



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**PRODUÇÃO DE MICROALGAS CULTIVADAS EM MEIO
REUTILIZADO E USO DA ELETROFLOCULAÇÃO COMO
MÉTODO DE SEPARAÇÃO DE BIOMASSA**

BIANCA BOMFIM ANDRADE

Salvador, Bahia

2021

BIANCA BOMFIM ANDRADE

**PRODUÇÃO DE MICROALGAS CULTIVADAS EM MEIO REUTILIZADO E
USO DA ELETROFLOCAÇÃO COMO MÉTODO DE SEPARAÇÃO DE
BIOMASSA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia como requisito para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Suzana Telles da Cunha Lima

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Janice Izabel Druzian

Salvador, Bahia

2021

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Universitário de Bibliotecas (SIBI/UFBA),
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Bomfim Andrade, Bianca

Produção de microalgas cultivadas em meio
reutilizado e uso da eletrofloculação como método de
separação de biomassa / Bianca Bomfim Andrade, Janice
Izabel Druzian, Suzana Telles da Cunha Lima. --
Salvador, 2021.

57 f. : il

Orientadora: Suzana Telles da Cunha Lima.

Coorientadora: Janice Izabel Druzian.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia (PPGBIOTEC)) -- Universidade Federal da
Bahia, Universidade Federal da Bahia, 2021.

1. Microalgas. 2. Bioprocesso. 3. Meio
reutilizado. 4. Eletrofloculação. I. Druzian, Janice
Izabel. II. Telles da Cunha Lima, Suzana. I. Telles
da Cunha Lima, Suzana. II. Druzian, Janice Izabel.
III. Título.

BIANCA BOMFIM ANDRADE

PRODUÇÃO DE MICROALGAS CULTIVADAS EM MEIO REUTILIZADO E USO DA ELETROFLOCULAÇÃO COMO MÉTODO DE SEPARAÇÃO DE BIOMASSA

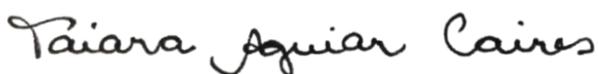
Dissertação apresentada como requisito para o grau de Mestre em Biotecnologia, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Instituto de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Bahia.

Aprovado em 25 de fevereiro de 2021.

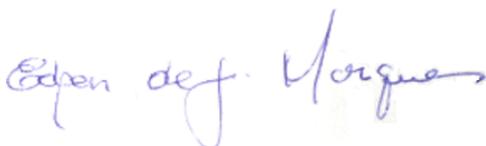
Banca examinadora:



Profª Drª Suzana Telles da Cunha Lima – Orientadora (PPGBIOTEC/UFBA)
Doutora em Biologia Vegetal pela Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP),
São Paulo, Brasil.
Universidade Federal da Bahia



Profª Drª Taiara Aguiar Caires
Doutora em Botânica pela Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), Feira de
Santana, Brasil.
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Bahia



Prof. Dr. Edson de Jesus Marques
Doutor em Química pela Universidade Federal da Bahia (UFBA), Salvador, Brasil.
Universidade do Estado da Bahia

Este trabalho é dedicado a Deus, minha família e amigos, que sempre estiveram ao meu lado, me dando todo o apoio necessário.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e aos amigos espirituais por toda a ajuda concedida durante todo o período de realização deste trabalho. Essa ajuda veio em forma de saúde, foco, persistência e coragem.

Agradeço também a minha família, de sangue e de coração, que me apoiou desde a seleção do mestrado e que sempre me encoraja e estimula a ser melhor a cada dia, e a buscar e realizar todos os meus objetivos.

Aos meus amigos que, mesmo distantes, sempre enviam suas energias positivas e acreditam no meu potencial.

Às minhas orientadoras, Dra. Suzana Telles da Cunha Lima e Dra. Janice Izabel Druzian, me aceitaram como orientanda e me ajudaram com todo o conhecimento que têm sobre as microalgas.

Ao Dr. Lucas Cardoso, colega de laboratório e tutor da Iniciação Científica, que desde então também tem me orientado e me dado suporte para a realização do meu trabalho.

Aos meus parceiros de laboratório, tanto do Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia (LABBIOTEC) quanto do Laboratório de Pescados e Cromatografia Aplicada (LAPESCA), em especial a Marina e Poline, minhas parceiras diárias que fizeram a rotina do mestrado ser mais leve e divertida.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), agência que disponibilizou a bolsa para que o projeto fosse desenvolvido.

Todos, sem dúvidas, foram e são muito importantes nesse processo e nada disso teria sido desenvolvido sem o seu apoio. A todos, minha eterna gratidão.

ANDRADE, Bianca Bomfim. Produção de microalgas cultivadas em meio reutilizado e uso da eletrofloculação como método de separação de biomassa. 57 fls. 2021. Dissertação Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2021.

RESUMO

As microalgas são organismos microscópicos, procarióticos ou eucarióticos, multicelulares ou unicelulares e fotossintetizantes encontrados em ambientes marinhos, dulciaquícolas e terrestres. Seu rápido crescimento, capacidade de adaptação a condições adversas e diversidade metabólica, caracterizada pela produção de grande quantidade de proteínas, carboidratos, pigmentos, lipídios e outras biomoléculas são responsáveis por sua grande importância biotecnológica. A produção de biomassa de microalgas possui alto custo, porém uma das alternativas para a redução destes custos é a reutilização do meio de cultivo, que consiste na separação da biomassa microalgal e consequente inoculação do meio residual, que pode ser suplementado ou não com nutrientes. Depois de cultivada, a biomassa produzida precisa ser separada do meio de cultivo para que seja utilizada nos diferentes processos industriais. Estima-se que o custo de separação pode atingir 20–30% do seu custo total de produção. A eletrofloculação é um método de separação de biomassa ecologicamente correto, barato e energeticamente eficiente e consiste no uso de dois eletrodos metálicos (um ânodo e um cátodo) que liberam íons que neutralizam a carga das células microalgais e permite a formação de flocos celulares, resultado na separação da biomassa. Desse modo, o desenvolvimento de tecnologias de produção e separação da biomassa microalgal que permitam a redução dos custos, sem comprometer a eficiência e qualidade do processo é de grande importância para a produção das biomoléculas obtidas de microalgas no mercado mundial. Diante disso, este trabalho tem como objetivo a verificação do efeito do reaproveitamento de meio durante o cultivo de microalgas marinhas e dulciaquícolas, bem como o teste da eletrofloculação como método para separação da biomassa de microalgas marinhas e dulciaquícolas. Para isso, as microalgas *Dunaliella salina* e *Ankistrodesmus falcatus* foram cultivadas em fotobiorreator tipo Erlenmeyer (1 L) em meio Conway e LC-Oligo, respectivamente. *D. salina* foi submetida a três diferentes condições de cultivo: meio padrão, meio suplementado com nitrogênio e meio suplementado com fósforo. Foram realizados 4 ciclos de cultivo em meio reutilizado. Ao final de cada ciclo, o meio residual foi reutilizado, recebendo novo inóculo da mesma espécie de trabalho. Foram analisados os parâmetros de produção máxima, taxa de crescimento máximo e produtividade máxima. Houve redução na produção de biomassa, crescimento e produtividade máximos durante cultivo de *D. salina* nos meios Não suplementado e suplementado com Fósforo após três ciclos. No meio suplementado com Nitrogênio houve aumento significativo da produção de biomassa em comparação ao cultivo Controle. A maior produção de biomassa foi obtida no 1º ciclo em meio reutilizado (1,122 g L⁻¹). O 4º ciclo de cultivo promoveu maior produção de biomassa que o 3º ciclo (0,908 g L⁻¹ e 0,854 g L⁻¹, respectivamente). A produtividade máxima aumentou significativamente durante os ciclos de cultivo em meio reutilizado, sendo a maior produtividade obtida no 4º ciclo (0,201 g L⁻¹ d⁻¹). Observou-se morte celular durante cultivo de *A. falcatus* em meio reutilizado. Além disso, foi desenvolvido um aparelho de eletrofloculação para fotobiorreator tubular composto por dois eletrodos paralelos de alumínio e fonte elétrica com ajuste de tensão (12V–24V) para separação de biomassa de microalgas marinhas, que resultou no depósito de uma patente de modelo de utilidade junto ao Instituto Nacional de Propriedade Industrial.

Palavras-chave: Microalgas; Bioprocesso; Meio reutilizado; Eletrofloculação

ANDRADE, Bianca Bomfim. Production of microalgae grown in reused medium and the use of electroflocculation as a method of biomass separation. 57 p. 2021. Dissertation Institute of Health Sciences, Federal University of Bahia, Salvador, 2021.

ABSTRACT

Microalgae are microscopic, prokaryotic or eukaryotic, multicellular or unicellular and photosynthetic organisms found in marine, freshwater and terrestrial environments. Its rapid growth, ability to adapt to adverse conditions and metabolic diversity, characterized by the production of large amounts of proteins, carbohydrates, pigments, lipids and other biomolecules are responsible for its great biotechnological importance. The production of microalgae biomass has a high cost, but one of the alternatives to reduce these costs is the reuse of the culture medium, which consists of the microalgal biomass separation and the consequent inoculation of the residual medium, which can be supplemented or not with nutrients. Once cultivated, the biomass produced needs to be separated from the culture medium in order to be used in different industrial processes. It is estimated that the cost of separation can reach 20–30% of its total production cost. Electroflocculation is a method of separating biomass that is ecologically correct, inexpensive and energy efficient and consists of the use of two metallic electrodes (an anode and a cathode) that release ions that neutralize the charge of the microalgal cells and allows the formation of cell flakes, a result in the separation of biomass. Thus, the development of technologies for the production and separation of microalgal biomass that allow cost reduction, without compromising the efficiency and quality of the process, is of great importance for the production of biomolecules obtained from microalgae on the world market. Therefore, this work aims to verify the effect of reusing medium during the cultivation of marine and freshwater microalgae, as well as the electroflocculation test as a method for separating the biomass from marine and freshwater microalgae. For this, the microalgae *Dunaliella salina* and *Ankistrodesmus falcatus* were grown in an Erlenmeyer type photobioreactor (1 L) in Conway and LC-Oligo media, respectively. *D. salina* was submitted to three different culture conditions: standard medium, medium supplemented with nitrogen and medium supplemented with phosphorus. Four cultivation cycles were performed in reused medium. At the end of each cycle, the residual medium was reused, receiving a new inoculum from the same microalgae of work. The parameters of maximum production, maximum growth rate and maximum productivity were analyzed. There was a reduction in the production of biomass, maximum growth and productivity during the cultivation of *D. salina* in the media Not supplemented and supplemented with Phosphorus after three cycles. In the medium supplemented with Nitrogen there was a significant increase in biomass production compared to the Control cultivation. The highest biomass production was obtained in the 1st cycle in a reused medium (1,122 g L⁻¹). The 4th cultivation cycle promoted greater biomass production than the 3rd cycle (0.908 g L⁻¹ and 0.854 g L⁻¹, respectively). The maximum productivity increased significantly during the cultivation cycles in reused medium, with the highest productivity obtained in the 4th cycle (0.201 g L⁻¹ d⁻¹). Cell death was observed during cultivation of *A. falcatus* in reused medium. In addition, an electroflocculation apparatus for a tubular photobioreactor was developed, consisting of two parallel aluminum electrodes and a voltage source (12V – 24V) for separating biomass from marine microalgae, which resulted in the filing of a utility model patent with the National Institute of Industrial Property.

Key-words: Microalgae; Bioprocess; Reused medium; Electroflocculation

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Células de <i>Dunaliella salina</i> com aumento de 1000x (Fonte: TINOCO et al., 2015).	16
Figura 2. Visão microscópica de <i>Ankistrodesmus falcatus</i> (Fonte: SINGH et al., 2015). ..	18
Figura 3. Formatos celulares da microalga marinha <i>Phaeodactylum tricornutum</i> (Fonte: adaptado de DE MARTINO et al., 2011).	19
Figura 4. Representação de um reator tipo raceway com tanques interligados (Fonte: adaptado de CHEW et al., 2018).	22
Figura 5. Fotobiorreator tubular vertical, (A) coluna de bolhas, (B) coluna de transporte aéreo (Fonte: adaptado de CHEW et al., 2018).	23
Figura 6. Etapas da eletrofloculação: (I) neutralização de cargas, (II) floculação e (III) flutuação das bolhas (Fonte: adaptado de SHI et al., 2017).	28
Figura 7. Cultivo outdoor de <i>Dunaliella salina</i> em biorreator tipo raceway.	30
Figura 8. Cultivo indoor de <i>Dunaliella salina</i> em fotobiorreator tipo Erlenmeyer (1 L). ..	31
Figura 9. Primeiro modelo de eletrofloculador construído, com eletrodos formados por fios de cobre ligados a uma fonte elétrica. (A) Imagem real dos eletrodos, (B) Ilustração do aparelho.	34
Figura 10. Segundo modelo de eletrofloculador construído, com eletrodos no formato de chapas de cobre. (A) Imagem real do eletrofloculador acoplado a um recipiente, (B) Ilustração do aparelho, com detalhe da vista lateral do eletrodo preso ao prendedor plástico.	34
Figura 11. Terceiro modelo de eletrofloculador construído utilizando chapas paralelas de cobre desenvolvido para utilização em fotobiorreator tubular (10 L). (A) Imagem real do eletrofloculador dentro do fotobiorreator tubular, (B) ilustração do eletrofloculador.	35
Figura 12. Desenho esquemático do quarto modelo de eletrofloculador construído com eletrodos formados por chapas paralelas de alumínio dentro de fotobiorreator tubular contendo biomassa microalgal e meio de cultivo após a separação.	36
Figura 13. Produção de biomassa de <i>Dunaliella salina</i> durante cultivo Controle e em meio reutilizado em biorreator tipo raceway.	37
Figura 14. Cultivo outdoor de <i>Dunaliella salina</i> em reator tipo raceway em meio reutilizado (1º ciclo) – 6º dia.	38
Figura 15. Produção de biomassa de <i>Dunaliella salina</i> durante cultivo Controle em sistema <i>indoor</i>	39
Figura 16. Produção de biomassa de <i>Dunaliella salina</i> durante 1º ciclo de cultivo em meio reutilizado (sistema <i>indoor</i>).	40

Figura 17. Produção de biomassa de <i>Dunaliella salina</i> durante 2º ciclo de cultivo em meio reutilizado (sistema <i>indoor</i>).....	41
Figura 18. Produção de biomassa de <i>Dunaliella salina</i> durante 3º ciclo de cultivo em meio reutilizado (sistema <i>indoor</i>).....	42
Figura 19. Produção de biomassa de <i>Dunaliella salina</i> durante 4º ciclo de cultivo em meio reutilizado suplementado com Nitrogênio (sistema <i>indoor</i>).	43
Figura 20. Coloração final dos cultivos de <i>Dunaliella salina</i> nos meios: (A) Não suplementado, (B) Suplementado com Nitrogênio e (C) Suplementado com Fósforo nos cultivos Controle e quatro ciclos de cultivo em meio reutilizado.	45
Figura 21. Densidade óptica durante cultivo Controle e 1º ciclo em meio reutilizado (sistema <i>indoor</i>) de <i>Ankistrodesmus falcatus</i>	46
Figura 22. Teste do segundo modelo de eletrofloculador com cultivo de <i>Dunaliella salina</i> . (A) Formação de bolhas ao redor dos eletrodos durante o processo, (B) Separação da biomassa (sobrenadante), (C) Meio residual após eletrofloculação.	47
Figura 23. Eletrofloculação de <i>Phaeodactylum tricornutum</i> e <i>Isochrysis galbana</i> com eletrodos de alumínio em fotobiorreator tubular. (A) Separação da biomassa de <i>P. tricornutum</i> após a eletrofloculação, (B) Separação da biomassa de <i>I. galbana</i> após a eletrofloculação.	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição do meio Conway (WALNE, 1966).....	32
Tabela 2. Composição do meio LC-Oligo (ABNT-NBR 12648/2004).....	33
Tabela 3. Parâmetros de crescimento de <i>Dunaliella salina</i> cultivada em meio reutilizado até 4 ciclos. $X_{\text{máx}}$ (Produção máxima), $\mu_{\text{máx}}$ (Taxa de crescimento máximo), $P_{\text{máx}}$ (Produtividade máxima).....	43

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	15
2.1 Microalgas.....	15
2.2 <i>Dunaliella salina</i>	16
2.3 <i>Ankistrodesmus falcatus</i>	17
2.4 <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	18
2.5 <i>Isochrysis galbana</i>	19
2.6 Cultivo de microalgas	20
2.7 Sistemas de cultivo de microalgas	21
2.7.1 Cultivo outdoor.....	21
2.7.2 Cultivo indoor.....	23
2.8 Cultivo em meio reutilizado.....	24
2.9 Separação da biomassa microalgal	25
2.9.1 Sedimentação gravitacional	26
2.9.2 Flotação.....	26
2.9.3 Centrifugação	26
2.9.4 Filtração	26
2.9.5 Floculação	27
2.9.6 Eletrofloculação	27
3. OBJETIVOS	29
3.1 Objetivo Geral.....	29
3.2 Objetivos específicos	29
4. MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1 Cepas de trabalho	30
4.2 Cultivo de <i>Dunaliella salina</i> e <i>Ankistrodesmus falcatus</i> em meio reutilizado ...	30
4.2.1 Condições de cultivo e obtenção de biomassa.....	30
4.2.1.1 <i>Dunaliella salina</i>	30
4.2.1.2 <i>Ankistrodesmus falcatus</i>	32
4.2.2 Parâmetros de crescimento	33
4.2.3 Análise estatística	33
4.3 Construção de eletrofloculador para separação de biomassa de microalgas.....	34
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37

5.1 <i>Dunaliella salina</i> : Cultivo outdoor	37
5.2 <i>Dunaliella salina</i> : Cultivo indoor	38
5.3 <i>Ankistrodesmus falcatus</i> : Cultivo indoor	46
5.4 Eletrofloculação	47
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	50
7. REFERÊNCIAS	50
8. ANEXOS	56

1. INTRODUÇÃO

As microalgas são microrganismos procarióticos ou eucarióticos, multicelulares ou unicelulares e fotossintetizantes que podem ser encontrados em ambientes marinhos, dulciaquícolas e terrestres (SUPARMANIAM et al., 2019; SONI et al., 2017). Os estudos envolvendo o cultivo de microalgas tiveram início em 1950 e ao longo dos anos o número de trabalhos aumentou consideravelmente, chegando a mais de 2700 publicações em 2017 (GARRIDO-CARDENAS et al., 2018).

