução 1% de azul de Tripán foi adicionado às alíquotas de cultivo e as células foram incubadas durante 10 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, a viabilidade foi determinada contando-se as células viáveis e não viáveis em Câmara de Neubauer em microscópio óptico com magnificação final de 400 vezes. A solução de azul de Tripán se difunde na região do protoplasma e cora as células inviáveis (com membrana rompida) em azul, portanto, as células danificadas aparecem coradas em azul e as viáveis não são coradas. A viabilidade celular foi calculada usando a seguinte fórmula:

$$\text{Células viáveis (\%)} = \frac{\text{total de células viáveis}}{\text{total de células}} \times 100$$

2.5. Análise Estatística

Nos três experimentos os tratamentos foram submetidos aos testes de Shapiro-Wilk e Levene, para verificação dos pré-requisitos de normalidade e homocedasticidade, respectivamente. Considerados os dados normais e homocedásticos, as diferenças entre os tratamentos foram determinadas por análise de variância (ANOVA) e teste post-hoc de Tukey, com nível de significância ($p < 0,05$) [35].

3. Resultados

3.1. Abundância das microalgas e dinâmica da MOD ao longo do cultivo

Nas representações gráficas de crescimento (Figura 3), o dia “0” representa os valores dos demais parâmetros avaliados antes do inóculo das microalgas. No 13º e 29º dias foram coletadas as amostras de cultivo referentes às fases exponencial e estacionária, respectivamente, utilizadas nos experimentos. A Figura 3a representa a abundância celular do cultivo de *Nannochloropsis oceanica* por densidade celular (10^4 células mL⁻¹) e peso seco (mg L⁻¹). Os valores iniciais de densidade celular e peso seco foram respectivamente 344×10^4 células mL⁻¹ e 39 mg L⁻¹. Os picos de densidade celular e peso seco coincidiram no 31º dia, e foram respectivamente 19.425×10^4 células mL⁻¹ e 556 mg L⁻¹. Após esse pico, o cultivo começa a entrar em declínio.

Altos valores de COD e UV medidos entre o 1º e o 4º dia de cultivo não foram plotados no gráfico, pois as leituras excederam a escala dos equipamentos (Figura 3b). Esses picos de leitura devem-se à presença do ácido ascórbico que foi adicionado a água antes do inóculo das microalgas, com o objetivo de retirar o cloro utilizado na esterilização da água de cultivo. A partir do 4º dia o COD seguiu um padrão ascendente ao longo do cultivo, tendo valor máximo de $13,43 \pm 0,09$ mg L⁻¹ no 33º dia. O menor valor foi de $6,48 \pm 1,2$ mg L⁻¹ no 5º dia de cultivo. A Absorbância UV (254 nm), que é proporcional à concentração de COD, medido ao longo do cultivo foi crescente do 4º ao 33º dia. O valor máximo coincidiu com o último dia de cultivo e foi de $0,11 \pm 0,00$ cm⁻¹; e o valor mínimo ocorreu no 7º dia de cultivo e foi de $0,06 \pm 0,00$ cm⁻¹.

As proteínas apresentaram valor mínimo de $2,28 \pm 1,08$ mg L⁻¹ no primeiro dia de cultivo e valor máximo de $6,74 \pm 0,96$ mg L⁻¹ no último dia de cultivo. Antes do inóculo, o valor de proteínas dissolvidas contido na água foi de $1,0 \pm 0,41$ mg L⁻¹, correspondendo ao valor mínimo (Figura 3c).

Durante o crescimento do cultivo, a concentração de carboidratos dissolvidos apresentou uma variação em pulsos (Figura 3d), atingindo elevados valores no 6º e 15º dias e diminuindo a partir daí, atingindo valores mínimos no 11º e 23º dias, seguidos de novos aumentos de carboidratos. Os aumentos, após atingir valores mínimos, coincidem com a inoculação de meio fertilizante no cultivo (1º, 10º e 22º dias). O 33º dia de cultivo

foi o de máxima concentração de carboidratos ($10,40 \pm 2,30 \text{ mg L}^{-1}$) e o 11º dia o de mínima concentração ($3,16 \pm 3,20 \text{ mg L}^{-1}$).

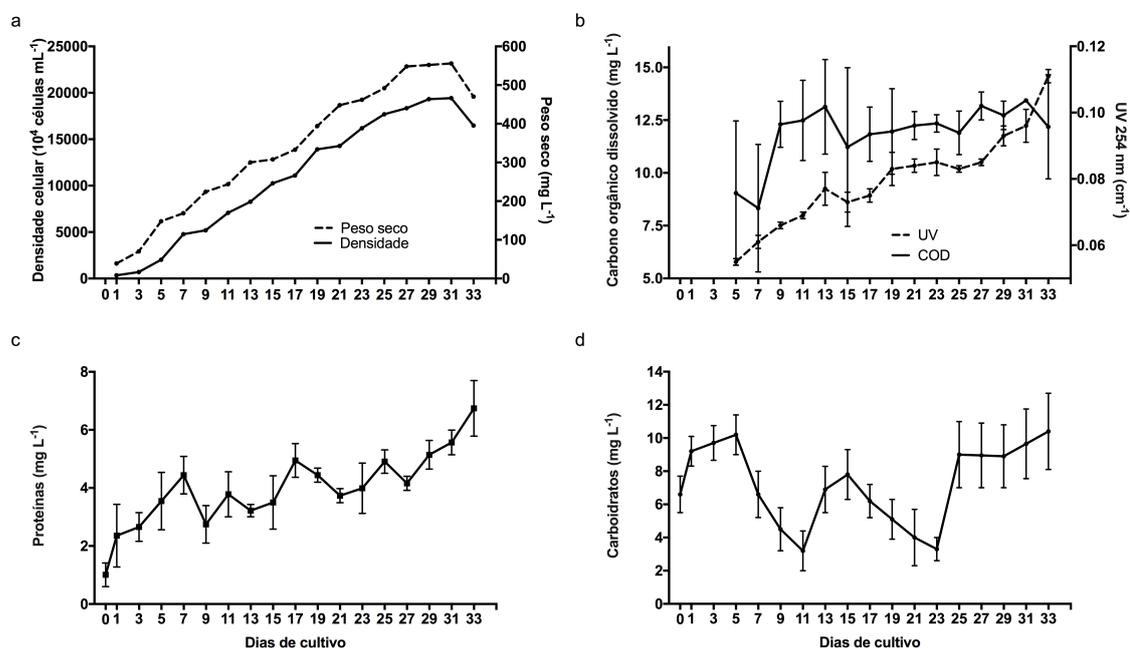


Figura 3: Valores médios (\pm Desvio Padrão – DP) de: a) Densidade celular (10^4 células mL^{-1}) e Peso seco (mg L^{-1}); b) Carbono Orgânico Dissolvido (mg L^{-1}) e Absorbância UV a 254nm (cm^{-1}); c) Proteínas dissolvidas (mg L^{-1}) e Carboidratos dissolvidos (mg L^{-1}) ao longo do cultivo (dias de cultivo) de *N. oceanica*.

3.2. Resultados dos Experimentos

3.2.1. Efeito da matéria orgânica particulada (MOP) e dissolvida (MOD) na floculação de *N. oceanica*

Nesse experimento, a melhor eficiência de concentração ($97 \pm 0,2 \%$) ocorreu igualmente em ambas as frações onde havia apenas matéria orgânica particulada ($>0,7 \mu\text{m}$ e $0,7 \mu\text{m} < x > 0,45 \mu\text{m}$). O Controle Positivo (Cultivo – com MOD total) apresentou o pior desempenho ($14 \pm 0,8 \%$), seguido pelas frações $< 0,7 \mu\text{m}$ (mistura de matéria orgânica particulada e dissolvida), com $18 \pm 1,1\%$ e $< 0,45 \mu\text{m}$ (MOD), com $26 \pm 2,2\%$ de eficiência, havendo diferença estatística entre essas 3 frações e os 2 tratamentos com MOP ($> 0,7 \mu\text{m}$ e $0,7 \mu\text{m} < x > 0,45 \mu\text{m}$), com $p < 0,05$ (Figura 4).

