



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA
QUÍMICA**

WILLIAM MICHELON

**FICORREMEDIAÇÃO DE EFLUENTES DA SUINOCULTURA:
EFEITOS DA COMPOSIÇÃO DO SUBSTRATO E DOS
NUTRIENTES (N e P) NA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DAS
MICROALGAS**

**FLORIANÓPOLIS
2015**

William Michelon

**FICORREMEDIAÇÃO DE EFLUENTES DA SUINOCULTURA:
EFEITOS DA COMPOSIÇÃO DO SUBSTRATO E DOS
NUTRIENTES (N e P) NA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DAS
MICROALGAS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós
Graduação em Engenharia Química da
Universidade Federal de Santa Catarina,
para a obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Hugo Moreira Soares

Coorientador: Prof. Dr. Marcio Luis Busi
da Silva

Florianópolis
2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária
da UFSC.

Michelon, William

Ficorremediação de Efluentes da Suinocultura: Efeitos da Composição do Substrato e dos Nutrientes (N e P) na Composição Química das Microalgas / William Michelon; orientador, Hugo Moeira Soares; coorientador, Marcio Luiz Busi da Silva – Florianópolis, SC, 2015.

131 p.

Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Santa Catarina. Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

Inclui referência

1. Engenharia Química. 2. nutrientes. 3. composição celular. 4. privação. 5. Ficorremediação. I. Soares, Hugo Moeira. II. Da Silva, Marcio Luiz Busi. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. IV. Título.

**Ficorremediação de Efluentes da Suinocultura: Efeitos da
Composição do Substrato e dos Nutrientes (N e P) na Composição
Química das Microalgas**

William Michelon

Dissertação submetida ao Programa de Pós Graduação em
Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina, para a
obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Química

Florianópolis, de 2015.

Prof. Dr. Hugo M. Soares
Orientador

Prof. Dr. Marcio Luis Busi da Silva
Coorientador

Prof^a. Dr^a. Cintia Soares
Coordenadora do Curso

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Marinho Bastos Quadri

Prof. Dr. Leonardo Rubi Rörig

Prof. Dr. Roberto Bianchini Derner

Florianópolis, 17 de dezembro de de 2015.

AGRADECIMENTOS

Quero primeiramente agradecer a DEUS que com a ajuda dele eu tive forças para chegar ao final dessa pequena jornada.

Aos meus pais, Jacir e Lindamar Michelin, ambos são responsáveis por cada sucesso obtido e cada degrau avançado. Durante todos esses anos foram grande exemplo de força, de coragem, perseverança e energia infinita para nunca desistir diante do primeiro obstáculo encontrado. Obrigado pela ajuda na conquista de mais uma vitória, obrigado por estarem sempre comigo.

Aos meus irmãos e cunhado, muito obrigado pelo apoio e paciência.

Ao professor orientador Dr. Hugo Moreira Soares, pela orientação e ensinamentos transmitidos ao longo deste período.

Aos coorientadores Dr. Marcio Luis Busi da Silva e Dra. Melissa Mezzari, pelo aprendizado, incentivo e ajuda no desenvolvimento deste projeto.

A UFSC e a EMBRAPA, pela a oportunidade que me foi concedida, tornando possível a realização desse trabalho.

A todos os meus estimados colegas e amigos do Laboratório de Experimentação e Análises Ambientais - LEAA da Embrapa Suínos e Aves: Jessica, Deise, Ismael, Mateus, Jean, Lidimara, Lucas, André, Adelcio, Marco, Rubia, Aline, Marina e Angélica pelo auxílio e companheirismo.

Aos amigos do Laboratório de Tratamento Biológico de Resíduos - LTBR da UFSC, Simone, Taise, Walter e também a Yenny e Francieli pela companhia e apoio durante a realização das disciplinas.

A EMBRAPA e CAPES que contribuíram como financiadores dessa pesquisa.

A todos, meu simplesmente **MUITO OBRIGADO**.