Seu rápido crescimento, capacidade de adaptação a condições adversas e a diversidade de metabólitos produzidos, com destaque para a produção de metabólitos primários, são responsáveis pela atenção que as microalgas tem despertado em diferentes setores da economia, principalmente alimentício, farmacêutico e cosmético (BERNAERTS et al., 2019).

Dentre as espécies de microalgas, destacam-se as marinhas *Dunaliella salina*, *Phaeodactylum tricornerutum* e *Isochrysis galbana*, e a dulciaquícola *Ankistrodesmus falcatus*. *Dunaliella salina* (Dunal) Teodoresco (Chlamydomonadales, Chlorophyta) é eucariótica, unicelular, biflagelada, clorofícea e capaz de crescer em ambientes com alta concentração de sais. Seu conteúdo proteico (74 mg g^{-1}) confere alto valor industrial (OKORO et al., 2019; TINOCO et al., 2015). Os estudos existentes envolvem principalmente a produção de β -caroteno, dessalinização, biorremediação e atividade antioxidante.

Ankistrodesmus falcatus (Corda) Ralfs (Sphaeropleales, Chlorophyta) é uma espécie de microalga unicelular, uninucleada, de coloração verde, comumente encontrada em lagos e de rápido crescimento. Suas alterações morfológicas são facilmente observáveis e, por isso, é utilizada como organismo modelo (MARTÍNEZ-RUIZ e MARTÍNEZ-JERÓNIMO, 2015). É considerada uma importante fonte de lipídios, pigmentos e polissacarídeos e tem sido muito estudada quanto ao seu potencial para a produção de biodiesel (GEORGE et al., 2014).

Phaeodactylum tricornerutum Bohlin (Bacillariophyta ordo incertae sedis) é a diatomácea mais bem caracterizada e seu genoma já foi sequenciado, permitindo a edição gênica e possibilitando a produção de componentes não-nativos (BUTLER et al., 2020). Seu conteúdo lipídico pode variar de 20–60% do seu peso seco e os triacilgliceróis (TAG) compõem a principal classe de lipídios encontrada em sua composição. O conteúdo proteico, por sua vez, pode representar até 55% do peso seco de biomassa de *P. tricornerutum*, enquanto

os carboidratos representam de 5–45% do seu peso seco (CUI et al., 2019).

Isochrysis galbana Parke (Isochrysidales, Haptophyta) é uma espécie de microalga marinha unicelular biflagelada conhecida pelo seu alto conteúdo lipídico e composição rica em ácidos graxos que podem ser utilizados na produção de biodiesel (SONG et al., 2018). A ação antioxidante dos ácidos graxos presentes na sua biomassa também tem sido estudada. Essa atividade antioxidante pode ser desenvolvida por diversas substâncias bioativas, incluindo o ácido eicosapentaenoico (EPA), peptídeos, carotenoides e polissacarídeos sulfatados (TALERO et al., 2015).

As microalgas necessitam de cinco componentes principais para seu crescimento: luz, água, fonte de carbono e macro e micronutrientes. Além destes, outros fatores abióticos e bióticos afetam o crescimento celular e desenvolvimento do cultivo, são eles: temperatura, pH, meio de cultivo, salinidade, presença de compostos químicos tóxicos, presença de outros microrganismos no cultivo, produção de biomassa, intensidade da aeração (OKORO et al., 2019).

O cultivo de microalgas pode ser realizado sob diferentes condições: fotoautotrófica, heterotrófica, mixotrófica ou fotoheterotrófica, sendo a principal diferença entre elas a fonte de carbono utilizada. Além disso, o cultivo pode ser realizado em ambiente aberto (*outdoor*) ou fechado (*indoor*). O método escolhido depende principalmente da espécie de microalga, fonte de nutrientes e custo de investimento (CHEW et al., 2018).

Uma das alternativas para a redução dos custos de cultivo é a reutilização do meio, que consiste na separação da biomassa do seu meio de cultivo e reaproveitamento do meio residual para um novo cultivo. O meio residual pode ou não ser suplementado com os nutrientes utilizados no meio padrão. A reutilização do meio pode contribuir para a economia de, aproximadamente, 84% de água e 55% da fonte de nitrogênio durante os cultivos. Depois de cultivada, a biomassa produzida precisa ser separada do meio de cultivo para que seja utilizada nos diferentes processos industriais. A separação consiste em duas etapas: inicialmente ocorre a união das células para aumentar a produção sólida do cultivo. Em seguida ocorre a desidratação, quando o sobrenadante é drenado, restando apenas a biomassa. Estima-se que o custo de separação pode atingir entre 20–30% do seu custo total de produção (SUPARMANIAM et al., 2019).

Desse modo, é de grande importância o desenvolvimento de tecnologias de produção e separação da biomassa microalgal que permitam a redução dos custos, sem comprometer a eficiência e qualidade do processo, permitindo o estabelecimento das biomoléculas obtidas de microalgas no mercado mundial a preços competitivos.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Microalgas

As microalgas são organismos microscópicos, procarióticos ou eucarióticos, multicelulares ou unicelulares e fotossintetizantes. São conhecidas como uma das formas de vida mais antigas e o organismo vivo que mais se prolifera na Terra (SUPARMANIAM et al., 2019). Estima-se que existam milhares de espécies destes microrganismos, que podem ser encontrados em ambientes marinhos, dulciaquícolas e terrestres (SONI et al., 2017).

O ambiente dulciaquícola consiste em lagoas, lagos, córregos, rios e zonas úmidas, que normalmente não possuem grandes quantidades de nitrogênio e fósforo, a não ser em zonas urbanas onde haja o escoamento de águas residuais do tratamento de esgoto. No ambiente marinho são encontradas espécies resistentes a alta concentração de sais, porém em menor diversidade que no ambiente dulciaquícola. As microalgas marinhas possuem maior poder de fotoconversão e podem ser mais facilmente convertidas em outros produtos devido à ausência de hemicelulose ou lignina (CHEW et al., 2018).

Os estudos envolvendo o cultivo de microalgas tiveram início em 1950 e ao longo dos anos o número de trabalhos aumentou consideravelmente, chegando a mais 2700 publicações em 2017 (GARRIDO-CARDENAS et al., 2018). Grande parte dos estudos tem como foco a otimização das condições de cultivo, o que indica a necessidade do melhoramento dos processos de produção e obtenção de biomassa microalgal.

Além do rápido crescimento e diversidade de metabólitos, as microalgas também se destacam pela sua capacidade de adaptação a condições adversas (TINOCO et al., 2015). A composição com grandes quantidades de proteínas, carboidratos, pigmentos, lipídios e outras biomoléculas torna as microalgas importantes alvos biotecnológicos e tem como consequência sua utilização em diversos setores industriais, principalmente alimentício, farmacêutico e cosmético (BERNAERTS et al., 2019).

Dentre os metabólitos microalgais, os lipídios são os metabólitos mais ricos em energia ($37,6 \text{ kJ g}^{-1}$) presentes nas microalgas e são classificados em polares ou apolares. Os lipídios polares (glicolipídios) são estruturais e encontram-se ligados às membranas das organelas, enquanto os apolares (triglicerídeos, diglicerídeos, monoglicerídeos, ácidos graxos, hidrocarbonetos e pigmentos) são lipídios de armazenamento. Assim como os lipídios, os carboidratos também são componentes estruturais e fontes de reserva. Os carboidratos estruturais estão presentes principalmente nas paredes celulares, enquanto os

carboidratos de reserva são acumulados dentro ou fora dos cloroplastos (SAJJADI et al., 2018).

Algumas espécies de microalgas são capazes de produzir grandes quantidades de proteínas. Glicoproteínas, ficobiliproteínas e até os aminoácidos e enzimas são obtidos e utilizados nos mais diversos setores industriais. Os pigmentos também são bioprodutos de alto valor agregado obtidos a partir das microalgas. Os mais utilizados são β -caroteno, astaxantina e ficocianina. Sua atividade antioxidante faz com que sejam mais utilizados que os corantes sintéticos (TANG et al., 2020).

2.2 *Dunaliella salina*

A microalga marinha *Dunaliella salina* (Dunal) Teodoresco (Chlamydomonadales, Chlorophyta), apresentada na Figura 1, é eucariótica, unicelular, biflagelada (seus flagelos possuem tamanho próximo ao da célula) e não possui parede celular rígida, sendo envolvida por um tipo de glicocálix. Pode se reproduzir de duas maneiras distintas: divisão longitudinal das células móveis ou fusão de duas células com formação de zigoto. É capaz de crescer em ambientes com alta concentração de sais, o formato de sua célula pode variar conforme a salinidade do meio, atingindo forma oval ou esférica, com tamanho estimado de 5–25 μm de comprimento e 3–13 μm de largura (OKORO et al., 2019; TINOCO et al., 2015).

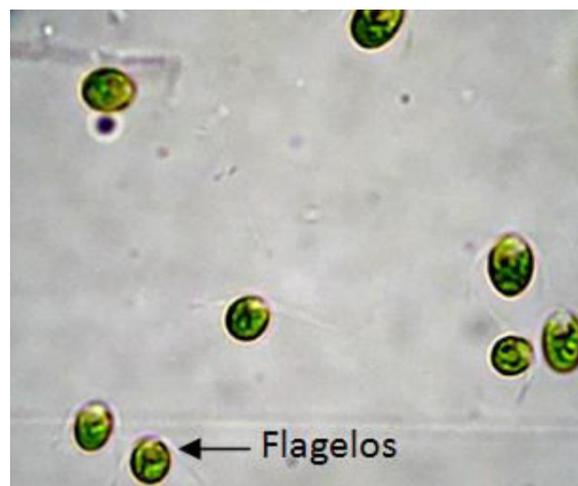


Figura 1. Células de *Dunaliella salina* com aumento de 1000x (Fonte: TINOCO et al., 2015).

A capacidade de produzir e armazenar grandes quantidades de proteínas confere à *D. salina* alto valor industrial. Os estudos existentes envolvem principalmente a produção de β -

caroteno, dessalinização, biorremediação e atividade antioxidante. Condições de estresse, como alta luminosidade, alta salinidade, limitação de nitrogênio ou baixa temperatura, favorecem o acúmulo de carotenoides em *D. salina*. García-González et al. (2005) confirmaram essa informação através de seus experimentos, observando que o aumento da intensidade luminosa sobre o cultivo de *D. salina* promoveu o aumento da produção de carotenoides nas células, atingindo até 10% do peso seco da biomassa.

Visando reduzir os custos do tratamento de águas residuais e da produção de biomoléculas a partir de microalgas, Zhu et al. (2018) utilizaram concentrado salino como meio de cultivo de *D. salina*, permitindo crescimento celular semelhante ao obtido quando o cultivo é realizado em meio padrão, produzindo 300 g de biomassa com 14,3 g de β -caroteno. Os metabólitos produzidos pela *Dunaliella* podem ser utilizados também no tratamento de doenças. Zamani et al. (2019) estudaram o efeito de nanopartículas de magnetita revestidas com goma arábica contendo extrato de *D. salina* e confirmaram o efeito anticâncer e antioxidante do extrato desta microalga.

2.3 *Ankistrodesmus falcatus*

Ankistrodesmus falcatus (Corda) Ralfs (Sphaeropleales, Chlorophyta) é uma espécie de microalga dulciaquícola unicelular, uninucleada, de coloração verde, comumente encontrada em lagos e de rápido crescimento. Seu formato é semelhante ao de uma agulha, com extremidades mais finas, como pode ser observado na Figura 2. Suas alterações morfológicas são facilmente observáveis e, por isso, é utilizada como organismo modelo para estudos morfológicos e fisiológicos (MARTÍNEZ-RUIZ e MARTÍNEZ-JERÓNIMO, 2015).

A espécie é considerada uma importante fonte de lipídios, pigmentos e polissacarídeos (GEORGE et al., 2014). Devido à sua composição, estudos têm avaliado seu potencial para a produção de biodiesel. Além disso, *A. falcatus* pode ser utilizada também na biorremediação de águas residuais e no estudo de toxicidade de compostos químicos.

O cultivo de *A. falcatus* sob estresse salino permite a produção de biomassa com maiores quantidades de lipídios totais (55,3%), carboidratos (14,5%), proteínas (4,8%) e com perfil de ácidos graxos com potencial aplicação para a produção de biodiesel (JAYANTA et al., 2012). Patil (1991) testou o cultivo de *A. falcatus* e *Scenedesmus quadricauda* em esgoto rico em fosfato e nitrogênio amoniacal, de forma isolada e em conjunto, e concluiu que ambas as opções são eficazes para o tratamento do esgoto, com produção de biomassa rica em proteínas.



Figura 2. Visão microscópica de *Ankistrodesmus falcatus* (Fonte: SINGH et al., 2015).

A presença de compostos tóxicos no ambiente aquático, como o níquel, pode ser determinada por *A. falcatus*. Martínez-Ruiz e Martínez-Jerónimo (2015) testaram a toxicidade do níquel na célula de *A. falcatus* e concluíram que a microalga é sensível a baixas concentrações da molécula, a qual causa efeitos negativos a níveis macromoleculares, enzimáticos, citoplasmáticos e morfológicos.

2.4 *Phaeodactylum tricornutum*

Phaeodactylum tricornutum Bohlin (Bacillariophyta ordo incertae sedis) é uma espécie de diatomácea marinha, isto é, possui uma parede celular composta por sílica. Seu formato pode adquirir quatro formas distintas, dependendo das condições ambientais do meio que está sendo cultivada e das fases do ciclo celular em que se encontra: fusiforme, trirradiado, oval e redonda, como mostra a Figura 3. Os formatos trirradiado e fusiforme são característicos da fase exponencial do crescimento celular em condições normais de cultivo (com agitação, salinidade da água do mar e temperatura média de 19 °C). Quando cultivada em meio com baixa salinidade e em baixa temperatura (15 °C), adquire o formato oval. Já o formato redondo pode ser encontrado quando as células estão submetidas a condições de estresse prolongadas (DE MARTINO et al., 2011).

É a espécie de diatomácea mais bem caracterizada e seu genoma já foi sequenciado, permitindo a edição gênica e direcionando a rota metabólica dessas algas para a produção de polihidroxibutiratos (PHB), anticorpos e ácidos graxos (BUTLER et al., 2020). Devido à sua versatilidade, tem sido considerada uma fábrica celular, com uma capacidade para a produção

de conteúdo lipídico entre 20–60% do seu peso seco, sendo os triacilglicerois (TAG) a principal classe de lipídios encontrada. O conteúdo proteico pode representar até 55% do peso seco de sua biomassa, enquanto os carboidratos representam de 5–45% do seu peso seco. Salinidade e concentração de nitrato são dois fatores que mais influenciam o conteúdo desses metabólitos nesta espécie (CUI et al., 2019).