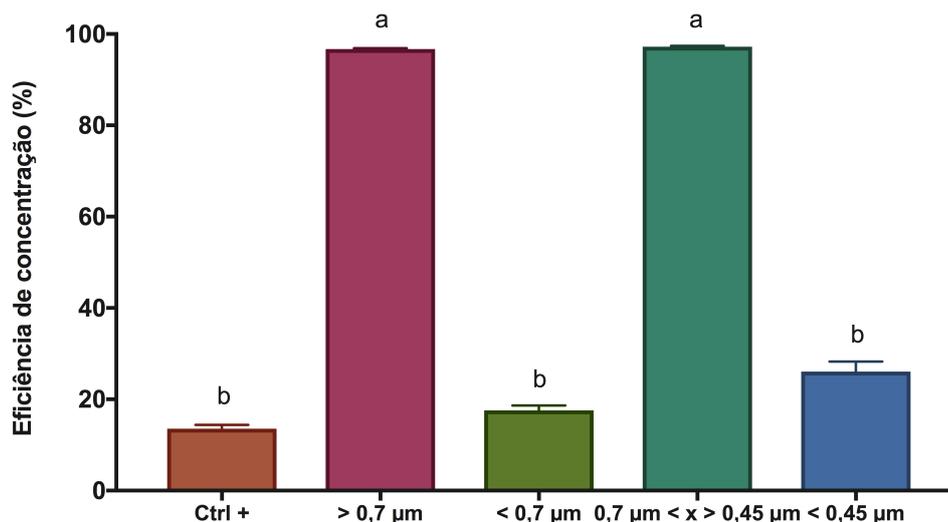


Figura 4: Valores médios (\pm DP) da eficiência de concentração (%) em cultivo de *N. oceanica* comparando as frações de diferentes tamanhos da matéria orgânica: 1) Ctrl + (Controle Positivo - meio de cultivo sem filtração); 2) > 0,7 µm; 3) < 0,7 µm; 4) 0,7 µm < x < 0,45 µm e 5) < 0,45 µm. Diferentes letras indicam diferenças estatísticas significativas.

3.2.2. Efeito da afinidade da MOD na floculação de *N. oceanica*

3.2.2.1. Fase Exponencial

O Controle Positivo (Cultivo - com MOD total) teve o pior desempenho na concentração ($77 \pm 1,3\%$) (Figura 5a), seguido da fração hidrofílica ($85 \pm 0,4\%$) e hidrofóbica ($89 \pm 0,2\%$). Os tratamentos com melhor eficiência foram o controle negativo (sem MOD) ($95 \pm 0,3\%$) e a fração transfílica ($91 \pm 0,6\%$). Houve diferenças estatísticas entre todos os tratamentos, com $p < 0,05$.

A maior concentração de COD ocorreu no Controle Positivo ($11,83 \pm 1,29 \text{ mg L}^{-1}$), e também foi elevada no tratamento com fração hidrofílica ($7,93 \pm 0,78 \text{ mg L}^{-1}$). O Controle Negativo ($4,05 \pm 0,14 \text{ mg L}^{-1}$) apresentou valor de COD maior do que as frações hidrofóbica e transfílica, respectivamente ($3,05 \pm 0,84 \text{ mg L}^{-1}$) e ($2,33 \pm 0,25 \text{ mg L}^{-1}$) (Figura 5b). Ocorreram diferenças estatísticas entre os tratamentos Controle Positivo e fração hidrofílica, e deles com os demais tratamentos. As frações hidrofóbica, transfílica e Controle Negativo não apresentaram diferenças estatísticas entre si ($p < 0,05$).

A absorvância UV a 254 nm apresentou maior valor no tratamento Controle Positivo ($0,08 \pm 0,00 \text{ cm}^{-1}$), seguido pelo tratamento com fração hidrofóbica ($0,04 \pm 0,00 \text{ cm}^{-1}$) (Figura 5b). O tratamento com menor valor de UV foi o Controle Negativo ($0,01 \pm 0,00 \text{ cm}^{-1}$), seguido das frações transfílica e hidrofílica, respectivamente ($0,02 \pm 0,00 \text{ cm}^{-1}$) e ($0,02 \pm 0 \text{ cm}^{-1}$). O Controle Positivo, frações hidrofóbica e hidrofílica diferenciaram-se estatisticamente entre si e os demais tratamentos. O Controle Negativo e a fração transfílica não apresentaram diferenças estatísticas entre si ($p < 0,05$).

A maior concentração de proteínas dissolvidas ocorreu no Controle Positivo ($4,49 \pm 0,22 \text{ mg L}^{-1}$) e tratamento com fração hidrofóbica ($4,11 \pm 0,29 \text{ mg L}^{-1}$), não havendo diferença estatística entre eles. O Controle Negativo, de menor concentração em proteínas ($0,49 \pm 0,42 \text{ mg L}^{-1}$) e a fração hidrofílica ($2,51 \pm 0,71 \text{ mg L}^{-1}$) se igualaram estatisticamente ao tratamento com a fração transfílica ($1,62 \pm 0,88 \text{ mg L}^{-1}$), porém, houve diferença estatística da fração hidrofílica com o Controle Negativo, fração hidrofóbica e controle positivo, com $p < 0,05$ (Figura 5c).

Os carboidratos dissolvidos obtiveram maior concentração no Controle Positivo ($6,20 \pm 0,80 \text{ mg L}^{-1}$), e menor concentração no tratamento contendo fração transfílica ($1,50 \pm 0,60 \text{ mg L}^{-1}$). Dentre os tratamentos com frações separados por hidrofobicidade, o que obteve maior valor de carboidratos foi o de fração hidrofílica ($3,40 \pm 0,80 \text{ mg L}^{-1}$) (Figura 5c). Não houve diferenças estatísticas entre os tratamentos Controle Positivo e fração hidrofóbica, mas estes se diferenciaram estatisticamente dos tratamentos com as frações transfílica, hidrofílica e Controle Negativo (que não apresentaram diferenças estatísticas entre elas), com $p < 0,05$.