RESUMO

A suinocultura é uma importante atividade social e econômica para todo o país, entretanto, esta atividade é reconhecida por causar problemas ambientais significativos. O tratamento de águas residuárias por processo de fitorremediação está atraindo o interesse renovado devido às suas potenciais aplicações da biomassa para produção de biocombustíveis e compostos de alto valor, agregando valor econômico ao agronegócio. A presente pesquisa teve como objetivo avaliar a remoção de nutrientes dos efluentes do UASB (Upflow Anaerobic Sludge Blanket) e sistema de lodos ativados (LA) de um processo de tratamento de dejetos suínos por fitorremediação, e a composição química celular. O cultivo foi realizado em escala laboratorial com fotobiorreatores verticais (FBRs) com luminosidade artificial ($44,8 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) temperatura de $23 \text{ }^\circ\text{C}$ e escala piloto numa casa de vegetação sob a luz natural, com intensidade luminosa variando de $90\text{-}733 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e temperatura ambiente com variação de $15,4\text{-}48 \text{ }^\circ\text{C}$, utilizando consórcio com *Chlorella* spp. e *Scenedesmus* spp. A biomassa foi coletada por centrifugação e precipitação química usando polímero orgânico catiônico (tanino). A eficiência de remoção para a amônia foi de 44,3 e 76,7% com efluente do UASB e LA, respectivamente. A eficiência da remoção de fósforo da cultura com UASB alcançou 89,6%, em contraste, com LA foi de 76,5%, após 96h de fitorremediação. A biomassa colhida a partir do efluente do UASB apresentou 56,1, 34,4 e 1,1% de proteínas, carboidratos e lipídios, respectivamente. Comparativamente, a composição celular das microalgas cultivadas com efluente LA teve diminuição nas proteínas (44%) mas os teores de carboidratos foram mais elevados (41,9%) e não houve diferença nos teores de lipídios (2%). No entanto, a biomassa separada por centrifugação os níveis foram de 25,2, 58,9 e 3% em carboidratos, proteínas e lipídios, respectivamente. Quando privadas de nutrientes (N e P) o teor de carboidratos foi de 56,8%, proteínas 22% e lipídios 16,3%. Os resultados demonstraram que a amônia e fósforo foram satisfatoriamente removidos. Biomassas de microalgas a partir de processos de tratamento terciário são ricas em proteínas e carboidratos, mas com baixo teor de lipídios. O processo de colheita pode alterar a composição química. A privação de nutrientes aumenta a acumulação de lipídios no interior das células e são ricas em ômega 3 e 6.

Palavras-chave: nutrientes, composição celular, privação, fitorremediação.

ABSTRACT

The swine is an important social and economic activity for the whole country, however, this activity is known to cause significant environmental problems, the treatment of wastewater by phycoremediation process is attracting renewed interest due to their potential applications of biomass production biofuels and high value compounds, adding economic value to agribusiness. This research aimed at evaluating the removal of nutrients from the effluent UASB (Upflow Sludge Blanket Anaerobic) and AL system (Activated sludge) of a treatment process of swine manure by phycoremediation, and cellular biochemical composition. Cultivation was carried out in laboratory scale with vertical photobioreactors (PBRs) with artificial light ($44.8 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) temperature of $23 \text{ }^\circ \text{C}$ and pilot scale reactor in greenhouse indoors under natural light with luminous intensity ranging from $90\text{-}733 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ and room temperature ranging from $15.4\text{-}48 \text{ }^\circ \text{C}$ using polyculture with *Chlorella* sp. and *Scenedesmus* sp. The biomass was collected for centrifugation and chemical precipitation using cationic organic polymer (tannin). The removal efficiency for ammonia was 44.3 and 76.7% with effluent from the UASB and LA, respectively. The efficiency of phosphorus removal of the culture with UASB reached 89.6%, in contrast with the LA was 76.5% after 96h of phycoremediation. The efficiency of phosphorus removal of the culture with UASB reached 89.6%, in contrast with the LA was 76.5% after 96h of phycoremediation. The harvested biomass from the UASB effluent showed 56.1, 34.4 and 1.1% protein, carbohydrates and lipids, respectively. Comparatively, the cellular composition of cultivated microalgae with LA effluent had decreased in protein (44%) but the carbohydrate content was higher (41.9%) and no difference in lipid content (2%). However, the biomass separated by centrifugation levels were 25.2, 58.9 and 3% of carbohydrates, proteins and lipids, respectively. When starved the carbohydrate content was 56.8%, proteins 22% and lipids 16.3%. The results showed that ammonia and phosphorus have been removed satisfactorily. Biomass of microalgae from tertiary treatment processes are rich in protein and carbohydrates, but low in lipids. The process of crop can change the biochemical composition. The nutrient deprivation increases the accumulation of lipids within cells and are rich in omega 3 and 6.

