



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

PRODUÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE BIOPOLÍMEROS APLICANDO PROCESSO
CÍCLICO DE REUTILIZAÇÃO DE RESÍDUO DA EXTRAÇÃO DE POLI-
HIDROXIBUTIRATO (PHB)

ENG. CLEBER KLASENER DA SILVA

Prof^a. Dr^a. MICHELE GREQUE DE MORAIS

Orientadora

RIO GRANDE, RS

2016

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

PRODUÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE BIOPOLÍMEROS APLICANDO PROCESSO
CÍCLICO DE REUTILIZAÇÃO DE RESÍDUO DA EXTRAÇÃO DE POLI-
HIDROXIBUTIRATO (PHB)

ENG. CLEBER KLASENER DA SILVA

Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para obtenção do
título de mestre em Engenharia e
Ciência de Alimentos – FURG

Prof^ª. Dr^ª. MICHELE GREQUE DE MORAIS
Orientadora

RIO GRANDE, RS

2016

Ficha catalográfica

S586p Silva, Cleber Klasener DA.
Produção biotecnológica de biopolímeros aplicando processo cíclico de reutilização de resíduos da extração de poli-hidroxibutirato (PHB) / Cleber Klasener da Silva. – 2016.
58 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Rio Grande/RS, 2016.

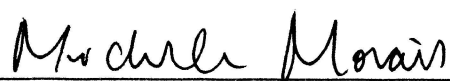
Orientadora: Dr^a. Michele Greque de Moraes.

1. Cianobactéria 2. Hipoclorito 3. Microalgas 4. Poli-hidroxialcanoato 5. *Spirulina* I. Moraes, Michele Greque de II. Título.

CDU 639.64

APROVAÇÃO

Dissertação defendida por Cleber Klasener da Silva e aprovada em 15 de abril de 2016, pela Comissão Examinadora constituída pelos professores:



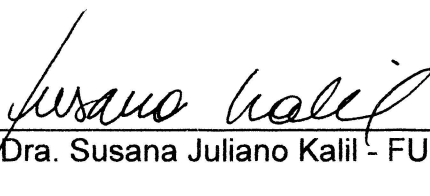
Profa. Dra. Michele Greque de Moraes – FURG



Profa. Dra. Francieli Dalcanton - UNOCHAPECÓ



Profa. Dra. Eliana Badiale Furlong – FURG



Profa. Dra. Susana Juliano Kalil - FURG

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais Celso e Liane, a meus irmãos Carlos e Tathiana por estarem sempre presentes em minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Deus.

A toda minha família.

A minha noiva Carina Borba.

Aos amigos, em especial a Carina, Carolina, Lilianne, Igor, Bruno, Adriano e Maristela.

Aos colegas dos laboratórios.

As minhas ICs Ana e Carina.

A professora Michele Greque de Moraes pela orientação.

Aos professores Jorge e Eliana pela colaboração.

Agradeço a todas as pessoas e amigos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

À Universidade Federal do Rio Grande e professores do PPGECA, pelos auxílios e ensinamentos. À estrutura física e técnica dos Laboratórios da Escola de Química e Alimentos (FURG) por todo o auxílio na concretização deste trabalho.

A CAPES pelo apoio financeiro para o desenvolvimento deste trabalho.

*“Aquele que controla os outros
pode ser poderoso, mas aquele que é mestre
de si mesmo é mais poderoso ainda.”*

Lao Tzu

CAPITULO I – RESUMO GERAL INTRODUÇÃO GERAL E OBJETIVOS

RESUMO

O crescimento populacional associado à necessidade de maior produção de alimentos vem aumentando drasticamente a problemática da deposição de resíduos no meio ambiente. Esforços industriais e acadêmicos estão sendo dedicados a nível mundial para o desenvolvimento de processos destinados a conservação de energia limpa e redução de resíduos. Porém, nem todos os resíduos podem ser facilmente reutilizados devido a presença de substâncias potencialmente tóxicas, orgânicas ou inorgânicas. Ao longo dos anos vêm sendo ampliado o aproveitamento de rejeitos industriais como matéria-prima importante para aplicações com maior valor agregado. As microalgas são micro-organismos fotossintéticos e autotróficos e/ou mixotróficos que utilizam a luz solar e CO₂ para a obtenção de energia. Em condições de estresse esses micro-organismos armazenam biopolímeros no interior das células na forma de grânulos. Para obtenção do biopolímero poli-hidroxibutirato (PHB), é necessário realizar a extração do mesmo a partir da biomassa microalgal. Para tal, é utilizado hipoclorito de sódio, gerando aproximadamente 200 mL de resíduo por litro de cultivo. O uso do resíduo da extração do PHB no cultivo microalgal, além de reduzir a deposição desse composto no meio ambiente, pode diminuir os custos de produção de biomassa. Nesse sentido, o objetivo desse trabalho foi estudar o potencial de produção cíclica de poli-hidroxibutirato (PHB) pela microalga *Spirulina* sp. LEB 18, utilizando resíduo da extração do polímero. O trabalho foi dividido em duas etapas, gerando dois artigos científicos que serão submetidos a publicação em revistas de importante circulação. No artigo 1, foram testadas três condições do resíduo da extração do biopolímero da biomassa da microalga *Spirulina* SP. LEB 18, sem tratamento, tratamento térmico e neutralização química. Os resíduos foram adicionados aos cultivos nas concentrações de 0, 2, 4, 6, 8 e 10 % (v/v). Os experimentos foram realizados em triplicata. O pré tratamento foi importante para inibir/neutralizar a ação do cloro sobre as células da microalga, alcançando concentrações de biomassa máxima de 1,12 g L⁻¹ para cultivos contendo 10 % (v/v) de adição do resíduo neutralizado. Através desta etapa verificou-se que a microalga apresentou potencial crescimento quando exposta a diferentes concentrações de resíduo da extração de biopolímero. Impulsionados por esse resultado iniciou-se a segunda etapa do trabalho visando aumentar a concentração de resíduo adicionado ao cultivo microalgal e avaliação da síntese de biopolímero. No artigo 2, foram testados 10, 15, 20, 25 e 30 % (v/v) de adição do resíduo da extração do biopolímero nos cultivos microalgais de *Spirulina* sp. LEB 18. Para comparação, foram utilizados dois experimentos controle, Zarrouk (ZN) e Zarrouk modificado com redução de nitrogênio (ZM). Os experimentos foram realizados em triplicata e avaliados quanto a produção de biomassa microalgal e PHB. Os ensaios com adição de resíduo apresentaram produção de biomassa igual ao controle ZM (p<0,1) (0,79 g L⁻¹). A produção de PHB no ensaio contendo 25 % de resíduo foi a maior, comparado aos demais, chegando a 10,6 % (p/p). A partir dos resultados obtidos verificou-se que é possível aplicar processo cíclico de reutilização do resíduo da extração de PHB no cultivo de microalgas visando a síntese de biopolímeros, reduzindo os problemas ambientais de poluição, mantendo o fluxo de nutrientes e reduzindo custos, reproduzindo assim os sistemas naturais.

Palavras-chave: cianobactéria, hipoclorito, microalga, poli-hidroxialcanoato

ABSTRACT

Population growth associated with the need for increased food production is dramatically increasing the problem of waste disposal on the environment. Industrial and academic efforts are being devoted worldwide for the development of processes to clean energy conservation and waste reduction. However, not all residues may be easily reused due to the presence of potentially toxic, organic or inorganic substances. Over the years it has been expanded the use of industrial waste as an important raw material for applications with higher added value. Microalgae are photosynthetic and autotrophic microorganisms and / or mixotrophic using sunlight and CO₂ to obtain energy. Under stress conditions, these microorganisms store biopolymers within cells in the form of granules. To obtain the biopolymer poly-hydroxybutyrate (PHB), it is necessary to perform the extraction of the same from the microalgae biomass. For this, used it is sodium hypochlorite, generating approximately 200 mL of residue per liter of culture. The use of the PHB extraction residue in microalgae cultivation and reduce the deposition of such a compound into the environment, the biomass may decrease production costs. In this sense, the objective of this work was to study the potential of cyclic production of poly-hydroxybutyrate (PHB) by *Spirulina* sp. LEB 18 using extraction residue of the polymer. The work was divided into two stages, generating two papers that will be submitted for publication in leading circulation magazines. Article 1, were tested three conditions of the residue from the extraction of the biopolymer biomass of *Spirulina* sp. LEB 18, without treatment, heat treatment, and chemical neutralization. The residues were added to the cultures at concentrations of 0, 2, 4, 6, 8 and 10% (v/v). The experiments were performed in triplicate. The pretreatment was important to inhibit / counteract the action of chlorine on the microalgae cells, reaching maximum biomass concentration of 1.12 g L⁻¹ to cultures containing 10% (v/v) adding the neutralized residue. By this step, it was found that the microalgae showed growth potential when exposed to different concentrations of the biopolymer residue extraction. Driven by this result began the second stage of the work to increase the concentration of residue added to microalgae cultivation and assessment of biopolymer synthesis. Article 2 were tested 10, 15, 20, 25 and 30% (v/v) adding the biopolymer extraction residue in the microalgae cultivation of *Spirulina* sp. LEB 18. For comparison, we used two control experiments, Zarrouk (ZN) and Zarrouk modified with reduced nitrogen (ZM). The experiments were performed in triplicate and evaluated for the production of microalgae biomass and PHB. Tests with the addition of biomass residue showed ZM equal to controls ($p < 0.1$) (0.79 g L⁻¹). The production of PHB in the assay containing 25% residue was higher compared to the other, reaching 10.6% (w/w). From the results obtained it was found that it is possible to apply cyclic process residue reuse of PHB extraction in microalgae cultivation aiming at biopolymer synthesis, reducing environmental pollution problems, while maintaining the flow of nutrients and reducing costs, thereby reproducing natural systems.

Keywords: cyanobacteria, hypochlorite, microalgae, poly-hydroxyalkanoate

LISTA DE QUADROS E TABELAS

CAPTÍTULO II – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Quadro 1 - Estrutura dos PHAs.....	12
------------------------------------	----

CAPTÍTULO III – DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

ARTIGO 1: POTENCIAL APLICAÇÃO DO RESÍDUO DE EXTRAÇÃO DE BIOPOLÍMERO PARA O CULTIVO DE *Spirulina* sp. LEB 18

Tabela 1 - Composição do Meio Zarrouk (1966) e Zarrouk modificado (MARTINS et al., 2014).....	22
---	----

Tabela 2 - Concentrações de C e N no resíduo de extração de PHB microalgal	23
--	----

Tabela 3 - Parâmetros cinéticos dos cultivos de <i>Spirulina</i> sp. LEB 18 em diferentes concentrações de resíduo da extração do PHB.....	24
--	----

Tabela 4 - Parâmetros cinéticos dos cultivos de <i>Spirulina</i> sp. LEB 18 em diferentes concentrações de resíduo da extração do PHB com tratamento térmico.....	26
---	----

Tabela 5 - Parâmetros cinéticos dos cultivos de <i>Spirulina</i> sp. LEB 18 em diferentes concentrações de resíduo da extração do PHB neutralizado com Na ₂ S ₂ O ₃	27
--	----

ARTIGO 2: PROCESSO CÍCLICO DE SÍNTESE DE POLI-HIDROXIBUTIRATO (PHB) POR *Spirulina* sp. LEB 18 UTILIZANDO RESÍDUO DA EXTRAÇÃO DO BIOPOLÍMERO

Tabela 1 - Composição do Meio Zarrouk (1966) e Zarrouk modificado (MARTINS et al., 2014).....	33
---	----

Tabela 2 - Parâmetros cinéticos dos cultivos de <i>Spirulina</i> sp. LEB 18 cultivadas em diferentes concentrações de resíduo da extração do PHB.....	38
---	----

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

- Figura 1 - Estrutura do grânulo de PHA intracelular.....13
- Figura 2 - Rota metabólica de poli-hidroxialcanoatos.....14

CAPÍTULO III – DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

ARTIGO 1: POTENCIAL APLICAÇÃO DO RESÍDUO DE EXTRAÇÃO DE BIOPOLÍMERO PARA O CULTIVO DE *Spirulina* sp. LEB 18

- Figura 1 - Processo de extração de polímeros de microalgas.....21
- Figura 2 - Curvas de crescimento de *Spirulina* sp. LEB 18 contendo, (a): (●) 0, (○) 2, (■) 4. (b): (▼) 6, (▲) 8 e (◆) 10 % (v/v) de resíduo de extração de PHB sem tratamento.....24
- Figura 3 - Curvas de crescimento de *Spirulina* sp. LEB 18 contendo, (a): (●) 0, (○) 2, (■) 4. (b): (▼) 6, (▲) 8 e (◆) 10 % (v/v) de resíduo de extração de PHB com tratamento térmico.....26
- Figura 4 - Curvas de crescimento *Spirulina* sp. LEB 18 contendo, (a): (●) 0, (○) 2, (■) 4. (b): (▼) 6, (▲) 8 e (◆) 10 % (v/v) de resíduo de extração de PHB neutralizado por tiosulfato de sódio.....27

ARTIGO 2: PROCESSO CÍCLICO DE SÍNTESE DE POLI-HIDROXIBUTIRATO (PHB) POR *Spirulina* sp. LEB 18 UTILIZANDO RESÍDUO DA EXTRAÇÃO DO BIOPOLÍMERO

- Figura 1 - Curvas de crescimento de *Spirulina* sp. LEB 18 cultivada com (a): 10 (▲), 15 (▼), 20 (◆), 25 (○) e 30 % (v/v) (□) de resíduo de extração do PHB. (b): controle ZN (●) e controle ZM (■).....36
- Figura 2 - Acompanhamento dos pHs do meio nos cultivos de *Spirulina* sp. LEB 18 cultivada com (a): 10 (▲), 15 (▼), 20 (◆), 25 (○) e 30 % (v/v) (□) de resíduo de extração do PHB. (b): controle ZN (●) e controle ZM (■).....37
- Figura 3 - Produtividade da biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 cultivada com (a): 10 (▲), 15 (▼), 20 (◆), 25 (○) e 30 % (v/v) (□) de resíduo de extração do PHB. (b): controle ZN (●) e controle ZM (■).....38
- Figura 4 - Concentração de nitrogênio amoniacal disponível no meio de cultivo: 10 (▲), 15 (▼), 20 (◆), 25 (○) e 30 % (v/v) (□) de resíduo de extração do PHB e controle ZM (■).....39
- Figura 5 - Cultivos de *Spirulina* sp. LEB 18 nos tempos 0 (a), 6 (b) e 20 (c) d de experimento.....39

Figura 6 Concentrações de carbono (a) e fósforo (b) nos cultivos com 10 (▲), 15 (▼), 20 (◆), 25 (○) e 30 % (v/v) (□) de resíduo de extração do PHB, ZN (●) e ZM (■).....	40
Figura 7 - Concentração de PHB (% p/p) na biomassa de Spirulina sp. LEB 18 cultivada com (a): 10 (▲), 15 (▼), 20 (◆), 25 (○) e 30 % (v/v) (□) de resíduo de extração do PHB. (b): controle ZN (●) e controle ZM (■).....	41
Figura 8 - Cromatograma do padrão externo nos tempos de retenção 3,9 (3HB) e 4,8 (3HV), (a) e da biomassa nos tempos de retenção 3,9 (3HB) e 5,1 (Hx) (b).....	42
Figura 9 - Espectro FTIR obtido do PHB de Spirulina sp. LEB 18.....	42

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	6
AGRADECIMENTOS	7
CAPITULO I – RESUMO GERAL INTRODUÇÃO GERAL E OBJETIVOS.....	9
RESUMO	10
ABSTRACT	11
LISTA DE QUADROS E TABELAS.....	12
ARTIGO 2: PROCESSO CÍCLICO DE SÍNTESE DE POLI-HIDROXIBUTIRATO (PHB) POR <i>Spirulina</i> sp. LEB 18 UTILIZANDO RESÍDUO DA EXTRAÇÃO DO BIOPOLÍMERO	12
LISTA DE FIGURAS	13
ARTIGO 2: PROCESSO CÍCLICO DE SÍNTESE DE POLI-HIDROXIBUTIRATO (PHB) POR <i>Spirulina</i> sp. LEB 18 UTILIZANDO RESÍDUO DA EXTRAÇÃO DO BIOPOLÍMERO	13
SUMÁRIO.....	15
1 INTRODUÇÃO.....	6
2 OBJETIVOS.....	7
2.1 Objetivo geral	7
2.2 Objetivos específicos.....	7
CAPITULO II – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	8
1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	9
1.1 Micro-organismos Fotossintetizantes.....	9
1.2 Microalgas e Cianobactérias.....	9
1.2.1 <i>Spirulina</i> sp.....	10
1.3 Fatores físico e químicos que afetam o cultivo de micro-organismos	10
1.4 Polímeros e Biopolímeros	12
1.5 Síntese do PHB.....	14
1.6 Resíduo da extração de PHB de microalgas.....	16
CAPITULO III – DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO	18

ARTIGO 1: POTENCIAL APLICAÇÃO DO RESÍDUO DE EXTRAÇÃO DE BIOPOLÍMERO PARA O CULTIVO DE <i>Spirulina</i> sp. LEB 18.....	19
1 INTRODUÇÃO	19
2 MATERIAL E MÉTODOS	20
2.1 Obtenção e composição do resíduo da extração de PHB microalgal.....	20
2.1 Micro-organismo e condições de cultivo	21
2.2 Monitoramento dos cultivos e determinação dos parâmetros cinéticos.....	22
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
3.1 Concentrações de C e N no resíduo	22
3.1 Cultivo de <i>Spirulina</i> sp. LEB 18 com resíduo da extração do PHB sem tratamento.....	22
3.2 Cultivo de <i>Spirulina</i> sp. LEB 18 em resíduo da extração do PHB com tratamento térmico	24
3.3 Cultivo de <i>Spirulina</i> sp. LEB 18 em resíduo da extração do PHB neutralizado com Na ₂ S ₂ O ₃	25
4 CONCLUSÃO	27
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	28
ARTIGO 2: PROCESSO CÍCLICO DE SÍNTESE DE POLI-HIDROXIBUTIRATO (PHB) POR <i>Spirulina</i> sp. LEB 18 UTILIZANDO RESÍDUO DA EXTRAÇÃO DO BIOPOLÍMERO	30
1 INTRODUÇÃO	30
2 MATERIAL E MÉTODOS	31
2.1 Micro-organismo e meio de cultivo	31
2.2 Condições de cultivo.....	32
2.3 Monitoramento dos cultivos.....	32
2.3.1 Determinação de pH e biomassa	32
2.3.2 Concentração de carbono inorgânico no meio de cultivo	33
2.3.3 Concentração de nitrogênio no meio de cultivo.....	33
2.3.4 Concentração de fósforo no meio de cultivo	33
2.3.5 Determinação dos parâmetros cinéticos de crescimento celular.....	33
2.3.6 Quantificação do polímero na célula	34
2.4 Extração do biopolímero	34
2.5 Purificação do biopolímero	34
2.6 Espectroscopia de Infravermelho.....	34

2.7 Tratamento estatístico.....	35
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4 CONCLUSÃO.....	41
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43
CAPITULO IV – CONCLUSÕES GERAIS E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	46
CAPITULO V – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
APÊNDICES	51
ANEXOS.....	58

1 INTRODUÇÃO

A situação socioambiental a qual estamos expostos gera a necessidade de modificações na forma de como agir e cuidar dos recursos naturais disponíveis ao ser humano. Essa necessidade é apoiada por diversas nações do planeta. Convenções mundiais são realizadas regularmente, como Cúpula da Terra no Rio de Janeiro em 1992, assinatura do Protocolo de Quioto (1997), Convenção-Quadro das Nações Unidas sobre Mudança do Clima (2005) e mais recentemente a Conferência do Clima em Paris - França (COP 21) (2015). Esforços industriais e acadêmicos estão sendo dedicados em nível mundial para o desenvolvimento de processos destinados a conservação de energia limpa e redução de resíduos. Nesse sentido a produção de compostos biodegradáveis bem como a utilização de resíduos gerados nos processos não sustentáveis são alternativas que devem ser cada vez mais aplicadas.