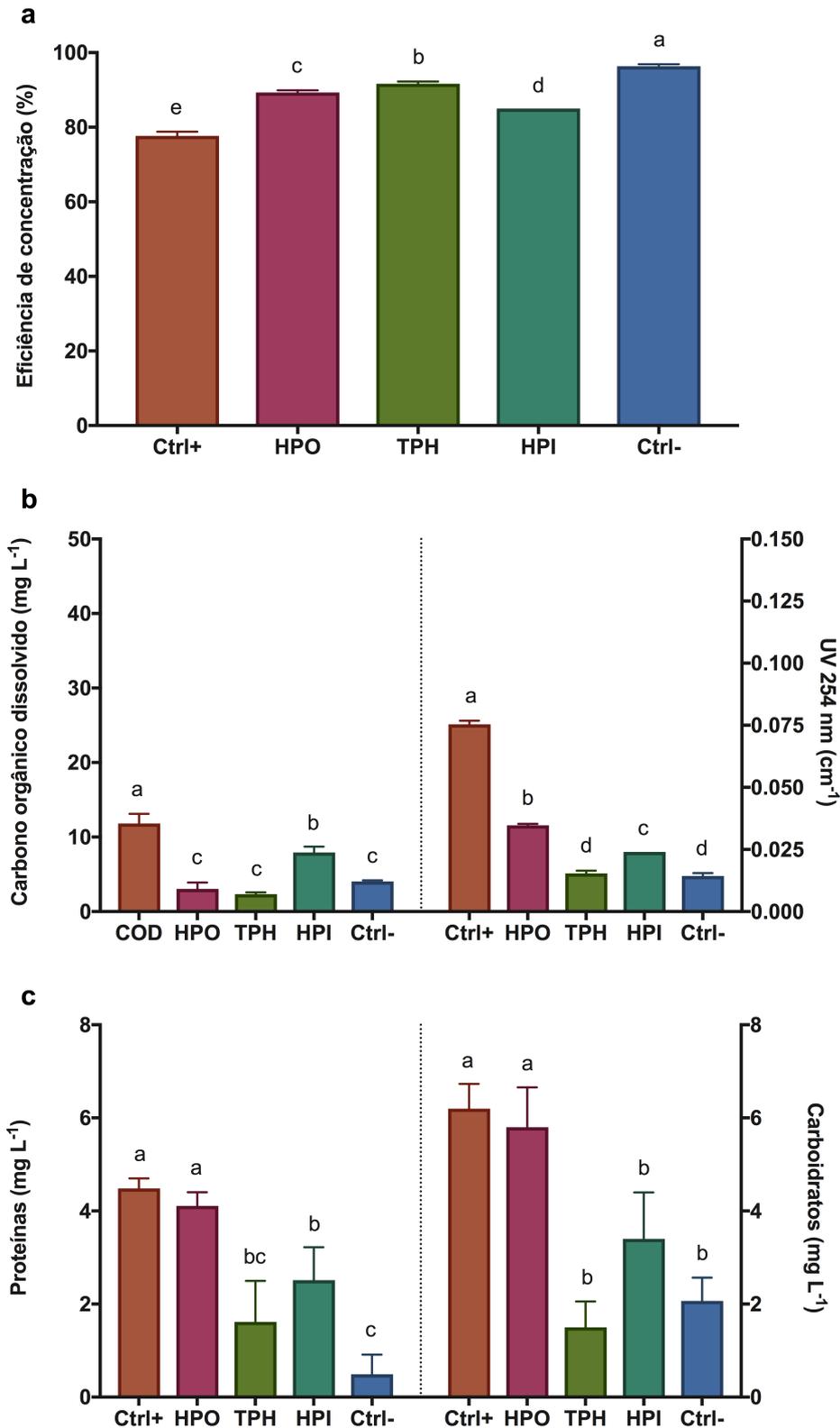


Figura 5: Valores médios (\pm DP) de: a) Eficiência de concentração (%); b) COD (mg L^{-1}) e Absorbância UV a 254nm (cm^{-1}); c) Proteínas dissolvidas (mg L^{-1}) e Carboidratos dissolvidos (mg L^{-1}) na MOD em 5 tratamentos (Controle Positivo, frações hidrofóbica, transfílica e hidrofílica e Controle Negativo), provenientes do cultivo da microalga *N. oceanica* em fase exponencial. Diferentes letras indicam diferenças estatísticas significativas.

3.2.2.2. Fase Estacionária

Para a eficiência de concentração (Figura 6a), o Controle Positivo (Cultivo - com MOD total) diferiu estatisticamente ($p < 0,05$) dos demais tratamentos. A melhor eficiência ocorreu no tratamento Controle Negativo (sem MOD) ($97 \pm 0,1 \%$), e a pior no controle positivo ($14 \pm 0,7 \%$). Dentre as frações separadas por hidrofobicidade, o pior resultado foi o tratamento com fração hidrofílica ($80 \pm 0,6 \%$).

Para o COD (Figura 6b), a fração hidrofílica ($14,75 \pm 1,98 \text{ mg L}^{-1}$) apresentou o maior valor dentre os tratamentos, e a fração transfílica o menor valor ($2,17 \pm 1,95 \text{ mg L}^{-1}$). O Controle Positivo e o tratamento com fração hidrofílica apresentaram diferença estatística entre si e os demais tratamentos. Já os tratamentos hidrofóbica, transfílica e Controle Negativo não apresentaram diferenças estatísticas.

O maior valor de UV (Figura 6b) ocorreu no tratamento Controle Positivo ($0,13 \pm 0,00 \text{ cm}^{-1}$), e o menor no tratamento Controle Negativo ($0,02 \pm 0,00 \text{ cm}^{-1}$). Todos os tratamentos diferiram estatisticamente ($p < 0,05$) entre si.

A maior concentração de proteínas dissolvidas (Figura 6c) ocorreu no tratamento Controle Positivo ($5,69 \pm 0,48 \text{ mg L}^{-1}$) e a menor no tratamento Controle Negativo ($0,45 \pm 0,03 \text{ mg L}^{-1}$), o qual não diferiu estatisticamente da fração hidrofílica. Os tratamentos Controle Positivo, com fração hidrofóbica e fração transfílica apresentaram diferenças estatísticas ($p < 0,05$) entre si.

O maior e o menor valor de carboidratos dissolvidos (Figura 6c) foram, respectivamente, $6,66 \pm 0,61 \text{ mg L}^{-1}$ (Controle Positivo) e $1,31 \pm 0,79 \text{ mg L}^{-1}$ (fração transfílica), e ambos diferem estatisticamente entre si. Já os tratamentos com fração hidrofóbica, hidrofílica e o Controle Positivo não diferiram estatisticamente entre si, nem em relação aos demais tratamentos ($p < 0,05$).