Keywords: nutrient, cellular composition, deprivation, phytoremediation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática para três modelos de alternativas de transporte e assimilação de P. A) modelo convencional contendo um único nutriente; (B) modelo contendo diferentes tipos de fósforo, separados em inorgânico solúvel (SIP), polifosfato (PoliP) e P orgânico estrutural e solúvel (SOP); (C) Esquema modificado a partir do proposto por Miyachi et al.(1964), com duas alternativas distintas, a partir dos quais um SOP é sintetizado diretamente.	34
Figura 2 - Rotina de biossíntese de componentes bioquímicos para <i>Chlorella vulgaris</i>	38
Figura 3 - Fluxograma do processo de tratamento de efluentes na ETDS da Embrapa Suínos e Aves.	46
Figura 4 - Reator utilizado para cultivo de microalgas sob condições naturais.	48
Figura 5 – Matriz e respectivas análises.....	50
Figura 6 – Correlação das concentrações de biomassa seca e clorofila <i>a</i>	58
Figura 7 - Efluentes utilizados no cultivo: (A) UASB e (B) LA.....	60
Figura 8 - Fotografias de microscopia óptica mostrando as microalgas (1000x): (A) <i>Chlorella</i> spp. (B) <i>Scenedesmus</i> spp.....	61
Figura 9 - Clorofila <i>a</i> e perfil de concentração de oxigênio dissolvido. (A) 6% v/v do efluente UASB e (B) 50% v/v do efluente LA.....	63
Figura 10 – Biomassa seca e velocidade específica de crescimento. (A) 6% v/v do efluente UASB e (B) 50% v/v do efluente LA.	64
Figura 11 - Perfil de remoção de nitrogênio amoniacal. (A) 6% v/v do efluente UASB e (B) 50% v/v do efluente LA.....	66
Figura 12 - Perfil de amônia livre em função da temperatura e pH. (A) 6% v/v do efluente UASB e (B) 50% v/v do efluente LA.....	68
Figura 13 - Perfil de remoção de fósforo. (A) 6% v/v do efluente UASB e (B) 50% v/v do efluente LA.....	70
Figura 14 - Perfil de remoção de alcalinidade. (A) 6% v/v do efluente UASB e (B) 50% v/v do efluente LA.....	72
Figura 15 - Perfil de remoção de carbono inorgânico, orgânico e total. (A) 6% v/v do efluente UASB e (B) 50% v/v do efluente LA.....	73
Figura 16 - Imagens de microscopia de fluorescência com consórcio de (A) <i>Scenedesmus</i> spp. e (B) <i>Chlorella</i> spp. coradas com Vermelho do Nilo e que mostram o acúmulo de lipídios neutros após 1, 10, 16, 20 e 25 dias cultivadas com deficiência de nitrogênio e fósforo.....	83

Figura 17 – (A) Perfil de remoção de fósforo. (B) Perfil de remoção de amônia. (C) Perfil de remoção de alcalinidade. (D) Perfil de remoção de carbono inorgânico, orgânico e total..... 128

Figura 18 - (A) Perfil de remoção de fósforo. (B) Perfil de remoção de amônia. (C) Perfil de remoção de alcalinidade. (D) Perfil de remoção de carbono inorgânico, orgânico e total..... 130

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição geral de diferentes fontes de alimentos humanos e algas (% da matéria seca).....	40
Tabela 2 - Relações das diluições para cada ensaio.....	47
Tabela 3 - As concentrações de nitrato e fosfato nos meios de cultura..	49
Tabela 4 – Caracterização dos efluentes utilizados.....	59
Tabela 5 – Resultado inibição do crescimento pelos diferentes digestatos.....	60
Tabela 6 – Qualidade da água residuária pós tratamento.....	75
Tabela 7 - Composição química celular após 4 dias de ficorremediação com diferentes substratos.....	77
Tabela 8 - Composição mineral de biomassa de microalgas após ficorremediação.....	77
Tabela 9 - Efeito do método de colheita na composição celular, após ficorremediação.....	80
Tabela 10 - Composição mineral de biomassa de microalgas a partir da centrifugação.....	80
Tabela 11 - Composição química de microalgas <i>Chlorella</i> spp. e <i>Scenedesmus</i> spp. cultivadas em diferentes condições.....	84
Tabela 12 - Composição mineral da biomassa de microalgas com diferentes concentrações de nutrientes.....	85
Tabela 13 – Perfil de ácidos graxos (%)......	91
Tabela 14 – Comparação do perfil de ácido graxo com outras espécies reportadas na literatura.....	92
Tabela 15 - Concentrações iniciais com UASB - 6% (v/v).....	128
Tabela 16 - Concentrações iniciais com LA - 50% (v/v).....	130

LISTA DE SIMBOLOS E ABREVIATURAS

ABPA - Associação Brasileira de Proteína Animal
ACCCase - Acetil-CoA carboxilase
AGPase - ADP- glucose pirophosphorilase
AMT - Transportador de amônio
ANOVA - Análise de Variância
AOAC - Association of Official Analytical Chemists
AOCS - American Oil Chemists Society
ATP - Adenosina trifosfato
CBAA - Compêndio Brasileiro de Alimentação Animal
CCMs - Mecanismo de concentração de CO₂
CI - Carbono inorgânico
CO₂ - Dióxido de carbono
COT - Carbono orgânico total
CT - Carbono total
CZ - Cinzas
DDI - Distúrbios por deficiência de iodo
DEF. - Deficientes
DMSO - Dimetil sulfóxido
DS - Decantador Secundário
ETDS - Estação de Tratamento de Dejetos Suínos
G3P - gliceraldeído 3-fosfato
IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
LA - Lodos ativados
NADPH – Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NIR - Nitrito redutase
NR - Nitrato redutase
OD - Densidade óptica
OMS - Organização Mundial da Saúde
pH – Potencial hidrogeniônico
RNA - Ácido ribonucléico
SF - Sólidos fixos
SIP - Fósforo inorgânico solúvel
SOP - Fósforo orgânico solúvel
ST - Sólidos totais
SV - Sólidos voláteis
TAGs - Triacilgliceróis
UALse - Uréia carboxilase
UASB - Upflow Anaerobic Sludge Blanket
USEPA - United States Environmental Protection Agency