As microalgas são micro-organismos fotossintetizantes e produtoras de compostos de interesse. Entre os produtos gerados por esses organismos estão os poli-hidroxicanoatos (PHAs), biopolímeros acumulados intracelularmente como fonte de reserva energética, que além de serem biodegradáveis, podem ser utilizados em diversas áreas, alimentos, medicina, agricultura entre outros. O poli-hidroxi-butarato (PHB), biopolímero produzido por algumas bactérias e cianobactérias quando o meio de cultivo apresenta excesso de carbono e limitação de algum nutriente, como nitrogênio ou fósforo (JOHANSEN, 2012).

O processo de extração de PHB de microalgas é realizado utilizando diferentes solventes. O hipoclorito de sódio (Na_2ClO) é uma das alternativas para o processo de extração de microalgas, digerindo praticamente todo material celular, exceto o biopolímero. Isso garante que o PHB obtido não apresente pigmentos, problema encontrado em outros processos de extração de biomassa microalgal (MARTINS et al., 2014).

Os resíduos originários da extração do PHB podem ser utilizados como fonte de nutrientes alternativo aos meios de cultivo tradicionais. O resíduo gerado é composto por material celular não polimérico, possibilitando o fornecimento de carbono e nitrogênio. A utilização desses compostos para o cultivo de microalgas torna possível a redução de custos e também a simplificação dos meios.

Como opção para reduzir a deposição de resíduos industriais no meio ambiente, está o desenvolvimento de tecnologias que reproduzam processos cíclicos de reutilização da natureza. Nesse sentido, o resíduo gerado durante a produção e extração de PHB de microalgas pode voltar ao início do processo servindo de matéria-prima para obtenção de novo produto.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Estudar a potencialidade de produção cíclica de poli-hidroxibutirato (PHB) pela microalga *Spirulina* sp. LEB 18, utilizando resíduo da extração do polímero.

2.2 Objetivos específicos

- Cultivar a microalga *Spirulina* sp. LEB 18 em resíduo da extração de PHB, sem pré-tratamento, com tratamento térmico e neutralização química.
- Avaliar a produção de poli-hidroxibutirato pela microalga utilizando resíduo da extração de PHB no meio de cultivo.

CAPITULO II – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

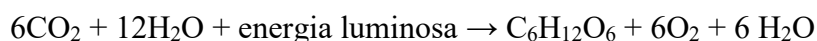
1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Micro-organismos Fotossintetizantes

A fotossíntese é o processo biológico de obtenção de energia a qual plantas e outros organismos fotossintéticos utilizam os elétrons da água e fótons da energia solar para converter o CO₂ atmosférico em compostos orgânicos, liberando na atmosfera oxigênio (ALBERTS, 2010). Dentre os micro-organismos que apresentam a capacidade de realizar a fotossíntese estão as microalgas (eucarióticas) e as cianobactérias (procarióticas) (LARKUM et al., 2012).

O carbono orgânico gerado a partir da fotossíntese, pelos micro-organismos de ambas as classes, é utilizado para a formação de proteínas, lipídeos e carboidratos além de ser fonte de energia para os processos bioquímicos que envolvem o desenvolvimento e manutenção dos organismos (COX; NELSON, 2014).

A reação que representa a fotossíntese pode ser descrita como:



Esta reação ocorre em duas etapas, fotossintetizante de transferência de elétrons (fase clara) e fixação carbono (fase escura). Na primeira fase, que ocorre dentro dos cloroplastos, a energia derivada da luz solar excita um elétron da clorofila, capacitando-o a se mover ao longo da cadeia transportadora de elétrons na membrana tilacóide. Os elétrons da clorofila são provenientes da água, gerando como subproduto o oxigênio que é liberado para a atmosfera. Durante essa etapa, são gerados Adenosina trifosfato (ATP) e o complexo enzimático NADPH. Na fase escura, a energia (ATPs e NADPHs) gerada na fase clara é utilizada como fonte de energia e força redutora respectivamente, para converter o CO₂ em carboidratos (ALBERTS, 2010).

1.2 Microalgas e Cianobactérias

Segundo Johansen (2012), as microalgas/cianobactérias são os organismos fotossintéticos mais eficientes encontrados na natureza, por apresentarem taxas de biofixação de dióxido de carbono (CO₂) maiores que as plantas. Ainda segundo o autor, são alternativa para a produção de biomassa, pois apresentam menor necessidade de espaço geográfico e água em comparação as culturas tradicionais de vegetais. Quando cultivadas em meios adequados, algumas espécies apresentam a capacidade de duplicar sua massa a cada 24 horas. Alta taxa de crescimento, aliada a capacidade de produção de compostos, tornam as microalgas e

cianobactérias potenciais produtoras de combustíveis, como o biodiesel (BOROWITZKA; MOHEIMANI, 2013).

A diversidade de compostos de interesse a qual as microalgas podem acumular vem chamando a atenção de pesquisadores. Dentre os compostos estudados, pode se destacar os pigmentos, lipídeos, hidrocarbonetos e biopolímeros além de metabólitos secundários, como antifúngicos, anti-inflamatórios, antimicrobianos e antioxidantes (GOUVEIA et al., 2010; PANDEY et al., 2014).

Existem várias espécies de microalgas, destacando-se a *Arthrospira* (*Spirulina*) como sendo uma das principais. Este micro-organismo é aprovado pelo FDA (*Food and Drug Administration*), apresentando o certificado GRAS (*Generally Recognized as Safe*), assim como pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), podendo ser utilizada na alimentação, bem como seus produtos, desde que esta esteja livre de contaminantes e adulteração.

1.2.1 *Spirulina* sp.

A *Arthrospira* (*Spirulina*) é uma cianobactéria verde azulada, microscópica (1 a 12µm diâmetro e até 1 mm comprimento), filamentosa, pertencente à classe *Oscillatoriaceae*. Essa microalga pode se desenvolver em ambientes com diferentes composições químicas e físicas, tais como meios alcalinos, pântanos, lagos e águas marinhas (PANDEY et al., 2014).

A *Spirulina* apresenta conteúdo proteico variando de 50 a 55 % de seu peso seco, concentração de lipídeos entre 6 a 13 %, além de grande quantidade de vitaminas e minerais como tiamina, B12, tocoferol, ferro, cálcio, magnésio, manganês, potássio e zinco. Quando submetida a limitações de algum nutriente como nitrogênio (N) ou fósforo (P), a *Spirulina* desvia sua rota metabólica e passa a acumular biopolímeros. Esses são armazenados intracelularmente como reserva de energia. Segundo (BALAJI; GOPI; MUTHUVELAN, 2013; LAYCOCK et al., 2013), a limitação principalmente de nitrogênio e fósforo juntamente com excesso de carbono são os responsáveis por esse desvio na rota metabólica.

1.3 Fatores físico e químicos que afetam o cultivo de micro-organismos

Schmidell et al. (2001), cita algumas características desejáveis de micro-organismos para cultivo. São eles: apresentar elevada taxa de conversão de substrato em produto, permitir acúmulo de compostos no meio, não produzir substâncias incompatíveis com o produto, não ser patogênico, apresentar constância quanto ao comportamento fisiológico, não exigir condições muito complexas nem meios dispendiosos. Essas características influenciam

diretamente no rendimento e custos de produção de determinado produto. No caso de microalgas, algumas condições físico-químicas devem ser observadas antes de iniciar o cultivo.

O meio de cultivo é um dos principais responsáveis pelas características da composição da biomassa microalgal, isso porque condições diferenciadas de meio podem afetar a taxa de crescimento e o nível máximo da produção de biomassa. A deficiência de nutrientes no meio pode fazer com que a microalga adapte seu metabolismo a nova condição (SANCHEZ et al., 2000).

A luminosidade e temperatura são fatores importantes em um cultivo microalgal. Segundo Wang et al. (2013a), intensidades luminosas elevadas podem inibir o crescimento da microalga. Por outro lado, altas concentrações de biomassa, a *Spirulina* apresenta redução na velocidade de crescimento (MORAIS et al., 2015). Portanto a relação entre intensidade luminosa e concentração celular deve ser bem estudada antes de se iniciar um cultivo.

A temperatura também apresenta grande influência no metabolismo das células, principalmente da fase escura da fotossíntese. A taxa de respiração aumenta exponencialmente com a temperatura e este fato faz com que haja variações na produção de biomassa microalgal (RICHMOND, 2007). Segundo Fox (1996), a produtividade da microalga *Spirulina* a 18 °C é 46 % da produtividade a 20 °C. Em temperaturas entre 22 e 32 °C a produtividade duplica, permanecendo constante até 40 °C. A temperatura ótima para cultivo de *Spirulina* varia de 35 a 37 °C.

Outro fator a se considerar durante o cultivo de microalgas é o pH do meio já que a forma com que o carbono estará disponível no meio de cultivo é função do pH (LAYCOCK et al., 2013). Raven, (1990), destaca que em pH abaixo de 5 apenas o CO₂ é consumido pela microalga. Enquanto que em pH acima de 9,5 o carbonato passa a ser a principal fonte de carbono.

As microalgas utilizam o CO₂ como fonte de carbono através da fotossíntese. O ar atmosférico contém atualmente (2016) 778,3 mg m⁻³ de dióxido de carbono (NOAA, 2016). Sendo necessária a adição de CO₂ ao cultivo. Porém, a *Spirulina* requer para seu crescimento alta alcalinidade, o que é controlado com elevadas concentrações de carbonatos, fonte de carbono para a microalga (RICHMOND, 2007). Muitas microalgas podem se multiplicar sob condições mixotróficas, utilizando tanto carbono inorgânico como orgânico simultaneamente (POERSCHMANN et al., 2004; KUMAR et al., 2010).

Compostos nitrogenados, orgânicos e inorgânicos, podem ser utilizados como fonte de nitrogênio no cultivo de microalgas (RICHMOND, 2007). Quando as microalgas são cultivadas em baixas concentrações de nitrogênio, ocorre o favorecimento do acúmulo de

lipídeos e polissacarídeos nas células. Por consequência, ocorre redução da taxa de crescimento celular. Quando o suprimento de nitrogênio é abundante, verifica-se a tendência de aumento nas concentrações de proteínas e de clorofila nas células.

O fósforo é essencial para o crescimento microalgal, já que participa do processo de obtenção de energia. Nas microalgas, os principais componentes portadores de fosfato são os açúcares fosfatados, ácidos nucleicos e fosfoenzimas (LOURENÇO, 2007).

1.4 Polímeros e Biopolímeros

A facilidade com que os polímeros se moldam, sua resistência térmica e química, aliado ao baixo custo em relação aos demais materiais utilizados para a confecção de embalagens os tornam uma das matérias primas mais utilizadas no mundo (REDDY et al., 2003). Setores industriais como construção civil, automobilística, alimentícia, máquinas e equipamentos são grandes consumidores de polímeros em geral, principalmente na forma de embalagens. Os principais materiais plásticos utilizados por essas indústrias são, o polietileno (PE), polipropileno (PP), cloreto de polivinil (PVC) e poliestireno (PS). O grande problema da utilização desses polímeros está associado a seu elevado tempo de decomposição uma vez que estes não conseguem ser metabolizados por micro-organismos deteriorantes (MICHAELI, 2008).

Ao longo dos últimos anos, tem se intensificado a pesquisa e utilização de polímeros biodegradáveis sintéticos ou biológicos (biopolímeros). Entre os polímeros biodegradáveis sintéticos podem ser citados os poliésteres alifáticos, tais como poli(ácido glicólico) (PGA); poli(álcool vinílico) (PVA); poli(óxido de etileno) (PEO); poli(ácido láctico) (PLA) e poli(ϵ -caprolactona) (PCL). Os biopolímeros de origem biológica são obtidos a partir de alguns micro-organismos ou plantas, onde se destacam o grupo dos poli-hidroxicanoatos (PHAs) (CHANPRATEEP, 2010). Esses podem apresentar características similares a dos polímeros convencionais, porém com a vantagem de serem biodegradáveis (LAYCOCK et al., 2013).

Os poli-hidroxicanoatos são poliésteres de ácido hidroxicanoico, biodegradáveis, produzidos por bactérias e cianobactérias como material de reserva de energia na forma de grânulos intracelulares (SPOLAORE et al., 2006; WANG et al., 2013). A síntese é ativada pelo excesso de carbono e limitação de pelo menos um nutriente como fósforo e/ou nitrogênio (LAYCOCK et al., 2013; SCHIMIDELL et al., 2001). Sua degradabilidade está ligada aos grupos funcionais ésteres de sua estrutura.

Os PHAs podem ser classificados de acordo com o comprimento da cadeia monomérica em poli-hidroxicanoatos de cadeia curta (PHA_{SCL}) e poli-hidroxicanoatos de

cadeia média (PHA_{MCL}). Os PHA_{SCL} são formados por monômeros com 3 a 5 átomos de carbono enquanto os PHA_{MCL} são formados por monômeros com 6 a 14 átomos de carbono. A fonte de carbono utilizada nos cultivos é um dos fatores que determina qual tipo de PHA será produzido (CHOI; LEE, 1999; LUENGO et al., 2003). No Quadro 1 são apresentadas as principais estruturas dos PHAs, onde o tipo de radical “R” e o valor de “n” dão origem a diferentes unidades monoméricas, formando diferentes polímeros e copolímeros.

Quadro 1 - Estrutura dos PHAs.

$\left[\text{—O—CH—(CH}_2\text{)}_n\text{—C—} \right]_{100-3000}$ <div style="display: flex; justify-content: center; gap: 20px;"> <div style="text-align: center;"> </div> <div style="text-align: center;">R</div> <div style="text-align: center;"> O</div> </div>		
n=1	R= hidrogênio R= metil R= etil R= propil R=pentil R= nonil	Poli (3-hidroxiacetoato) Poli (3-hidroxiacetoato) Poli (3-hidroxiacetoato) Poli (3-hidroxiacetoato) Poli (3-hidroxiacetoato) Poli (3-hidroxiacetoato)
n=2	R= hidrogênio R= metil	Poli (4-hidroxiacetoato) Poli (4-hidroxiacetoato)
n=3	R= hidrogênio R= metil	Poli (5-hidroxiacetoato) Poli (5-hidroxiacetoato)
n=4	R= hexil	Poli (6-hidroxiacetoato)

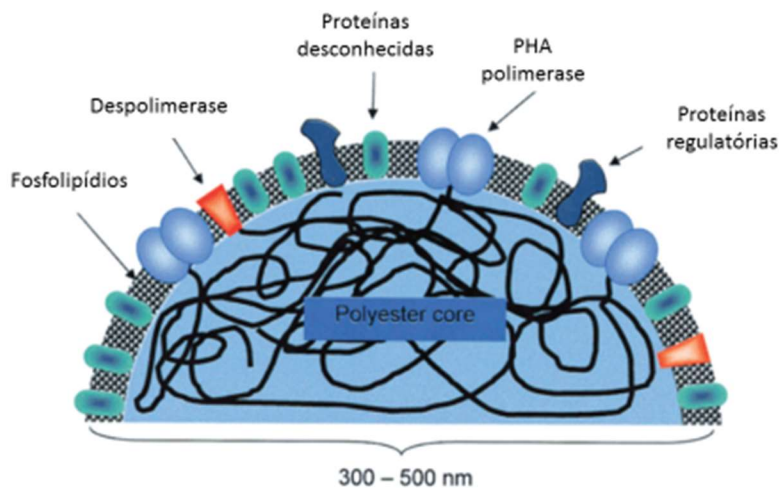
Fonte: (LEE et al., 1996)

O PHB é um homopolímero pertencente ao grupo dos PHAs, e produzido por organismos procarióticos na forma de grânulos intracelulares (URTUVIA et al., 2014). A barreira à transmissão de luz ao qual o PHB oferece, o torna forte concorrente aos polímeros tradicionais no armazenamento de alimentos que se oxidam com facilidade. Podem substituir, por exemplo, o polipropileno (PP) em embalagens para acondicionamento de alimentos como margarina, maionese e requeijão (BUCCI; TAVARES; SELL, 2007). Além disso, esse biopolímero apresenta importância tecnológica pelo fato de poder ser aplicado na área agroindustrial (abraçadeiras), biomédica (engenharia de tecidos) e indústria de embalagens no geral.

1.5 Síntese do PHB

Os PHAs acumulados sob a forma de grânulos no citoplasma celular como reserva de carbono constituem inclusões geralmente esféricas, com diâmetros variando de 0,2-0,5 μm . O grânulo encontra-se envolto por uma camada fosfolipídica. Esta camada pode ter a função de proteção, evitando o contato com a água, o que poderia levar o polímero da forma amorfa para a cristalina. Nesta camada encontram-se proteínas responsáveis pela síntese e degradação com biopolímero (Figura 1).

Figura 1 - Estrutura do grânulo de PHA intracelular.



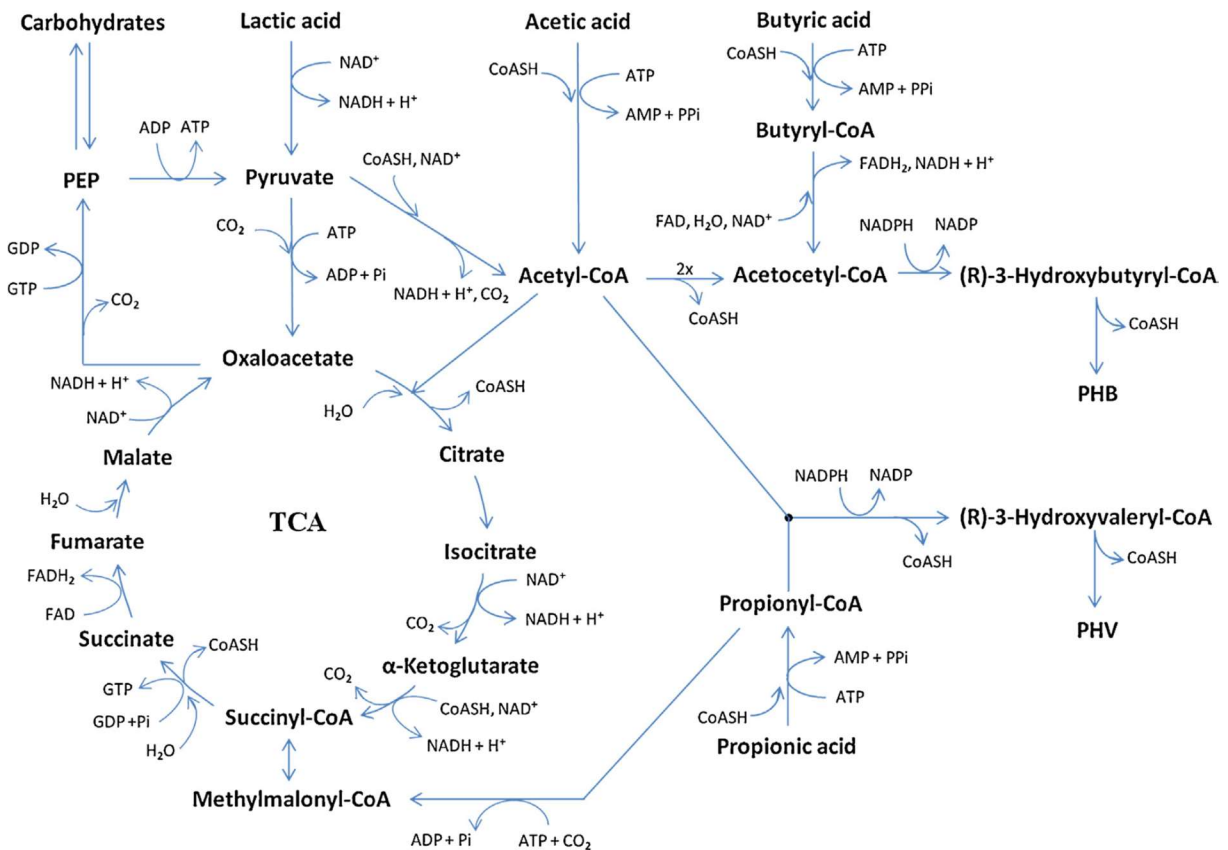
Fonte: (REHM, 2003)

O PHB é sintetizado (Figura 2) a partir da acetil-CoA, nesse processo três enzimas estão envolvidas. A β -cetotiolase que catalisa a condensação de duas moléculas de acetil-CoA, formando uma molécula de acetoacetil-CoA; esta, por sua vez, é reduzida a D(-)-3-hidroxiacetil-CoA numa reação estereoespecífica catalisada pela enzima *3-cetoacil-CoA redutase NADPH* dependente. A última etapa da síntese do PHB compreende a polimerização da unidade D(-)-3-hidroxiacetil-CoA a um polímero em crescimento, numa reação catalisada pela enzima *PHA sintase* (JENDROSSEK, 2009; SCHIMIDELL et al., 2001). Logo, a síntese de PHB é um processo regulado pela disponibilidade de acetil-CoA e disponibilidade de equivalentes reduzidos na forma de NADPH.