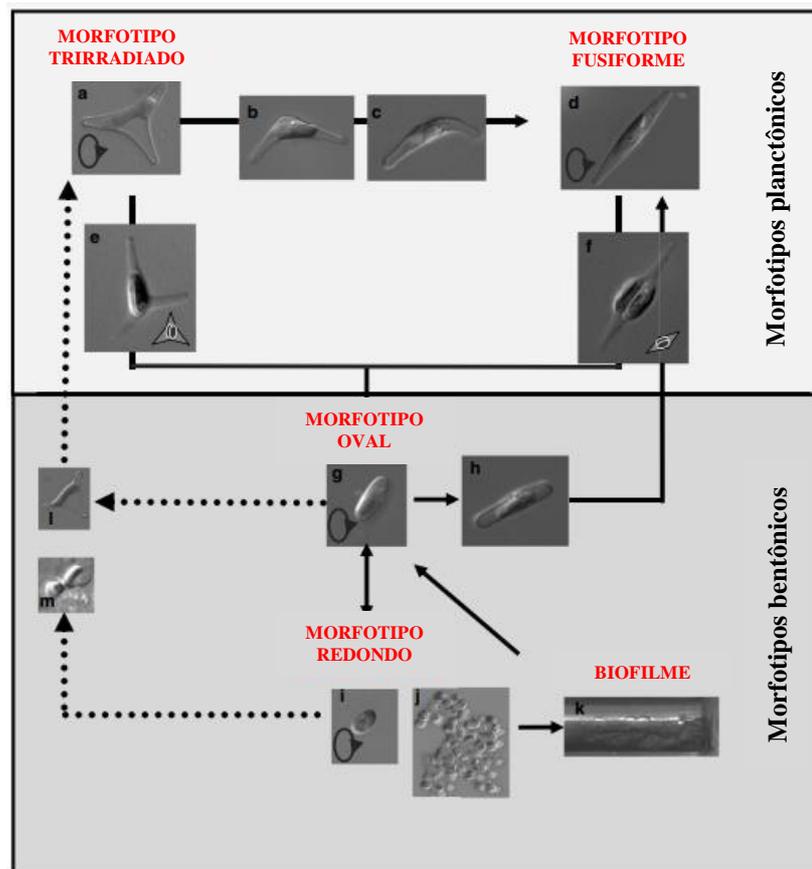


Figura 3. Formatos celulares da microalga marinha *Phaeodactylum tricornutum* (Fonte: adaptado de DE MARTINO et al., 2011).

2.5 *Isochrysis galbana*

Isochrysis galbana Parke (Isochrysidales, Haptophyta) é uma espécie de diatomácea marinha unicelular biflagelada conhecida pelo seu alto conteúdo lipídico e composição rica em ácidos graxos que podem ser utilizados na produção de biodiesel (SONG et al., 2018). Em estudos comparativos, Atmanli (2020), observou superioridade na produção de biodiesel, em relação a *Scenedesmus dimorphus*, com 42,65 %, contra 15,87 %, respectivamente, o que sugere *I. galbana* como importante fonte para a produção de biodiesel.

A ação antioxidante dos ácidos graxos presentes na sua biomassa também tem sido

estudada. Essa atividade antioxidante pode ser desenvolvida por diversas substâncias bioativas, incluindo o ácido eicosapentaenoico (EPA), peptídeos, carotenoides e polissacarídeos sulfatados (TALERO et al., 2019). Bonfanti et al. (2018) observaram 79% de inibição da ciclooxygenase-2 (COX-2) em testes com o extrato lipídico de *I. galbana*.

2.6 Cultivo de microalgas

As microalgas necessitam de cinco componentes principais para seu crescimento: luz, água, fonte de carbono, macro e micronutrientes. Além destes, outros fatores afetam o crescimento celular e desenvolvimento do cultivo, são eles: (1) fatores abióticos – temperatura, pH, meio de cultivo, salinidade, presença de compostos químicos tóxicos; (2) fatores bióticos – presença de outros microrganismos no cultivo; e (3) fatores relacionados ao processo – produção de biomassa e intensidade da aeração (OKORO et al., 2019).

Os nutrientes contidos no meio de cultivo são essenciais para o crescimento celular. Os principais macronutrientes são carbono, nitrogênio e fósforo. A presença do carbono é essencial para permitir a formação de todas as moléculas orgânicas sintetizadas pela célula, como ácidos nucleicos, proteínas, carboidratos, lipídios e vitaminas. O nitrogênio também é importante devido à sua presença na estrutura de proteínas e pigmentos (MENEGAZZO e FONSECA, 2019). Apesar de não estar presente em grande quantidade na biomassa microalgal, o fósforo é um importante nutriente, pois participa de vários processos do metabolismo celular, como a síntese de ácidos nucleicos e fosfolipídios e a transferência de energia. Além disso, o fósforo interfere na disponibilidade de outros nutrientes, como cálcio e ferro (GAINARD et al., 2019).

O cultivo de microalgas pode ser realizado sob diferentes condições: fotoautotrófica, heterotrófica, mixotrófica ou fotoheterotrófica. O cultivo fotoautotrófico é o mais antigo e mais utilizado, no qual a radiação originada da fonte luminosa é capturada como energia e o carbono inorgânico (dióxido de carbono, CO₂) é utilizado como elemento para construção de moléculas retentoras de energia, através de processos fotossintéticos. A única fonte de carbono para o crescimento celular é o CO₂ atmosférico. Nestas condições, o cultivo é favorecido pelo baixo nível de contaminação, no entanto, apresenta uma baixa produção de biomassa, tornando seu custo de separação dispendiosa (CHEW et al., 2018).

No cultivo heterotrófico não há dependência da luz para geração de energia, de modo que são utilizadas fontes orgânicas de carbono e energia, o que eleva o custo total desta condição (ZHOU et al., 2017). Uma das vantagens do cultivo heterotrófico é a possibilidade

de obter maior produtividade devido ao uso das fontes orgânicas. As fontes de carbono mais utilizadas são nutrientes à base de carboidratos (CHEW et al., 2018).

O cultivo mixotrófico ocorre quando as microalgas obtêm energia principalmente a partir da fotossíntese e são utilizadas fontes orgânicas e inorgânicas (CO₂) de carbono. Esta condição é indicada para espécies de microalgas que são capazes de viver sob condição fotoautotrófica, heterotrófica ou ambas. O CO₂ liberado durante a respiração celular é capturado e reutilizado sob condições fototróficas de cultivo na presença de luz (CHEW et al., 2018). O cultivo mixotrófico é mais eficiente que os cultivos fotoautotrófico e heterotrófico, pois possibilita a produção de maior quantidade de biomassa utilizando menor quantidade de substrato orgânico (PANG et al., 2019).

No cultivo fotoheterotrófico a energia é fornecida através da luz e de compostos orgânicos ao mesmo tempo. Também conhecido como foto-organotrofia, foto-assimilação ou foto-metabolismo, se diferencia do cultivo mixotrófico porque este não necessita de luz, sendo possível realizá-lo apenas utilizando compostos orgânicos como fonte de energia. Diferentes fontes de nutrientes proporcionam a produção de diferentes quantidades de biomassa (CHEW et al., 2018).

2.7 Sistemas de cultivo de microalgas

O cultivo de microalgas pode ser realizado em ambiente aberto (*outdoor*) ou fechado (*indoor*). O método escolhido depende principalmente da espécie de microalga, fonte de nutrientes e custo de investimento.

2.7.1 Cultivo *outdoor*

Os cultivos *outdoor* são mais comumente realizados em biorreatores abertos para produção industrial em larga escala. Um dos tipos de reatores mais utilizados é o de pista ou *raceway* (Figura 4), que pode ser construído como um único tanque ou grupos de tanques interligados. A movimentação do cultivo é feita por um conjunto de paletas acopladas a roldanas. A turbulência criada permite a troca de dióxido de carbono (CO₂) com a atmosfera e ajuda a manter uma densidade uniforme de microalgas, reduzindo o tempo de residência das microalgas em regiões escuras (CHEW et al., 2018).

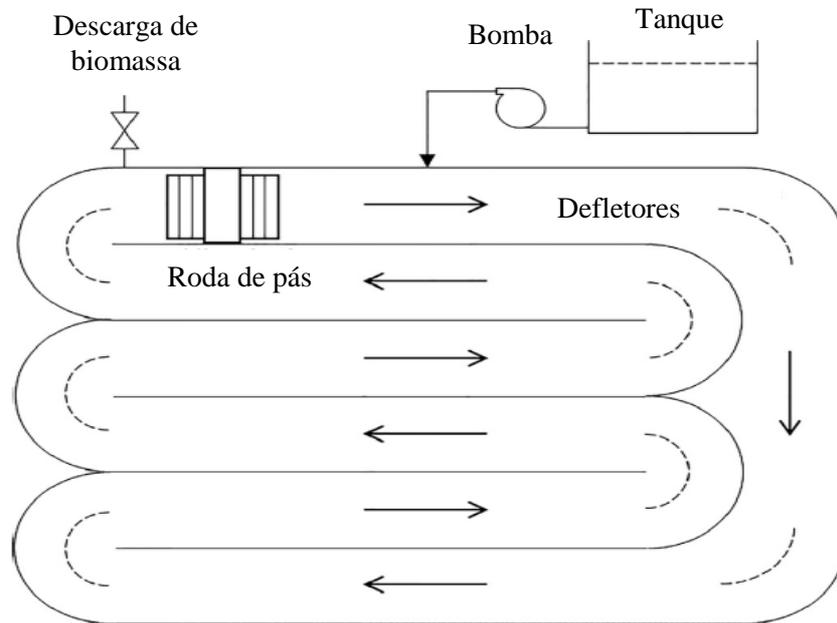


Figura 4. Representação de um reator tipo raceway com tanques interligados (Fonte: adaptado de CHEW et al., 2018).

A incidência de luz e a disponibilidade de CO_2 são dois dos principais fatores que interferem no desempenho do cultivo *outdoor*. Um alto nível de irradiância aumenta a produtividade do cultivo, pois significa que maior quantidade de células está em contato com a luz, possibilitando, assim, seu crescimento. Nos cultivos *outdoor*, o CO_2 atmosférico utilizado como fonte de carbono não é suficiente, sendo necessário a utilização de uma fonte orgânica de carbono. A quantidade de CO_2 necessária é diretamente proporcional à profundidade do reator, de modo que quanto maior é o reator, maior é o armazenamento de CO_2 e menor é a perda (GAINARD et al., 2019).

Os sistemas abertos têm sido amplamente utilizados em aplicações de larga escala devido ao seu baixo custo e facilidade de operação. Esse sistema permite que as algas cresçam naturalmente junto com um mecanismo de mistura adicional e com a absorção da luz solar. Entretanto, os principais desafios deste sistema são a evaporação, que resulta em baixo rendimento, e a contaminação do meio de cultura. Além disso, a temperatura também exerce grande influência no cultivo *outdoor*, pois é um parâmetro importante para a taxa de crescimento de microalgas e neste sistema não é possível controlá-la (CHEW et al., 2018).

2.7.2 Cultivo *indoor*

O cultivo *indoor* consiste na realização do experimento dentro de laboratório, em fotobiorreatores fechados e com o fornecimento de energia luminosa através de lâmpadas. A agitação do meio acontece, geralmente, pelo fornecimento de ar através de aspersores. Dentre estes fotobiorreatores existe o fotobiorreator tubular vertical, que pode ser do tipo coluna de bolhas ou coluna de transporte aéreo. O reator de coluna de bolhas (Figura 5) consiste num recipiente cilíndrico pelo qual o fluxo do cultivo é impulsionado pelas bolhas de ar geradas. Devido ao seu formato e ao fornecimento externo de luz, a eficiência da mistura e da fotossíntese é aumentada, visto que incentiva a mobilidade das células microalgais das áreas iluminadas para as zonas escuras axiais (CHEW et al., 2018).

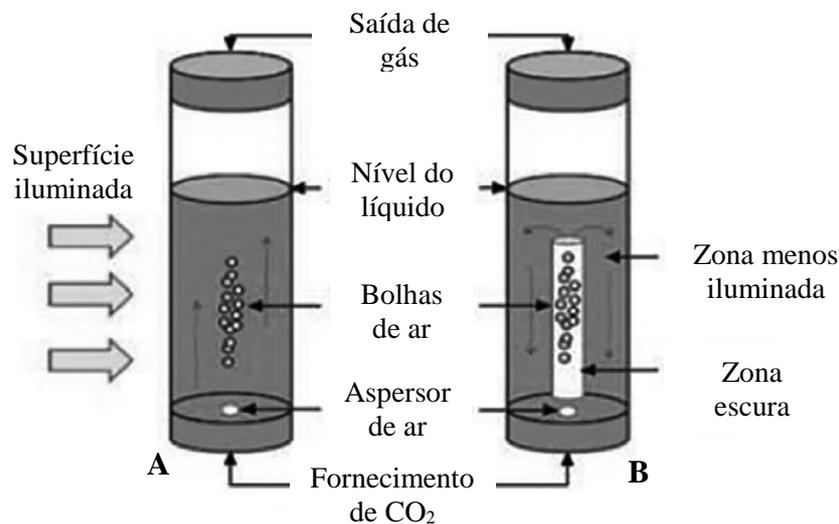


Figura 5. Fotobiorreator tubular vertical, (A) coluna de bolhas, (B) coluna de transporte aéreo (Fonte: adaptado de CHEW et al., 2018).

Os sistemas fechados foram desenvolvidos com o objetivo de cultivar as algas nas condições ótimas, eliminando assim os principais problemas do sistema aberto (contaminação e taxa de evaporação). Geralmente, os fotobiorreatores apresentam um nível de produção elevada, quando comparada com o sistema aberto. No entanto apresenta um custo mais elevado dos investimentos para montagem e para a manutenção do sistema em funcionamento. A alta demanda de energia para manter a iluminação e temperatura é um dos principais fatores do alto custo de produção *indoor* (GAINARD et al., 2019; CHEW et al., 2018).

2.8 Cultivo em meio reutilizado

A reutilização do meio de cultivo tem sido estudada como alternativa para a redução dos custos de produção de biomassa de microalgas. A reutilização consiste na separação da biomassa microalgal do meio de cultivo e consequente inoculação do meio residual, que pode ser suplementado ou não com nutrientes.

Estima-se que são necessários até 15 milhões de toneladas de nitrogênio (N) e 2 milhões de toneladas de fósforo (P) para produzir 39 bilhões de litros de biocombustível a partir de microalgas. A reutilização do meio pode contribuir para a economia de, aproximadamente, 84% de água e 55% de nitrato durante os próximos cultivos (SUPARMANIAM et al., 2019).

O cultivo em meio reutilizado já foi estudado para uma variedade espécies de microalgas, dentre elas *Nannochloropsis* sp., *Chlorella vulgaris*, *Chlorella zofingiensis*, *Tetraselmis* sp., *Chlamydomonas reinhardtii*, *Arthrospira (Spirulina) platensis* e *Dunaliella salina*. Apesar de ideal, a reutilização do meio sem nenhuma suplementação de nutrientes pode afetar o crescimento celular, impedindo o alcance de grandes concentrações de biomassa microalgal. Espécies resistentes à limitação de nutrientes podem ser uma alternativa quando o cultivo for realizado em meio reutilizado.

Em estudo anterior, *Spirulina* sp. LEB18 foi cultivada por quatro ciclos em meio reutilizado sem suplementação de nenhum nutriente, atingindo concentrações superiores a 1,00 g L⁻¹ em todos os ciclos e produzindo biomassa contendo biomoléculas de interesse, como carboidratos, pigmentos e ácidos graxos (ANDRADE et al., 2019). Diferentemente, o crescimento da microalga *Chlorella zofingiensis* em meio não suplementado foi significativamente inferior ao crescimento em meio suplementado, com produtividade insuficiente para a produção de biomassa em escala industrial (ZHU et al., 2013).

Além da limitação de nutrientes, a presença de materiais particulados no meio reutilizado pode influenciar significativamente a produção de biomassa, reduzindo a produtividade e favorecendo a formação de agregados celulares (RODOLFI et al., 2003). Esses materiais podem ser metabólitos (lipídios, polissacarídeos ou proteínas) liberados pela célula durante a lise celular ocorrida na separação da biomassa ou causada pelo estresse fisiológico. Ainda, os minerais podem ser acumulados no meio residual, principalmente os íons NH₄⁺, CO₃²⁻, PO₄³⁻ liberados dos sais de cloreto, bicarbonato e fosfato, respectivamente (HADJ-ROMDHANE et al., 2012).

O meio reutilizado também pode conter outros microrganismos além da microalga de interesse, como bactérias, protozoários, fungos e outras espécies de microalgas que podem

inibir o crescimento celular e afetar negativamente a produção de biomassa. Desse modo, antes do início do cultivo no meio reutilizado pode ser necessária sua esterilização. González-López et al. (2013) avaliaram a eficiência de diversos métodos de esterilização e sua influência no crescimento celular. O estudo concluiu que a ozonização foi o método que promoveu a maior redução da carga bacteriana do meio residual, permitindo uma maior produtividade celular de *Nannochloropsis gaditana* ($0,8 \text{ g L}^{-1}\text{d}^{-1}$).¹

As reutilizações podem ser realizadas em meios padrões ou em meios produzidos a partir de resíduos. Zhu et al. (2013) cultivaram a microalga *Chlorella zofingiensis* em água residual da criação de porcos e reutilizaram esse meio para produzir biomassa. Os meios reutilizados podem ser obtidos a partir de diferentes técnicas de separação. A influência do método utilizado para separar a biomassa do meio residual tem sido amplamente estudada. O meio residual obtido por floculação induzida pelo aumento do pH pode ser reutilizado para cultivar microalgas, permitindo taxa de crescimento semelhante à alcançada em meio não reutilizado e produzindo biomassa com composição de ácidos graxos adequados para a produção de biodiesel (WU et al., 2012).