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	23
1.1	OBJETIVOS.....	25
1.1.1	<i>Objetivo Geral</i>	25
1.1.2	<i>Objetivos Específicos</i>	25
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	27
2.1	SUINOCULTURA.....	27
2.1.1	<i>Suinocultura e o Meio Ambiente</i>	28
2.2	BIORREMEDIAÇÃO DE EFLUENTES COM MICROALGAS	29
2.2.1	<i>Remoção de Nitrogênio e Fósforo</i>	31
2.2.2	<i>Assimilação de N e P</i>	32
2.2.2.1	Assimilação do Íon Amônio.....	32
2.2.2.2	Assimilação dos Íons Nitrato e Nitrito.....	32
2.2.2.3	Assimilação de Uréia e Nitrogênio Orgânico	33
2.2.2.4	Assimilação de Fósforo	33
2.3	REÚSO DE ÁGUA PROVENIENTE DA SUINOCULTURA.....	35
2.4	LEGISLAÇÃO AMBIENTAL.....	36
2.5	COMPOSIÇÃO QUÍMICA DAS MICROALGAS	37
2.6	BIOSSÍNTESE DE LIPÍDIOS, CARBOIDRATOS E PROTEÍNAS.....	37
2.6.1	<i>Usos da biomassa</i>	42
3	MATERIAL E METODOS.....	45
3.1	ESTAÇÃO DE TRATAMENTOS DE DEJETOS SUÍNOS (ETDS).....	45
3.2	Obtenção do inóculo de microalgas.....	46
	ltivo de microalgas.....	47
	<i>Escala laboratorial</i>	47
3.3.2	<i>Escala piloto</i>	48
3.3.3	<i>Monitoramento da comunidade microalgal</i>	49

3.4 MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA.....	49
3.5 SEPARAÇÃO DA BIOMASSA.....	49
3.6 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS	50
3.6.1 <i>Determinação de nitrogênio amoniacal</i>	50
3.6.2 <i>Determinação de Nitrito e Nitrato</i>	51
3.6.3 <i>Determinação de Fósforo</i>	51
3.6.4 <i>Determinação de carbono total</i>	52
3.6.5 <i>Determinação da Temperatura, Oxigênio Dissolvido e pH</i>	52
3.6.6 <i>Alcalinidade Total</i>	52
3.6.7 <i>Determinação da Clorofila a</i>	52
3.6.8 <i>Determinação de turbidez e sólidos totais</i>	53
3.6.9 <i>Determinação de cinzas ou matéria mineral (CZ)</i>	53
3.6.9.1 <i>Determinação de Na e K</i>	54
3.6.9.2 <i>Determinação de P</i>	54
3.6.9.3 <i>Determinação de Ca, Mg, Cu, Zn, Fe e Mn</i>	54
3.6.10 <i>Determinação de lipídios - Extrato Etéreo (EE)</i>	54
3.6.11 <i>Determinação do perfil de ácidos graxos</i>	55
3.6.12 <i>Determinação de proteínas - Nitrogênio em amostras sólidas pelo método de combustão (NTD)</i>	55
3.6.13 <i>Determinação de carboidratos</i>	56
3.7 Análise estatística.....	56
3.8 CALCULOS REALIZADOS.....	56
3.8.1 <i>Remoção de nutrientes</i>	56
3.8.2 <i>Velocidade Específica de Crescimento Celular (μ_x)</i>	57
3.8.3 <i>Produtividade de biomassa</i>	58
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
4.1 CARACTERIZAÇÃO DOS EFLUENTES	59
4.2 TESTE DE INIBIÇÃO PELO SUBSTRATO	59
4.3 MONITORAMENTO DAS ESPÉCIES DE MICROALGAS.....	61

4.4	CRESCIMENTO DAS MICROALGAS E REMOÇÃO DE nitrogênio, fósforo e carbono.....	62
4.4.1	<i>Crescimento das microalgas e clorofila a.....</i>	62
4.4.2	<i>Remoção de nitrogênio</i>	65
4.4.2.1	Amônia livre.....	68
4.4.3	<i>Remoção de fósforo.....</i>	69
4.4.4	<i>Remoção de alcalinidade</i>	71
4.4.5	<i>Remoção de carbono.....</i>	73
4.5	CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DA ÁGUA RESIDUÁRIA PÓS TRATAMENTO E POTENCIAL REÚSO	74
4.6	COMPOSIÇÃO QUÍMICA DAS MICROALGAS	76
4.6.1	<i>Composição química após fitorremediação.....</i>	76
4.6.2	<i>Composição química após separação centrifugação vs coagulação química</i>	79
4.6.3	<i>Composição química com deficiência de nutrientes.....</i>	81
4.6.4	<i>Composição dos ácidos graxos de microalgas privadas de N e P.....</i>	90
5	CONCLUSÕES.....	95
6	REFERENCIAS.....	97
	APÊNDICE A.....	127
	APÊNDICE B.....	131