Quando todos os nutrientes necessários ao crescimento microbiano estão disponíveis, espera-se que os níveis de coenzima A (CoA) livre estejam altos, devido à grande demanda por grupos acetil pelo ciclo de Krebs para formação de esqueletos carbônicos e a geração de energia. Quando algum nutriente é limitado, a demanda por acetil diminui, com isso

os níveis de CoA livre são restringidos, reduzindo também a inibição sobre β -cetotiolase. O que desencadeia a síntese de PHB (JENDROSSEK, 2009; SCHIMIDELL et al., 2001; URTUVIA et al., 2014) (Figura 2).

Figura 2 - Rota metabólica de poli-hidroxicarboxilatos



Fonte: (FRADINHO; OEHMEN; REIS, 2014).

Fradinho; Oehmen; Reis (2014), demonstraram a variação da concentração de PHB quando ocorre excesso ou escassez de fonte de carbono no substrato. Segundo os autores, quando se limita a disponibilidade de carbono no meio, para manter o equilíbrio de Acetil-CoA no ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) as células consomem o PHB que havia sido acumulado durante a fase de excesso de carbono.

Os micro-organismos acumulam PHB como forma de reserva de energia, logo a degradação intracelular deve ser realizada por todos os micro-organismos capazes de acumular esse polímero. Essa degradação ocorre quando a fonte de carbono não está mais disponível. A degradação do polímero ocorre por via enzimática, onde a PHB *despolimerase* (intracelular) é capaz de degradar grânulos em estado nativo cujos produtos são H₂O e CO₂ (SRIDEWI; BHUBALAN; SUDESH, 2006).

Para que o PHB possa ser utilizado, ele precisa primeiramente ser extraído do interior das células e em alguns casos purificado. Os métodos de extração geralmente utilizados empregam solvente, que permeia através da parede celular e solubiliza o polímero que se encontra no citosol. Os principais solventes utilizados para a extração são: clorofórmio, dicloroetano, carbonato de propileno, carbonato de etileno, ésteres, cetonas entre outros (POSADA et al., 2011). Depois de separado, o polímero solubilizado é precipitado em um solvente de maior polaridade, por exemplo, água ou etanol.

Na digestão celular, o objetivo é digerir o material não polimérico da célula. Para isso podem ser utilizados dodecil sulfato de sódio, triton, detergentes e hipoclorito de sódio. Na digestão enzimática, são utilizadas enzimas como lisozimas, proteases, fosfolipases, lecitinasas entre outras (KAPRITCHKOFF et al., 2006; POSADA et al., 2011).

Outra técnica de rompimento celular é por ação mecânica, ao qual podem ser empregados homogeneizadores de alta pressão, ultrasonicador, moinho de pérolas entre outros (JACQUEL et al., 2008; POSADA et al., 2011; TAMER; MOO-YOUNG; CHISTI, 1998). Para elevar a eficiência da extração, podem ser empregadas combinações das técnicas.

1.6 Resíduo da extração de PHB de microalgas

A utilização de resíduos, de maneira geral, traz benefícios devido à minimização do problema ambiental que representa o descarte desses materiais. Nem todos os resíduos podem ser facilmente utilizados, devido ao fato de elementos e/ou substâncias potencialmente tóxicas, orgânicas ou inorgânicas estarem presentes nos mesmos. Ao longo dos anos vem sendo ampliado o aproveitamento de rejeitos industriais como matérias-primas, importantes para aplicações com maior valor agregado (FRADINHO; OEHMEN; REIS, 2014; RUIZ et al., 2014; ZORTÉA et al., 2013).

O cultivo de microalgas em águas residuais tem sido proposto desde os anos 1960, devido ao potencial que esses micro-organismos apresentam em utilizar resíduos como substrato para seu metabolismo (PARK et al., 2010). Em geral, o cultivo de microalgas em águas residuais tem duplo objetivo: a produção de biomassa e o tratamento de resíduos, reduzindo sua ação poluente do ambiente.

Para obtenção do biopolímero poli-hidroxibutirato de origem microalgal é necessário realizar extração do mesmo, para tal, realiza-se digestão da biomassa microalgal utilizado hipoclorito de sódio. Essa extração é responsável pelo acúmulo de quase 200 mL de resíduo por litro de cultivo. O resíduo gerado durante o processo de extração de PHB de microalgas é tratado como possível fonte de nutrientes para novos cultivos, uma vez que este

apresenta em sua composição a biomassa microalga digerida, com exceção do material polimérico. Além da parede celular, durante o processo de extração, compostos como proteínas, aminoácidos, lipídeos e carboidratos também são digeridos e liberam no meio, carbono, nitrogênio, fosforo entre outros componentes.

A disponibilidade desses compostos torna o resíduo da extração do PHB boa alternativa para novos cultivos de microalgas em rejeitos do processo.

CAPITULO III – DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

O presente trabalho foi desenvolvido em duas etapas, sendo separada em dois artigos:

ARTIGO 1: POTENCIAL APLICAÇÃO DO RESÍDUO DE EXTRAÇÃO DE BIOPOLÍMERO PARA O CULTIVO DE *Spirulina* sp. LEB 18

ARTIGO 2: PROCESSO CÍCLICO DE SÍNTESE DE POLI-HIDROXIBUTIRATO (PHB) POR *Spirulina* sp. LEB 18 UTILIZANDO RESÍDUO DA EXTRAÇÃO DO BIOPOLÍMERO

ARTIGO 1: POTENCIAL APLICAÇÃO DO RESÍDUO DE EXTRAÇÃO DE BIOPOLÍMERO PARA O CULTIVO DE *Spirulina* sp. LEB 18

RESUMO

A capacidade de desenvolvimento, aproveitamento da biomassa e tratamento de resíduos pelas microalgas vem despertando o interesse de pesquisadores há alguns anos. *Spirulina* (*Arthrospira*) é uma cianobactéria fotossintetizante que apresenta elevado conteúdo proteico, além de ser fonte de vitaminas e minerais. Sua capacidade de utilização de resíduos como substrato e conversão em produtos, tais como biodiesel/bioetanol e biopolímeros apresenta importância econômica, ambiental e social. O objetivo desse trabalho foi a utilização do resíduo da extração de poli-hidroxibutirato (PHB) da biomassa microalgal no cultivo de *Spirulina* sp. LEB 18. Foram realizados cultivos com resíduo nas concentrações 0, 2, 4, 6, 8 e 10 % (v/v) + meio Zarrouk. O resíduo utilizado foi exposto a três condições: sem tratamento, com tratamento térmico a 121 °C por 15 min e neutralização química com tiosulfato de sódio. Os cultivos apresentaram concentrações de biomassa máximas sem tratamento, com tratamento térmico e com resíduo neutralizado de 0,96 g L⁻¹ (8 % resíduo), 1,2 g L⁻¹ (6 % resíduo) e 1,12 g L⁻¹ (10 % resíduo), respectivamente. Os valores obtidos para produtividade sem tratamento, com tratamento térmico e com neutralização química foram 0,04, 0,08 e 0,08 g L⁻¹ d⁻¹ respectivamente. Esses resultados mostram a capacidade da utilização desse resíduo para o cultivo de *Spirulina* sp. LEB 18 sem prejudicar o desenvolvimento da microalga, reduzindo o descarte de resíduos no meio ambiente.

Palavras chave: cianobactéria, resíduo, poli-hidroxialcanoatos.

1 INTRODUÇÃO

Durante os períodos expansivos da capacidade produtiva, em função das demandas de mercado, a busca por novos produtos e tecnologias tem gerado elevadas quantidades de resíduos. O desenvolvimento e capacidade de produção de bens na sociedade deve estar diretamente associado à busca do equilíbrio entre a tecnologia adotada e educação ambiental.

Uma alternativa para reduzir as emissões industriais no meio ambiente, é o desenvolvimento de tecnologias que reproduzam os processos cíclicos de reutilização da natureza. Nesse sentido o resíduo gerado durante a produção e extração de determinado produto retorna ao início do processo como matéria prima para obtenção de novo composto.

O cultivo de microalgas para o tratamento de águas residuais iniciou há cerca de 80 anos com os gêneros *Chlorella* e *Dunaliella*. A aplicação desses micro-organismos foi devido ao seu potencial em utilizar diferentes resíduos como substrato e convertê-los em biomassa com possível aplicação na síntese de polímeros, combustíveis e compostos bioativos (FRADINHO; OEHMEN; REIS, 2014; PARANJAPE; LEITE; HALLENBECK, 2016; PARK et al., 2010; RUIZ et al., 2014).

Durante o processo de extração de poli-hidroxibutirato (PHB) de microalgas com hipoclorito de sódio, ocorre a geração de resíduos, que corresponde a material não polimérico

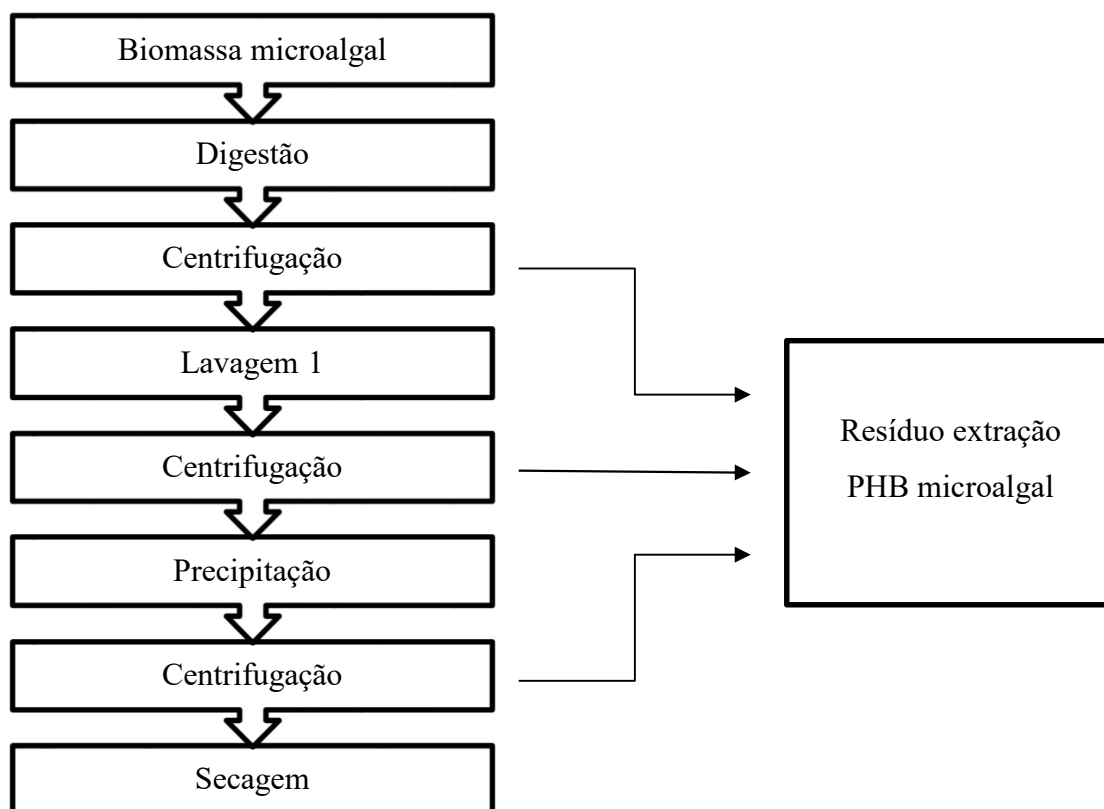
da biomassa e químicos utilizados para extração. A disponibilidade dos compostos existentes nesse resíduo é fundamental para a ciclicação do processo, pois estes podem ser utilizados como fonte de nutrientes para o novo cultivo. Outro fator importante para a ciclicação do processo está ligado a capacidade da microalga em suportar o resíduo no meio de cultivo. Com o desenvolvimento desse estudo, fatores importantes na produção de biocompostos podem ser viabilizados, como aproveitamento de resíduos, redução no impacto ambiental e redução dos custos do produto final. Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi a utilização do resíduo da extração de poli-hidroxibutirato (PHB) da biomassa no cultivo da microalga *Spirulina* sp. LEB 18.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção e composição do resíduo da extração de PHB microalgal

O resíduo acumulado da extração de PHB microalgal (Figura 1) foi recuperado e armazenado sob refrigeração até o momento dos cultivos.

Figura 1: Processo de extração de polímeros de microalgas



A concentração de carbono e nitrogênio do resíduo foi determinada utilizando analisador elementar CHNS/O (Perkin-Elmer 2400, USA). O padrão certificado acetanilida foi utilizado para calibração do equipamento (Perkin Elmer, USA) (BAUMGARTEN, 2010).

2.1 Micro-organismo e condições de cultivo

A microalga *Spirulina* sp. LEB 18 utilizada nesse estudo pertence ao banco de cepas do Laboratório de Engenharia Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande - FURG (MORAIS, 2008). O micro-organismo foi mantido em meio Zarrouk (ZARROUK, 1966). Para os ensaios, o meio Zarrouk foi modificado segundo Martins et al. (2014), onde as fontes de nitrogênio, carbono e fósforo foram reduzidas (Tabela 1).

Tabela 1 - Composição do Meio Zarrouk (1966) e Zarrouk modificado (MARTINS et al., 2014)

	Zarrouk	Zarrouk/Martins
Reagentes	Quantidade (g L ⁻¹)	Quantidade (g L ⁻¹)
NaHCO ₃	16,80	8,40
K ₂ HPO ₄	0,50	0,10
NaNO ₃	2,50	0,05
K ₂ SO ₄	1,00	1,00
NaCl	1,00	1,00
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,20	0,20
CaCl ₂	0,04	0,04
FeSO ₄ . 7H ₂ O	0,01	0,01
EDTA	0,08	0,08
Solução A5	1 mL	1 mL
Solução B6	1 mL	1 mL

FONTE: Zarrouk, (1966); Martins et al. (2014)

Solução A5: (g L⁻¹): H₃BO₃, 2,86; MnCl₂.4H₂O, 1,81; ZnSO₄.7H₂O, 0,222; Na₂MoO₄.2H₂O, 0,390; CuSO₂.5H₂O, 0,079.

Solução B6: (mg L⁻¹): NH₄VO₃: 22,86; KCr(SO₄)₂. 12 H₂O: 192; NiSO₄. 6H₂O: 44,8; Na₂WO₄. 2H₂O: 17,94; TiOSO₄. 8H₂O: 61,1; CO(NO₃)₂. 6H₂O: 43,98.

Foram testadas, nos cultivos, concentrações de 2, 4, 6, 8 e 10 % (v/v) de resíduo da extração do PHB por hipoclorito de sódio e comparados a cultivo em meio Zarrouk (0 % resíduo). O resíduo foi exposto a 3 condições: sem tratamento, tratamento térmico a 121 °C por 15 min e neutralização química do cloro com tiosulfato de sódio (Na₂S₂O₃). A quantidade de Na₂S₂O₃ necessário para neutralizar o cloro residual foi determinada por titulação em reação de oxirredução (VAZ et al., 2014).

Os cultivos de *Spirulina* sp. LEB 18 foram realizados em duplicata em reatores do tipo erlenmeyer de 500 mL com volume útil de 400 mL com concentração inicial de biomassa de 0,2 g L⁻¹ e aeração constante a 3 vvm (volume de ar por volume de meio, por minuto). Os cultivos foram mantidos a 30 °C com fotoperíodo de 12 h claro/escuro, luminosidade de 60 μmol m⁻² s⁻¹ (EL202/03, Eletrolab) e mantidos por 15 d.

2.2 Monitoramento dos cultivos e determinação dos parâmetros cinéticos

As amostras foram coletadas diariamente para acompanhamento da concentração de biomassa e determinada através da densidade óptica a 670 nm em espectrofotômetro (Quimis Q798DRM, Brasil), com curva de calibração que relaciona densidade óptica com peso seco de biomassa microalgal.

A partir das curvas de crescimento celular foram obtidas as concentrações celular máxima ($X_{m\acute{a}x}$, g L⁻¹), produtividade (P_x , g L⁻¹ d⁻¹), velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{m\acute{a}x}$, d⁻¹) e tempo de geração (t_g , d). A produtividade celular foi determinada segundo a equação de Bailey e Ollis, (1986), $[P = (X_t - X_o)/(t - t_o)]$, onde X_t é a concentração de biomassa (g L⁻¹) no tempo t (d) e X_o é a concentração celular de biomassa (g L⁻¹) no tempo t_o (d). A velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{m\acute{a}x}$) foi obtida pela regressão exponencial na fase logarítmica de crescimento celular (SCHIMIDELL et al., 2001). O tempo de geração foi calculado pela equação $[t_g = (\ln 2)/(\mu_{m\acute{a}x})]$.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Concentrações de C e N no resíduo

Os resultados para concentração de C e N no resíduo da extração de PHB microalgal são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Concentrações de C e N no resíduo de extração de PHB microalgal.

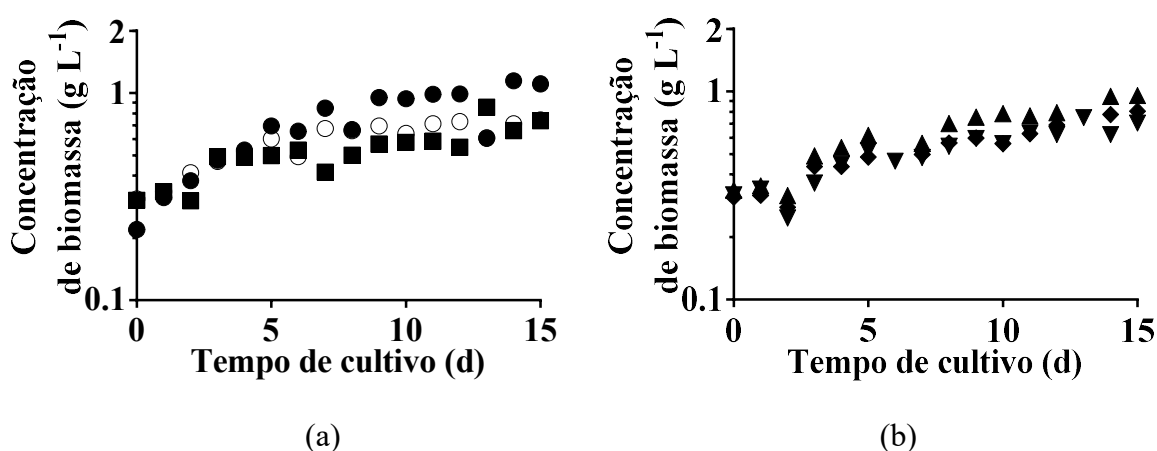
Amostra	Concentração resíduo (g L ⁻¹)	C (% , m m ⁻¹)	N (% , m m ⁻¹)
Amostra A	1,2	13,08	1,92
Amostra B	1,2	13,31	2,08

3.1 Cultivo de *Spirulina* sp. LEB 18 com resíduo da extração do PHB sem tratamento

Os cultivos contendo as maiores concentrações de resíduo, 6, 8 e 10 %, apresentaram redução na concentração celular nos dois primeiros dias (Figura 2b). Isso é atribuído ao período de adaptação ao novo meio. Os micro-organismos ao entrarem em contato com meios de composição diferentes do que vem sendo cultivados, tendem a apresentar esse período devido à dificuldade para converter as novas substâncias em nutrientes. Durante esse período, o micro-organismo sofre alterações nas rotas metabólicas e passa a produzir enzimas capazes de catalisar a quebra de compostos antes não existentes no meio de cultivo (CHU et al., 2016; ROLFE et al., 2012).