2.9 Separação da biomassa microalgal

Depois de cultivada, a biomassa produzida precisa ser separada do meio de cultivo para que seja utilizada nos diferentes processos industriais. Os métodos de separação atualmente utilizados demandam grandes quantidades de energia, o que encarece o processo de produção de biomassa microalgal. Estima-se que o custo de separação possa atingir entre 20–30% do seu custo total de produção. O alto gasto energético durante a obtenção da biomassa se deve ao pequeno tamanho das células, baixa densidade e estabilidade coloidal. A separação da biomassa microalgal consiste em duas etapas. Inicialmente ocorre a união das células para aumentar a produção sólida do cultivo. Em seguida ocorre a desidratação, quando o sobrenadante é removido, restando apenas a biomassa (SUPARMANIAM et al., 2019).

O método de separação deve atender a alguns requisitos, dentre eles a ausência de toxicidade à célula, de modo a não contaminá-la e não deixar resíduos no meio de cultivo, visto que este pode ser reutilizado ao final da separação. Além disso, a escolha do método de separação deve ser feita após a análise da densidade, tamanho da célula, nível de umidade e produção de sal do meio (OKORO et al., 2019; SUPARMANIAM et al., 2019).

2.9.1 Sedimentação gravitacional

A sedimentação gravitacional é o método mais antigo e simples de operar. Consiste na sedimentação mais rápida das células maiores e mais densas quando comparadas com as menores e menos densas. Apesar do baixo custo de operação, a sedimentação é um método demorado, com baixa taxa de recuperação e pode levar à deterioração da biomassa (SUPARMANIAM et al., 2019). É um método adequado para a separação de células com tamanho maior que 70 μm (MENEGAZZO e FONSECA, 2019). Devido às limitações deste método foi necessário o desenvolvimento de novas tecnologias mais eficientes.

2.9.2 Flotação

A flotação é um método simples que consiste na separação físico-química através da ação gravitacional. Nele, bolhas de gás passam por uma suspensão líquida-sólida e as células microalgais se aderem às bolhas, flutuando para a superfície. O tamanho das bolhas interfere diretamente na eficiência da separação. Além disso, o tamanho das células é o fator mais importante a ser levado em conta, sendo indicado para separação de partículas com até 500 μm . Apesar de mais rápido e eficaz que a sedimentação, a flotação possui altos custos operacionais, pois é necessário utilizar um compressor, demandando assim grande quantidade de energia (SUPARMANIAM et al., 2019). É indicado para a separação de microalgas dulciaquícolas; a salinidade do meio de cultivo das microalgas marinhas pode interferir na adesão das bolhas, dificultando a separação celular (MENEGAZZO e FONSECA, 2019).

2.9.3 Centrifugação

A centrifugação é um dos métodos de separação mais utilizados. Como o nome indica, faz uso da força centrífuga para separar a biomassa do meio de cultivo, de modo que as células se depositam no fundo ou nas laterais dos recipientes (MENEGAZZO e FONSECA, 2019). É um método rápido, pode ser utilizado para todas as cepas de microalgas e possui alta taxa de recuperação (superior a 95%). Apesar das diversas vantagens, a centrifugação possui alto custo devido aos equipamentos, alta demanda de energia elétrica e pode causar danos às células devido às altas forças de cisalhamento (SUPARMANIAM et al., 2019).

2.9.4 Filtração

A filtração consiste na separação de uma mistura líquido-sólida através do uso de

membranas. Pode ser dividida em microfiltração (poros com diâmetro entre 100–10000 nm) e ultrafiltração (poros com diâmetro entre 1–100 nm), o que permite a separação de microalgas de baixa densidade (MENEGAZZO e FONSECA, 2019). As membranas utilizadas podem ser confeccionadas por diferentes materiais e devem ser escolhidas com base na sua aplicação. Apesar de ser eficiente na remoção de vírus e protozoários, a necessidade de limpeza e substituições regulares das membranas são um desafio na filtração (SUPARMANIAM et al., 2019).

2.9.5 Floculação

A floculação é o método de separação que faz uso de agentes floculantes para promover a agregação das células na forma de flocos de alta densidade. A floculação pode ocorrer devido à ação de agentes químicos (orgânicos ou inorgânicos), do pH ou substâncias poliméricas extracelulares. Para a separação das células microalgais é necessário a utilização de um floculante que promova a coagulação, devido à carga negativa das células (consequência da presença de grupos funcionais ionizados na superfície e da adsorção de íons da matéria orgânica) (SUPARMANIAM et al., 2019). A escolha do agente floculante deve ainda considerar seu grau de interferência no processamento, uso da biomassa obtida, eficácia em baixa produção e seu custo. É considerado um método superior aos convencionais, pois é possível separar grandes volumes de cultivo e pode ser utilizado para um grande número de espécies (MENEGAZZO e FONSECA, 2019).

2.9.6 Eletrofloculação

A eletrofloculação consiste na separação através de dois eletrodos metálicos (um ânodo e um cátodo). A floculação ocorre em três etapas: inicialmente ocorre a oxidação eletrolítica dos ânodos para liberar floculantes metálicos. A interação das células microalgais com os íons metálicos resulta na neutralização de cargas. Em seguida, ocorre a formação de flocos celulares devido à coagulação e a migração dos flocos para a região superior do recipiente (Figura 6). A eletrofloculação não necessita de floculantes químicos, é ecologicamente correta, barata e energeticamente eficiente (SUPARMANIAM et al., 2019).

Os principais fatores que afetam a eletrofloculação são: corrente, voltagem, tempo, material de que são feitos os eletrodos e sua área de contato, densidade, pH e condutividade da solução. O aumento da corrente elétrica permite a separação da biomassa mais rapidamente devido a maior oxidação do ânodo e liberação dos cátions floculantes (CHATSUNGNOEN & CHISTI, 2019). A voltagem varia dependendo da resistência

oferecida pelo cultivo. O material de que são feitos os eletrodos tem influência direta na eficiência da separação. Alumínio e ferro são os metais mais utilizados, sendo o alumínio o mais eficiente (100% de eficiência, contra 78,9% do ferro), devido a sua maior corrente e capacidade de dissociação (BARROS et al., 2015).

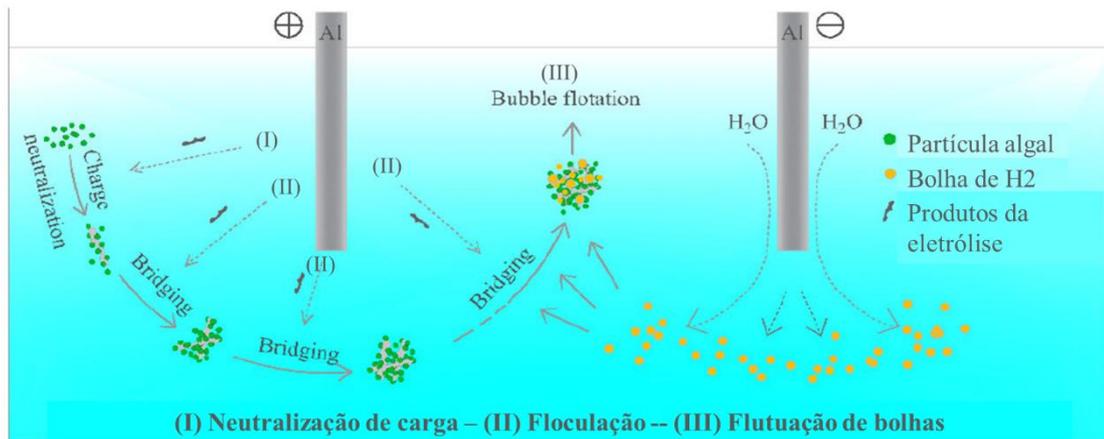


Figura 6. Etapas da eletrofloculação: (I) neutralização de cargas, (II) floculação e (III) flutuação das bolhas (Fonte: adaptado de SHI et al., 2017).

Uma maior área superficial dos eletrodos permite um maior fluxo de volume de cultivo entre eles, aumentando a eficiência do processo (RAUT et al., 2015). Durante a eletrofloculação, o pH do cultivo aumenta rapidamente e esse aumento é influenciado diretamente pelo metal utilizado nos eletrodos. Quanto maior o pH do meio, maior a quantidade necessária de cátions para a separação (CHATSUNGNOEN & CHISTI, 2019).

O uso da eletrofloculação na obtenção de biomassa microalgal ainda é pouco abordada. São poucos os estudos que investigam a eficiência do processo. Valero et al. (2015) testaram a eletrofloculação para a separação da biomassa das microalgas presentes em reservatórios (*Scenedesmus* spp., *Kirchneriella* sp. e *Microcystis* sp.) e alguns dos fatores que podem influenciar o processo (voltagem, tempo, separação dos eletrodos e sedimentação natural). Os autores concluíram que a menor distância entre os eletrodos (5,5 cm) permitiu uma maior separação, utilizando a voltagem de 10V durante 1 minuto.

Mubarak et al. (2020) compararam diferentes métodos de separação (eletrofloculação, centrifugação, filtração e floculação) para a obtenção de biomassa de *Chlorella pyrenoidosa* e concluíram que a eletrofloculação foi o segundo método mais eficiente (95%), inferior apenas à floculação com FeCl_3 (98,5%). Os autores concluíram ainda que o meio de cultivo residual da eletrofloculação suplementado com o meio Bold

Basal permitiu crescimento celular da mesma espécie de microalga em valores próximos ao cultivo em meio fresco.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Verificar o efeito do reaproveitamento de meio durante o cultivo de microalgas marinhas e dulciaquícolas, bem como testar a eletrofloculação como método para separação da biomassa de microalgas marinhas e dulciaquícolas.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos da reutilização de meio de cultivo na produção de *Dunaliella salina* e *Ankistrodesmus falcatus*;
- Caracterizar as biomassas de *Dunaliella salina* e *Ankistrodesmus falcatus* produzidas durante o cultivo em meio reutilizado quanto à composição centesimal e propriedades térmicas;
- Caracterizar os meios residuais após cultivo de *Dunaliella salina* e *Ankistrodesmus falcatus* quanto à composição química;
- Avaliar o potencial de utilização da eletrofloculação como método de separação e isolamento de *Phaeodactylum tricornutum* e *Isocrhysis galbana*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Cepas de trabalho

As cepas de *Dunaliella salina* (137435), *Phaeodactylum tricornutum* (137427), *Isochrysis galbana* (137440) e *Ankistrodesmus falcatus* (137416) foram obtidas do Banco de Microalgas do Instituto de Biologia da Universidade Federal da Bahia (UFBA) (Cadastro SisGen C945879).

4.2 Cultivo de *Dunaliella salina* e *Ankistrodesmus falcatus* em meio reutilizado

4.2.1 Condições de cultivo e obtenção de biomassa

4.2.1.1 *Dunaliella salina*

Inicialmente, a microalga marinha *D. salina* foi cultivada em sistema *outdoor* em biorreator tipo *raceway* com volume de trabalho de 5 L, durante 15 dias, em meio Conway (WALNE, 1966) (Figura 7). Sua composição é apresentada na Tabela 1. Foi realizado o cultivo Controle e o meio residual foi utilizado para realização do 1º ciclo em meio reutilizado. Devido à morte celular observada no 1º ciclo de cultivo em meio reutilizado, os experimentos em sistema *outdoor* foram cancelados e substituídos pelos experimentos em sistema *indoor* para testar a melhor condição de cultivo que permite o maior crescimento celular.

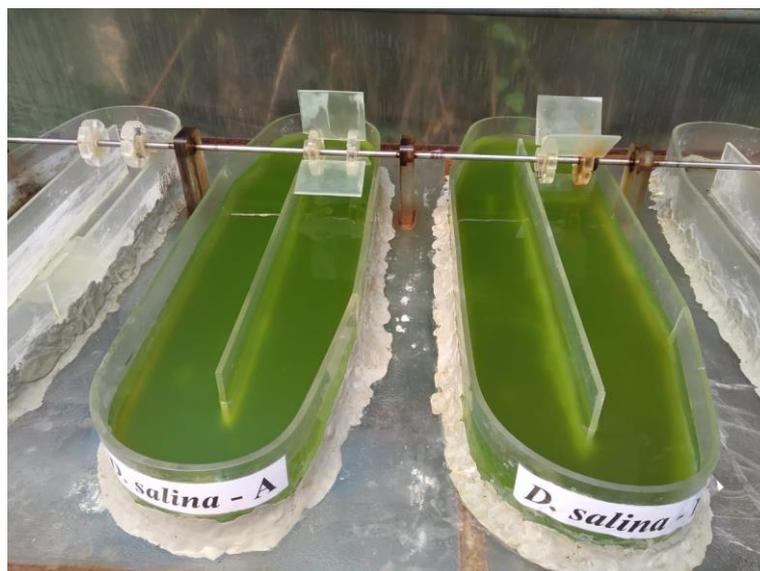


Figura 7. Cultivo *outdoor* de *Dunaliella salina* em biorreator tipo *raceway*.

O cultivo *indoor* da microalga *D. salina* foi realizado em fotobiorreator tipo Erlenmeyer com volume de trabalho de 1 L em meio Conway (WALNE, 1966) (Figura 8). A iluminação foi fornecida por lâmpadas fluorescentes de luz branca de 32 W, irradiância de $\pm 114 \mu\text{E}/\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 12 horas claro/escuro, temperatura de $20 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ e aeração através de bombas de oxigênio. O cultivo de *D. salina* foi reiniciado a cada 15 dias e este ciclo foi repetido 4 vezes.



Figura 8. Cultivo indoor de *Dunaliella salina* em fotobiorreator tipo Erlenmeyer (1 L).

D. salina foi submetida a três diferentes condições de cultivo: em meio padrão, em meio suplementado com nitrogênio e em meio suplementado com fósforo. As suplementações foram realizadas com base nas quantidades determinadas na composição do meio Conway. Dessa forma, foram adicionados ao meio suplementado com nitrogênio os nutrientes do meio Conway somados a 1,0 mL de solução de nitrato de sódio com concentração de 100 g L^{-1} . O meio suplementado com fósforo recebeu, além dos nutrientes do meio Conway, 1,0 mL de solução de fosfato de sódio com concentração de 20 g L^{-1} . Essa suplementação foi realizada no início de cada ciclo de cultivo.

As biomassas foram separadas por centrifugação (Centrifuge MPW-351) a 5000 rpm por 20 minutos. Ao final de cada ciclo, o meio residual foi reutilizado, recebendo novo inóculo de *D. salina*. As biomassas foram congeladas a $-12 \text{ }^\circ\text{C}$ (Electrolux FE 22), liofilizadas (Terroni Enterprise II) e armazenadas a $-12 \text{ }^\circ\text{C}$ (Electrolux FE 22).

Todos os experimentos foram realizados em duplicata e iniciados com 50 mL de inóculo obtido durante a fase exponencial de um cultivo anterior mantido em fotobiorreator tipo Erlenmeyer com volume de trabalho de 1 L. As etapas de caracterização das biomassas e dos meios residuais não foram realizadas devido à suspensão das atividades de pesquisa

devido à pandemia do novo coronavírus.

Tabela 1. Composição do meio Conway (WALNE, 1966).

Solução	Componente	Massa (g)
Solução Principal (P)	EDTA (C ₁₀ H ₁₄ O ₈ Na ₂ . 2H ₂ O)	45,000
	Ácido Bórico (H ₃ BO ₃)	33,600
	Nitrato de Sódio (NaNO ₃)	100,000
	Cloreto de Manganês (MnCl ₂ . 4H ₂ O)	0,360
	Cloreto de Ferro (FeCl ₃ . 6H ₂ O)	1,300
Solução Traços de Metais	Fosfato de Sódio (NaH ₂ PO ₄ . 2H ₂ O)	20,000
	Cloreto de Zinco (ZnCl ₂)	0,210
	Cloreto de Cobalto (CoCl ₂ . 6H ₂ O)	0,200
	Molibdato de Amônia ((NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ . 4H ₂ O)	0,090
Solução de Vitaminas	Sulfato de Cobre (CuSO ₄ . 5H ₂ O)	0,200
	Cianocobalamina (Vitamina B12)	0,005
	Biotina (Vitamina B1)	0,100

4.2.1.2 *Ankistrodesmus falcatus*

O cultivo da microalga dulciaquícola *A. falcatus* foi realizado em sistema *indoor*, em fotobiorreator tipo Erlenmeyer, com volume de trabalho de 1 L. O meio de cultivo utilizado foi o LC-Oligo (ABNT-NBR 12648/2004) e seus nutrientes estão descritos na Tabela 2. O cultivo foi mantido por 20 dias e a iluminação foi fornecida por lâmpadas fluorescentes de luz branca de 32 W, irradiância de $\pm 114 \mu\text{E}/\text{m}^2.\text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 12 horas claro/escuro, temperatura de $20 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ e aeração fornecida por bombas de oxigênio.