1 INTRODUÇÃO

A suinocultura no Brasil representa uma atividade de fundamental importância econômica e social. No entanto é reconhecida como atividade de grande potencial poluidor, por produzir quantidades de resíduos com altas cargas de nutrientes (fósforo e nitrogênio), matéria orgânica, sólidos, patógenos, metais pesados, hormônios e antibióticos (USEPA, 1999). Para isso, o setor agroindustrial necessita de tecnologias de baixo custo que promovam a remoção de matéria orgânica e dos nutrientes presentes nos dejetos. Dessa maneira, a utilização de microalgas como tratamento se torna atraente, devido à sua capacidade de incorporar nutrientes, tais como, N e P, os quais causam eutrofização em corpos hídricos. A utilização de microalgas no tratamento terciário de águas residuárias estabilizadas oriundas da suinocultura é favorável, pois, conseguem crescer em diferentes diluições dos dejetos de suínos e mesmo sem diluição, com capacidade de tolerar altas concentrações de amônia e fósforo (CANIZARES; DOMINGUEZ, 1993).

Como uma matéria-prima alternativa para a produção de biocombustíveis, as microalgas têm recebido muita atenção nos últimos anos devido à sua maior velocidade de crescimento e capacidade de acumular maior quantidade de lipídios e carboidratos dentro de suas células, o qual pode ser utilizado para produzir bioetanol e o biodiesel. Além disso, possuem na sua composição química teores de proteínas e outros compostos de alto valor, como antioxidantes e pigmentos que são de extremo interesse para indústria nutricional.

Desta maneira, o tratamento de efluentes da suinocultura e a utilização da biomassa excedente como matéria-prima, torna-se uma alternativa promissora no atual cenário do agronegócio no Brasil. Além disso, as águas residuárias pós fitorremediação podem ser reutilizadas no processo produtivo suinícola (MEZZARI, 2013).

A disponibilidade de nutrientes é de importância fundamental para o crescimento e a produção primária de microalgas. Independentemente de características intrínsecas, o crescimento e metabolismo das microalgas quando submetidas a limitação de nutrientes mudam a sua composição celular. A limitação de nitrogênio e fósforo pode levar a uma diminuição do teor de proteína e um aumento relativo em carboidratos e/ou de armazenamento de lipídios. As alterações bioquímicas medidas em microalgas refletem os seus mecanismos para lidar com as alterações de parâmetros fisiológicos e são conhecidas

como sendo específicas da cepa. A subsequente utilização de corantes, tais como o Vermelho do Nilo, oferece uma ferramenta de análise rápida e importante para medir o teor de lipídios neutros (VIGEOLAS, et al., 2012, JIANG, et al., 2012).

Devido ao seu uso ampliado como uma fonte renovável de matéria-prima, a produção de lipídios a partir de microalgas tem recebido forte interesse nas últimas décadas (CHISTI, 2007). Estudos publicados sobre a síntese de lipídios nas microalgas concentram-se principalmente na melhoria das condições de cultivo e seleção de espécies, com o objetivo de aumentar o teor de lipídios totais (JIAN-MING, et al., 2010).

Neste contexto o presente trabalho buscou avaliar a ficorremediação de efluentes da suinocultura e os efeitos da composição do substrato e dos nutrientes (N e P) na composição química das microalgas.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Avaliar a eficiência de remoção de nitrogênio e fósforo de efluentes da suinocultura por processo de ficorremediação e efeito destes na composição de proteínas, carboidratos e lipídios celular.

1.1.2 Objetivos Específicos

Determinar a taxa de remoção por ficorremediação de N e P em efluentes da suinocultura;

Determinar o fator de diluição mínimo de digestato de UASB e de efluente de LA que permita melhor crescimento de microalgas;

Comparar o efeito do processo de separação das algas (centrifugação e floculação química) na composição da biomassa.

Quantificar o efeito de N e/ou P na composição proteica, carboidratos e lipídica das microalgas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 SUINOCULTURA

A produção de suínos no Brasil é uma atividade que ocupa posição de grande importância econômica, social e cultural (HIGARASHI, 2004). Além da importância econômica, existe a importância social envolvendo a suinocultura, constituindo-se em um importante meio de fixação do homem no campo, pois, emprega mão-de-obra familiar e é praticado, em sua maioria, em pequenas propriedades, gerando renda, reduzindo o êxodo rural e os problemas provenientes desta questão (RANZI, ANDRADE, 2004).