Outro fator que pode ter influenciado para a ocorrência da fase lag de crescimento é a presença de compostos clorados no meio de cultivo, proveniente do resíduo da extração de PHB. Durante o processo de extração de PHB utiliza-se hipoclorito de sódio, este composto é comumente utilizado como agente desinfetante por apresentar a capacidade de oxidar compostos orgânicos. O hipoclorito de sódio presente no meio de cultivo destrói algumas células da microalga, entretanto outras sofrem apenas lesões na parede celular e se regeneram (VIRTO et al., 2005). Após esse período, observou-se a fase de multiplicação celular.

Figura 2 - Curvas de crescimento de *Spirulina* sp. LEB 18 contendo, (a): (●) 0, (○) 2, (■) 4. (b): (▼) 6, (▲) 8 e (◆) 10 % (v/v) de resíduo de extração de PHB sem tratamento.



A cianobactéria *Spirulina* sp. LEB 18 se multiplicou em todas as condições testadas (Figura 2 e Tabela 3). O valor médio de concentração de biomassa, $1,15 \text{ g L}^{-1}$, obtido no ensaio sem adição de resíduo, está de acordo com o encontrado por Martins et al. (2014), ao cultivar *Spirulina* sp. LEB 18 nas mesmas condições de cultivo. Ao adicionar resíduo, não foi verificado decréscimo significativo ($p < 0,05$) nos valores de X_{\max} em nenhuma das condições testadas, onde a máxima concentração de biomassa, $0,96 \text{ g L}^{-1}$, foi obtida nos cultivos com 8 % (v/v) de resíduo.

Tabela 3 - Parâmetros cinéticos dos cultivos de *Spirulina* sp. LEB 18 em diferentes concentrações de resíduo da extração do PHB.

Concentração resíduo (% v/v)	X_{\max} (g L^{-1})	P_x ($\text{g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$)	μ_{\max} (d^{-1})	t_g (d)
controle	$1,15 \pm 0,03^a$	$0,07 < 0,01^b$	$0,22 \pm 0,03^a$	$3,15 \pm 0,74^c$
2	$0,74 \pm 0,12^a$	$0,03 \pm 0,01^a$	$0,13 \pm 0,01^a$	$5,29 \pm 0,39^{bc}$
4	$0,95 \pm 0,04^a$	$0,03 \pm 0,01^a$	$0,13 \pm 0,01^a$	$5,15 \pm 0,35^{ab}$
6	$0,71 \pm 0,09^a$	$0,03 \pm 0,01^a$	$0,19 \pm 0,04^a$	$3,66 \pm 0,85^{bc}$
8	$0,96 \pm 0,20^a$	$0,04 \pm 0,01^a$	$0,21 \pm 0,04^a$	$3,32 \pm 0,35^{bc}$
10	$0,81 \pm 0,14^a$	$0,03 \pm 0,01^a$	$0,22 \pm 0,01^a$	$3,09 \pm 0,73^a$

* Letras iguais na coluna, resultados estatisticamente iguais ($p < 0,05$).

Para velocidade específica máxima de crescimento, verificou-se no ensaio controle, valor médio de $0,22 \text{ d}^{-1}$, valor este considerado estatisticamente igual ($p < 0,05$) aos ensaios contendo resíduo no meio de cultivo. A produtividade (P_x), apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) entre os cultivos com e sem adição de resíduo.

A duração da fase exponencial para os cultivos contendo resíduo variam de 2 a 4 d, seguidas da fase estacionária. Mesmo assim, o cultivo de microalgas em resíduo sem tratamento pode ser utilizado com o intuito de não descartar contaminantes no meio ambiente, reduzir a utilização de reagentes químicos para a formulação do meio e por consequência reduzir também o custo de produção da biomassa microalgal (QIN et al., 2013; RAHMAN et al., 2014).

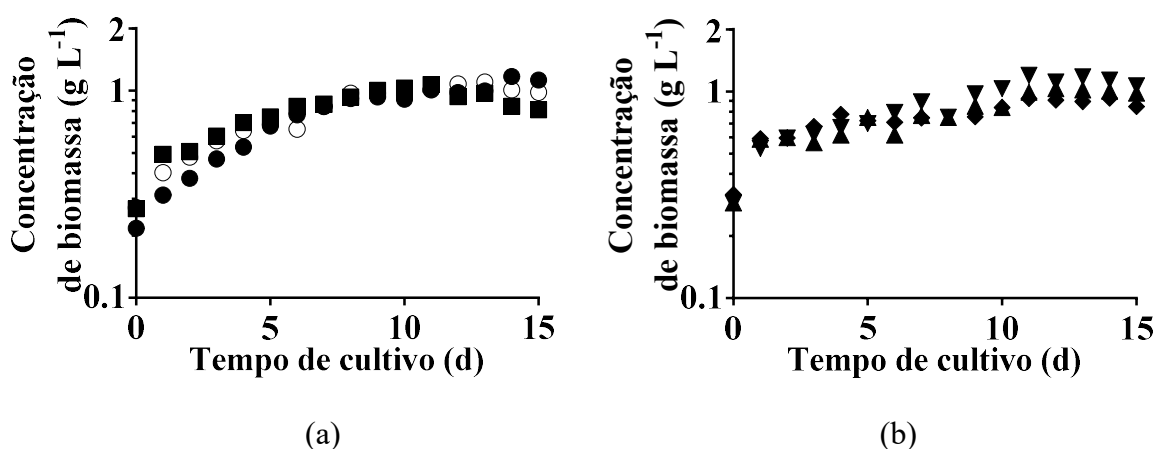
3.2 Cultivo de *Spirulina* sp. LEB 18 em resíduo da extração do PHB com tratamento térmico

Para os cultivos contendo resíduo tratado termicamente, não houve redução na concentração celular e não foi possível visualizar fase lag de crescimento (Figura 3). Esse comportamento ocorre devido ao tratamento térmico, em temperaturas elevadas o hipoclorito de sódio é degradado, formando cloreto de sódio e oxigênio. NaCl está presente na formulação do meio Zarrouk a 1 g L^{-1} . Ao realizar a determinação teórica do NaCl formado na reação, obteve-se $0,1 \text{ g L}^{-1}$ para a máxima concentração de resíduo. Logo entende-se que nessas concentrações, esse composto não foi prejudicial ao desenvolvimento da microalga.

Após os cultivos apresentarem os picos de concentração de biomassa, ao 12º d de cultivo, ambos os ensaios apresentaram início do período de morte celular. Isso pode ter ocorrido devido à redução das fontes de nitrogênio e fósforo, limitando o crescimento microalgal (MARTINS et al., 2014). Como o resíduo é composto basicamente de biomassa microalgal digerida a qual contém aminoácidos das ficobiliproteínas, clorofila entre outros compostos (JIANG et al., 2011; WU; WU; SHEN, 2001), acreditava-se que o resíduo poderia ser fonte de nutrientes. Porém, ao adicionar 10 % de resíduo, não foi possível observar variação na concentração de biomassa. Isso ocorreu pois as concentrações de C e N no resíduo são inferiores a do meio Zarrouk padrão.

Quando as microalgas são cultivadas em baixas concentrações de nitrogênio, ocorre acúmulo de lipídeos e polissacarídeos nas células (PARANJAPE; LEITE; HALLENBECK, 2016; RICHMOND, 2007). Como o PHB é um composto lipídico, sua síntese provavelmente é favorecida nestas condições. Porém como consequência, ocorre redução da taxa de crescimento celular.

Figura 3 - Curvas de crescimento de *Spirulina* sp. LEB 18 contendo, (a): (●) 0, (○) 2, (■) 4, (b): (▼) 6, (▲) 8 e (◆) 10 % (v/v) de resíduo de extração de PHB com tratamento térmico.



No ensaio contendo 6 % de resíduo tratado termicamente, obteve-se o máximo valor para concentração celular ($1,20 \text{ g L}^{-1}$). Também, para esse ensaio foram obtidos os valores máximos referentes à produtividade, velocidade específica de crescimento e tempo de geração (Tabela 4). Estes valores foram considerados estatisticamente iguais ao ensaio controle ($p < 0,05$).

Tabela 4 - Parâmetros cinéticos dos cultivos de *Spirulina* sp. LEB 18 em diferentes concentrações de resíduo da extração do PHB com tratamento térmico.

Concentração resíduo (%, v/v)	X_{\max} (g L^{-1})	P_x ($\text{g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$)	μ_{\max} (d^{-1})	t_g (d)
controle	$1,17 \pm 0,08^a$	$0,07 \pm 0,01^a$	$0,19 \pm 0,01^a$	$3,68 \pm 0,22^a$
2	$1,10 \pm 0,08^a$	$0,06 \pm 0,01^a$	$0,21 < 0,01^a$	$3,36 \pm 0,04^a$
4	$1,07 \pm 0,05^a$	$0,07 < 0,01^a$	$0,32 \pm 0,02^a$	$2,18 \pm 0,33^a$
6	$1,20 \pm 0,17^a$	$0,08 \pm 0,01^a$	$0,36 \pm 0,03^a$	$1,91 \pm 0,62^a$
8	$1,03 \pm 0,17^a$	$0,06 < 0,01^a$	$0,36 \pm 0,03^a$	$1,91 \pm 0,63^a$
10	$0,93 \pm 0,09^a$	$0,06 < 0,01^a$	$0,32 < 0,01^a$	$2,19 \pm 0,04^a$

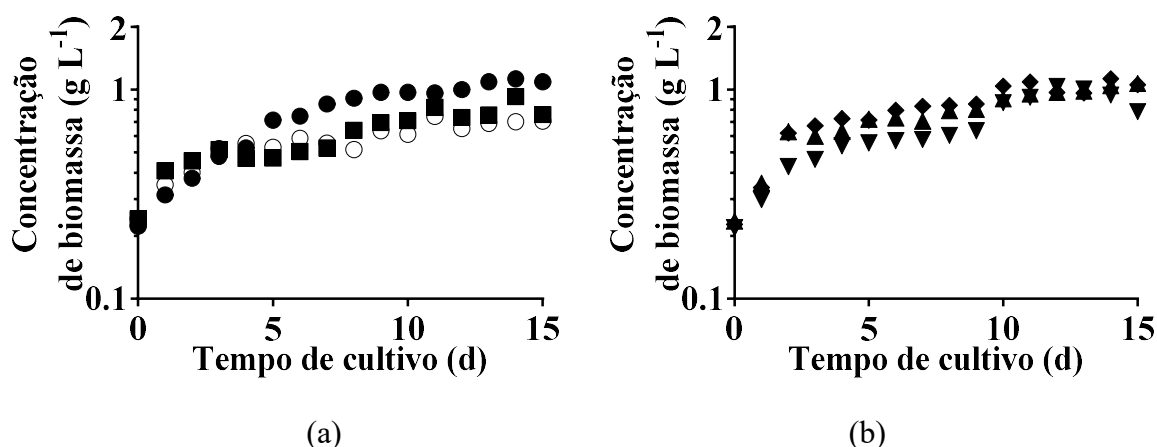
* Letras iguais na coluna, resultados estatisticamente iguais ($p < 0,05$).

3.3 Cultivo de *Spirulina* sp. LEB 18 em resíduo da extração do PHB neutralizado com $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$.

Nos cultivos realizados com resíduo tratado com tiosulfato de sódio, não foi possível visualizar a fase lag de crescimento (Figura 4). O processo de tratamento do resíduo por tiosulfato de sódio acarreta na oxi-redução do cloro livre conforme mostrado na equação a seguir: $2\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 + \text{Cl}_2 \rightarrow \text{Na}_2\text{S}_4\text{O}_6 + 2\text{NaCl} + 10\text{H}_2\text{O}$. Essa reação é responsável pela formação de cloreto de sódio, composto adicionado na formulação do meio de cultivo para o desenvolvimento microalgal. A formação desse composto possibilita a redução na utilização de NaCl no meio de cultivo, uma vez que este será formado durante o processo de tratamento do

resíduo. Ainda em relação às curvas dos cultivos, foi possível observar semelhança no comportamento do desenvolvimento microalgal entre os ensaios contendo 8 e 10 % de resíduo e o ensaio controle.

Figura 4 - Curvas de crescimento *Spirulina* sp. LEB 18 contendo, (a): (●) 0, (○) 2, (■) 4. (b): (▼) 6, (▲) 8 e (◆) 10 % (v/v) de resíduo de extração de PHB neutralizado por tiosulfato de sódio.



Os máximos valores para concentração celular, $1,12 \text{ g L}^{-1}$, foram obtidos quando a microalga *Spirulina* sp. LEB 18 foi cultivada com 10 % de resíduo no meio de cultivo, bem como quando não houve adição de resíduo (Tabela 5). Isso demonstra a capacidade de incorporação de maiores concentrações de resíduo ao meio de cultivo. O mesmo comportamento ocorreu para os demais parâmetros cinéticos, onde produtividade e velocidade específica máxima foram iguais aos do ensaio controle ($p < 0,05$).

Tabela 5 - Parâmetros cinéticos dos cultivos de *Spirulina* sp. LEB 18 em diferentes concentrações de resíduo da extração do PHB neutralizado com $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$.

Concentração resíduo (%, v/v)	X_{max} (g L^{-1})	P_x ($\text{g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$)	μ_{max} (d^{-1})	t_g (d)
controle	$1,12 \pm 0,01^a$	$0,06 \pm 0,00^a$	$0,17 \pm 0,03^a$	$4,00 \pm 0,67^a$
2	$0,85 \pm 0,20^a$	$0,05 \pm 0,02^a$	$0,18 \pm 0,12^a$	$3,87 \pm 0,29^a$
4	$0,94 \pm 0,23^a$	$0,07 \pm 0,04^a$	$0,17 \pm 0,11^a$	$4,13 \pm 0,63^a$
6	$1,03 \pm 0,10^a$	$0,08 < 0,01^a$	$0,21 \pm 0,04^a$	$3,33 \pm 0,66^a$
8	$1,07 \pm 0,07^a$	$0,06 < 0,01^a$	$0,24 \pm 0,02^a$	$2,90 \pm 0,28^a$
10	$1,12 \pm 0,13^a$	$0,06 < 0,01^a$	$0,30 \pm 0,01^a$	$2,31 \pm 0,10^a$

* Letras iguais na coluna, resultados estatisticamente iguais ($p < 0,05$).

Ao relacionar os ensaios contendo 10 % resíduo, sem tratamento, com tratamento térmico e com neutralização química, observa-se melhor produção de biomassa para os cultivos onde o resíduo foi neutralizado. Isso pode ser atribuído ao fato de que o agente limitante de crescimento (cloro) foi neutralizado sem formação de compostos inibitórios a multiplicação da microalga.

Quando observadas as produtividades nos 3 tratamentos, é possível observar que ao utilizar resíduo da extração sem prévio tratamento, houve redução na produtividade em relação ao ensaio controle. Essa diferença não foi observada nos ensaios onde o resíduo foi submetido aos tratamentos, térmico e de neutralização. Sendo assim, o processo de pré tratamento do resíduo apresenta a vantagem de não alterar a produção de biomassa pela microalga *Spirulina* sp. LEB 18 em relação aos cultivos controle.

4 CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos neste trabalho, foi possível observar a capacidade de produção de biomassa pela microalga *Spirulina* sp. LEB 18 cultivada em diferentes concentrações de resíduo da extração de PHB. As concentrações máximas de biomassa para os cultivos utilizando resíduo sem tratamento, com tratamento térmico e neutralizado foram 0,96 g L⁻¹ (8 % resíduo), 1,2 g L⁻¹ (6 % resíduo) e 1,12 g L⁻¹ (10 % resíduo), respectivamente. Logo o experimento no qual o resíduo foi tratado com Na₂S₂O₃ se mostra mais adequado ao cultivo da microalga *Spirulina* sp. LEB 18. Esses resultados demonstram a capacidade de utilização do resíduo da extração de PHB no cultivo da microalga *Spirulina* sp. LEB 18. Além de reduzir a deposição deste resíduo no meio ambiente, os bioprodutos gerados da biomassa formada podem ser aplicados para produção de biocombustíveis, compostos bioativos ou biopolímeros, completando o processo cíclico de reutilização de resíduo com produção de PHB.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAUMGARTEN, M. D. G. Z. **Manual de Análises em Oceanografia Química**. 2. ed. Rio Grande: FURG, 2010.
- CHU, D.; BARNES, D. J.; MONOD, J.; STÜLKE, J.; HILLEN, W.; BRÜCKNER, R.; TITGEMEYER, F.; BOULINEAU, S.; BOIANELLI, A.; INADA, T.; KIMATA, K.; ADLER, F.; et al. The lag-phase during diauxic growth is a trade-off between fast adaptation and high growth rate. **Scientific Reports**, v. 6, p. 25191, 29 abr. 2016.
- FRADINHO, J. C.; OEHMEN, A.; REIS, M. A. M. Photosynthetic mixed culture polyhydroxyalkanoate (PHA) production from individual and mixed volatile fatty acids (VFAs): Substrate preferences and co-substrate uptake. **Journal of Biotechnology**, v. 185, p. 19–27, 2014.
- JIANG, L.; LUO, S.; FAN, X.; YANG, Z.; GUO, R. Biomass and lipid production of marine microalgae using municipal wastewater and high concentration of CO₂. **Applied Energy**, v. 88, n. 10, p. 3336–3341, 2011.
- MARTINS, R. G.; GONÇALVES, I. S.; MORAIS, M. G. DE; COSTA, J. A. V. Bioprocess Engineering Aspects of Biopolymer Production by the Cyanobacterium *Spirulina* Strain LEB 18. **International Journal of Polymer Science**, v. 2014, p. 1–7, 2014.
- MORAIS, M. G. DE. **Bioengenharia microalgal na utilização de gás de combustão e extração de biopolímeros para desenvolvimento de nanofibras**. [s.l.] Universidade Federal do Rio Grande, 2008.
- PARANJAPE, K.; LEITE, G. B.; HALLENBECK, P. C. Effect of nitrogen regime on microalgal lipid production during mixotrophic growth with glycerol. **Bioresource Technology**, v. 214, p. 778–786, 2016.
- PARK, J.; JIN, H.-F.; LIM, B.-R.; PARK, K.-Y.; LEE, K. Ammonia removal from anaerobic digestion effluent of livestock waste using green alga *Scenedesmus* sp. **Bioresource technology**, v. 101, n. 22, p. 8649–8657, 2010.
- QIN, L.; SHU, Q.; WANG, Z.; SHANG, C.; ZHU, S.; XU, J.; LI, R.; ZHU, L.; YUAN, Z. Cultivation of *Chlorella vulgaris* in Dairy Wastewater Pretreated by UV Irradiation and Sodium Hypochlorite. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, n. 2, p. 1121–1130, 2013.
- RAHMAN, A.; ANTHONY, R. J.; SATHISH, A.; SIMS, R. C.; MILLER, C. D. Effects of wastewater microalgae harvesting methods on polyhydroxybutyrate production. **Bioresource Technology**, v. 156, p. 364–367, 2014.
- RICHMOND, A. (ED.). **Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology**. [s.l.] Wiley-Blackwell, 2007.
- ROLFE, M. D.; RICE, C. J.; LUCCHINI, S.; PIN, C.; THOMPSON, A.; CAMERON, A. D. S.; ALSTON, M.; STRINGER, M. F.; BETTS, R. P.; BARANYI, J.; PECK, M. W.; HINTON, J. C. D. Lag phase is a distinct growth phase that prepares bacteria for exponential

growth and involves transient metal accumulation. **Journal of bacteriology**, v. 194, n. 3, p. 686–701, fev. 2012.

RUIZ, J.; ARBIB, Z.; ÁLVAREZ-DÍAZ, P. D.; GARRIDO-PÉREZ, C.; BARRAGÁN, J.; PERALES, J. A. Influence of light presence and biomass concentration on nutrient kinetic removal from urban wastewater by *Scenedesmus obliquus*. **Journal of Biotechnology**, v. 178, n. 1, p. 32–37, 2014.