A biomassa foi separada por centrifugação (Centrifuge MPW-351) a 5000 rpm por 20 minutos. Ao final da centrifugação, o meio residual foi reutilizado, sem suplementação, recebendo novo inóculo de *A. falcatus*. A biomassa foi congelada a $-12 \text{ }^\circ\text{C}$ (Electrolux FE 22), liofilizada (Terroni Enterprise II) e armazenada a $-12 \text{ }^\circ\text{C}$ (Electrolux FE 22).

Os experimentos foram realizados em duplicata e iniciados com 50 mL de inóculo obtido durante a fase exponencial de um cultivo anterior mantido em fotobiorreator tipo *Erlenmeyer* com volume de trabalho de 1 L. Não foi possível realizar o cultivo de *A. falcatus* em meio reutilizado suplementado, bem como caracterizar as biomassas e meios residuais devido à suspensão das atividades de pesquisa devido à pandemia do novo coronavírus.

Tabela 2. Composição do meio LC-Oligo (ABNT-NBR 12648/2004).

Solução	Componente	Massa (g)
1	Nitrato de Cálcio ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	4,000
2	Nitrato de Potássio (KNO_3)	10,000
3	Sulfato de Magnésio (MgSO_4)	1,466
4	Fosfato de Potássio (K_2HPO_4)	4,000
5	Sulfato de Cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	0,030
	Molibdato de Amônia ($(\text{NH}_4)_6\text{MO}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	0,060
	Sulfato de Zinco ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0,060
	Nitrato de Manganês ($\text{Mn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	0,060
	Ácido Cítrico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	0,060
	Ácido Bórico (H_3BO_3)	0,060
6	Cloreto Férrico ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0,313
	Sulfato Férrico ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0,313
	Citrato Férrico ($\text{C}_6\text{H}_5\text{FeO}_7 \cdot x\text{H}_2\text{O}$)	0,594
7	Bicarbonato de Sódio (NaHCO_3)	15,000

4.2.2 Parâmetros de crescimento

O crescimento celular foi monitorado diariamente através da leitura da densidade óptica dos cultivos utilizando espectrofotômetro (Unicam Helios ϵ) no comprimento de onda de 680 nm. Foi feita uma curva de crescimento padrão que correlaciona a densidade óptica com o peso seco da biomassa de *D. salina*. A produtividade de biomassa foi calculada através da Equação 1. A produtividade máxima foi definida como a maior produtividade para cada ciclo. A taxa de crescimento específico máxima ($\mu_{\text{máx}}$, d^{-1}) foi calculada através da regressão linear da fase logarítmica de cada experimento (COSTA et al., 2018).

$$P_x = (X_t - X_0)/(t - t_0) \quad (\text{Equação 1})$$

Onde:

X_t : produção de biomassa (g L^{-1}) no tempo t (d)

X_0 : produção de biomassa (g L^{-1}) no tempo t_0 (d)

4.2.3 Análise estatística

Os resultados foram avaliados utilizando uma análise de variância seguida de teste de Tukey a 95.0% de nível de confiança utilizando o programa STATISTICA 10.0.

4.3 Construção de eletrofloculador para separação de biomassa de microalgas

Inicialmente, foi construído um eletrofloculador utilizando fios de cobre para formar os eletrodos do aparelho, conectados a uma fonte elétrica de 19,5 V e 3,34 A (Figura 9). Porém, após a realização de testes o aparelho não foi capaz de promover uma corrente elétrica suficiente para separar o material microalgal. Dessa forma, foi construído outro aparelho, a partir de duas chapas de cobre presas a prendedores plásticos que poderiam ser acoplados ao recipiente que conteria o cultivo de microalgas (Figura 10).

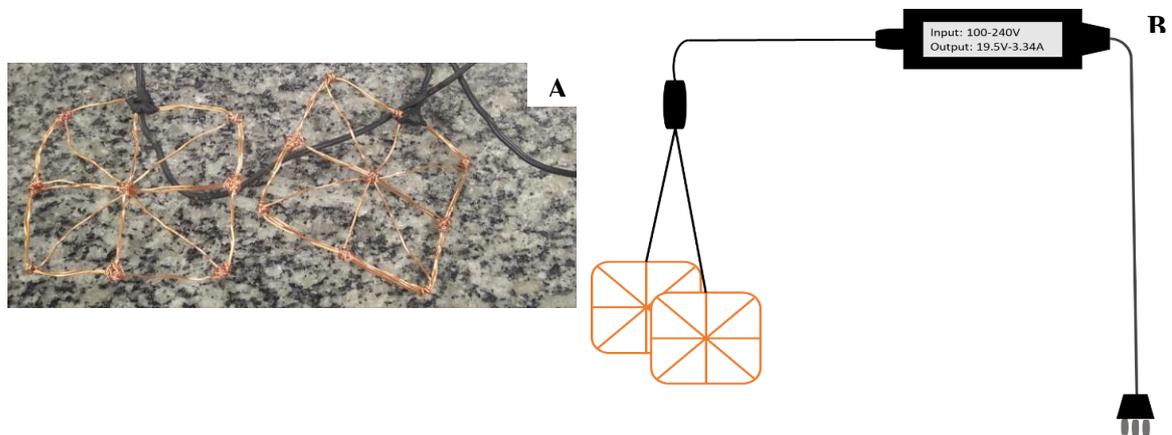


Figura 9. Primeiro modelo de eletrofloculador construído, com eletrodos formados por fios de cobre ligados a uma fonte elétrica. (A) Imagem real dos eletrodos, (B) Ilustração do aparelho.

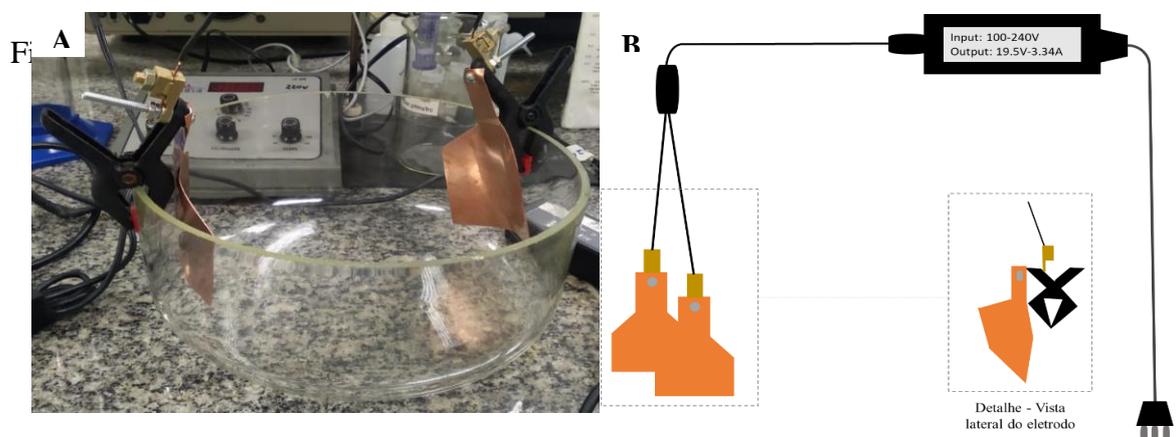


Figura 10. Segundo modelo de eletrofloculador construído, com eletrodos no formato de chapas de cobre. (A) Imagem real do eletrofloculador acoplado a um recipiente, (B) Ilustração do aparelho, com detalhe da vista lateral do eletrodo preso ao prendedor plástico.

A fim de utilizar o eletrofloculador em cultivos de maior escala, um novo modelo foi construído, dessa vez utilizando duas chapas de cobre paralelas e mais longas (62,40 x 2,50 cm) presas em dois suportes plásticos cilíndricos na região superior e inferior dos eletrodos. Esse aparelho foi desenvolvido para ser acoplado ao fotobiorreator tubular com capacidade de 10,0 L presente no laboratório (Figura 11).

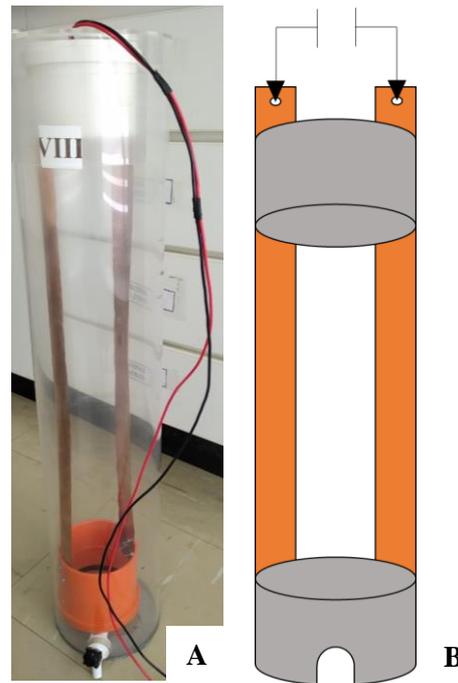


Figura 11. Terceiro modelo de eletrofloculador construído utilizando chapas paralelas de cobre desenvolvido para utilização em fotobiorreator tubular (10 L). (A) Imagem real do eletrofloculador dentro do fotobiorreator tubular, (B) ilustração do eletrofloculador.

Devido à impossibilidade de reproduzir os experimentos de eletrofloculação com o eletrofloculador construído após o primeiro uso, as chapas de cobre foram substituídas por chapas de alumínio nas mesmas dimensões (Figura 12). Foi utilizada uma fonte elétrica bivolt (110V–220V) com ajuste de tensão (12, 15, 16, 18, 19, 20 ou 24 V). Os testes de eletrofloculação foram realizados inicialmente com a espécie de microalga marinha *Dunaliella salina* e concluídos com as espécies *Phaeodactylum tricornutum* e *Isochrysis galbana*, também marinhas.

Os cultivos de *P. tricornutum* e *I. galbana* foram realizados em fotobiorreator tubular com volume de trabalho de 10,0 L, durante 15 dias, em meio Conway (WALNE, 1966). A iluminação foi fornecida por lâmpadas fluorescentes de luz branca de 32 W, irradiância de \pm

$114 \mu\text{E}/\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 12 horas claro/escuro, temperatura de $20 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ e aeração através de bombas de oxigênio.

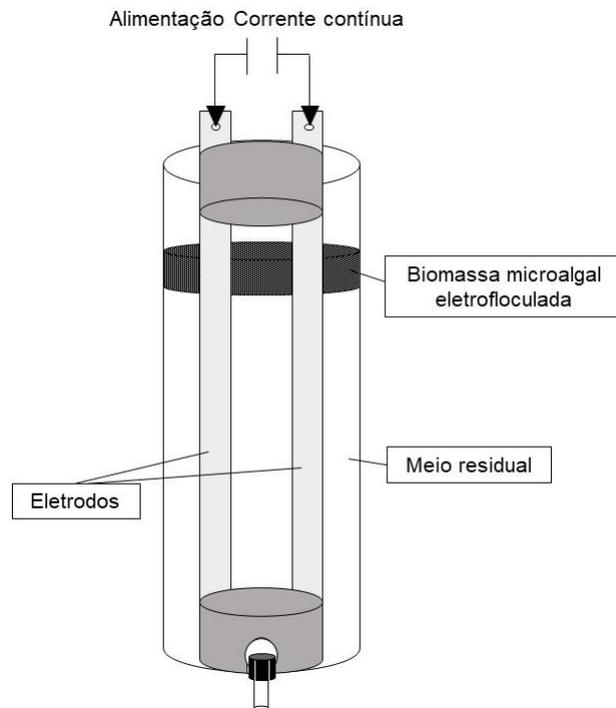


Figura 12. Desenho esquemático do quarto modelo de eletrofloculador construído com eletrodos formados por chapas paralelas de alumínio dentro de fotobiorreator tubular contendo biomassa microalgal e meio de cultivo após a separação.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 *Dunaliella salina*: Cultivo outdoor

A Figura 13 apresenta a produção da biomassa de *D. salina* durante cultivo no reator tipo *raceway*. O cultivo Controle apresentou fase *lag* (adaptação) entre os dias 0–2 e a fase exponencial teve duração de 8 dias (dia 3–10), atingindo sua produção máxima no 10º dia (0,773 g L⁻¹). A fase *lag* é o período de adaptação da célula às condições de cultivo, tais como meios utilizados e volume de trabalho (VONSHAK, 1997). A partir do 12º dia o cultivo entrou em fase estacionária, com duração de 1 dia (dia 12–13), após a qual houve morte celular. A produção máxima de biomassa foi superior à obtida por Prieto et al. (2011) após cultivo de *D. salina* em biorreator tipo *raceway* após 25 dias de cultivo no meio f2 (0,450 g L⁻¹).

Diferentemente, no 1º ciclo de cultivo em meio reutilizado não houve fase *lag* e a produção máxima foi de 0,303 g L⁻¹ (2º dia). A ausência da fase *lag* pode ser justificada pela presença de células residuais do primeiro cultivo (Controle) que não foram separadas do meio mesmo após a centrifugação. A presença dessas células pode acelerar o crescimento, visto que já estão adaptadas às condições de cultivo, de modo que podem utilizar os nutrientes presentes no meio de forma imediata (ZHU et al., 2013).

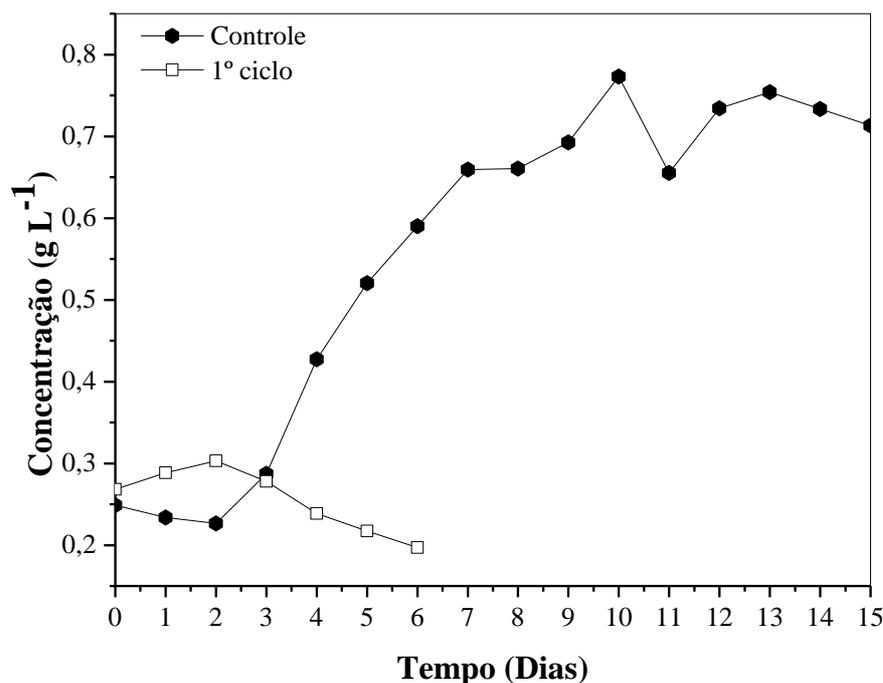


Figura 13. Produção de biomassa de *Dunaliella salina* durante cultivo Controle e em meio reutilizado em biorreator tipo *raceway*.

Entretanto, após o 2º dia houve redução da produção de biomassa devido à morte celular (Figura 14). O estudo anterior feito com a cepa de microalga *Spirulina* sp. LEB18 também cultivada em biorreator tipo *raceway* com meio Zarrouk permitiu a reutilização do meio de cultivo por 4 ciclos (ANDRADE et al., 2019). A morte celular de *D. salina* durante o 1º ciclo no meio Conway pode ter sido causada pela baixa concentração de nutrientes do meio, os quais podem ter sido consumidos em sua maioria durante o cultivo Controle.

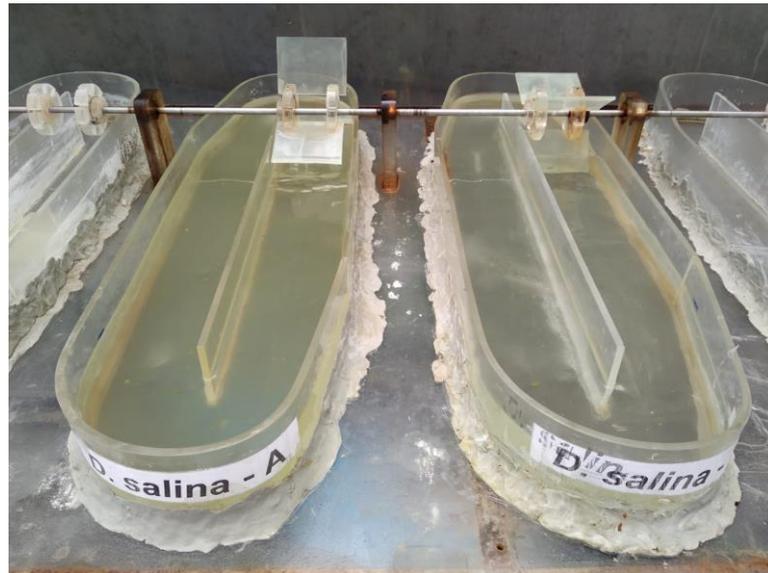


Figura 14. Cultivo outdoor de *Dunaliella salina* em reator tipo *raceway* em meio reutilizado (1º ciclo) – 6º dia.