A carne suína é a principal fonte de proteína animal no mundo. Anualmente são produzidas 100 milhões de toneladas. A China responde por cerca da metade da produção mundial. O restante da produção é seguido pela União Européia (UE), Estados Unidos da América (EUA) e Brasil. Na última década, a participação do Brasil nas exportações saltou de 4% para 11% e o país se tornou o quarto maior produtor e exportador com 3% do mercado mundial (MARTINS, et al., 2010).

Conforme ABPA (2015), a expansão do consumo de carne suína está a pleno vapor, chegando a um consumo de 2,9 milhões de toneladas ao ano. No 1º trimestre de 2015 foram abatidas 9,17 milhões de cabeças de suínos. A Região Sul respondeu por 66,0% do abate nacional de suínos, seguida pelas Regiões Sudeste (18,7%), Centro-Oeste (14,1%), Nordeste (1,1%) e Norte (0,1%). Dentre os oito maiores estados produtores de suínos, Santa Catarina é aquele de menor superfície, o que lhe atribui um índice de concentração da produção muito grande em relação aos demais (IBGE, 2015).

No entanto, é importante garantir a lucratividade da atividade suinícola e a continuidade desse tipo de agronegócio que envolve diretamente, 150.000 pessoas em Santa Catarina. Não se pode esquecer que as áreas de risco de poluição causada pelos dejetos de suínos abrangem praticamente todas as regiões desse estado (SEGANFREDO, 2002).

2.1.1 Suinocultura e o Meio Ambiente

A produção de suínos é uma das atividades de maior impacto ambiental, considerada pelos órgãos de controle ambiental, como potencialmente e causadora de degradação ambiental, sendo enquadrada como tendo "grande potencial poluidor" (EMBRAPA 2004).

A suinocultura é reconhecidamente uma atividade de grande potencial poluidor, por produzir grandes quantidades de resíduos com altas cargas de nutrientes (fósforo e nitrogênio), matéria orgânica, sedimentos, patógenos, metais pesados (cobre e zinco utilizados nas rações como promotores de crescimento), hormônios e antibióticos (USEPA, 1999).

Um dos mais graves problemas ambientais ocasionados pela pecuária origina-se nas dificuldades de manejo dos dejetos produzidos com a crescente concentração geográfica da produção animal e a sua intensificação por meio de sistemas de confinamento. Os dejetos oriundos da criação intensiva são armazenados em esterqueiras ou lagoas de tratamento, onde produzem metano, amônia e outros gases que provocam odores desagradáveis e contribuem para o comprometimento da qualidade do ar. A suinocultura é uma exploração pecuária concentradora de dejetos animais, possuidores de alta carga poluidora para o solo, o ar e a água (MATOS, et al., 1997; GUIVANT, MIRANDA, 1999).

O manejo inadequado dos resíduos da suinocultura (extravasamento de esterqueiras, aplicação excessiva no solo) pode ocasionar a contaminação de rios (eutrofização), de lençóis subterrâneos (o aumento da concentração do íon nitrato), do solo (patógenos e excesso de nutrientes) e do ar (emissões gasosas) (KUNZ, et al., 2005).

O lançamento de efluentes suínos não tratados no solo, rios e lagos, constituem um risco potencial para o aparecimento ou recrudescimento de doenças, desconforto na população (proliferação de insetos e mau cheiro) e degradação dos recursos naturais. Em Santa Catarina, Estado com alta concentração de suínos e com 82% do sistema de captação de água baseado em mananciais superficiais e 15% baseado em lençóis subterrâneos, o nível de contaminação destes recursos hídricos foi considerado alarmante (90% das fontes de abastecimento, nas regiões produtoras de suínos, estavam contaminadas por coliformes fecais) (EMBRAPA, 2004).

A constituição química e orgânica dos dejetos é muito variável, assim sendo, as águas residuárias produzidas apresentam essa variação

de maneira mais acentuada, já que este é influenciado pelo manejo e a quantidade de água utilizada no processo. Porém, de maneira geral, os dejetos de suínos apresentam concentrações elevadas de demanda bioquímica de oxigênio, sólidos em suspensão e macronutrientes. (DARTORA et al., 1998).

A proporção de nitrogênio orgânico e amoniacal em dejetos de suínos pode variar em função do seu estado natural, apresentando proporções de 50% destas formas com variações de $\frac{1}{4}$ a $\frac{3}{4}$ em efluentes com mais de três dias. Contudo, após a mistura entre fezes e urinas (dejeito líquido), o nitrogênio contido na urina é transformado rapidamente em nitrogênio amoniacal. Onde na fase líquida o nitrogênio amoniacal (NH_3^+) representa entre 75 a 85% e o orgânico entre 10 a 5%, na fração sólida o nitrogênio orgânico representa de 15% a 10% (KONZEN, 2003).