SCHIMIDELL, W.; LIMA, U. DE A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotechnologia Industrial**. São Paulo: Blucher, 2001.

VAZ, M. G. M. V.; BASTOS, R. W.; MILANEZ, G. P.; MOURA, M. N.; FERREIRA, É. G.; PERIN, C.; PONTES, M. C. F.; DO NASCIMENTO, A. G. Use of sodium hypochlorite solutions to obtain axenic cultures of *Nostoc* strains (Cyanobacteria). **Brazilian Journal of Botany**, v. 37, n. 2, p. 115–120, 2014.

VIRTO, R.; MAÑAS, P.; ÁLVAREZ, S.; CONDON, S.; RASO, J. Membrane Damage and Microbial Inactivation by Chlorine in the Absence and Presence of a Chlorine-Demanding Substrate. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 9, p. 5022–5028, 2005.

WU, G. F.; WU, Q. Y.; SHEN, Z. Y. Accumulation of poly- β -hydroxybutyrate in cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803. **Bioresource Technology**, v. 76, p. 85–90, 2001.

ZARROUK, C. **Contribution à l'étude d'une cyanophycée influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthese de *Spirulina maxima* (Setch et Gardner) Geitler**. Paris: University of Paris, 1966.

ARTIGO 2: PROCESSO CÍCLICO DE SÍNTESE DE POLI-HIDROXIBUTIRATO (PHB)
POR *Spirulina* sp. LEB 18 UTILIZANDO RESÍDUO DA EXTRAÇÃO DO
BIOPOLÍMERO

RESUMO

O aproveitamento de resíduos, assim como a produção de compostos biodegradáveis é há anos objeto de estudos e de interesse mundial, como forma de reduzir o impacto ambiental gerado por processos exploratórios não sustentáveis. O objetivo desse trabalho foi utilizar o resíduo da extração do biopolímero no cultivo da microalga *Spirulina* sp. LEB 18, visando processo cíclico de síntese de PHB. Foram testadas concentrações de 10, 15, 20, 25 e 30 % (v/v) de resíduo da extração do biopolímero. Para comparação, foram utilizados dois experimentos controle, Zarrouk normal (ZN) e Zarrouk modificado (ZM) com redução de nitrogênio. Os experimentos foram realizados em triplicata e avaliados quanto a produção de biomassa microalgal e PHB. Os ensaios com adição de resíduo apresentaram produção de biomassa igual a ZM (0,79 g L⁻¹, p<0,1). A produção de PHB no ensaio contendo 25 % de resíduo foi maior quando comparado aos demais cultivos com adição de resíduo, obtendo-se 10,6 % (p/p) de biopolímero. A partir dos resultados obtidos é possível afirmar que a utilização de resíduo da extração de PHB nos cultivos microalgais, visando a síntese de biopolímeros, pode ocorrer em processo cíclico, reduzindo custos e a deposição de resíduos o que favorece a preservação do meio ambiente.

Palavras-chave: cianobactéria, poli-hidroxibutirato, resíduo, *Spirulina*.

1 INTRODUÇÃO

As moléculas que compõe o petróleo são utilizadas nos processos de síntese de combustíveis, materiais construtivos, plásticos e outros produtos de uso diário. Contudo, o fluxo de resíduos que acompanha esses processos de produção compromete muitos sistemas naturais. Neste cenário, é importante avaliar as escolhas para o futuro. Ao invés de manipular a biologia da vida, deve-se encontrar inspiração nas formas como a natureza atua, transformando a percepção linear em uma visão de modelo cíclico (PAULI, 2014).

O estudo tecnológico de micro-organismos fotossintéticos, como as microalgas e cianobactérias, vem ao encontro dessa necessidade, pois estas possuem sistema biológico com potencial para síntese de diferentes biocompostos. A partir da energia solar, as microalgas são capazes de produzir compostos orgânicos como proteínas, lipídios, corantes e biopolímeros (VONSHAK, 1997).

A *Spirulina* sp. é uma cianobactéria verde azulada que pode ser encontrada sob condições ambientais variadas, como águas salobras, mar e lagoas salinas. Essa versatilidade, aliada a variedade de produtos que podem ser obtidos de sua biomassa, vem sendo explorada por pesquisadores para tratamento de resíduos de diversas indústrias, como alcooleira e processamento de óleos (ABDEL-RAOUF; AL-HOMAIDAN; IBRAHEEM, 2012;

FRADINHO; OEHMEN; REIS, 2014; MARKOU; CHATZIPAVLIDIS; GEORGAKAKIS, 2012).

Os polímeros armazenados pelas cianobactérias como reserva energética são alternativa aos plásticos derivados de petróleo. Os biopolímeros podem apresentar características físicas similares a dos polímeros de origem petroquímica, como cristalinidade, maleabilidade e barreira a luz. Apresentam ainda a vantagem de serem biodegradáveis (quando quebrada, uma molécula de PHB libera no ambiente água e dióxido de carbono) e compatíveis com células e tecidos por serem atóxicos (LAYCOCK et al., 2014). Essas características potencializam a substituição ou complementação dos polímeros petroquímicos com os biopolímeros microbianos, podendo ser aplicados na produção de embalagens alimentícias, agricultura e na área médica (FABRA; LÓPEZ-RUBIO; LAGARON, 2015; FAN et al., 2015).

Durante o processo de extração dos biopolímeros de microalgas é produzida elevada quantidade de resíduos, o qual é composto basicamente de biomassa digerida isenta da fração polimérica e reagentes de extração. A preocupação com o meio ambiente leva a estudos para que a reutilização de resíduos seja proveitosa, gerando benefícios tanto para o homem como para os ecossistemas (PELIZER et al., 2007).

Nesse sentido, o aproveitamento do resíduo da extração do PHB para novos cultivos da microalga é de grande interesse, uma vez que o resíduo gerado na etapa de extração pode ser utilizado como fonte de nutrientes para iniciar novo processo. Dessa forma, tem-se um ciclo de produção com menor quantidade de resíduos. Este estudo é um dos pioneiros em aplicar o processo cíclico de produção de polímeros por microalgas. Os resultados promissores deste trabalho direcionam para novos estudos utilizando resíduos até então pouco aproveitados. Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi utilizar o resíduo da extração do biopolímero no cultivo da microalga *Spirulina* sp. LEB 18 visando processo cíclico de síntese de PHB.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Micro-organismo e meio de cultivo

A microalga *Spirulina* sp. LEB 18 (MORAIS; COSTA, 2007), pertencente ao banco de microalgas do Laboratório de Engenharia Bioquímica – FURG, foi utilizada para este estudo. Os ensaios foram realizados em meio Zarrouk modificado com redução das fontes de C, N e P (MARTINS et al., 2014). O meio de cultivo foi complementado com o resíduo da extração do PHB, previamente neutralizado com tiosulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$), nas concentrações de 10, 15, 20, 25 e 30 % (v/v). Para comparação, foram realizados dois ensaios

sem adição de resíduo, ZN: Zarrouk (ZARROUK, 1966) e ZM: Zarrouk modificado (Tabela 1).

Tabela 1 - Composição do meio ZN (ZARROUK, 1966) e ZM (MARTINS et al., 2014)

Reagentes	ZN (g L ⁻¹)	ZM (g L ⁻¹)
NaHCO ₃	16,80	8,40
K ₂ HPO ₄	0,50	0,10
NaNO ₃	2,50	0,05
K ₂ SO ₄	1,00	1,00
NaCl	1,00	1,00
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,20	0,20
CaCl ₂	0,04	0,04
FeSO ₄ . 7H ₂ O	0,01	0,01
EDTA	0,08	0,08
Solução A5	1 mL	1 mL
Solução B6	1 mL	1 mL

FONTE: Zarrouk, (1966); Martins et al. (2014)

Solução A5: (g L⁻¹): H₃BO₃, 2,86; MnCl₂.4H₂O, 1,81; ZnSO₄.7H₂O, 0,222; Na₂MoO₄.2H₂O, 0,390; CuSO₂.5H₂O, 0,079.

Solução B6: (mg L⁻¹): NH₄VO₃: 22,86; KCr(SO₄)₂. 12 H₂O: 192; NiSO₄. 6H₂O: 44,8; Na₂WO₄. 2H₂O: 17,94; TiOSO₄. 8H₂O: 61,1; CO(NO₃)₂. 6H₂O: 43,98.

2.2 Condições de cultivo

Os cultivos foram realizados em reator tubular vertical de 1,8 L (volume útil de 1,5 L) ($\theta = 7,5$; $h = 60$ cm) com agitação contínua através da injeção de ar estéril por pedra porosa com dimensões de 1 x 3 cm. A concentração inicial de biomassa foi 0,25 g L⁻¹. Os cultivos foram mantidos em câmara termostaticada a 30 °C por 20 d. A luminosidade utilizada foi 12 KW/m² e fotoperíodo 12 h claro/escuro.

2.3 Monitoramento dos cultivos

2.3.1 Determinação de pH e biomassa

Diariamente amostras foram coletadas assepticamente para acompanhamento da concentração de biomassa e pH. A concentração de biomassa foi determinada através da densidade óptica a 670 nm em espectrofotômetro (UVmini-1240 Shimadzu, Japão), com curva de calibração que relaciona densidade óptica com peso seco da biomassa microalgal (COSTA et al., 2006). A determinação do pH foi realizada em pHmetro digital (PHS-3E pHtek, Brasil).

2.3.2 Concentração de carbono inorgânico no meio de cultivo

Para a determinação da concentração de carbono inorgânico no meio de cultivo foi utilizado método indireto, a qual são relacionados os valores de pH, temperatura e alcalinidade. Para tal, titulou-se 20,0 mL de amostra com ácido clorídrico 0,1 N sob agitação e acompanhou-se o pH até atingir 4,3. O volume de ácido clorídrico (HCl) gasto foi utilizado para determinar a alcalinidade total e relacionada a concentração de C no meio de cultivo (CARMOUZE, 1994).

2.3.3 Concentração de nitrogênio no meio de cultivo

A concentração de nitrogênio amoniacal do meio de cultivo foi determinada utilizando método colorimétrico proposto por Cataldo et al. (2008). Em 2 mL de amostra do meio isento de células, foi adicionado 0,8 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) com 5 % de ácido salicílico (C₇H₆O₃) e após 20 min foi adicionado 19 mL de hidróxido de sódio (NaOH) 2 N. Após resfriar a temperatura ambiente, realizou-se a leitura da absorbância a 410 nm. Através da curva padrão obteve-se os resultados de concentração de nitrogênio amoniacal.

2.3.4 Concentração de fósforo no meio de cultivo

A concentração de fósforo foi determinada através de análise colorimétrica utilizando o Kit fosfato (PhosVer 3 Hach, USA). Nesta determinação retirou-se uma alíquota de 10 mL de meio isento de células e realizou-se o procedimento com o Kit. Após 2 min realizou-se a leitura da absorbância a 890 nm e através de curva padrão determinou-se a concentração de fósforo.

2.3.5 Determinação dos parâmetros cinéticos de crescimento celular

A partir das curvas de crescimento celular, foram obtidas a concentração de biomassa máxima ($X_{m\acute{a}x}$, g L⁻¹), produtividade (P_x , g L⁻¹ d⁻¹) e velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{m\acute{a}x}$, d⁻¹). A produtividade de biomassa foi obtida segundo a Equação 1 (BAILEY; OLLIS, 1986), onde X é a concentração de biomassa (g L⁻¹) no tempo t (d) e X_o é a concentração de biomassa (g L⁻¹) no tempo t_o (d).

$$P_x = \frac{X_t - X_o}{t - t_o} \quad (1)$$

A velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{m\acute{a}x}$) foi calculada por regressão exponencial aplicada à fase logarítmica de crescimento de acordo com a Equação 2 (SCHIMIDELL et al., 2001).

$$\mu_{m\acute{a}x} = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \quad (2)$$

2.3.6 Quantificação do polímero na célula

A concentração de biopolímero na biomassa foi determinada por cromatografia gasosa (CG) nos dias 0, 3, 6, 9, 11, 13, 15, 17 e 20. A biomassa seca (105 °C por 24 h), foi submetida a lise celular, hidrólise do polímero e metanólise em 1 mL de clorofórmio, 0,85 mL de metanol e 0,15 mL de ácido sulfúrico a 100 °C por 3,5 h (BRANDL et al., 1988). Os grupos metil éster formados foram analisados em cromatógrafo gasoso (2014 Shimadzu, Japão) equipado com coluna capilar de sílica Restek Rtx-5 (30 m, 0,25 mm, 0,25µm) e detector de ionização de chama (FID). As condições de operação foram 250 °C para injetor e detector. O programa utilizado para separar os metil ésteres foi: 60 °C por 2 min, taxa de incremento de 25 °C / min até atingir 180 °C / 8 min. A curva de calibração foi construída utilizando como padrão poli(ácido 3-hidroxi-butírico-co-3-hidroxi-valérico) 88 mol % HB e 12 mol % HV (Sigma Aldrich) (BRANDL et al., 1988; ZHANG et al., 2015).

2.4 Extração do biopolímero

Ao final do cultivo, a biomassa microalgal foi centrifugada a 3975 x g, por 20 min a temperatura ambiente (centrífuga Hitachi-Japão). Após, para cada grama de biomassa, foi adicionada 100 mL de água destilada e 25 mL de hipoclorito de sódio (10-12 % de cloro ativo (m/v)) e mantida sob agitação por 10 min. A suspensão resultante foi submetida a sucessivas lavagens com água destilada e centrifugação (3975 x g por 20 min em temperatura ambiente). Repetiu-se o ciclo do processo adicionando 50 mL de acetona. O precipitado final (biopolímero bruto) foi seco em estufa a 35 °C por 48 h (MARTINS et al., 2014).

2.5 Purificação do biopolímero

O biopolímero bruto extraído foi desengordurado por 2 h em hexano, a 60 °C, sob agitação em rota evaporador. Após foi filtrado a vácuo e seco em estufa a 30 °C por 24 h. O solvente utilizado para a purificação de biopolímero foi o 1,2-carbonato de propileno (Sigma-Aldrich), Utilizando método baseado na Patente US 4140741 A (LAFFERTY; HEINZLE, 1978), citado por (MARTINS et al., 2014).

2.6 Espectroscopia de Infravermelho

A amostra do biopolímero extraído e purificado foi submetida a análise de Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) no intervalo de 4.000 a 450 cm⁻¹ (IRPrestige-21, Shimadzu).

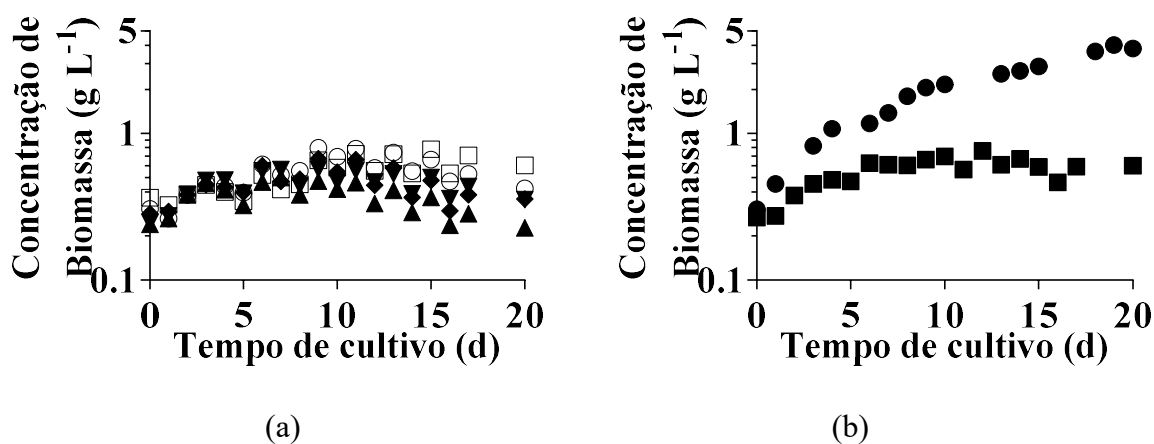
2.7 Tratamento estatístico

Os experimentos foram realizados em triplicata e avaliados através de análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey para comparação das médias ($p < 0,1$).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os ensaios contendo resíduo, bem como ZM, apresentaram concentração de biomassa inferior a 1 g L^{-1} . Estes valores foram menores que o ensaio ZN, que alcançou concentração de biomassa de $3,99 \text{ g L}^{-1}$ no 19º d de cultivo (Figura 1). Esta diferença na concentração de biomassa ocorreu porque os experimentos com adição de resíduo foram realizados sob condições limitadas de nitrogênio, visando o acúmulo de PHB. Segundo Kumar et al. (2010), o nitrogênio é o segundo elemento mais importante para o crescimento microalgal, sendo o constituinte principal dos ácidos nucleicos e das proteínas. Os experimentos contendo resíduo, assim como o controle ZM apresentaram final da fase exponencial no 3º d de cultivo, enquanto no controle ZN a fase exponencial de crescimento se manteve até 15 d.

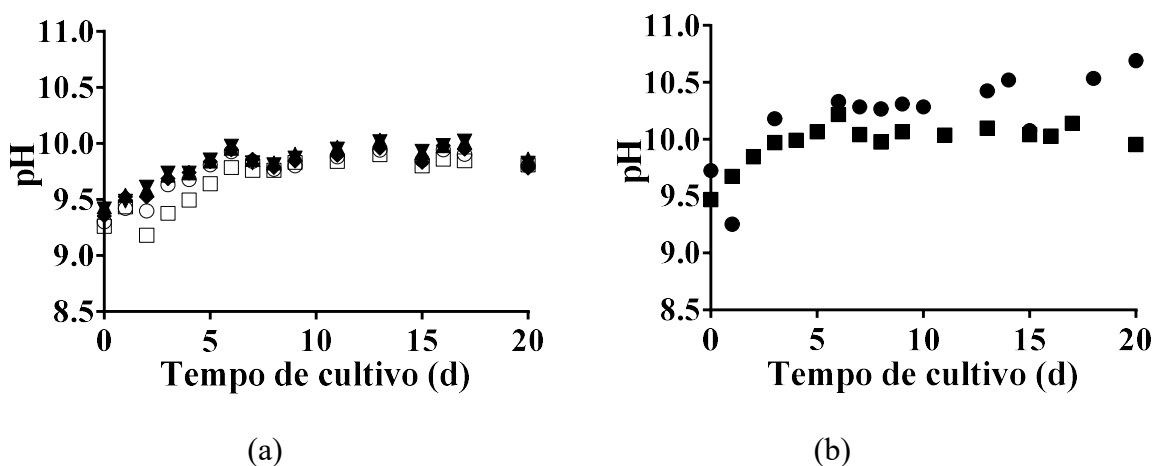
Figura 1 - Curvas de crescimento de *Spirulina* sp. LEB 18 cultivada com (a): 10 (▲), 15 (▼), 20 (◆), 25 (○) e 30 % (v/v) (□) de resíduo de extração do PHB. (b): ZN (●) e ZM (■).



O pH tem grande influência na multiplicação microalgal, estando diretamente ligado a disponibilidade dos nutrientes no meio de cultivo, como carbono e nitrogênio. Em ambos os casos o pH altera a forma com que estes compostos estão presentes no meio de cultivo. O carbono quando em pH elevado ($> 10,5$), se apresenta na forma de carbonato (CO_3^{2-}). Quando o pH do meio está entre 6 e 10,5 o carbono encontra-se na forma de bicarbonato (HCO_3^-). Em pHs abaixo desses valores o carbono estará disponível na forma de ácido carbônico (H_2CO_3^-) (HILLE et al., 2013).

Assim como ocorre com o carbono, a forma com que o nitrogênio está disponível no meio de cultivo é função de pH e temperatura. Quando em pH menor que 8 o nitrogênio encontra-se indisponível na forma de amônia (NH_3) e está disponível na forma do íon amônio (CARVALHO; OLIVEIRA; ALBERTO, 2014). Isso dificulta a absorção deste nutriente pela célula microalgal, reduzindo ou alterando seu metabolismo. Em todos os ensaios realizados, ocorreu elevação dos valores do pH até o 6º d, variando de aproximadamente 9,5 a 10 (Figura 2). Estes valores são conhecidos como pH ideal para desenvolvimento da microalga *Spirulina* sp (PANDEY et al., 2014; RICHMOND, 2007).