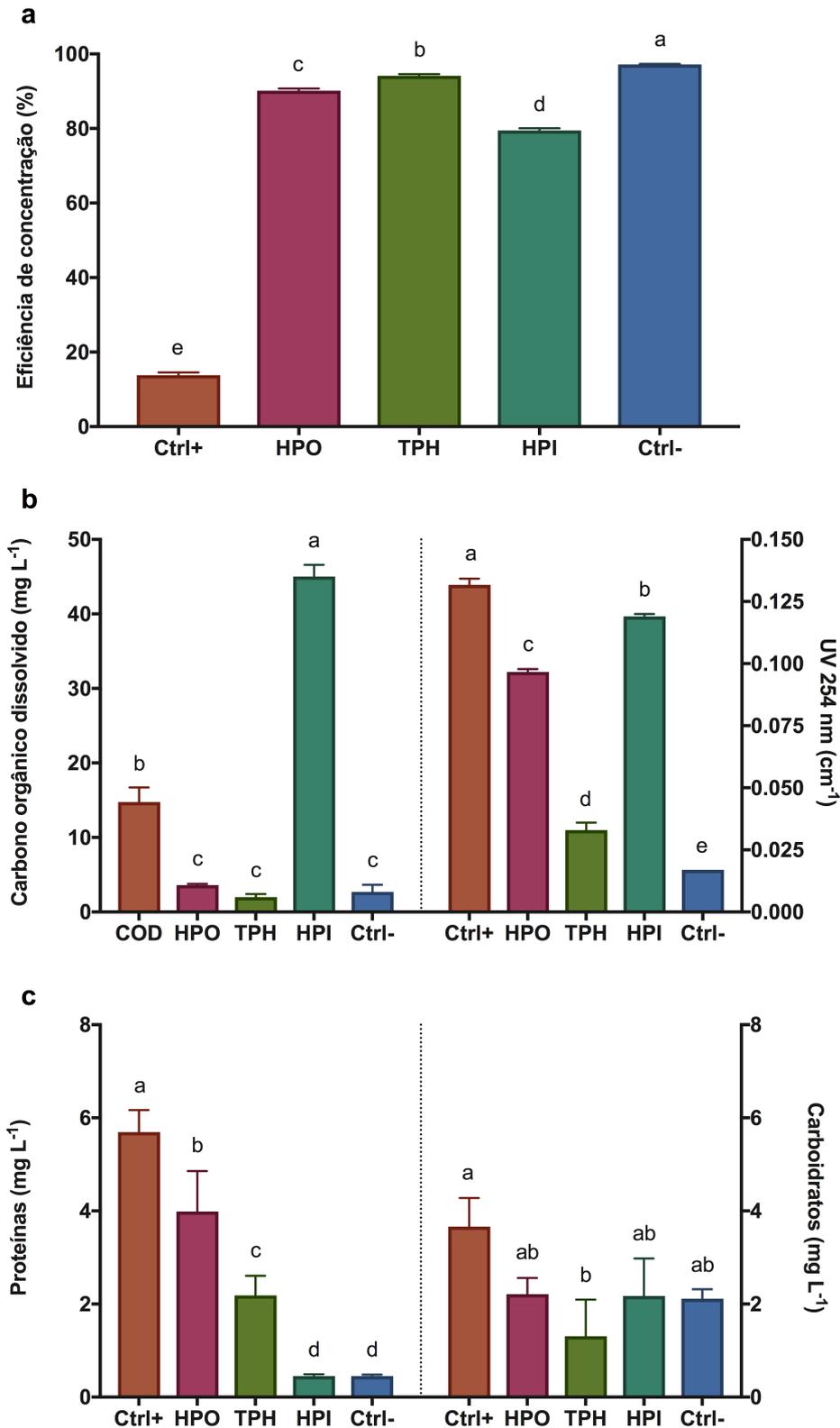


Figura 6: Valores médios (\pm DP) de: a) Eficiência de concentração (%); b) COD (mg L^{-1}) e Absorbância UV a 254nm (cm^{-1}); c) Proteínas dissolvidas (mg L^{-1}) e Carboidratos dissolvidos (mg L^{-1}) na MOD em 5 tratamentos (Controle Positivo, frações hidrofóbica, transfílica e hidrofílica e Controle Negativo), provenientes do cultivo da microalga *N. oceanica* em fase estacionária. Diferentes letras indicam diferenças estatísticas significativas.

3.2.3. Remoção da MOD por “skimmer” e seu efeito na flocculação de *N. oceanica*

Para eficiência de concentração (Figura 7a), os tratamentos Controle Negativo (sem MOD) ($97 \pm 1,0 \%$) e com “skimmer” ($93 \pm 1,0 \%$) não apresentaram diferença estatística entre si. A menor eficiência de concentração ocorreu no tratamento descarte ($67 \pm 3,0 \%$), que foi similar ao controle positivo (Cultivo – com MOD total) e estes apresentaram diferença estatística em relação aos demais tratamentos.

Nesse experimento, o maior valor de COD (Figura 7b) ocorreu no tratamento descarte ($15,54 \pm 0,44 \text{ mg L}^{-1}$) e o menor valor no tratamento Controle Negativo ($2,25 \pm 0,41 \text{ mg L}^{-1}$). O mesmo ocorreu com os valores de absorvância em UV 254 nm, onde o descarte apresentou valor de $0,48 \pm 0,01 \text{ cm}^{-1}$, tendo como valor mínimo o Controle Negativo com $0,02 \pm 0,00 \text{ cm}^{-1}$. Todos os tratamentos (COD e UV) apresentaram diferenças estatísticas entre si ($p < 0,05$).

Os tratamentos Controle Negativo e com “skimmer” não diferiram estatisticamente entre si para proteínas dissolvidas (Figura 7c), mas ambos diferiram do controle positivo e descarte, que foram estatisticamente diferentes entre si ($p < 0,05$). O maior valor ocorreu no tratamento descarte ($5,68 \pm 0,46 \text{ mg L}^{-1}$), e o menor no Controle Negativo ($0,69 \pm 0,21 \text{ mg L}^{-1}$).

Não houve diferença estatística entre os tratamentos “skimmer” e descarte nos valores de carboidratos dissolvidos (Figura 7c), mas houve diferença entre eles e os tratamentos Controle Positivo e Controle Negativo, que também diferiram estatisticamente entre si ($p < 0,05$). O maior valor dentre os carboidratos dissolvidos ocorreu no Controle Positivo ($7,52 \pm 0,65 \text{ mg L}^{-1}$) e o menor ocorreu no Controle Negativo ($0,89 \pm 0,39 \text{ mg L}^{-1}$).

O tratamento com “skimmer” não provocou rompimento da membrana celular nas microalgas, pois durante a observação ao microscópio, não foram observadas células coradas em azul pelo pigmento Azul de Tripán em nenhum dos 4 tratamentos (controle positivo, “skimmer”, descarte e controle negativo).

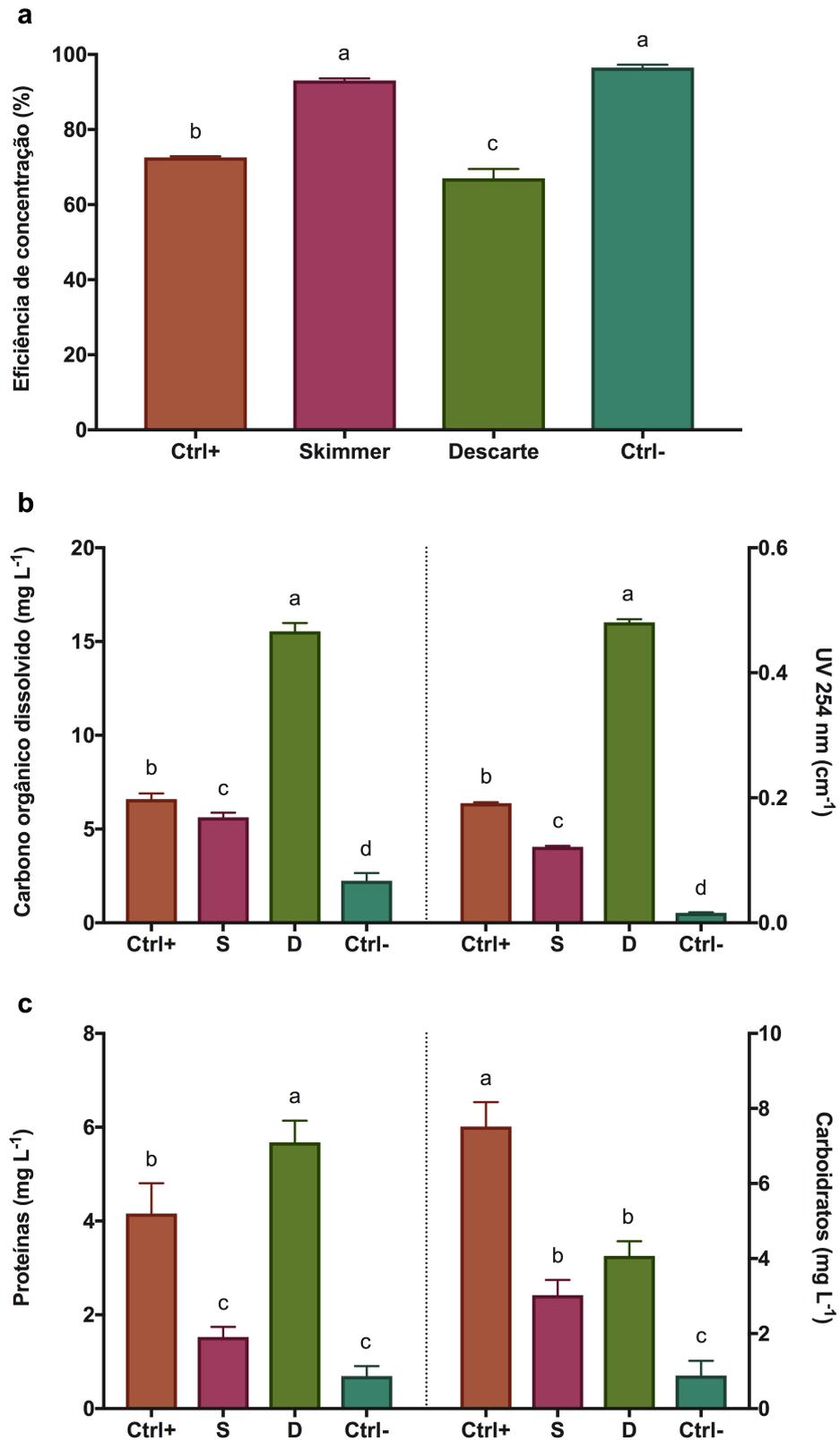


Figura 7: Avaliação dos tratamentos Controle Positivo, “skimmer”, descarte e Controle Negativo em 6 parâmetros na fase exponencial do cultivo de *N. oceânica*. Valores médios (\pm DP) de: a) Eficiência de concentração (%); b) COD (mg L^{-1}) e Absorbância UV a 254nm (cm^{-1}); c) Proteínas Dissolvidas (mg L^{-1}) e Carboidratos Dissolvidos (mg L^{-1}). Diferentes letras indicam diferenças estatísticas significativas.