Visando a qualidade do ar, os odores, com certeza, são os inconvenientes mais fortes, em virtude da fermentação da matéria orgânica contida nos dejetos, resultando na liberação de gás sulfídrico e a amônia que, além de poluírem o ar, tornam-se potencialmente tóxicos, quando acima de determinadas concentrações. Quando o problema está relacionado com lançamento em corpos hídricos, este torna-se maior, podendo causar desequilíbrio ecológico, devido à diminuição do oxigênio dissolvido na água e contaminação com elementos tóxicos (MACKIE, et al., 1998; ASSIS, 2004).

Todavia, quando os dejetos são aplicados ao solo ocorre à estimulação da atividade microbiana e as exigências de oxigênio por esses micro-organismos podem superar a difusão do oxigênio atmosférico, tornando o ambiente anaeróbio, de forma que a degradação da matéria orgânica não se completa, provocando a redução do pH e ocorrendo a produção de gases. Muito desses gases gerados (metano e oxido nitroso) são ocasionadores do efeito estufa (MATOS, et. al., 1997).

2.2 BIORREMEDIAÇÃO DE EFLUENTES COM MICROALGAS

Basicamente o tratamento de efluentes passa por quatro etapas, sendo o tratamento preliminar, visa reter os sólidos grosseiros. O tratamento primário é composto por processos de ordem física, em sua maioria por tanques de sedimentação, objetivando a remoção de sólidos sedimentáveis. No tratamento secundário destinam-se os processos biológicos, com objetivo principal de remoção da matéria orgânica, esta

é mediada por uma população mista de bactérias heterotróficas que utilizam o componente orgânico para energia e crescimento. O tratamento terciário pode ser empregado com a finalidade de remoção de nutrientes (N e P). Segundo Oswald (1988) o processo de tratamento terciário visa eliminar todos os íons inorgânicos, podendo ser realizado quimicamente ou biologicamente.

A história do uso comercial de culturas de microalgas se estende por cerca de 75 anos, na aplicação em tratamentos de águas residuárias e na produção de biomassa de diferentes espécies, como a *Chlorella* e *Dunaliella* (ABDEL-RAOUF, et al. 2012). Conforme De La Noue e De Pauw (1988) o biotratamento com microalgas se torna atraente devido sua capacidade de incorporação de nutrientes, como nitrogênio e fósforo, os quais causam eutrofização em corpos hídricos.

A biotecnologia utilizando microalgas tem sido bastante discutida (RICHMOND, 1986). A ficorremedição com emprego de microalgas tem sido tradicionalmente utilizada como tratamento terciário ou polimento final (MARTIN, 1986; OSWALD, 1988).

Diversas pesquisas tem relatado o emprego de águas residuárias de diferentes origens como fonte de nutrientes para o cultivo de microalgas, tais como: efluente suinícola (DE PAUW et al., 1978; DE PAUW et al., 1980; GROENEWEG, et al., 1980; DE LA NOÛE, BASSERES, 1989; GANTAR, 1991; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, et al., 2011; ABOU-SHANAB, 2013; JEONG, 2013), efluentes agroindustriais (CÒRDOBA, HERNÁNDEZ, 1995; GONZÁLEZ, et al., 1997; HERNÁNDEZ, et al, 2013) esgoto doméstico (TAM, WONG, 1989; TRAVIESO, et al., 1996, SINGH, THOMAS, 2012; PASSOS, et al., 2013; KINNUNEN, 2014), e efluente de laticínios (WANG, et al., 2010; UMMALYMA, SUKUMARAN, 2014).

Para González-Fernández et al. (2011), as microalgas são micro-organismos que proporcionam reciclagem de nutrientes, incorporando-os dentro de suas células. A proporção de nitrogênio presente em dejetos de suínos faz com que este substrato seja ideal para o cultivo de microalgas. A utilização de microalgas no tratamento terciário de águas residuárias estabilizadas oriundas da suinocultura é promissor, pois, conseguem crescer em diferentes diluições dos resíduos de suínos e mesmo sem diluição, com capacidade de tolerar altas concentrações de amônia (CANIZARES; DOMINGUEZ, 1993).

2.2.1 Remoção de Nitrogênio e Fósforo

De acordo com Richmond (1986), as culturas de microalgas oferecem uma solução excelente para tratamentos terciários e quaternários, devido à sua capacidade de usar amônia e fósforo inorgânico para o seu metabolismo e crescimento. E também a sua capacidade de biorremocão de metais pesados de águas residuárias (WILDE, BENEMANN, 1993; RICHARDS, MULLINS, 2013; PARK, 2013). No entanto, muitos dos micronutrientes são tóxicos em altas concentrações para a maioria das espécies de microalgas, podendo formar precipitados com os outros elementos essenciais e reduzindo a sua disponibilidade. Contudo, algumas estirpes de algas são particularmente tolerantes a íons metálicos (MEHTA, GAUR, 2005).