Figura 2 - Monitoramento dos pHs do meio nos cultivos de *Spirulina* sp. LEB 18 cultivada com (a): 10 (▲), 15 (▼), 20 (◆), 25 (○) e 30 % (v/v) (□) de resíduo de extração do PHB. (b): ZN (●) e ZM (■).



Em 6 d de cultivo, a velocidade específica de crescimento apresentou máximos valores (Tabela 2), coincidindo com a elevação do pH. Na fase exponencial do desenvolvimento microbiano ocorre maior consumo de nutrientes. Enquanto estes nutrientes estiverem disponíveis em quantidades suficientes e não ocorrer produção de compostos inibitórios, a fase exponencial será mantida (CLARKE, 2013). Após a multiplicação exponencial, o pH se manteve constante para todos os ensaios até o final dos experimentos, com exceção ao controle ZN, onde o pH se elevou até o último dia de cultivo, acompanhando a produção de biomassa.

A maior produtividade ($p < 0,1$), assim como ocorreu em relação a biomassa, foi obtida pelo cultivo em meio padrão (ZN) (Tabela 2) e (Figura 3). Os demais cultivos não apresentaram diferença estatística ($p < 0,1$) entre si. A diferença entre os valores é atribuída ao fato de que ZN foi realizado com meio de cultivo padrão, onde há grande disponibilidade de nutrientes. O fato de não haver diferença entre os cultivos onde a fonte de nitrogênio foi

reduzida, se mostra como bom indicador da viabilidade de utilização de resíduo da extração do PHB para a produção de biomassa.

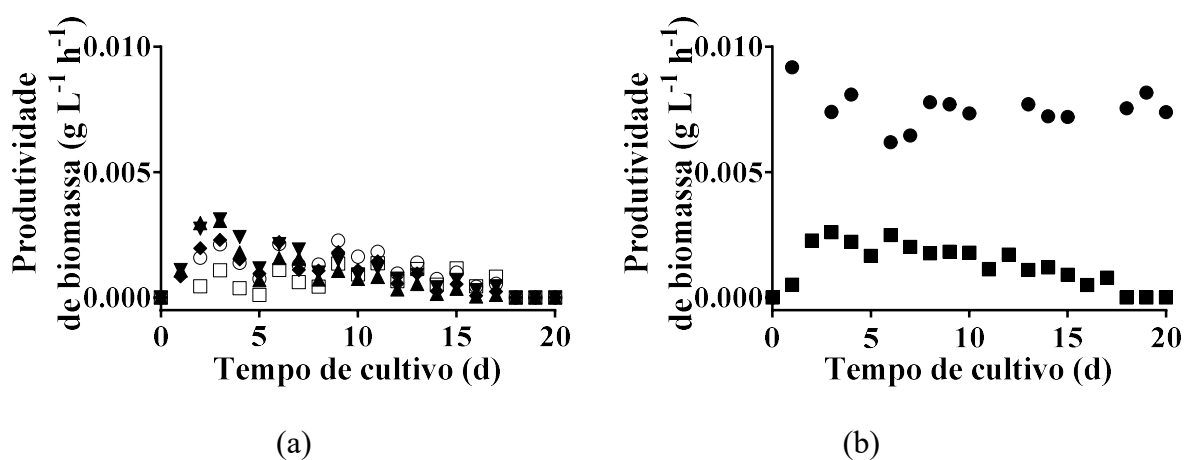
Tabela 2 - Parâmetros cinéticos dos cultivos de *Spirulina* sp. LEB 18 cultivadas em diferentes concentrações de resíduo da extração do PHB.

Concentração resíduo (% v/v)	X_{max} (g L ⁻¹)	P_x (g L ⁻¹ h ⁻¹)	μ_{max} (d ⁻¹)
10	0,50 ± 0,01 ^c	0,002 ± <0,001 ^b	0,16 ± 0,04
15	0,57 ± 0,01 ^{bc}	0,001 ± <0,001 ^b	0,19 ± 0,01
20	0,67 ± 0,02 ^b	0,002 ± <0,001 ^b	0,12 ± 0,02
25	0,79 ± 0,02 ^b	0,002 ± <0,001 ^b	0,11 ± 0,01
30	0,76 ± 0,02 ^b	0,001 ± <0,001 ^b	0,05 ± 0,02
ZN	3,99 ± 0,12 ^a	0,008 ± <0,001 ^a	0,20 ± 0,01
ZM	0,76 ± 0,19 ^b	0,002 ± <0,001 ^b	0,17 ± 0,02

* Letras iguais na mesma coluna, os resultados não diferem estatisticamente ($p < 0,1$).

As concentrações de nitrogênio amoniacal disponíveis no meio de cultivo sem limitação de nitrogênio (ZN) foram de 116 a 11 mg L⁻¹ do início ao final do experimento. Enquanto que nos cultivos com redução de nitrogênio (Figura 4), a variação foi de aproximadamente 9 a 1 mg L⁻¹, sendo que, quanto mais resíduo foi adicionado, maior a quantidade de nitrogênio amoniacal inicialmente disponível no meio. Esse comportamento foi observado, devido ao fato de que o resíduo da extração de PHB de microalgas é composto em grande parte por frações proteicas e ácidos nucleicos oriundos da biomassa microalgal.

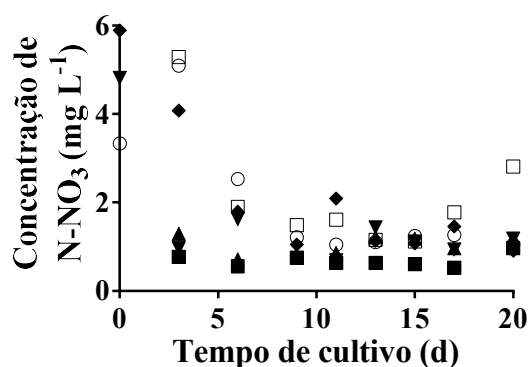
Figura 3 - Produtividade da biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 cultivada com (a): 10 (▲), 15 (▼), 20 (◆), 25 (○) e 30 % (v/v) (□) de resíduo de extração do PHB. (b): controle ZN (●) e controle ZM (■).



Nos ensaios com redução de nitrogênio, o nutriente em questão foi consumido quase que completamente até o sexto dia de cultivo, mesmo dia em que se encerrou a fase

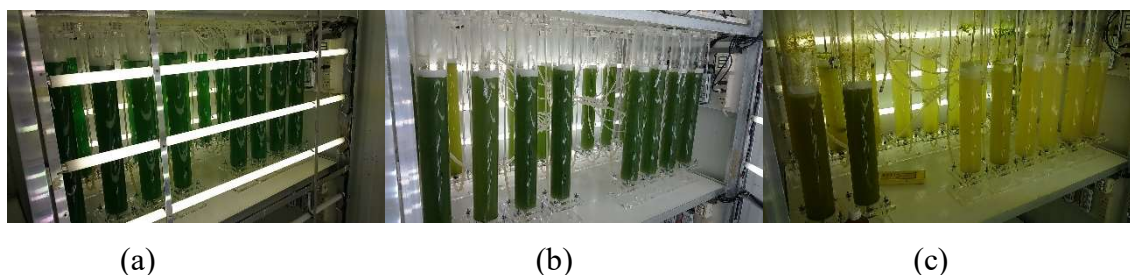
exponencial de multiplicação celular e o pH foi estabilizado. No ensaio ZN, devido a maior quantidade de nitrogênio no meio de cultivo, este não foi consumido por completo até final do experimento, porém foi possível observar redução significativa a partir do 12º d de cultivo. Na Figura 5 e Apêndice 5, podem ser acompanhados os efeitos da limitação de nitrogênio ao longo do cultivo. Após a escassez do nutriente, foi observada alteração na coloração das células, possivelmente devido a redução no teor de clorofila, consequência da mudança na rota metabólica para acúmulo de compostos lipídicos como o PHB.

Figura 4 - Concentração de nitrogênio amoniacal disponível no meio de cultivo: 10 (▲), 15 (▼), 20 (◆), 25 (○) e 30 % (v/v) (□) de resíduo de extração do PHB e ZM (■).



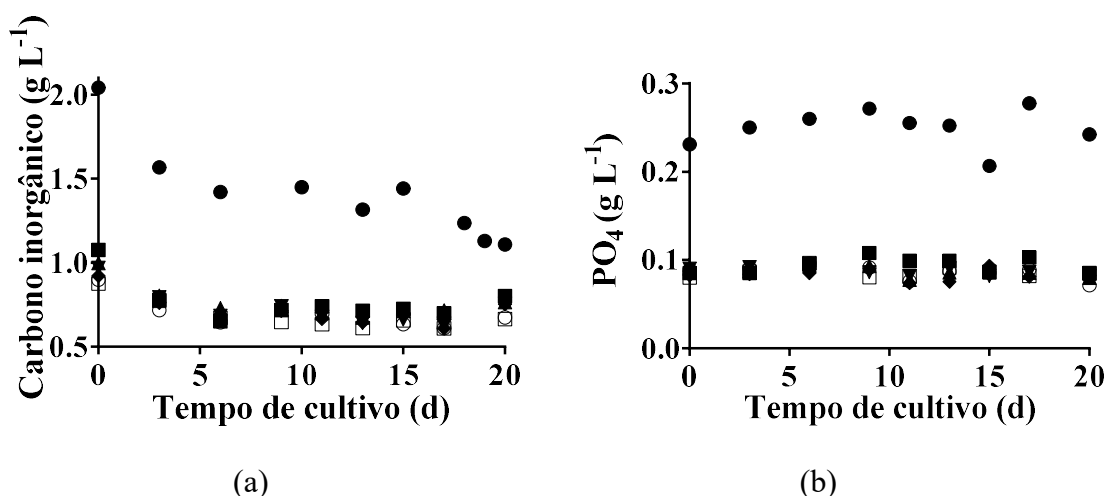
As concentrações de carbono inorgânico no meio de cultivo variaram de 2,1 para 1,1 g L⁻¹ para o experimento ZN, enquanto nos ensaios com redução de nutrientes, a variação foi 1,1 para 0,8 g L⁻¹ (Figura 6 a). A adição de resíduo ao meio de cultivo ocasionou pequena redução na concentração inicial de carbono no meio. Sabendo que o carbono do resíduo está na forma de carbono orgânico, a redução na concentração inicial do mesmo pode ser atribuída ao fato de que o método utilizado para quantificação do carbono, leva em conta apenas o carbono inorgânico. A concentração de fósforo se manteve praticamente constante para todos os ensaios ao longo do cultivo (Figura 6 b). Isso ocorreu porque o fósforo é adicionado ao meio de cultivo em quantidades maiores que a demanda da cianobactéria.

Figura 5 - Cultivos de *Spirulina* sp. LEB 18 nos tempos 0 (a), 6 (b) e 20 (c) d de experimento.



A partir do 13^o d de cultivo, a produção de PHB apresentou diferença significativa ($p < 0,1$) entre os cultivos com redução de nutrientes e o cultivo ZN (Figura 7). Esta diferença deixou de existir apenas no último dia de cultivo. Entre os cultivos com redução de nutrientes, também é possível observar diferença ($p < 0,1$) a partir do 13 d, sendo que o ensaio ZM apresentou máximos valores (12 %, p/p), seguido do experimento com 25 % de resíduo (10,6 %, p/p).

Figura 6 - Concentrações de carbono (a) e fósforo (b) nos cultivos com 10 (▲), 15 (▼), 20 (◆), 25 (○) e 30 % (v/v) (□) de resíduo de extração do PHB, ZN (●) e ZM (■).

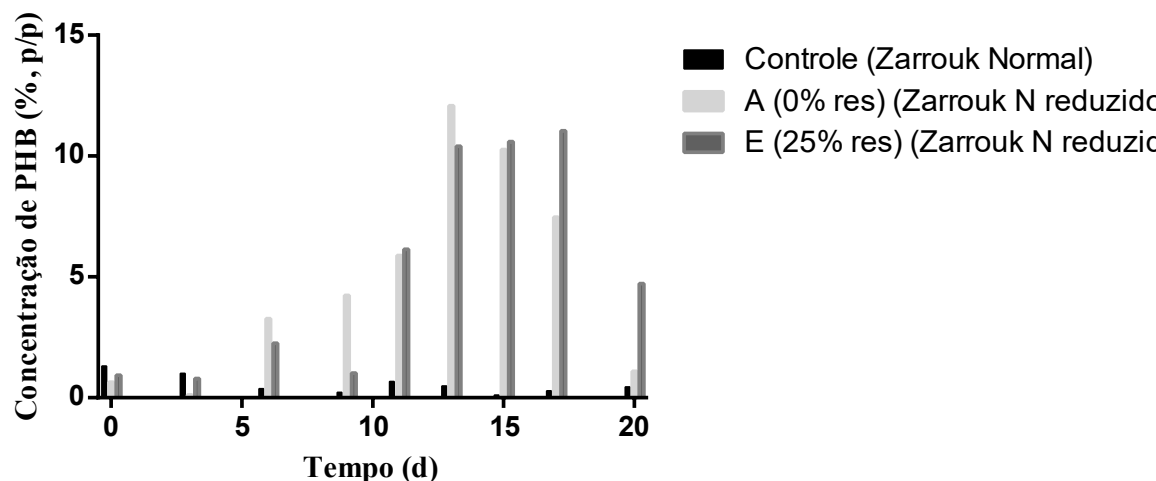


A limitação do nitrogênio nos cultivos coincide com o acúmulo de PHB nas células. Na Figura 4, pode ser observado que ao 6^o d de cultivo, as concentrações de nitrogênio amoniacal encontram-se em condições de limitação. A partir desse dia, observou-se aumento gradativo no acúmulo de PHB (Figura 7). Resultados semelhantes foram descritos por Jau et al. (2005), quando cultivaram *Spirulina platensis* em meio Kosaric. Os autores observaram acúmulo de poli-hidroxialcanoato (PHA) entre o 5^o e 7^o d de cultivo sob condições reduzidas de nitrogênio. Ainda segundo Jau et al. (2005), no início dos cultivos, quantidades inferiores a 1 % (p/p) de PHB foram quantificadas. Sendo que ao longo da produção, a quantidade de PHB em relação a massa seca passou para 10 % (p/p). Comportamento este similar ao encontrado no presente trabalho, onde foi obtido máximo de 12 % (p/p) de polímero.

Outro ponto importante a se observar, é que ao mesmo tempo em que a produção de PHB aumentou e a concentração de nitrogênio atingiu os mínimos valores, a biomassa não apresentou crescimento. Sendo assim, pode-se dizer que o processo de produção de PHB pela microalga *Spirulina* sp. LEB 18 ocorre em duas etapas: na primeira, os nutrientes estão em quantidade e qualidade suficientes para multiplicação celular, e na segunda, devido à exaustão

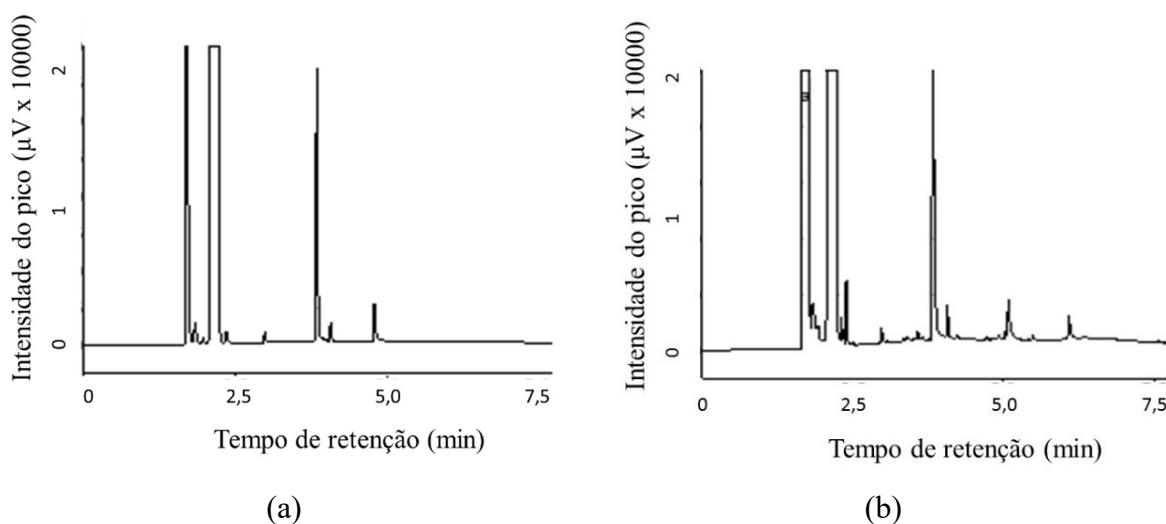
do nutriente essencial (nitrogênio), a cianobactéria passa a acumular biopolímeros. Esse processo é de fácil compreensão, pois o PHB é acumulado como reserva energética

Figura 7 - Concentração de PHB (% p/p) na biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 cultivada com ZN (■) e controle ZM (□) e controle 25 % resíduo (▒).



Quando todos os nutrientes necessários ao crescimento microbiano estão disponíveis, espera-se que os níveis de coenzima A (CoA) livre estejam altos, devido à grande demanda por grupos acetil pelo ciclo de Krebs para formação de esqueletos carbônicos e a geração de energia. Quando algum nutriente é limitado, a demanda por acetil diminui, com isso os níveis de CoA livre são restringidos, reduzindo também a inibição sobre a β -cetotilase, o que desencadeia a síntese de PHB (LAYCOCK et al., 2014; SCHIMIDELL et al., 2001).

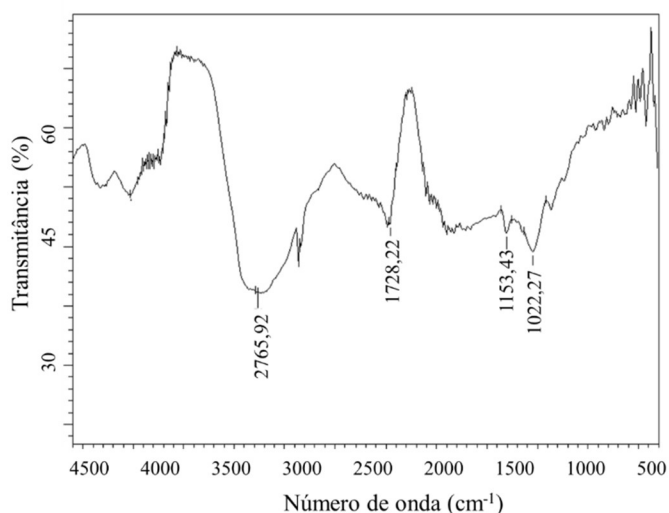
Figura 8 - Cromatograma do padrão externo nos tempos de retenção 3,9 (3HB) e 4,8 (3HV), (a) e da biomassa nos tempos de retenção 3,9 (3HB) e 5,1 (Hx) (b).



No decorrer dos cultivos de microalgas, diferentes compostos podem ser produzidos, assim como variações na concentração de cada um destes. Ao analisar os cromatogramas obtidos para quantificação do PHB (Apêndice 6), foi possível observar a ocorrência, além do monômero (3HB), a presença de outro polímero (Hx), possivelmente 3HV visto que este apresenta tempo de retenção próximo ao padrão (Figura 8b).

Para confirmação das espécies químicas, foi utilizado espectro de FTIR (Figura 9). O fragmento encontrado próximo a 1728 cm^{-1} corresponde a ligação carbonila (C=O), enquanto que os fragmentos encontrados entre 1200 e 1000 cm^{-1} equivalem aos grupos metil (CH_3), metileno (CH_2) e alongamentos C-O. A banda de maior transmitância encontrada, próximo a 3000 cm^{-1} corresponde as ligações carbono-hidrogênio (CH). Os grupos encontrados correspondem com os mencionados por Hong et al. (1999); Kansiz; Billman-Jacobe; Mcnaughton (2000), ao desenvolverem técnicas para detecção e quantificação de PHB por FTIR.