4. Discussão

Para que possamos explorar todos os benefícios que as microalgas podem nos oferecer, é importante que se desenvolvam métodos economicamente viáveis de produção e de coleta de biomassa em larga escala. O uso das microalgas na aquicultura (como alimento) e para produção de biocombustíveis, são exemplos de produtos finais que necessitam ter um valor acessível, para que possam ser economicamente sustentáveis.

A separação das microalgas da água representa até 50% dos custos totais da produção segundo Greenwell et al. [36], sendo que hoje em dia a centrifugação é o principal processo usado para este fim. Entretanto, este é um método oneroso, apesar de eficiente [37]. Por esse motivo, o desenvolvimento de outros métodos economicamente sustentáveis é tão importante, pois a centrifugação só é viável para a produção de elementos de alto valor econômico, como ácidos graxos polinsaturados para suplementos alimentares e pigmentos [1]. A concentração através do uso de floculantes, por outro lado, é um método de separação de baixo custo, comumente usado no tratamento de água e de efluentes. Estudos recentes demonstraram que a floculação é um processo promissor para a coleta de microalgas [9, 34, 38], mas que ainda apresenta alguns problemas tais como a interferência de alguns elementos presentes na água, pois os floculantes não têm ação específica nas células das microalgas, interagindo com outras diversas substâncias [12, 38]. Conseqüentemente, torna-se necessário otimizar o processo para separação e coleta de biomassa de microalgas.

Usualmente em estações de tratamento de água o floculante atua em água doce, não havendo interferência do sal no processo. Por outro lado, para concentração de microalgas marinhas, o sal atua negativamente devido a alta força iônica, bem como pela presença de outros elementos presentes na água do mar, como íons ferro, magnésio, cálcio e fosfato. Estas propriedades acarretam na redução da atividade química dos floculantes, além do mascaramento dos sítios ativos e na alteração da sua estrutura química, resultando na queda da eficiência e na maior demanda de floculante [12]. A resolução dos problemas causados pela água salgada durante a concentração é de grande importância, pois a água marinha é abundante e deve ser utilizada prioritariamente para cultivos de microalgas, deixando a água doce para usos mais nobres, como abastecimento público e produção agrícola.

Além do sal, outro fator que interfere no processo de concentração de microalgas é a matéria orgânica presente na água do mar, e também produzida durante o crescimento do cultivo. Em especial, a matéria orgânica dissolvida (MOD) é um forte interferente, pois compete com a microalga pelo flocculante, aumentando significativamente sua demanda [13]. A MOD já está presente em quantidades significativas na água do mar utilizada no cultivo das microalgas. Entretanto, a maior parte da MOD em sistemas de cultivo de microalgas provém das próprias microalgas.

Microalgas são microrganismos procarióticos ou eucarióticos clorofilados, autotróficos, que produzem hidratos de carbono, proteínas e lipídios como resultado da fotossíntese, sendo que esses compostos são também excretados pelas microalgas, compondo a MOD presente na água do cultivo, mas também produzidos pela lise celular devido à morte das células, que ocorre nas fases estacionária e senescente do crescimento das microalgas.

Ao longo do cultivo da microalga *Nannochloropsis oceanica* verificou-se que o COD aumentou gradativamente, como também é demonstrado pelos valores de absorvância UV a 254nm (Figura 3b). As leituras de ambos (COD e UV) foram comprometidas do 1º ao 4º dia de cultivo, pois excederam os valores máximos dos equipamentos. Após testes realizados, chegou-se à conclusão que a interferência aconteceu em virtude do ácido ascórbico, que é adicionado ao cultivo antes do inóculo de microalgas, para eliminar o cloro utilizado na purificação da água do mar. Ao longo do cultivo, as maiores concentrações de COD foram observadas na fase estacionária, onde o cultivo já acumula maior concentração desses compostos não só pela exsudação, mas também pelo rompimento de células após a sua morte. As leituras em UV em comprimento de onda 254 nm identificam compostos aromáticos, em sua maior parte de natureza hidrofóbica [19, 39], demonstrando também que a hidrofobicidade aumentou no decorrer do cultivo. Isso ocorre porque compostos orgânicos com estrutura aromática ou ligações duplas de carbono são absorvidos pela radiação ultravioleta a 254 nm [40].

A concentração de proteínas se elevou inicialmente, havendo pequenas quedas em pulsos a partir do 7º dia, mas apresentando valores crescentes no decorrer do cultivo. As mais altas concentrações ocorreram na fase final (estacionária), coincidindo com os

valores de UV, representando aumento da hidrofobicidade. Os carboidratos, por outro lado, apresentaram pulsos com maiores valores ao longo do cultivo. Os aumentos na concentração de carboidratos, provavelmente resultaram da entrada de meio fertilizante que foram adicionados um dia antes dos aumentos em sua concentração. Por outro lado, as quedas bruscas na concentração de carboidratos podem ter resultado da ação de bactérias que consomem preferencialmente os açúcares de menor peso molecular, o que pode vir a ser uma solução para a melhora da eficiência de floculação no cultivo onde há altas taxas de carboidratos, já que estes possuem relação inversa com a floculação.

A matéria orgânica, presente nos ambientes aquáticos se apresenta nas formas particulada e dissolvida e em diferentes tamanhos. Essas propriedades influenciam diretamente a maneira como interagem com o meio e sua facilidade de remoção da água [16]. A matéria orgânica particulada (MOP) é facilmente retirada por métodos tradicionais, como coagulação ou filtração, não sendo um interferente importante na interação entre as células e o floculante. Já a matéria orgânica dissolvida (MOD), além de estar presente em alta concentração em cultivos de microalgas, é uma fração de alta interação, influenciando negativamente no processo de concentração [14]. O experimento com diferentes tamanhos de partículas de MOD e MOP mostrou claramente que há diferenças marcantes na eficiência de concentração considerando-se as diferentes frações matéria orgânica presente na água. Nos testes realizados o desempenho de concentração se apresentou muito baixo especialmente nas frações contendo MOD ($< 0,7 \mu\text{m}$ e $< 0,45 \mu\text{m}$), ao contrário do que aconteceu em amostras que continham apenas MOP. De acordo com esses resultados, buscando entender ainda melhor a influência da MOD na concentração de microalgas, fracionamos a MOD de acordo com a sua hidrofobicidade, buscando entender que parte dessa MOD afeta mais o processo em estudo e de onde ela vem.

O fracionamento da MOD por resinas XAD baseia-se nas diferentes capacidades de sorção das resinas sob condições ácidas ou básicas [23]. Esse tipo de fracionamento separa a MOD em três grandes frações definidas operacionalmente como: hidrofóbica, transfilica e hidrofílica e é considerado um fracionamento químico. A fração hidrofóbica é de origem alóctone, proveniente da degradação dos compostos orgânicos presentes da água. Já a fração hidrofílica tem sua principal origem no metabolismo das microalgas durante o crescimento do cultivo. Os ácidos hidrofóbicos (ácidos húmicos e

fúlvico – HPOA) e os ácidos transfilicos (TPHA) representam de 50 a 90% da MOD nas águas naturais, enquanto que a parcela hidrofílica (HPI) representa de 20 a 30% [41]. Entretanto, cada sistema aquático pode ter múltiplas fontes de MOD, e variações na distribuição das frações de MOD têm sido associadas a mudanças sazonais e a fatores ambientais, que vão desde ocorrências de tempestades a foto- e biodegradação [42].