5.2 *Dunaliella salina*: Cultivo indoor

Devido à morte celular ocorrida durante o cultivo de *D. salina* em sistema *outdoor*, foi necessário reduzir a escala dos experimentos e transferi-los para o sistema *indoor*, a fim de testar melhores condições de cultivo. Desse modo, foram realizadas três condições de cultivo: meio Conway (Não suplementado), meio Conway adicionado de 1,0 mL de solução de nitrato de sódio (Nitrogênio) com concentração de 100 g L⁻¹ e meio Conway adicionado de 1,0 mL de solução de fosfato de sódio (Fósforo) com concentração de 20 g L⁻¹. Estes nutrientes foram escolhidos por serem dois dos principais macronutrientes para o crescimento celular das microalgas.

A Figura 15 apresenta os resultados obtidos durante cultivo Controle em sistema *indoor*. Houve fase *lag* em todas as condições de cultivo, porém, esta foi maior no meio

suplementado com Nitrogênio (dias 0–5).

A microalga *D. salina* permaneceu em fase exponencial até o final do cultivo (15 dias) em meio suplementado com Fósforo, com produção máxima de $1,194 \text{ g L}^{-1}$ (15º dia). No meio Não suplementado, a fase exponencial teve duração de 7 dias (dia 5–12), com produção máxima de $1,043 \text{ g L}^{-1}$ (12º dia), após a qual teve início a fase estacionária. No cultivo em meio suplementado com Nitrogênio a fase exponencial teve duração de 8 dias (dia 6–13) e houve o menor crescimento microalgal, sendo a produção máxima obtida no 13º dia ($0,53 \text{ g L}^{-1}$).

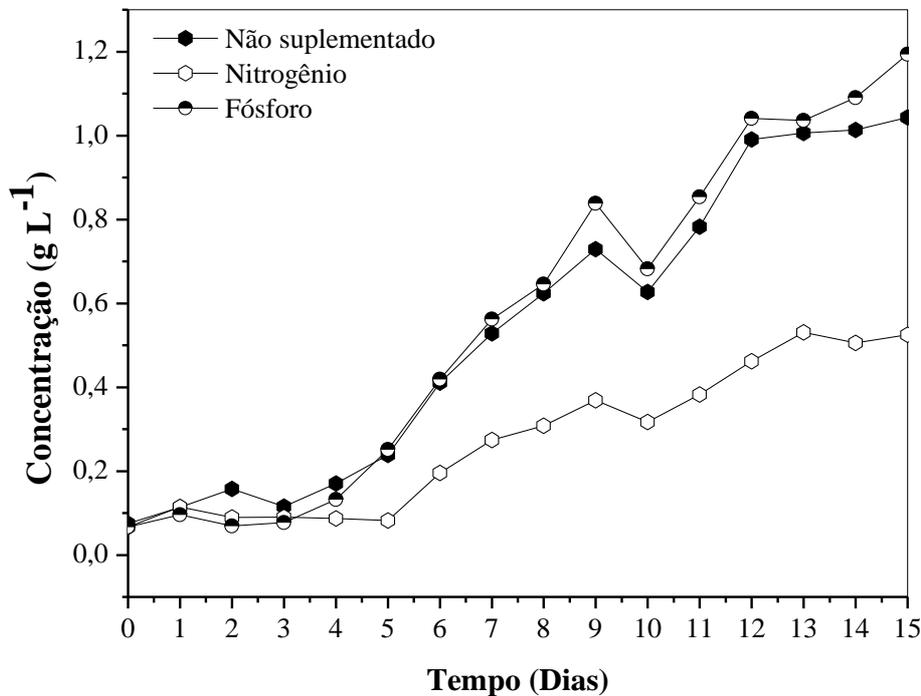


Figura 15. Produção de biomassa de *Dunaliella salina* durante cultivo Controle em sistema indoor.

A produção de biomassa de *D. salina* cultivada em meio f/2 obtida por Chen et al. (2015) foi inferior (aproximadamente $0,3 \text{ g L}^{-1}$) à obtida no presente estudo durante cultivo de *D. salina* em meio Não suplementado ($1,043 \text{ g L}^{-1}$). Além disso, durante o cultivo com duração de 8 dias, os autores observaram o alcance da fase estacionária a partir do 4º dia, diferentemente do observado no presente estudo, onde a fase estacionária teve início apenas a partir do 12º dia.

Durante o 1º ciclo de cultivo em meio reutilizado o maior crescimento foi observado no meio suplementado com Nitrogênio (Figura 16). Após a fase lag (dia 0–2), o crescimento

de *D. salina* foi exponencial até o final do cultivo (15 dias), obtendo a produção máxima de $1,122 \text{ g L}^{-1}$ (15º dia). Os cultivos nos meios Não suplementado e suplementado com Fósforo não promoveram o crescimento exponencial da microalga e a produção se manteve quase constante durante todo o experimento.

Diferentemente, Zhu et al. (2013) observaram maior produção de biomassa de *Chlorella zofingiensis* em meio reutilizado (água residual da criação de porcos) suplementado com fósforo ($74,5 \text{ mg L}^{-1}$ de fosfato monopotássico, KH_2PO_4) em fotobiorreator de 800 mL ($2,176 \text{ g L}^{-1}$), seguido do meio suplementado com nitrogênio ($1,977 \text{ g L}^{-1}$) – cuja fonte foi ureia ($141,4 \text{ mg L}^{-1}$). Similarmente, o meio não suplementado promoveu a menor produção de biomassa ($0,863 \text{ g L}^{-1}$).

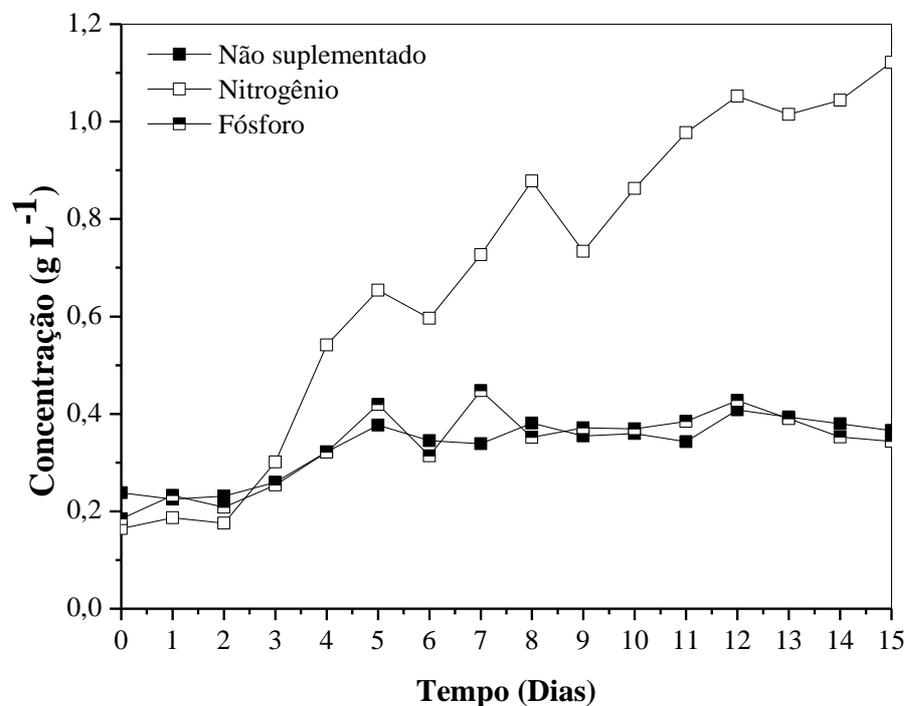


Figura 16. Produção de biomassa de *Dunaliella salina* durante 1º ciclo de cultivo em meio reutilizado (sistema *indoor*).

No 2º ciclo de cultivo em meio reutilizado o maior crescimento de *D. salina* foi obtido em meio suplementado com Nitrogênio (Figura 17), com produção máxima obtida no 12º dia ($0,957 \text{ g L}^{-1}$). Foi observada fase *lag* (adaptação) apenas no cultivo em meio suplementado com Nitrogênio, com duração de 2 dias (0–2). Nos meios Não suplementado e suplementado com Fósforo o crescimento foi praticamente constante até o 12º dia, atingindo as concentrações de $0,286 \text{ g L}^{-1}$ e $0,354 \text{ g L}^{-1}$, respectivamente. Após o 12º dia houve redução

da concentração devido à morte celular.

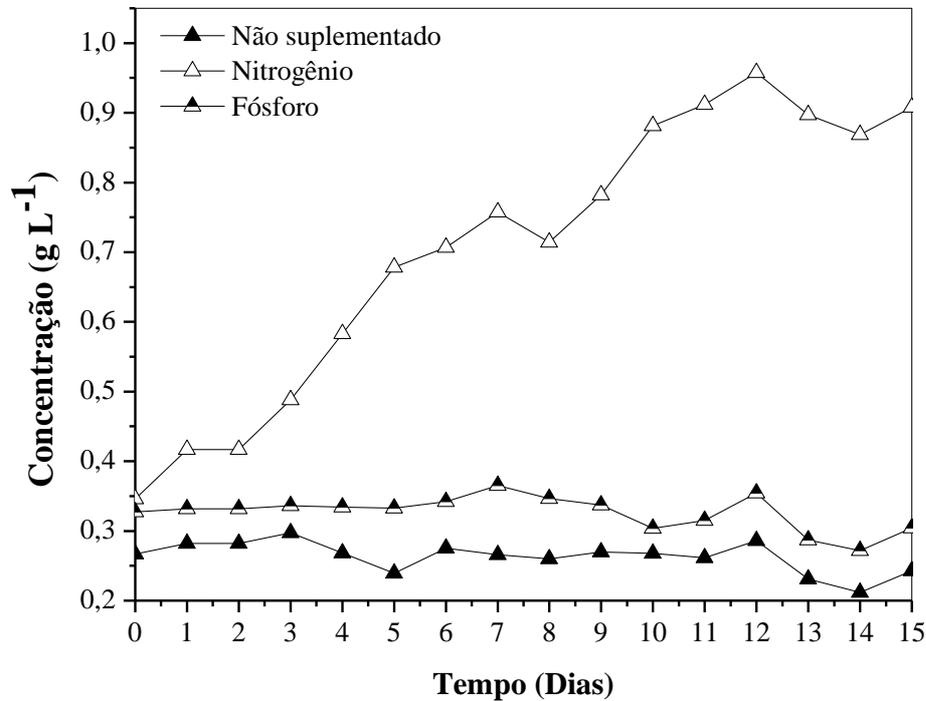


Figura 17. Produção de biomassa de *Dunaliella salina* durante 2º ciclo de cultivo em meio reutilizado (sistema *indoor*).

O nitrogênio faz parte da composição das proteínas e pigmentos. Desse modo, a limitação de nitrogênio afeta negativamente o crescimento celular, pois impede a formação de células, bem como a realização do metabolismo fotossintético (MENEGAZZO e FONSECA, 2019). Isso pode justificar a menor produção de biomassa nos cultivos Não suplementado e suplementado com Fósforo em relação ao cultivo suplementado com Nitrogênio nos ciclos de cultivo em meio reutilizado.

Chen et al. (2015) também observaram menor crescimento celular de *D. salina* e *Nannochloropsis salina* em meio com limitação de nitrogênio (aproximadamente 0,2 g L⁻¹) quando comparado aos meios com limitação de elementos traço (0,4 g L⁻¹ e 0,35 g L⁻¹, respectivamente), fósforo e vitaminas (0,3 g L⁻¹ e 0,25 g L⁻¹, respectivamente).

A maior produção celular obtida no 3º ciclo de cultivo em meio reutilizado foi observada também no meio suplementado com Nitrogênio, com produção máxima de 0,854 g L⁻¹ (10 dias) e produção final de 0,834 g L⁻¹, como mostra a Figura 18. Não foi observada fase de adaptação nesta condição, de modo que a fase exponencial teve duração de 7 dias (dia 0–7) e a fase estacionária teve início no 8º dia de cultivo, com duração de 7 dias.

Também não foi observada fase *lag* nos meios Não suplementado e suplementado com Fósforo. Em ambas as condições a fase exponencial teve início no dia 0 e terminou no 6º dia, após a qual deu-se início à fase estacionária, com duração até o final do experimento. As concentrações máximas foram obtidas no 6º (0,339 g L⁻¹) e 10º dia (0,343 g L⁻¹) nos meios Não suplementado e suplementado com Fósforo, respectivamente.

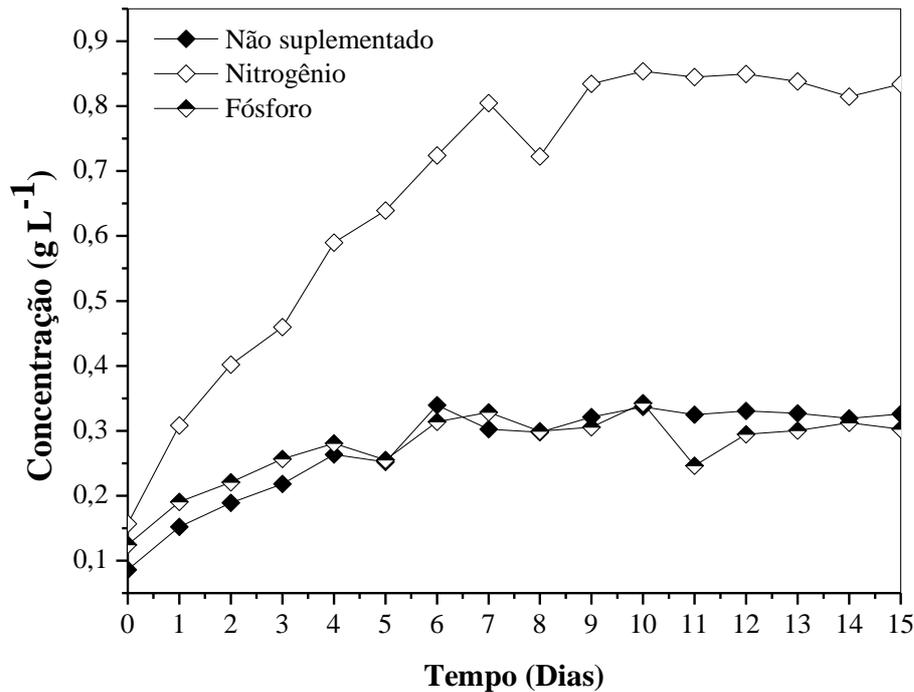


Figura 18. Produção de biomassa de *Dunaliella salina* durante 3º ciclo de cultivo em meio reutilizado (sistema *indoor*).

Zhu et al. (2013) também não observaram fase *lag* em 3 ciclos de cultivo de *Chlorella zofingiensis* em meio reutilizado suplementado com nitrogênio e fósforo. Os autores obtiveram menor produção de biomassa no 3º ciclo (aproximadamente 0,5 g L⁻¹) em relação ao presente estudo com *D. salina* em meio suplementado apenas com nitrogênio.

Os meios reutilizados Não suplementado e suplementado com Fósforo não promoveram o crescimento celular durante o 3º ciclo, o que indicou a produção insuficiente de nutrientes para a manutenção dos cultivos. Por isso, apenas o meio suplementado com Nitrogênio foi utilizado para a realização do 4º ciclo de cultivo em meio reutilizado.

Apenas duas fases foram observadas durante o crescimento de *D. salina* no 4º ciclo: exponencial e estacionária (Figura 19). A fase exponencial teve duração de 9 dias (dias 0–9), após a qual teve início a fase estacionária (dias 10–15). A suplementação de nitrogênio a cada início de ciclo permitiu a manutenção do metabolismo celular e, assim, a produção de

biomassa em concentrações altas (produção final: 0,895 g L⁻¹).