Figura 9 - Espectro FTIR obtido do PHB de *Spirulina* sp. LEB 18.



4 CONCLUSÃO

Os cultivos realizados com resíduo da extração de polímero microalgal apresentaram maior produção de PHB, alcançando 10,6 % (p/p) no ensaio contendo 25 % (v/v) de resíduo. A síntese de PHB foi influenciada pela disponibilidade de N no meio, sendo que o acúmulo do biopolímero ocorreu com a limitação desse nutriente. A análise de FTIR confirmou os resultados da cromatografia gasosa, onde os fragmentos encontrados correspondem as espécies químicas presentes no PHB das células de *Spirulina* sp. LEB 18. Com os resultados

obtidos observa-se a possibilidade de tornar cíclico o processo de produção de PHB a partir de *Spirulina* sp. LEB 18 reduzindo assim custos e impactos ambientais decorrentes do processo.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-RAOUF, N.; AL-HOMAIDAN, A. A.; IBRAHEEM, I. B. M. Microalgae and wastewater treatment. **Saudi journal of biological sciences**, v. 19, n. 3, p. 257–75, jul. 2012.
- ALLEN, M. M.; SMITH, A. J. Nitrogen chlorosis in blue-green algae. **Archiv für Mikrobiologie**, v. 69, n. 2, p. 114–120, 1969.
- BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. **Biochemical Engineering Fundamentals**. [s.l.] McGraw-Hill, 1986.
- BRANDL, H. et al. Pseudomonas oleovorans as a Source of Poly(beta-Hydroxyalkanoates) for Potential Applications as Biodegradable Polyesters. **Applied and environmental microbiology**, v. 54, n. 8, p. 1977–82, ago. 1988.
- CARVALHO, L. F.; OLIVEIRA, M. S.; ALBERTO, J. C. V. Evaluation of the Influence of Nitrogen and Phosphorus Nutrients in the Culture and Production of biosurfactants by Microalga Spirulina. **Int. Journal of Engineering Research and Applications**, v. 4, n. 6, p. 90–98, 2014.
- CATALDO, D. A. et al. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid 1. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 6, n. 1, p. 71–80, 11 nov. 2008.
- CHANPRATEEP, S. Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 110, n. 6, p. 621–32, dez. 2010.
- CLARKE, K. G. **Bioprocess Engineering, An introductory Engineering and Life Science Approach**. 1. ed. [s.l.: s.n.].
- COSTA, J. A. V. et al. Simultaneous cultivation of Spirulina platensis and the toxigenic cyanobacteria Microcystis aeruginosa. **Zeitschrift für Naturforschung. C, Journal of biosciences**, v. 61, n. 1-2, p. 105–10, jan. 2006.
- MORAIS, M. G.; COSTA, J. A V. Isolation and selection of microalgae from coal fired thermoelectric power plant for biofixation of carbon dioxide. **Energy Conversion and Management**, v. 48, n. 7, p. 2169–2173, 2007.
- FABRA, M. J.; LÓPEZ-RUBIO, A.; LAGARON, J. M. Three-Layer Films Based on Wheat Gluten and Electrospun PHA. **Food and Bioprocess Technology**, v. 8, n. 11, p. 2330–2340, 2015.
- FAN, X. et al. Preparation and characterization of electrospun antimicrobial fibrous membranes based on polyhydroxybutyrate (PHB). **Fibers and Polymers**, v. 16, n. 8, p. 1751–1758, 29 ago. 2015.
- FRADINHO, J. C.; OEHMEN, A.; REIS, M. A M. Photosynthetic mixed culture polyhydroxyalkanoate (PHA) production from individual and mixed volatile fatty acids

(VFAs): Substrate preferences and co-substrate uptake. **Journal of Biotechnology**, v. 185, p. 19–27, 2014.

HILLE, R. et al. A modified pH drift assay for inorganic carbon accumulation and external carbonic anhydrase activity in microalgae. **Journal of Applied Phycology**, v. 26, n. 1, p. 377–385, 2013.

HONG, K. et al. A rapid method for detecting bacterial polyhydroxyalkanoates in intact cells by Fourier transform infrared spectroscopy. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 51, n. 4, p. 523–526, 1999.

JAU, M. H. et al. Biosynthesis and mobilization of poly(3-hydroxybutyrate) [P(3HB)] by *Spirulina platensis*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 36, n. 3, p. 144–151, 2005.

KANSIZ, M.; BILLMAN-JACOB, H.; MCNAUGHTON, D. Quantitative determination of the biodegradable polymer Poly(beta-hydroxybutyrate) in a recombinant *Escherichia coli* strain by use of mid-infrared spectroscopy and multivariate statistics. **Applied and environmental microbiology**, v. 66, n. 8, p. 3415–3420, 2000.

KUMAR, A. et al. Enhanced CO₂ fixation and biofuel production via microalgae: Recent developments and future directions. **Trends in Biotechnology**, v. 28, n. 7, p. 371–380, 2010.

LAFFERTY, R. M.; HEINZLE, E. **Cyclic carbonic acid esters as solvents for poly-(β-hydroxybutyric acid)** Google Patents, , 1978. Disponível em:
<<http://www.google.com/patents/US4101533>>

LAYCOCK, B. et al. The chemomechanical properties of microbial polyhydroxyalkanoates. **Progress in Polymer Science**, v. 39, n. 2, p. 397–442, 2014.

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

MARTINS, R. G. et al. Bioprocess Engineering Aspects of Biopolymer Production by the Cyanobacterium *Spirulina* Strain LEB 18. **International Journal of Polymer Science**, v. 2014, p. 1–7, 2014.

PANDEY, A. et al. **Biofuels From Algae**. San Diego: Elsevier B.V., 2014.

PAULI, G. **A economia azul: 10 anos, 100 inovações, 100000000 de empregos**. 1. ed. Curitiba: IESDE Brasil S/A, 2014.

RICHMOND, A. (ED.). **Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology**. [s.l.] Wiley-Blackwell, 2007.

SCHIMIDELL, W. et al. **Biotecnologia Industrial**. São Paulo: Blucher, 2001.

VERLINDEN, R. A. J. et al. Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, n. 6, p. 1437–1449, 2007.

VONSHAK. **Spirulina Platensis Arthrospira: Physiology, Cell-Biology And Biotechnology**. Bristol: [s.n.].

ZARROUK, C. **Contribution à l'étude d'une cyanophycée influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthese de Spirulina maxima (Setch et Gardner) Geitler**. Paris: University of Paris, 1966.

ZHANG, Y.-Z. et al. Engineering of *Ralstonia eutropha* for the production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) from glucose. **Journal of biotechnology**, v. 195, p. 82–8, 10 fev. 2015.

CAPITULO IV – CONCLUSÕES GERAIS E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

O pré tratamento do resíduo da extração do PHB por tiosulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) foi a melhor opção para cultivo da microalga *Spirulina* sp LEB 18, apresentando máxima concentração de biomassa ($1,12 \text{ g L}^{-1}$), não apresentar período de adaptação ao meio e não ter exibido morte celular durante os cultivos. Os cultivos realizados com resíduo da extração de biopolímero microalgal apresentaram maior produção de PHB, alcançando 10,6 % (p/p) no ensaio contendo 25 % (v/v) de resíduo. A síntese de PHB foi influenciada pela disponibilidade de N no meio, sendo que o acúmulo do biopolímero ocorreu com a limitação desse nutriente. A análise de FTIR confirmou os resultados da cromatografia gasosa, que indicava a predominância de PHB nas células de *Spirulina* sp. LEB 18. Foi detectado também outro composto, possivelmente outro polímero. O presente trabalho é um dos pioneiros em aplicar o conceito de processo cíclico de obtenção de PHB por cianobactérias. Ao comprovar a possibilidade de utilização do resíduo da extração de biopolímeros em novo processo de obtenção de PHB por *Spirulina* sp. LEB 18 fecha-se o ciclo, reduzindo assim custos e impactos ambientais decorrentes do processo.

Para trabalhos futuros, sugere-se:

- Identificar o biopolímero (Hx) observado neste trabalho.
- Estudo de diferentes relações C, N e P no meio de cultivo contendo resíduo da extração de PHB.
- Avaliar os efeitos de diferentes intensidades luminosas bem como fotoperíodo na produção do biopolímero.
- Testar diferentes pHs e temperatura no cultivo.
- Substituir bicarbonato por CO_2 nos cultivos.

CAPITULO V – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-RAOUF, N.; AL-HOMAIDAN, A. A.; IBRAHEEM, I. B. M. Microalgae and wastewater treatment. **Saudi journal of biological sciences**, v. 19, n. 3, p. 257–75, jul. 2012.
- ALLEN, M. M.; SMITH, A. J. Nitrogen chlorosis in blue-green algae. **Archiv für Mikrobiologie**, v. 69, n. 2, p. 114–120, 1969.
- BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. **Biochemical Engineering Fundamentals**. [s.l.] McGraw-Hill, 1986.
- BAUMGARTEN, M. D. G. Z. **Manual de Análises em Oceanografia Química**. 2. ed. Rio Grande: FURG, 2010.
- BRANDL, H. et al. Pseudomonas oleovorans as a Source of Poly(beta-Hydroxyalkanoates) for Potential Applications as Biodegradable Polyesters. **Applied and environmental microbiology**, v. 54, n. 8, p. 1977–82, ago. 1988.
- CARVALHO, L. F.; OLIVEIRA, M. S.; ALBERTO, J. C. V. Evaluation of the Influence of Nitrogen and Phosphorus Nutrients in the Culture and Production of biosurfactants by Microalga Spirulina. **Int. Journal of Engineering Research and Applications**, v. 4, n. 6, p. 90–98, 2014.
- CATALDO, D. A. et al. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid 1. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 6, n. 1, p. 71–80, 11 nov. 2008.
- CHANPRATEEP, S. Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 110, n. 6, p. 621–32, dez. 2010.
- CHU, D.; BARNES, D. J.; MONOD, J.; STÜLKE, J.; HILLEN, W.; BRÜCKNER, R.; TITGEMEYER, F.; BOULINEAU, S.; BOIANELLI, A.; INADA, T.; KIMATA, K.; ADLER, F.; et al. The lag-phase during diauxic growth is a trade-off between fast adaptation and high growth rate. **Scientific Reports**, v. 6, p. 25191, 29 abr. 2016.
- CLARKE, K. G. **Bioprocess Engineering, An introductory Engineering and Life Science Approach**. 1. ed. [s.l.: s.n.].
- COSTA, J. A. V. et al. Simultaneous cultivation of Spirulina platensis and the toxigenic cyanobacteria Microcystis aeruginosa. **Zeitschrift für Naturforschung. C, Journal of biosciences**, v. 61, n. 1-2, p. 105–10, jan. 2006.
- FABRA, M. J.; LÓPEZ-RUBIO, A.; LAGARON, J. M. Three-Layer Films Based on Wheat Gluten and Electrospun PHA. **Food and Bioprocess Technology**, v. 8, n. 11, p. 2330–2340, 2015.
- FAN, X. et al. Preparation and characterization of electrospun antimicrobial fibrous membranes based on polyhydroxybutyrate (PHB). **Fibers and Polymers**, v. 16, n. 8, p. 1751–1758, 29 ago. 2015.

FRADINHO, J. C.; OEHMEN, A.; REIS, M. A. M. Photosynthetic mixed culture polyhydroxyalkanoate (PHA) production from individual and mixed volatile fatty acids (VFAs): Substrate preferences and co-substrate uptake. **Journal of Biotechnology**, v. 185, p. 19–27, 2014.

HILLE, R. et al. A modified pH drift assay for inorganic carbon accumulation and external carbonic anhydrase activity in microalgae. **Journal of Applied Phycology**, v. 26, n. 1, p. 377–385, 2013.

HONG, K. et al. A rapid method for detecting bacterial polyhydroxyalkanoates in intact cells by Fourier transform infrared spectroscopy. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 51, n. 4, p. 523–526, 1999.

JIANG, L.; LUO, S.; FAN, X.; YANG, Z.; GUO, R. Biomass and lipid production of marine microalgae using municipal wastewater and high concentration of CO₂. **Applied Energy**, v. 88, n. 10, p. 3336–3341, 2011.

JAU, M. H. et al. Biosynthesis and mobilization of poly(3-hydroxybutyrate) [P(3HB)] by *Spirulina platensis*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 36, n. 3, p. 144–151, 2005.

KANSIZ, M.; BILLMAN-JACOB, H.; MCNAUGHTON, D. Quantitative determination of the biodegradable polymer Poly(beta-hydroxybutyrate) in a recombinant *Escherichia coli* strain by use of mid-infrared spectroscopy and multivariate statistics. **Applied and environmental microbiology**, v. 66, n. 8, p. 3415–3420, 2000.

KUMAR, A. et al. Enhanced CO₂ fixation and biofuel production via microalgae: Recent developments and future directions. **Trends in Biotechnology**, v. 28, n. 7, p. 371–380, 2010.

LAFFERTY, R. M.; HEINZLE, E. **Cyclic carbonic acid esters as solvents for poly-(β-hydroxybutyric acid)** Google Patents, , 1978. Disponível em: <<http://www.google.com/patents/US4101533>>

LAYCOCK, B. et al. The chemomechanical properties of microbial polyhydroxyalkanoates. **Progress in Polymer Science**, v. 39, n. 2, p. 397–442, 2014.

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

MARTINS, R. G. et al. Bioprocess Engineering Aspects of Biopolymer Production by the Cyanobacterium *Spirulina* Strain LEB 18. **International Journal of Polymer Science**, v. 2014, p. 1–7, 2014.

MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. Isolation and selection of microalgae from coal fired thermoelectric power plant for biofixation of carbon dioxide. **Energy Conversion and Management**, v. 48, n. 7, p. 2169–2173, 2007.

MORAIS, M. G. DE. **Bioengenharia microalgal na utilização de gás de combustão e extração de biopolímeros para desenvolvimento de nanofibras**. [s.l.] Universidade Federal

do Rio Grande, 2008.

PANDEY, A. et al. **Biofuels From Algae**. San Diego: Elsevier B.V., 2014.

PAULI, G. **A economia azul: 10 anos, 100 inovações, 100000000 de empregos**. 1. ed. Curitiba: IESDE Brasil S/A, 2014.

PARANJAPE, K.; LEITE, G. B.; HALLENBECK, P. C. Effect of nitrogen regime on microalgal lipid production during mixotrophic growth with glycerol. **Bioresource Technology**, v. 214, p. 778–786, 2016.

PARK, J.; JIN, H.-F.; LIM, B.-R.; PARK, K.-Y.; LEE, K. Ammonia removal from anaerobic digestion effluent of livestock waste using green alga *Scenedesmus* sp. **Bioresource technology**, v. 101, n. 22, p. 8649–8657, 2010.

QIN, L.; SHU, Q.; WANG, Z.; SHANG, C.; ZHU, S.; XU, J.; LI, R.; ZHU, L.; YUAN, Z. Cultivation of *Chlorella vulgaris* in Dairy Wastewater Pretreated by UV Irradiation and Sodium Hypochlorite. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, n. 2, p. 1121–1130, 2013.

RAHMAN, A.; ANTHONY, R. J.; SATHISH, A.; SIMS, R. C.; MILLER, C. D. Effects of wastewater microalgae harvesting methods on polyhydroxybutyrate production. **Bioresource Technology**, v. 156, p. 364–367, 2014.

RICHMOND, A. (ED.). **Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology**. [s.l.] Wiley-Blackwell, 2007.

ROLFE, M. D.; RICE, C. J.; LUCCHINI, S.; PIN, C.; THOMPSON, A.; CAMERON, A. D. S.; ALSTON, M.; STRINGER, M. F.; BETTS, R. P.; BARANYI, J.; PECK, M. W.; HINTON, J. C. D. Lag phase is a distinct growth phase that prepares bacteria for exponential growth and involves transient metal accumulation. **Journal of bacteriology**, v. 194, n. 3, p. 686–701, fev. 2012.

RUIZ, J.; ARBIB, Z.; ÁLVAREZ-DÍAZ, P. D.; GARRIDO-PÉREZ, C.; BARRAGÁN, J.; PERALES, J. A. Influence of light presence and biomass concentration on nutrient kinetic removal from urban wastewater by *Scenedesmus obliquus*. **Journal of Biotechnology**, v. 178, n. 1, p. 32–37, 2014.

SCHIMIDELL, W.; LIMA, U. DE A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biocnologia Industrial**. São Paulo: Blucher, 2001.

VAZ, M. G. M. V.; BASTOS, R. W.; MILANEZ, G. P.; MOURA, M. N.; FERREIRA, É. G.; PERIN, C.; PONTES, M. C. F.; DO NASCIMENTO, A. G. Use of sodium hypochlorite solutions to obtain axenic cultures of *Nostoc* strains (Cyanobacteria). **Brazilian Journal of Botany**, v. 37, n. 2, p. 115–120, 2014.

VERLINDEN, R. A. J. et al. Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, n. 6, p. 1437–1449, 2007.

VIRTO, R.; MAÑAS, P.; ÁLVAREZ, S.; CONDON, S.; RASO, J. Membrane Damage and

Microbial Inactivation by Chlorine in the Absence and Presence of a Chlorine-Demanding Substrate. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 9, p. 5022–5028, 2005.

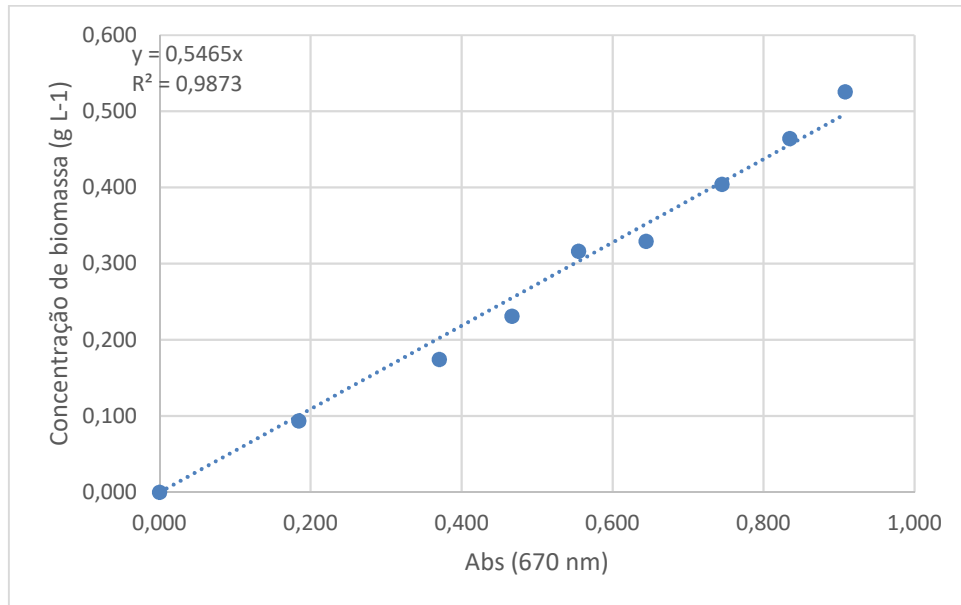
VONSHAK. **Spirulina Platensis Arthrospira: Physiology, Cell-Biology And Biotechnology**. Bristol: [s.n.].

WU, G. F.; WU, Q. Y.; SHEN, Z. Y. Accumulation of poly- β -hydroxybutyrate in cyanobacterium *Synechocystis* sp . PCC6803. **Bioresource Technology**, v. 76, p. 85–90, 2001.