Sabe-se que a fração de HPO contém, principalmente, hidrocarbonetos, alquil-aminas e ácidos carboxílicos de elevado peso molecular, além de ácidos aromáticos, fenóis e substâncias húmicas [43]. Estes elementos formam uma densidade de carga significativamente maior na fração HPO do que na fração HPI, que contém porção elevada de carbono alifático e compostos nitrogenados, como carboidratos, proteínas, açúcares e aminoácidos [30, 44, 45]. Já a fração TPH apresenta teores mais elevados de oxigênio, nitrogênio e enxofre, com um menor caráter aromático.

Resultados obtidos neste trabalho demonstram que a fração Hidrofílica apresentou os piores resultados de eficiência de floculação em comparação com as demais frações. Verificou-se que esta fração apresentou a maior quantidade de MOD nos dois experimentos. Takaara et al. [46] analisaram o potencial inibitório da MOD produzida por *Microcystis aeruginosa* na etapa de coagulação e verificaram que compostos hidrofílicos de cianobactérias carregados negativamente têm efeito significativo na inibição da coagulação com o uso de cloreto de polialumínio. Entretanto, concentrações mais elevadas de COD no experimento em fase estacionária, maior até que o Controle Positivo, provavelmente se deveu a problemas metodológicos. O aumento na concentração de COD provavelmente é o resultado de contaminação da amostra proveniente das resinas, o que pode ocorrer após algumas percolações, por resíduos de sorções acumulados, principalmente nesta fração, que percorreu ambas as colunas, XAD 7HP e XAD 4. Algumas vantagens de se usar as resinas XAD são alto fator de concentração, eficiente desorção, capacidade de regeneração da resina adsorvente e grandes volumes de amostra podem ser processados. Por outro lado, as desvantagens de fracionamento com essas resinas são que o uso de ácidos e bases fortes altera levemente as características químicas da MOD, com o aumento de sua polaridade, degradação oxidativa, contaminações da amostra proveniente da resina e possível sorção irreversível [47]. Contudo, como a possível contaminação não alterou as concentrações

de carboidratos ou proteínas, os prováveis componentes seriam outros compostos orgânicos que não afetaram significativamente os resultados de eficiência de concentração.

Por outro lado, a fração Hidrofílica apresentou concentrações diferentes de proteína e carboidratos nos dois experimentos. Durante a fase exponencial HPI apresentou maiores concentrações de carboidrato em comparação com proteína. O inverso ocorreu no experimento da fase estacionária, quando ocorreu maior concentração de proteína e menores de carboidratos (Figuras 5c e 6c). Proteínas e carboidratos produzidos ao longo do cultivo de *N. oceanica* apresentaram variações em suas concentrações conforme a fração de MOD. As proteínas aumentaram constantemente ao longo do cultivo, enquanto que a concentração de carboidratos foi variável, provavelmente devido ao consumo destes pelas bactérias (Figura 4c).

Apesar de que a fração hidrofílica foi aquela que apresentou os menores resultados de eficiência de concentração comparada com as frações hidrofóbica e transfílica (Figuras 5 e 6), esta apresentou eficiências de concentração muito maiores do que o Controle positivo, onde estava presente toda a matéria orgânica dissolvida, i.e., sem fracionamento, nos dois experimentos. Isto indica que o efeito da afinidade, ou hidrofobicidade, da matéria orgânica não é o principal fator que afeta a concentração.

A observação dos resultados mostra que a concentração de proteínas foi significativamente maior no Controle Positivo na fase estacionária, portanto, é bastante provável que as proteínas sejam as responsáveis por essa interferência negativa no processo. O efeito negativo de proteína sobre o processo de concentração também foi observado em estudos recentes [48, 39], que atribuíram o aumento de proteína à degradação de bactérias e protozoários presentes no cultivo, além da lise celular das microalgas, liberando proteínas das suas membranas.

Buscando reduzir a interferência negativa da MOD, utilizou-se o “skimmer”, que funcionou como uma ferramenta eficiente para melhora no processo de concentração, sendo o teste executado na fase estacionária, onde a flocculação apresentou pior desempenho nos experimentos anteriores. Na aquicultura, é comum utilizar “skimmers” para a remoção de matéria orgânica, mantendo a qualidade da água nos cultivos [25], e

uma versão adaptada deste mesmo sistema, testado por Barrut et al. [26], foi eficiente na remoção de matéria orgânica em sistemas de recirculação. Neste estudo, o tratamento “skimmer” apresentou melhor eficiência de concentração, igualando-se estatisticamente ao tratamento sem matéria orgânica (Controle Negativo), com rendimento acima de 90%. O “skimmer” atuou reduzindo as concentrações de carbono orgânico dissolvido e também de proteína e carboidratos. Entretanto, a eficiência da retirada de matéria orgânica por ação do “skimmer” parece ter atuado especialmente sobre as proteínas, pois a concentração deste elemento foi significativamente menor do que nos outros tratamentos. Esse é outro fator que aponta as proteínas como principais interferentes no processo de concentração.

As proteínas solúveis são facilmente removidas, pois induzem a formação de espuma migrando para a superfície da água e concentrando-se enquanto reduzem a tensão superficial [49]. Sabe-se que as substâncias tensoativas tais como as proteínas não apenas geram espuma na superfície da água por ação do “skimmer”, mas também alteram a interface de sólidos de hidrofílico para hidrofóbico, o que facilita a sua concentração na espuma [50].

Mesmo com a eficiência de remoção demonstrada neste trabalho, a utilização do “skimmer” precisa ser otimizada. Prova disso foi a presença de grande quantidade de células no tratamento “descarte”, no qual deveria haver apenas espuma com matéria orgânica. Portanto, a operacionalização do “skimmer” deve ser melhorado avaliando-se o dimensionamento do skimmer para cada tipo e tamanho de tanque e controle mais preciso da vazão. Mesmo não sendo totalmente adaptado, além da eficiência de remoção, outro excelente resultado foi que não houveram células de *N. oceanica* danificadas no processo, significando que a passagem pelo equipamento não interfere na integridade da membrana celular dessas microalgas.

5. Conclusões

Neste estudo demonstrou-se que a MOD, isto é, a matéria orgânica que passa pelo filtro de 0,45 µm de poro é o principal interferente no processo de concentração. As menores eficiências de concentração ocorreram na fase estacionária no Controles Positivos e na fração hidrofílica (HPI), que apresentaram as maiores concentrações de Carbono Orgânico Dissolvido e de proteína. A concentração de proteínas e carboidratos

aumentaram ao longo do crescimento de *N. oceanica*. No caso dos carboidratos, houve decréscimo e acréscimo de concentração em pulsos bruscos, com aumentos decorrentes em função da adição de meio fertilizante e diminuições de concentração em função do consumo bacteriano desse meio. As proteínas ao longo do cultivo aumentaram de maneira mais estável. As proteínas foram retiradas do cultivo por ação do “skimmer”, e essa retirada levou à um ganho na eficiência de concentração em torno de 20%, superando os 90%, provando assim que as proteínas são um forte interferente e que o “skimmer” é uma ferramenta eficiente para melhora da coleta de biomassa de *N. oceanica*. Não foram observadas células mortas no tratamento com uso de “skimmer”, portanto esta ferramenta não compromete a integridade celular de *N. oceanica*, sendo seguro e aconselhado o seu uso para este fim.

Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer ao professor Adalto Bianchini e à doutora Patrícia Costa e ao mestre Mario Davi Dias Carneiro pelo suporte nas análises de carbono e proteínas. Também a Bruno Kubelka e Bruno Cruz pelo auxílio no preparo dos fotobiorreatores. M. Roselet agradece à Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior – CAPES pela bolsa de mestrado. P. C. Abreu é bolsista de produtividade em pesquisa do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq. F. Roselet é pesquisador de pós-doutorado do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq.