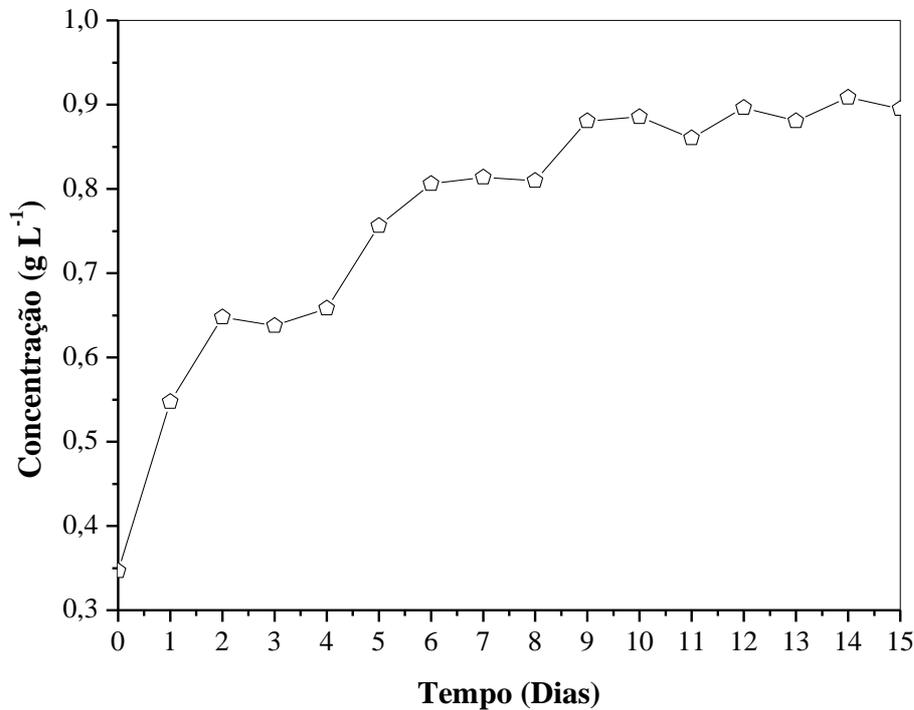


Figura 19. Produção de biomassa de *Dunaliella salina* durante 4º ciclo de cultivo em meio reutilizado suplementado com Nitrogênio (sistema *indoor*).

A produção máxima ($X_{m\acute{a}x}$), produtividade máxima ($P_{m\acute{a}x}$) e o crescimento celular máximo ($\mu_{m\acute{a}x}$) foram afetados significativamente pelo número de ciclos de cultivo nos meios reutilizados Não suplementado e suplementado com Fósforo (Tabela 3). Houve redução de 32,5% e 28,7% da produção de biomassa durante o cultivo no meio Não suplementado e suplementado com Fósforo, respectivamente, após três ciclos em meio reutilizado.

Por sua vez, o crescimento e a produtividade máximos foram reduzidos, respectivamente, em 33,7% e 86,8% no meio Não suplementado, enquanto no meio suplementado com Fósforo a redução foi de 15,6% e 76,7%. Yu et al. (2018) também observaram redução da produção e produtividade durante 3 ciclos de cultivo das espécies de microalgas *Scenedesmus* SDEC-8 e *Chlorella* SDEC-18 em meio reutilizado suplementado com os nutrientes do meio padrão, utilizando fotobiorreator de coluna com volume de trabalho de 3 L.

Tabela 3. Parâmetros de crescimento de *Dunaliella salina* cultivada em meio reutilizado até 4 ciclos. $X_{m\acute{a}x}$ (Produção máxima), $\mu_{m\acute{a}x}$ (Taxa de crescimento máximo), $P_{m\acute{a}x}$ (Produtividade

máxima).

Condição	Ciclo	$X_{m\acute{a}x}$ (g L ⁻¹)	$\mu_{m\acute{a}x}$ (d ⁻¹)	$P_{m\acute{a}x}$ (g L ⁻¹ d ⁻¹)
Não suplementado	Controle	1,043 ± 0,160 ^a	0,184 ± 0,008 ^a	0,076 ± 0,004 ^a
	1°	0,408 ± 0,011 ^b	0,035 ± 0,005 ^b	0,028 ± 0,001 ^b
	2°	0,297 ± 0,095 ^c	0,012 ± 0,014 ^c	0,015 ± 0,034 ^c
	3°	0,339 ± 0,013 ^d	0,062 ± 0,042 ^d	0,066 ± 0,036 ^d
Nitrogênio	Controle	0,531 ± 0,028 ^a	0,152 ± 0,008 ^a	0,048 ± 0,005 ^a
	1°	1,122 ± 0,084 ^b	0,129 ± 0,019 ^b	0,098 ± 0,020 ^b
	2°	0,957 ± 0,036 ^c	0,064 ± 0,003 ^c	0,071 ± 0,030 ^c
	3°	0,854 ± 0,202 ^d	0,080 ± 0,030 ^d	0,151 ± 0,028 ^d
Fósforo	Controle	1,194 ± 0,038 ^a	0,218 ± 0,008 ^a	0,086 ± 0,002 ^a
	1°	0,448 ± 0,232 ^b	0,038 ± 0,011 ^b	0,048 ± 0,039 ^b
	2°	0,365 ± 0,027 ^c	0,010 ± 0,011 ^c	0,005 ± 0,002 ^c
	3°	0,343 ± 0,011 ^d	0,034 ± 0,033 ^d	0,066 ± 0,045 ^d

± indica o desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna para cada condição de cultivo indicam que houve diferença significativa entre os experimentos a 95% de confiança ($p < 0,05$).

No meio suplementado com Nitrogênio houve aumento significativo da produção de biomassa nos meios reutilizados em comparação ao cultivo Controle. A maior produção de biomassa foi obtida no 1° ciclo em meio reutilizado (1,122 g L⁻¹). O 4° ciclo de cultivo promoveu maior produção de biomassa que o 3° ciclo (0,908 g L⁻¹ e 0,854 g L⁻¹, respectivamente). O crescimento celular máximo reduziu significativamente ao longo dos ciclos. Houve redução de 30,26% na taxa de crescimento máximo no último ciclo em relação ao Controle. Diferentemente, a produtividade máxima aumentou significativamente durante os ciclos de cultivo em meio reutilizado, sendo a maior produtividade obtida no 4° ciclo (0,201 g L⁻¹ d⁻¹), valor quase cinco vezes superior ao Controle.

A coloração dos cultivos foi alterada a cada ciclo, passando de verde escuro no cultivo Controle para verde-amarelado nos ciclos em meio reutilizado (Figura 20). Essa alteração pode ser justificada pela presença de células residuais no meio ou pela liberação de matéria orgânica solúvel resultante da excreção natural ou da lise celular durante a centrifugação (RODOLFI et al., 2003). O mesmo foi observado por Hadj-Romdhane et al. (2013) no cultivo de *Chlorella vulgaris* em meio reutilizado. Os autores concluíram que a matéria orgânica presente no meio consistia principalmente em polissacarídeos.



Figura 20. Coloração final dos cultivos de *Dunaliella salina* nos meios: (A) Não suplementado, (B) Suplementado com Nitrogênio e (C) Suplementado com Fósforo nos cultivos Controle e quatro ciclos de cultivo em meio reutilizado.

A coloração mais clara e amarelada dos cultivos em meio Não suplementado e suplementado com Fósforo no 3º ciclo indicam a morte celular ocorrida, visto que o metabolismo celular não estava mais ativo, não ocorrendo a produção dos pigmentos que conferem a cor característica destas microalgas. A produção de clorofila pelas células microalgais faz parte do seu metabolismo primário e, portanto, está diretamente relacionada à produção de biomassa (COSTA et al., 2018).

Além disso, os meios Não suplementado e suplementado com Fósforo consistiram em meios com limitação de nitrogênio, visto que este nutriente não foi adicionado aos meios residuais. Desse modo, a coloração amarelada pode ser resultado do fenômeno chamado “clorose de nitrogênio”, no qual a clorofila e a ficocianina são degradadas durante a limitação de nitrogênio. Nessas condições as células das microalgas passam de um estado vegetativo para um estado de dormência (KHOSRAVI-DARANI et al., 2013).

Outra possível explicação para a coloração amarelada ao longo dos cultivos é o consumo dos nutrientes, principalmente nitrato, durante os ciclos de cultivo. Essa redução da produção de nitrato pode ter influenciado a produção de β caroteno, pigmento de cor amarelada que tem sua produção aumentada sob limitação de nitrogênio (TINOCO et al., 2015).

A coloração mais escura do cultivo de *D. salina* no 1º ciclo em meio suplementado com Nitrogênio corrobora com os resultados apresentados anteriormente, que mostram a maior produção de biomassa nesta condição (Tabela 3).

5.3 *Ankistrodesmus falcatus*: Cultivo indoor

A Figura 21 apresenta a absorbância dos cultivos de *A. falcatus* Controle e em meio reutilizado não suplementado. O aumento da absorbância durante o cultivo Controle indica o aumento da produção celular. A fase de adaptação da microalga às condições de cultivo (fase *lag*) teve duração de 3 dias (dias 0–3), após a qual teve início a fase exponencial, com término no 18º dia de cultivo. A partir do dia 19 teve início a fase estacionária.

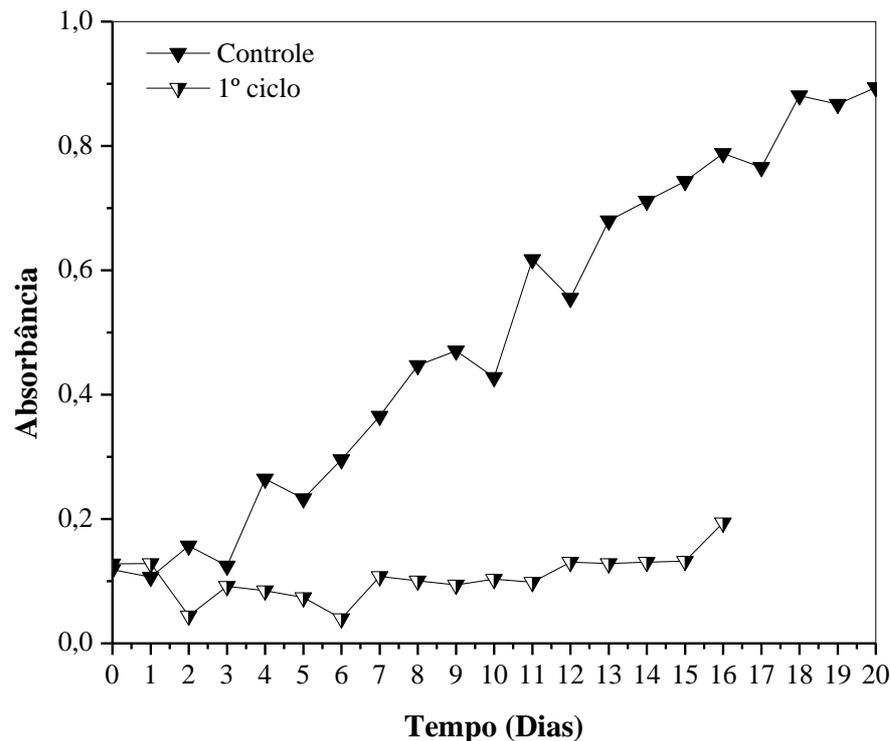


Figura 21. Densidade óptica durante cultivo Controle e 1º ciclo em meio reutilizado (sistema indoor) de *Ankistrodesmus falcatus*.

O cultivo em meio reutilizado não suplementado não permitiu o crescimento celular, de modo que o experimento foi finalizado no 16º dia em consequência da morte celular observada. A deficiência de nutrientes no meio de cultivo reutilizado não suplementado pode ter afetado negativamente o metabolismo de *A. falcatus*, impedindo a síntese moléculas estruturais como as proteínas, a realização da fotossíntese, dentre outros processos (KILHAM et al., 1997).

5.4 Eletrofloculação

Como discutido anteriormente, o material de que são feitos os eletrodos e sua área de contato são dois fatores que influenciam o funcionamento e a eficiência de separação dos eletrofloculadores. A construção dos eletrodos com fios de cobre não foi suficiente para permitir a separação da biomassa microalgal nos testes realizados. Devido à quantidade reduzida do metal houve pouca liberação e interação dos íons metálicos com as células das microalgas. Dessa forma, foi necessário utilizar chapas de cobre para que a separação da biomassa ocorresse.

Após 15 dias de cultivo da microalga *D. salina*, 5 litros do cultivo foram transferidos para um recipiente de vidro com volume de 5,0 L. Foi possível observar a formação de bolhas ao redor dos eletrodos no início da eletrofloculação e a migração das células microalgais durante todo o processo, que durou 15 minutos (Figura 22A). Ao final do processo a biomassa formou uma camada na parte superior do conteúdo do recipiente (Figura 22B). O meio residual adquiriu coloração azulada, como pode ser observado na Figura 22C. Essa coloração indica a formação de hidróxido de metal e perda de massa do cobre que compõe os eletrodos. Rahmani et al. (2017) também observaram mudança na coloração do meio para verde-azulado após eletrofloculação com eletrodo de cobre.

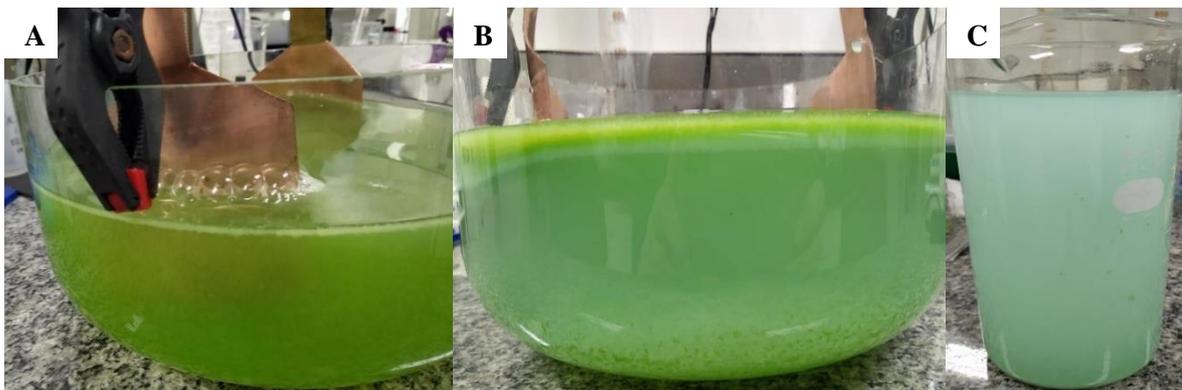


Figura 22. Teste do segundo modelo de eletrofloculador com cultivo de *Dunaliella salina*. (A) Formação de bolhas ao redor dos eletrodos durante o processo, (B) Separação da biomassa (sobrenadante), (C) Meio residual após eletrofloculação.

Diante do bom funcionamento do aparelho construído, outro modelo foi desenvolvido para que o processo pudesse ser realizado no fotobiorreator onde o cultivo estava contido,

permitindo a separação de todo o material em apenas um ciclo de eletrofloculação. Entretanto, após o primeiro uso do eletrofloculador para maior escala não foi possível utilizá-lo novamente. Neste caso, pode ter ocorrido grande perda de massa de cobre dos eletrodos durante o processo, inviabilizando usos posteriores. Rahmani et al. (2017) observaram perda de massa do eletrodo de cobre utilizado igual a 45,03% após 5 minutos de eletrofloculação do cultivo de *Chlorella pyrenoidosa*.

A substituição das chapas de cobre pelas chapas de alumínio permitiu a separação da biomassa e a reprodutibilidade do processo. Foi possível obter as biomassas das microalgas marinhas *P. tricornutum* e *I. galbana* (Figura 23) após 10 minutos de eletrofloculação com uma tensão de 19 V sem agitação e 15 minutos de repouso do cultivo para que a migração dos flocos fosse completamente realizada.

Foi realizado um teste da eletrofloculação com a microalga dulciaquícola *Ankistrodesmus falcatus*, no entanto, devido à menor quantidade de sal presente no meio, não foi possível separar a biomassa microalgal.

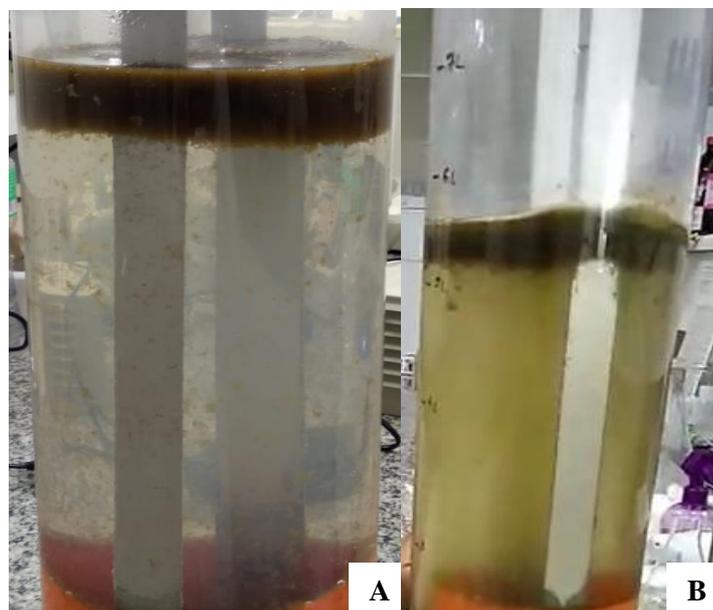


Figura 23. Eletrofloculação de *Phaeodactylum tricornutum* e *Isochrysis galbana* com eletrodos de alumínio em fotobiorreator tubular. (A) Separação da biomassa de *P. tricornutum* após a eletrofloculação, (B) Separação da biomassa de *I. galbana* após a eletrofloculação.