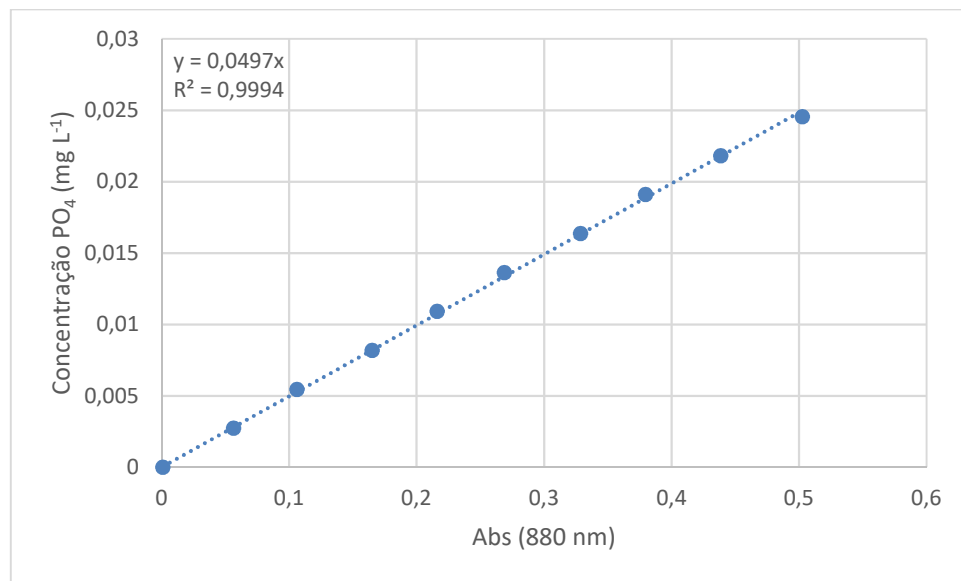
ZHANG, Y.-Z. et al. Engineering of *Ralstonia eutropha* for the production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) from glucose. **Journal of biotechnology**, v. 195, p. 82–8, 10 fev. 2015.

ZARROUK, C. **Contribution à l'étude d'une cyanophycée influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthese de Spirulina maxima (Setch et Gardner) Geitler**. Paris: University of Paris, 1966.

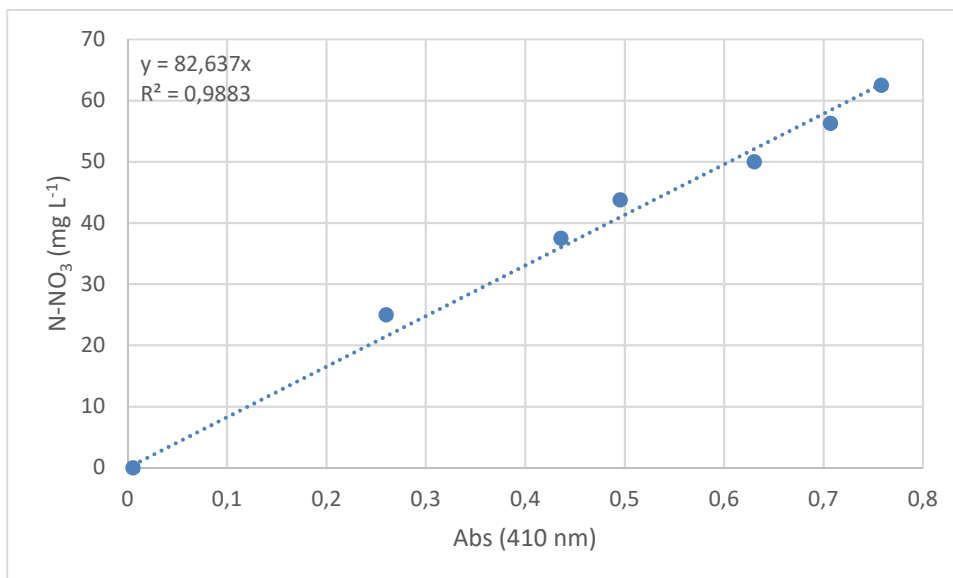
APÊNDICES

APÊNDICE 1 - Curva padrão biomassa *Spirulina* sp. LEB 18

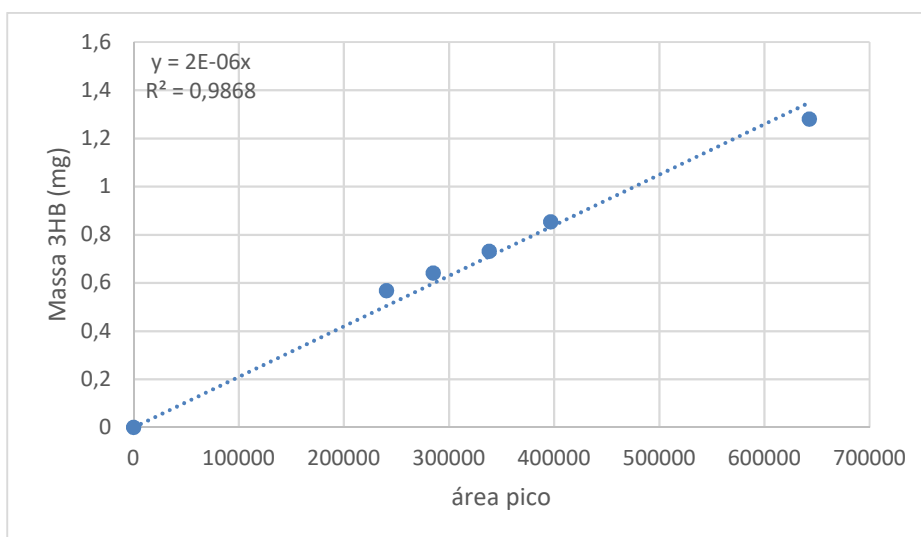
APÊNDICE 2 - Curva padrão determinação fósforo



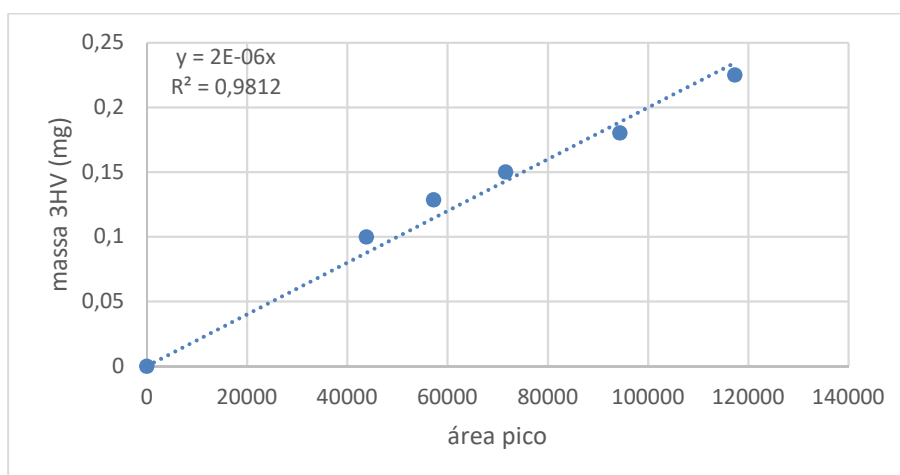
APÊNDICE 3 - Curva padrão determinação nitrogênio amoniacal



APÊNDICE 4 - Curva padrão (3HB) (a) e (3HV) (b).






(a)



(b)

APENDICE 5 – Imagens dos cultivos al longo do tempo

Tempo (d)	Imagens
0	
4	
7	

9

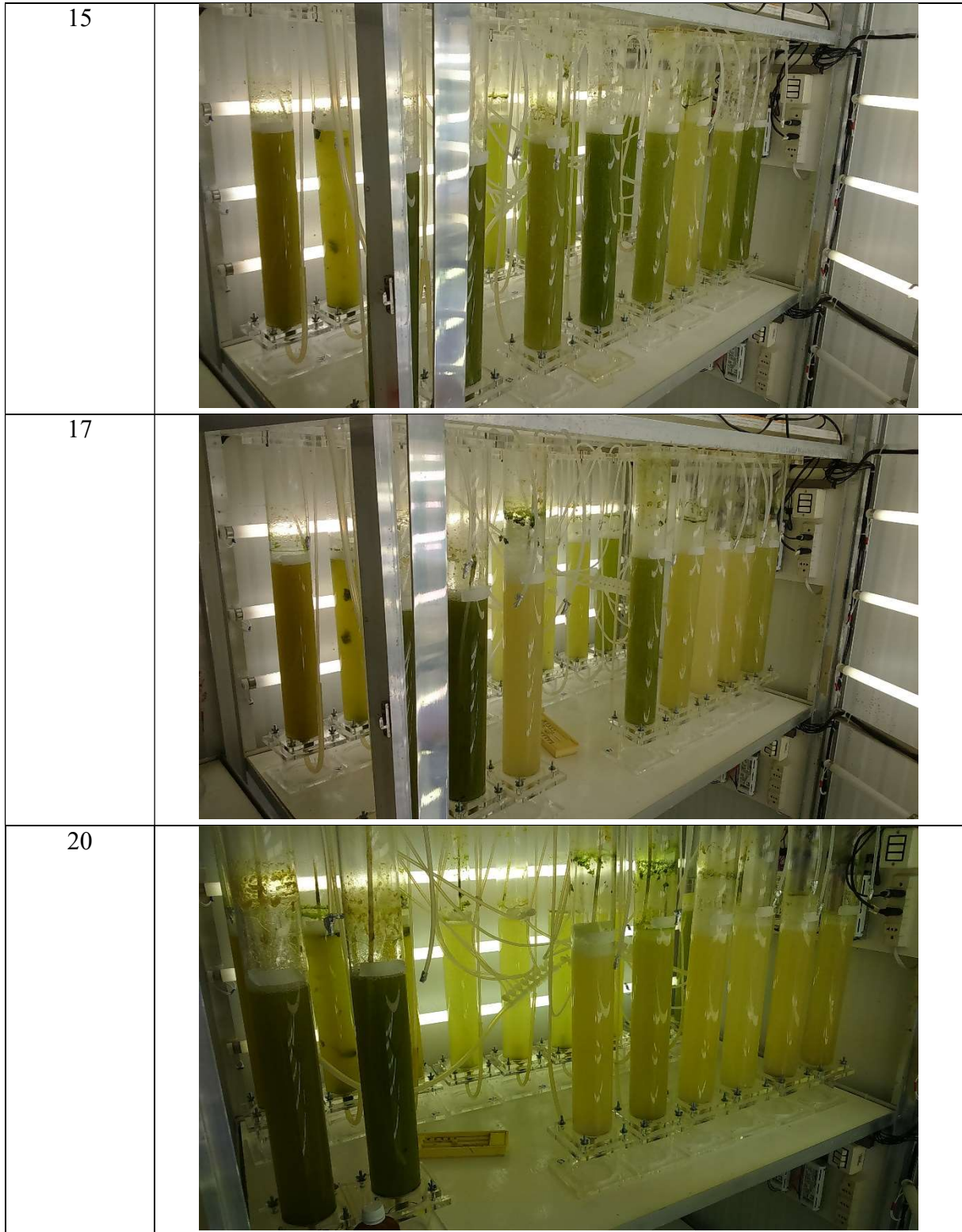


11

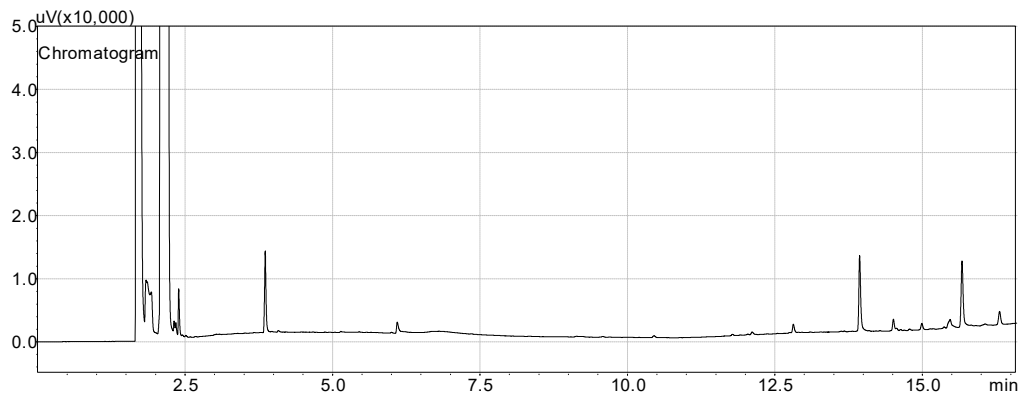


13

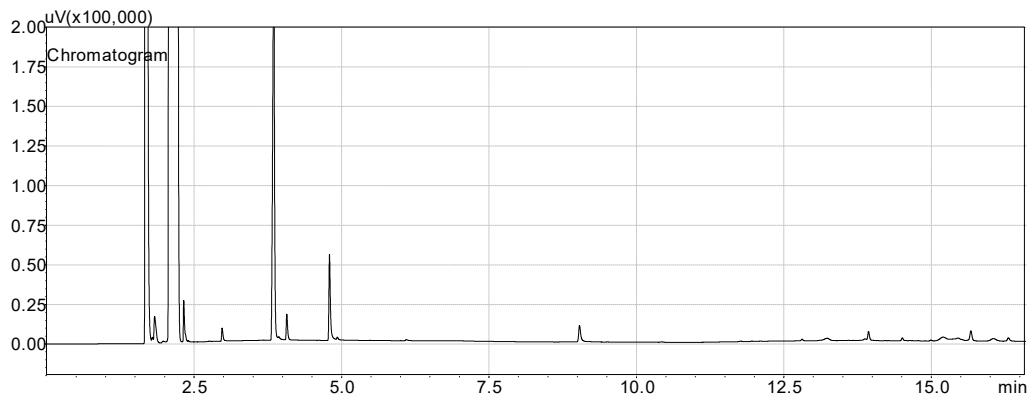




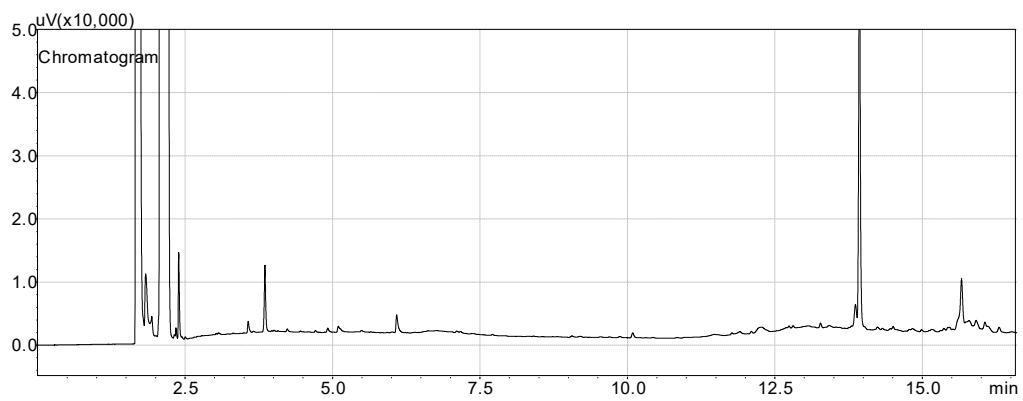
APENDICE 6 – Cromatogramas branco (a), padrão (b), biomassa controle ZN (c), biomassa controle ZM (d) e biomassa cultivada em 25 % resíduo (e)



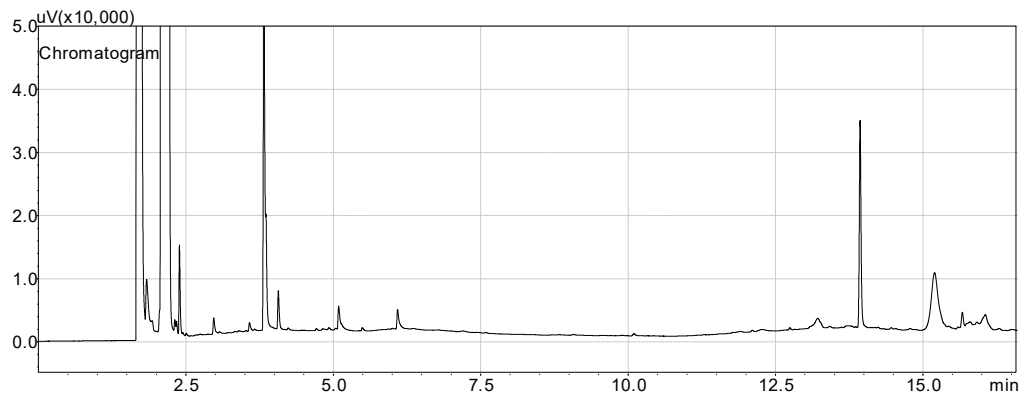
(a)



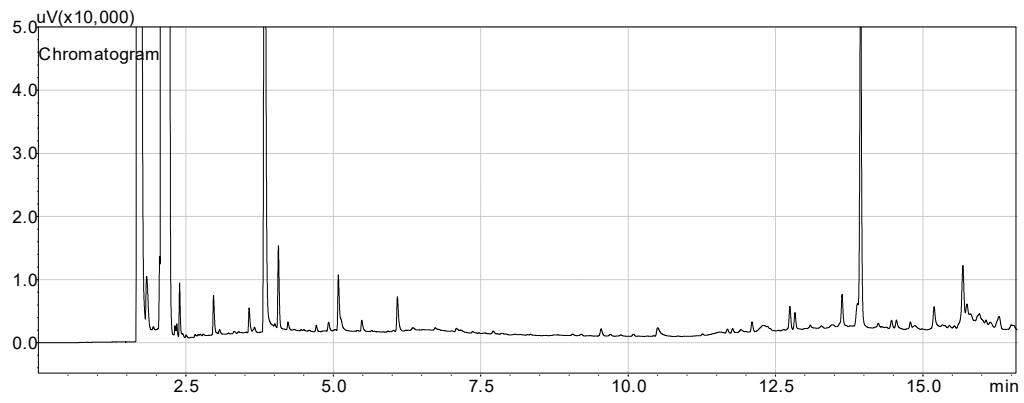
(b)



(c)



(d)



(e)

ANEXOS

ANEXO 1 – Método de cálculo para carbono inorgânico total (CT) (CARMOUZE, 1994)

Independente da forma que seja fornecido, CO_2 , HCO_3^- ou CO_3^{2-} , uma vez dissolvido em meio aquoso, o carbono participa do equilíbrio químico: $CO_2 \leftrightarrow H_2CO_3 \leftrightarrow_{K_1} HCO_3^- \leftrightarrow_{K_2} CO_3^{2-}$, onde a soma das espécies representa o carbono inorgânico dissolvido total. Como a concentração de CO_2 é muito maior que H_2CO_3 , considera-se apenas a concentração do CO_2 na reação.

$$K_1 = \frac{[H^+][HCO_3^-]}{[CO_2]}$$

$$K_2 = \frac{[H^+][CO_3^{2-}]}{[HCO_3^-]}$$

K_1 e K_2 a 30 °C são respectivamente $4,709 \cdot 10^{-7}$ e $5,128 \cdot 10^{-11}$.

As concentrações de cada espécie podem ser calculadas por:

$$[CO_2] = \alpha_0 * C_T$$

$$[HCO_3^-] = \alpha_1 * C_T$$

$$[CO_3^{2-}] = \alpha_2 * C_T$$

Onde α_0 , α_1 e α_2 são calculados em função de pH e constantes de equilíbrio:

$$\alpha_0 = \frac{1}{1 + \frac{K_1}{[H^+]} + \frac{K_1 K_2}{[H^+]^2}}$$

$$\alpha_1 = \frac{1}{1 + \frac{[H^+]}{K_1} + \frac{K_2}{[H^+]}}$$

$$\alpha_2 = \frac{1}{1 + \frac{[H^+]^2}{K_1 K_2} + \frac{[H^+]}{K_2}}$$

A concentração de carbono inorgânico total (CT) não é um dado disponível, mas pode ser obtido pela alcalinidade total:

$$Alc_c = [HCO_3^-] + 2 * [CO_3^{2-}] = \alpha_1 * C_T + 2 \alpha_2 * C_T$$

Então:

$$[CO_2] = \alpha_0 * \frac{Alc_c}{(\alpha_1 + 2 \alpha_2)}$$

$$[HCO_3^-] = \alpha_1 * \frac{Alc_c}{(\alpha_1 + 2 \alpha_2)}$$

$$[CO_3^{2-}] = \alpha_2 * \frac{Alc_c}{(\alpha_1 + 2 \alpha_2)}$$

Como a soma de todas as espécies representa o carbono inorgânico total dissolvido:

$$C_T = [H_2CO_3] + [HCO_3^-] + [CO_3^{2-}]$$