Referências

- [1] Borowitzka, M.A., 2013. High-value products from microalgae—their development and commercialisation. *J Appl Phycol* 25, 743–756.
- [2] Brennan, L., Owende, P., 2010. Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renew Sust Energ Rev* 14, 557–577.
- [3] Zhu, Y., Dunford, N. T., 2013. Growth and biomass characteristics of *Picochlorum oklahomensis* and *Nannochloropsis oculata*. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 90 (6): 841–849.
- [4] Soares, D., 2010. Avaliação do crescimento celular e da produtividade de lipídeos de microalgas marinhas em diferentes regimes de cultivo. 107 p (Dissertação de Mestrado). Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, UFPR, Curitiba, PR, Brasil.
- [5] Gris, L. Produção da microalga *Nannochloropsis oculata* em fotobiorreator airlift. 2011. 148 p (Dissertação de Mestrado). Departamento de Engenharia Química, UFRGS, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.
- [6] Vandamme, D., Foubert, I., Muylaert, K., 2013. Flocculation as a low-cost method for harvesting microalgae for bulk biomass production. *Trends Biotechnol* 31, 233–239.
- [7] Greenwell, H.C., Laurens, L.M.L., Shields, R.J., Lovitt, R.W., Flynn, K.J., 2010. Placing microalgae on the biofuels priority list: a review of the technological challenges. *Journal of The Royal Society Interface* 7, 703–726.
- [8] Rawat, I., Ranjith Kumar, R., Mutanda, T., Bux, F., 2013. Biodiesel from microalgae: A critical evaluation from laboratory to large scale production. *Appl Energ* 103, 444–467.
- [9] Gregory, J., 2013. Flocculation Fundamentals, in: *Encyclopedia of Colloid and Interface Science*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 459–491.
- [10] Sales, R., Abreu, P.C., 2015. Use of natural pH variation to increase the flocculation of the marine microalgae *Nannochloropsis oculata*. *Appl Biochem Biotechnol* 175:2012–2019. doi: 10.1007/s12010-014-1412-2
- [11] Roselet F., Vandamme, D., Roselet, M., et al., 2017. Effects of pH, salinity, biomass concentration, and algal organic matter on flocculant efficiency of synthetic versus natural polymers for harvesting microalgae biomass. *Bioenerg Res* 1–11. doi: 10.1007/s12155-016-9806-3

- [12] Bilanovic, D., Shelef, G., Sukenik, A., 1988. Flocculation of microalgae with cationic polymers — Effects of medium salinity. *Biomass* 17, 65–76.
- [13] Henderson, R., Parsons, S. A., and Jefferson, B., 2008a. The impact of algal properties and pre-oxidation on solid-liquid separation of algae. *Water Research* 42(8-9), 1827-1845.
- [14] Garzon-Sanabria, A.J., Ramirez-Caballero, S.S., Moss, F.E.P., Nikolov, Z.L., 2013. Effect of algogenic organic matter (AOM) and sodium chloride on *Nannochloropsis salina* flocculation efficiency. *Bioresour Technol* 143, 231–237.
- [15] Vandamme, D., Foubert, I., Fraeye, I., Muylaert, K., 2012. Influence of organic matter generated by *Chlorella vulgaris* on five different modes of flocculation. *Bioresour Technol* 124, 508–511.
- [16] Edzwald, J.K., 2010. Coagulation in Drinking Water Treatment: Particles, Organics and Coagulants. *Water Sci Technol* 27, 21–35.
- [17] Leloup, M., Nicolau, R., Pallier, V., Yéprémian, C., Feuillade-Cathalifaud, G., 2013. Organic matter produced by algae and cyanobacteria: Quantitative and qualitative characterization. *Journal of Environmental Sciences* 25, 1089–1097.
- [18] Safarikova, J., Baresova, M., Pivokonsky, M., Kopecka, I., 2013. Influence of peptides and proteins produced by cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* on the coagulation of turbid waters. *Sep Purif Technol* 118:49–57. doi: 10.1016/j.seppur.2013.06.049.
- [19] Pivokonsky, M., Kloucek, O., and Pivokonska, L., 2006. Evaluation of the production, composition and aluminum and iron complexation of algogenic organic matter. *Water Research* 40(16), 3045 – 3052.
- [20] Pivokonsky, M., Naceradska, J., Brabenec, T., et al., 2015. The impact of interactions between algal organic matter and humic substances on coagulation. *Water Res* 84:278–285. doi: 10.1016/j.watres.2015.07.047.
- [21] Pivokonsky, M., Pivokonska, L., Bäumeltová, J., Bubakova, P., 2009. The Effect of Cellular Organic Matter Produced by Cyanobacteria *Microcystis Aeruginosa* on Water Purification. *J Hydrol Hydromech* 57.
- [22] Pivokonsky, M., Safarikova, J., Baresova, M., Pivokonska, L., Kopecka, I., 2014. A comparison of the character of algal extracellular versus cellular organic matter produced by cyanobacterium, diatom and green alga. *Water Res* 51, 37–46.
- [23] Aiken, G.R., McKnight, D.M., Thorn, K.A., and Thurman, E.M. 1992. Isolation of hydrophilic acids from water using macroporous resins. *Organic Geochemistry*

18: 567-573.

- [24] Henderson, R.K., Parsons, S.A., Jefferson, B., 2010. The impact of differing cell and algogenic organic matter (AOM) characteristics on the coagulation and flotation of algae. *Water Res* 44, 3617–3624.
- [25] Weeks, N. C., Timmons, M. B. & Chen, S., 1992. Feasibility of using foam fractionation for the removal of dissolved and suspended solids from fish culture water. *Aquacult Eng*, 11 (4): 251-265.
- [26] Barrut, B., Blancheton, J. P., Callier, M., Champagne, J.Y., Grasmick, A., 2013. Separation efficiency of a vacuum gas lift for microalgae harvesting. *Bioresour Technol*, v. 128, n. 0, p. 235-240. ISSN 0960 – 8524.
- [27] Borowitzka, M.A., Moheimani, N.R. (Eds.), 2013. *Algae for Biofuels and Energy*. Springer Netherlands, Dordrecht.
- [28] Zhu, C.J., Lee, Y.-K., 1997. Determination of biomass dry weight of marine microalgae. *J Appl Phycol* 9, 189–194.
- [29] Borges, L., Caldas, S., D’Oca, M.G.M., Abreu, P.C., 2016. Effect of harvesting processes on the lipid yield and fatty acid profile of the marine microalga *Nannochloropsis oculata*. *Aquaculture Reports* 4:164–168. doi: 10.1016/j.aqrep.2016.10.004
- [30] Matilainen, A., Gjessing, E., Lahtinen, Hed, L., Bhatnagar, A., Sillanpaa, M., 2011. An overview of the methods used in the characterization of natural organic matter (NOM) in relation to drinking water treatment. *Chemosphere*, v. 83, n. 11, p. 1431-1442.
- [31] Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28, 350–356.
- [32] Gornall, A. G., Bardawill, C. J., David, M. M., 1949. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. Biol. Chem.*, 177, 751.
- [33] Malcolm, R.L., MacCarthy, P., 1992. Quantitative evaluation of XAD-8 and XAD-4 resins used in tandem for removing organic solutes from water. *Environ. Int.* 18 (6), 597-607.
- [34] Roselet, F., Vandamme, D., Roselet, M., Muylaert, K., Abreu, P.C., 2015. Screening of commercial natural and synthetic cationic polymers for flocculation of freshwater and marine microalgae and effects of molecular weight and charge density. *Algal Res* 10, 183-188.