Diante dos resultados obtidos com o eletrofloculador para fotobiorreator tubular com

eletrodos paralelos de alumínio foi possível proteger o processo através do depósito de uma patente de modelo de utilidade junto ao Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI), com número de processo BR 20 2020 019742 3 e título “Reator de eletrofloculação para separação das microalgas *Phaeodactylum tricornutum* e *Isochrysis galbana* com alta atividade antioxidante e sem toxicidade”.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A reutilização de meio para o cultivo de microalgas e o uso da eletrofloculação são alternativas para a solução de dois grandes gargalos da produção de microalgas: o alto custo do meio de cultivo e da separação de biomassa. O cultivo de *Dunaliella salina* em meio reutilizado suplementado com nitrogênio permite a produção de biomassa em quantidades superiores ao cultivo em meio padrão. Entretanto, ainda é necessário avaliar os efeitos desta forma de cultivo na composição da biomassa, bem como avaliar se o cultivo de *Ankistrodesmus falcatus* em meio reutilizado suplementado também permite a produção de maior quantidade de biomassa. Além disso, o uso de eletrofloculador formado por eletrodos de alumínio mostrou-se o modelo mais adequado para a separação da biomassa de microalgas marinhas, permitindo a separação em menos tempo e de forma mais simplificada que a centrifugação. Ainda são necessários testes e ajustes para que o aparelho separe também a biomassa de microalgas dulciaquícolas.

7. REFERÊNCIAS

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas. 2004. Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica - Método de ensaio com algas (Chlorophyceae). Pp.1-20. Rio de Janeiro, Projeto NBR 12648:2004. 28ª reunião.

ANDRADE, B.B.; CARDOSO, L.G.; ASSIS, D.J.; COSTA, J.A.V.; DRUZIAN, J.I.; LIMA, S.T.C. Production and characterization of *Spirulina* sp. LEB 18 cultured in reused Zarrouk's medium in a raceway-type bioreactor. **Bioresource Technology**, v. 284, p. 340-348, 2019.

ATMANLI, A. Experimental comparison of biodiesel production performance of two different microalgae. **Fuel**, v. 278, 118311, 2020.

BARROS, A.I., GONÇALVES, A.L., SIMÕES, M., PIRES, J.C.M. Harvesting techniques applied to microalgae: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 41, 1489-1500, 2015.

BERNAERTS, T.M.M.; GHEYSEN, L.; FOUBERT, I.; HENDRICKX, M.E.; VAN LOEY, A.M. The potential of microalgae and their biopolymers as structuring ingredients in food: A review. **Biotechnology Advances**, 107419, 2019.

BONFANTI, C.; CARDOSO, C.; AFONSO, C.; MATOS, J.; GARCIA, T.; TANNI, S.; BANDARRA, N.M. Potential of microalga *Isochrysis galbana*: Bioactivity and bioaccessibility. **Algal Research**, v. 29, p. 242-248, 2018.

BUTLER, T.; KAPOORE, R.V.; VAIDYANATHAN, S. *Phaeodactylum tricorutum*: A diatom cell factory. **Trends in Biotechnology**, 2020. No prelo.

CHATSUNGNOEN, T. & CHISTI, Y. Flocculation and electroflocculation for algal biomass recovery. **Biofuels from Algae**, 257-286, 2019.

CHEN, Y.; TANG, X.; KAPOORE, R.V.; XU, C.; VAIDYANATHAN, S. Influence of nutrient status on the accumulation of biomass and lipid in *Nannochloropsis salina* and *Dunaliella salina*. **Energy Conversion and Management**, v. 106, p. 61-72, 2015.

CHEW, K.W.; CHIA, S.R.; SHOW, P.L.; YAP, Y.J.; LING, T.C.; CHANG, J. Effects of water culture medium, cultivation systems and growth modes for microalgae cultivation: A review. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 91, p. 332-344, 2018.

COSTA, S.S.; MIRANDA, A.L.; ANDRADE, B.B.; ASSIS, D.J.; SOUZA, C.O.; MORAIS, M.G.; COSTA, J.A.V.; DRUZIAN, J.I. Influence of nitrogen on growth, biomass composition, production, and properties of polyhydroxyalkanoates (PHAs) by microalgae. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 116, p. 552-562, 2018.

CUI, Y.; TOMAS-HALL, S.R.; SCHENK, P.M. *Phaeodactylum tricorutum* microalgae as a rich source of omega-3 oil: Progress in lipid induction techniques towards industry adoption. **Food Chemistry**, v. 297, 124937, 2019.

DE MARTINO, A.; BARTUAL, A.; WILLIS, A.; MEICHENIN, A.; VILLAZÁN, B.; MAHESWARI, U.; BOWLER, C. Physiological and molecular evidence that environmental changes elicit morphological interconversion in the model diatom *Phaeodactylum tricorutum*. **Protist**, v. 162, p. 462-481, 2011.

GAIGNARD, C.; GARGOUCH, N.; DUBESSAY, P.; DELATTRE, C.; PIERRE, G.; LAROCHE, C.; FENDRI, I.; ABDELKAFI, S.; MICHAUD, P. New horizons in culture and valorization of red microalgae. **Biotechnology Advances**, v. 37, p. 193-222, 2019.

GARCÍA-GONZÁLEZ, M.; MORENO, J.; MANZANO, J.C.; FLORENCIO, F.J.;

GUERRERO, M.G. Production of *Dunaliella salina* biomass rich in 9-cis- β -carotene and lutein in a closed tubular photobioreactor. **Journal of Biotechnology**, v. 115, p. 81-90, 2005.

GARRIDO-CARDENAS, J.A.; MANZANO-AGUGLIARO, F.; ACIEN-FERNANDEZ, F.G.; MOLINA-GRIMA, E. Microalgae research worldwide. **Microalgal Research**, v. 35, p. 50-60, 2018.

GEORGE, B.; PANCHA, I.; DESAI, C.; CHOKSHI, K.; PALIWAL, C.; GHOSH, T.; MISHRA, S. Effects of different media composition, light intensity and photoperiod on morphology and physiology of freshwater microalgae *Ankistrodesmus falcatus* – A potential strain for bio-fuel production. **Bioresource Technology**, v. 171, p. 367-374, 2014.

GONZÁLEZ-LÓPEZ, C.V.; CERÓN-GARCÍA, M.C.; FERNÁNDEZ-SEVILLA, J.M.; GONZÁLEZ-CÉSPEDES, A.M.; CAMACHO-RODRÍGUEZ, J.; MOLINA-GRIMA, E. Medium recycling for *Nannochloropsis gaditana* cultures for aquaculture. **Bioresource Technology**, v. 129, p. 430-438, 2013.

HADJ-ROMDHANE, F.; JAOUEN, P.; PRUVOST, J.; GRIZEAU, D.; VAN VOOREN, G.; BOURSEAU, P. Development and validation of a minimal growth medium for recycling *Chlorella vulgaris* culture. **Bioresource Technology**, v. 123, p. 366-374, 2012.

HADJ-ROMDHANE, F.; ZHENG, X.; JAOUEN, P.; PRUVOST, J.; GRIZEAU, D.; CROUÉ, J.P.; BOURSEAU, P. The culture of *Chlorella vulgaris* in a recycled supernatant: Effects on biomass production and medium quality. **Bioresource Technology**, v. 132, p. 285-292, 2013.

JAYANTA, T.; CHANDRA, K.M.; CHANDRA, G.B. Growth, total lipid content and fatty acid profile of a native strain of the freshwater oleaginous microalgae *Ankistrodesmus falcatus* (Ralf) grown under salt stress condition. *International Research Journal of Biological Sciences*, v. 1, p. 27-35, 2012.

KHOSRAVI-DARANI, K.; MOKHTARI, Z.B.; AMAI, T.; TANAKA, K. Microbial production of poly(hydroxybutyrate) from C1 carbon sources. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, p. 1407-1424, 2013.

KILHAM, S.S.; KREEGER, D.A.; GOULDEN, C.E.; LYNN, S.G. Effects of nutrient limitation on biochemical constituents of *Ankistrodesmus falcatus*. **Freshwater Biology**, v.

38, p. 591-596, 1997.

MARTÍNEZ-RUIZ, E.B. e MARTÍNEZ-JERÓNIMO, F. Nickel has biochemical, physiological, and structural effects on the green microalga *Ankistrodesmus falcatus*: An integrative study. **Aquatic Toxicology**, v. 169, p. 27-36, 2015.

MENEGAZZO, M.L. e FONSECA, G.G. Biomass recovery and lipid extraction processes for microalgae biofuels production: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 107, p. 87-107, 2019.

MUBARAK, M., SHAIJA, A., SUCHITHRA, T.V. Evaluation of ferric chloride and electroflocculation of *Chlorella pyrenoidosa* and reuse of the culture medium for subsequent cultures. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, 8, 103612, 2020.

OKORO, V.; AZIMOV, U.; MUNOZ, J.; HERNANDEZ, H.H.; PHAN, A.N. Microalgae cultivation and harvesting: Growth performance and use of flocculants - A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 115, 2019.

PANG, N.; GU, X.; CHEN, S.; KIRCHHOFF, H.; LEI, H.; ROJE, S. Exploiting mixotrophy for improving productivities of biomass and co-products of microalgae. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 112, p. 450-460, 2019.

PATIL, H.S. The Role of *Ankistrodesmus falcatus* and *Scenedesmus quadricauda* in Sewage Purification. **Bioresource Technology**, v. 37, p. 121-126, 1991.

PRIETO, A.; CAÑAVATE, J.P.; GARCÍA-GONZÁLEZ, M. Assessment of carotenoid production by *Dunaliella salina* in different culture systems and operation regimes. **Journal of Biotechnology**, v. 151, p. 180-185, 2011.

RAHMANI, A.; ZERROUKI, D.; DJAFER, L.; AYRAL, A. Hydrogen recovery from the photovoltaic electroflocculation-flotation process for harvesting *Chlorella pyrenoidosa* microalgae. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 42, p. 19591-19596, 2017.

RAUT, N., PANWAR, S., VAIDYA, R. Electroflocculation for harvesting microalgae, first ed. Saarbrücken, Alemanha, 2015.

RODOLFI, L.; ZITTELLI, G.C.; BARSANTI, L.; ROSATI, G.; TREDICI, M.R. Growth medium recycling in *Nannochloropsis* sp. mass cultivation. **Biomolecular Engineering**, v.

20, p. 243-248, 2003.

SAJJADI, B.; CHEN, W.; RAMAN, A.A.A.; IBRAHIM, S. Microalgae lipid and biomass for biofuel production: A comprehensive review on lipid enhancement strategies and their effects on fatty acid composition. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 97, p. 200-232, 2018.

SHI, W., ZHU, L., CHEN, Q., LU, J., PAN, G., HU, L., YI, Q. Synergy of flocculation and flotation for microalgae harvesting using aluminium electrolysis. **Bioresource Technology**, 233, 127-133, 2017.

SINGH, P.; GULDHE, A.; KUMARI, S.; RAWAT, I.; BUX, F. Investigation of combined effect of nitrogen, phosphorus and iron on lipid productivity of microalgae *Ankistrodesmus falcatus* KJ671624 using response surface methodology. **Biochemical Engineering Journal**, v. 94, p. 22-29, 2015.

SONG, P.; ZHANG, L.; LI, Q. Response of photosynthetic apparatus of *Isochrysis galbana* to diferente nitrogen concentrations. **Bioresource Technology Reports**, v. 4, p. 74-79, 2018.

SONI, R.A.; SUDHAKAR, K.; RANA, R.S. *Spirulina* - From growth to nutritional product: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 69, p. 157-171, 2017.

SUPARMANIAM, U.; LAM, M.K.; UEMURA, Y.; LIM, J.W.; LEE, K.T.; SHUIT, S.H. Insights into the microalgae cultivation technology and harvesting process for biofuel production: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 115, p. 1-23, 2019.

TALERO, E.; GARCÍA-MAURIÑO, S.; ÁVILA-ROMÁN, J.; RODRÍGUEZ-LUNA, A.; ALCAIDE, A.; MOTILVA, V. Bioactive compounds isolated from microalgae in chronic inflammation and câncer. **Marine Drugs**, v. 13, p. 6152-6209, 2015.

TANG, D.Y.Y.; KHOO, K.S.; CHEW, K.W.; TAO, Y.; HO, S.; SHOW, P.L. Potential utilization of bioproducts from microalgae for the quality enhancement of natural products. **Bioresource Technology**, v. 304, 12299, 2020.

TINOCO, N.A.B.; TEIXEIRA, C.M.L.L.; REZENDE, C.M. O gênero *Dunaliella*: Biotecnologia e aplicações. **Revista Virtual de Química**, v. 7, p. 1421-1440, 2015.

VALERO, E., ÁLVAREZ, X., CANCELA, Á., SÁNCHEZ, Á. Harvesting green algae from

eutrophic reservoir by electroflocculation and post-use for biodiesel production. **Bioresource Technology**, 187, 255-262, 2015.

VONSHAK, A., 1997. *Spirulina platensis* (Arthrospira) Physiology, Cell-Biology and Biotechnology, 1^a edição, Londres.

WALNE, P. R. Experiments in the large scale culture of the larvae of *Ostrea edulis*. **Fishery Investigations**, v.25, n.4, p.1-53, 1966.

WU, Z.; ZHU, Y.; HUANG, W.; ZHANG, C.; LI, T.; ZHANG, Y.; LI, A. Evaluation of flocculation induced by pH increase for harvesting microalgae and reuse of flocculated medium. **Bioresource Technology**, v. 110, p. 496-502, 2012.

YU, Z.; PEI, H.; HOU, Q.; NIE, C.; ZHANG, L.; YANG, Z.; WANG, X. The effects of microalgal extracellular substances on microalgal growth, metabolism and long-term medium recycle, and inhibition alleviation through ultrasonication. **Bioresource Technology**, v. 267, p. 192-200, 2018.

ZAMANI, H.; RASTEGARI, B.; VARAMINI, M. Antioxidant and anti-cancer activity of *Dunaliella salina* extract and oral drug delivery potential via nano-based formulations of gum Arabic coated magnetite nanoparticles. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 54, 101278, 2019.

ZHOU, W.; WANG, J.; CHEN, P.; JI, C.; KANG, Q.; LU, B.; LI, K.; LIU, J.; RUAN, R. Bio-mitigation of carbon dioxide using micromicroalgal systems: Advances and perspectives. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 76, p. 1163-1175, 2017.

ZHU, C.; ZHAI, X.; JIA, J.; WANG, J.; HAN, D.; LI, Y.; TANG, Y.; CHI, Z. Seawater desalination concentrate for cultivation of *Dunaliella salina* with floating photobioreactor to produce β -carotene. **Microalgal Research**, v. 35, p. 319-324, 2018.

ZHU, L.D.; TAKALA, J.; HILTUNEN, E.; WANG, Z.M. Recycling harvest water to cultivate *Chlorella zofingiensis* under nutrient limitation for biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 144, p. 14-20, 2013.

28/09/2020 870200121776
13:47

29409161911807241

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 20 2020 019742 3

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 2

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 15180714000104

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Rua Augusto Viana s/n,

Cidade: Salvador

Estado: BA

CEP: 40-110060

País: Brasil

Telefone: (71)32839097

Fax: (71)32839097

Email: inova@ufba.br

Depositante 2 de 2

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE DO ESTADO DA BAHIA

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 14485841000140

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Av. Centro Administrativo da Bahia – Edf. MultiCab Empresarial, nº
3.386 – Sussuarana

Cidade: SALVADOR

Estado: BA

CEP: 41218-700

País: BRASIL

Telefone: (71) 340 64619

Fax:

Email: agencia.inovacao@uneb.br

Dados do Pedido

Natureza Patente: 20 - Modelo de Utilidade (MU)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): REATOR DE ELETROFLOCULAÇÃO PARA SEPARAÇÃO DAS MICROALGAS *Phaeodactylum tricornutum* E *Isochrysis galbana* COM ALTA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E SEM TOXICIDADE

Resumo: A presente invenção trata-se de um equipamento de eletrofloculação contínua, utilizado para separação da biomassa de *Phaeodactylum tricornutum* e *Isochrysis galbana* do seu meio de cultivo sintético, com aplicação na área de bioquímica de proteínas, visando a eletrofloculação com modificações técnicas e eletroquímicas para aumentar a separação das microalgas do meio sintético, produzindo biomassa com alta atividade antioxidante e sem toxicidade.

Figura a publicar: 2