- [35] Zar, J. H., 2010. *Biostatistical Analysis*. Upper Saddle River: Prentice Hall.
- [36] Greenwell, H.C., Laurens, L.M.L., Shields, R.J., Lovitt, R.W., Flynn, K.J., 2010. Placing microalgae on the biofuels priority list: a review of the technological challenges. *Journal of The Royal Society Interface* 7, 703–726.
- [37] Rawat, I., Ranjith Kumar, R., Mutanda, T., Bux, F., 2013. Biodiesel from microalgae: A critical evaluation from laboratory to large scale production. *Appl Energ* 103, 444–467.
- [38] Roselet, F., Burkert, J., Abreu, P.C., 2016. Flocculation of *Nannochloropsis oculata* using a tannin-based polymer: Bench scale optimization and pilot scale reproducibility. *Biomass Bioenerg* 87:55–60. doi: 10.1016/j.biombioe.2016.02.015.
- [39] Henderson, R.K., Baker, A., Parsons, S.A., Jefferson, B., 2008b. Characterisation of algogenic organic matter extracted from cyanobacteria, green algae and diatoms. *Water Res* 42, 3435–3445.
- [40] Edzwald, J. K., Tobiason, J. E., 2011. Chemical principles, source water composition and watershed protection. In: EDSWALD, J. K. (org). *Water Quality and Treatment: a handbook on drinking water*. 6a edição. Denver, Colorado: American Water Works Association, McGraw Hill.
- [41] Croué, J. P., 1999. Natural organic matter: structural characteristics and reactive properties. In: Singer, P. C. (ed). *Formation and Control of Disinfection By-products in Drinking Water*. American Water Works Association, Denver, Colorado, pp. 65-94.
- [42] Chow, J. C., Watson, J. G., Louie, P. K. K., Chen, L.-W. A., and Sin, D., 2005. Comparison of PM_{2.5} carbon measurement methods in Hong Kong, China, *Environ. Poll.*, 137, 334–344.
- [43] Edzwald, J.K., 1993. Algae, Bubbles, Coagulants, and Dissolved Air Flotation. *Water Sci Technol* 27:67–81.
- [44] Sharp, E. L., Parsons, S. A. Jefferson, B. 2006. Seasonal variations in natural organic matter and its impact on coagulation in water treatment. *Science of the Total Environment*. 363, 183 -194.
- [45] Penru, Y., Simon, F. X., Guastalli, A. R., Esplugas, S., Llorens, J., and Baig, S., 2013. Characterization of natural organic matter from Mediterranean coastal seawater. *Journal of Water Supply: Research and Technology-AQUA*-62(1), 42-51.

- [46] Takaara, T., Sano, D., Masago, Y., and Omura, T., 2010. Surface-retained organic matter of *Microcystis aeruginosa* inhibiting coagulation with polyaluminium chloride in drinking water treatment. *Water Research* 44(13), 3781 – 3786.
- [47] Rigobello, E. S., Dantas, A. D. B., Di Bernardo, L., Vieira, E. M., 2011. Influence of the apparent molecular size of aquatic humic substances on colour removal by coagulation and filtration. *Environmental Technology*, v. 32, p. 1767-1777.
- [48] Pivokonska, L., Pivokonsky, M., Tomaskova, H., 2008. Optimization of NOM Removal during Water Treatment. *Separation Science and Technology* 43, 1687–1700.
- [49] Summerfelt, S.T., 2006. Design and selection of biological filters for freshwater and marine applications. *Aquacultural Engineering* 34 (3), 275–302.
- [50] Suzuki, Y., Hanagasaki, N., Furukawa, T., Yoshida, T., 2008. Removal of bacteria from coastal seawater by foam separation using dispersed bubbles and surface-active substances. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 105 (4), 383–388.

CONCLUSÕES GERAIS

De acordo com os resultados dos experimentos concluiu-se que:

- 1) A MOD é o principal interferente no processo de concentração, pois nas frações onde estava presente em maior quantidade, especialmente na fase estacionária, a eficiência do processo foi drasticamente inferior às frações onde apenas a MOP estava presente.
- 2) A fase estacionária do cultivo é a que sempre se obtém os piores resultados de eficiência de concentração, isto se deve às maiores concentrações de matéria orgânica nessa fase e também por apresentar as maiores concentrações de proteínas, que leva a uma maior interferência no processo.
- 3) Dentre as frações por hidrofobicidade, independente da fase de crescimento do cultivo, o pior resultado de eficiência de concentração é o da fração HPI, provavelmente devido ao fato desta fração apresentar maior quantidade de MOD em relação às frações TPH e HPO.
- 4) As concentrações de proteínas e carboidratos, de modo geral, aumentam com o crescimento do cultivo de *N. oceanica*.
- 5) No caso dos carboidratos, houve decréscimo e acréscimo de concentração apresentando pulsos, com aumentos decorrentes da adição de meio fertilizante e diminuições de concentração em função do consumo bacteriano desse meio.
- 6) As proteínas ao longo do cultivo aumentam sua concentração, e seu aumento coincide com aumento de hidrofobicidade, pois sua concentração em fase estacionária é maior em fração HPO.
- 7) Ainda em relação às proteínas, estas são o principal componente retirado do cultivo por ação do “skimmer”, e essa retirada rende à concentração um ganho de eficiência de 20%, superando os 90%, provando assim que as proteínas são um forte interferente e o “skimmer” mostrou-se uma ferramenta eficiente para melhora da coleta de biomassa de *N. oceanica*.
- 8) Como não foram observadas células mortas no tratamento com uso de “skimmer”, conclui-se também que, além de eficiente, esta ferramenta não compromete a integridade celular de *N. oceanica*, sendo seguro e aconselhado o seu uso para este fim.

PERSPECTIVAS DE FUTUROS ESTUDOS

As hipóteses deste trabalho e seus resultados não proporcionaram apenas respostas, mas também novos questionamentos e outras possibilidades. Dentre eles:

- 1) A alternativa de se testar inóculos de culturas de bactérias comumente presentes em cultivos de microalgas como consumidores e conseqüentemente redutores de matéria orgânica. O que leva a hipótese de que os picos e quedas bruscas das concentrações de carboidratos e proteínas (mesmo que estas em escala menor que os carboidratos) provavelmente decorreram da presença de bactérias. Desta forma novos experimentos devem ser conduzidos para se analisar a quantidade e ação das bactérias sobre a MOD do cultivo.
- 2) A interferência do ácido ascórbico que gerou elevadas valores de COD e UV nos remete à necessidade de se testar a eficiência de outros produtos com potencial para retirar o cloro na água após sua desinfecção como, por exemplo, o tiosulfato de sódio.
- 3) Este estudo mostrou que a presença de proteínas no cultivo afeta significativamente a concentração. Desta forma é importante se analisar em futuros estudos a composição de proteínas, aminoácidos e peptídeos presentes na MOD e como estes estão interferindo nesse processo.
- 4) Ainda sobre o uso do “skimmer”, que foi uma experiência positiva e eficaz a favor do processo de concentração, resta realizar novos experimentos, testando-o em diferentes fases do cultivo em escala maior, definindo em que período (o menor possível) seria mais eficiente utilizá-lo com o mínimo gasto de energia.
- 5) Da mesma forma, se mostrou importante testar o “skimmer”, para diferentes níveis de vazão e tempo de uso para se avaliar a melhor retirada de MOD do meio de cultivo.
- 6) Para saber quais carboidratos estão presentes no cultivo e qual sua dinâmica, qualificar as diferentes formas de carboidratos através das análises com HPLC.
- 7) Em relação ao uso das resinas de adsorção XAD, a falta de informações a respeito do protocolo para percolação na literatura existente levam a questionar se estas foram manipuladas adequadamente. Esse questionamento se fundamenta no resultado obtido de alta concentração de COD na fração HPI da fase estacionária do cultivo de *N. oceanica*, maior que a concentração do controle positivo (cultivo), que gerou a MOD de origem percolada pelas resinas. Para se esclarecer este ponto seria interessante a realização de novos experimentos utilizando as resinas, com adaptações ao protocolo,

com novas formas de purificação entre as percolações e determinação de possíveis interferentes presentes no cultivo que afetem a eficiência do processo.

8) Realização de testes em maior escala que proporcionem maior proximidade de condições dos cultivos em larga escala.