A importância na cultura de microalgas deriva do fato de que os processos de tratamento convencionais sofrem algumas desvantagens: a eficiência variável dependendo do nutriente a ser removido; oneroso para operar; os processos com tratamentos químicos muitas vezes levam a poluição secundária; a perda de valiosos nutrientes potenciais (N, P) (DE LA NOÛE, et al., 1992; GUTERSTAN, TODD, 1990; PHANG, 1990).

Muitos estudos demonstram o sucesso do uso de culturas de microalgas na remoção de nutrientes (N e P) chegando numa eficiência de 50,2 - 99,9% em condições ideais de crescimento (MARTIN, 1985; COLAK, KAYA, 1988; GANTAR, et al., 1991; LAU, et al., 1996; RASOUL-AMINI et al., 2014; HAN, et al., 2014).

Dentre as clorofíceas amplamente usadas para os estudos de remoção de nutrientes *Chlorella* spp. tem sido utilizada em vários experimentos e demonstrou ser eficaz na eliminação de nitrogênio e fósforo a partir de diferentes efluentes e variadas concentrações iniciais. A eficiência de remoção de N e P a partir do crescimento de *Chlorella* spp. pode variar de 8 a 100%. Estudos recentes confirmam também que *C. vulgaris* tem eficiência de remoção de nutrientes maior do que a de *Chlorella kessleri*, ao comparar suas performances em meios artificiais. Em alguns estudos, *Chlorella* spp. tem eficiência de remoção de nitrogênio de 23-100%, enquanto a eficiência de remoção de fósforo é de 20-100% (GONZÁLEZ, et al., 1997; ASLAN, KAPDAN, 2006; KHAN YOSHIDA, 2008; RUIZ-MARIN, et al., 2010; WANG, 2010; CAI, et al., 2013).

2.2.2 Assimilação de N e P

Depois do carbono, além do hidrogênio e oxigênio, o nitrogênio é quantitativamente o elemento mais importante que contribui para a massa seca de células de microalgas, o que representa de 1 a 13% do peso seco (ALCAINE, 2010; PEREZ-GARCIA, et al. 2011).

Microalgas são capazes de assimilar uma grande variedade de fontes de nitrogênio, principalmente de íons amônio (NH_4^+) e nitrato (NO_3^-), e ureia, bem como extrato de levedura, peptona, aminoácidos, e purinas (CHEN, CHEN, 2006).

2.2.2.1 Assimilação do Íon Amônio

O nitrogênio amoniacal é a fonte de nitrogênio mais utilizada pelas microalgas, sendo a fonte mais energeticamente eficiente, uma vez que é necessária menos energia para a sua absorção (GROBBERLAAR, 2004).

Sob condições autotróficas e heterotróficas, o íon amônio é transportado através das membranas por um grupo de proteínas que pertencem à família do transportador de amônio (AMT), um grupo de proteínas evolutivamente relacionadas comumente encontrados algas (WILHELM, 2006). O íon amônio está presente em todos os compartimentos das células. A sua concentração altera, dependendo de vários fatores, as diferenças no pH e do potencial elétrico entre os compartimentos. Em compartimentos onde amônio não é metabolizado, tais como o vacúolo, sua concentração pode aproximar-se do seu valor de equilíbrio (PEREZ-GARCIA, et al. 2011).

2.2.2.2 Assimilação dos Íons Nitrato e Nitrito

O nitrato é a forma predominante de nitrogênio disponível. É reduzido à nitrogênio amoniacal antes de estar disponível para a assimilação. Os passos de transporte consistem na entrada do nitrato para dentro da célula e nitrito para o cloroplasto. O primeiro passo de redução de nitrato para nitrito ocorre no citosol e é catalisada pela enzima nitrato redutase (NR), e o segundo passo de redução a partir de nitrito de amônio no cloroplasto é catalisada pela nitrito redutase NIR (YANG, et al., 2000; FERNANDEZ, GALVAN, 2008).

As variáveis ambientais afetam a assimilação do nitrato. A irradiância pode ter um efeito negativo sobre a assimilação de qualquer nutriente, pois as algas assimilam mais rapidamente na presença de luz. A luz reduz cofatores como flavoproteínas, ferredoxinas e nucleotídeos de piridina, que se tornam como doadores de elétrons para nitrato e a redução de nitrito. Na maioria das microalgas, a nitrato-redutase está totalmente expressa em células em crescimento (MORRIS, 1974).

2.2.2.3 Assimilação de Uréia e Nitrogênio Orgânico

O consumo de nitrogênio orgânico por microalgas ocorre sob condições autotróficas e heterotróficas. Todos os substratos nitrogenados orgânicos capazes de suportar o crescimento sob condições de luz também são capazes de fazê-lo no escuro (PEREZ-GARCIA, et al. 2011). Também é possível utilizar uréia como a única fonte de nitrogênio. O nitrogênio geralmente é hidrolisado em nitrogênio amoniacal e bicarbonato antes de ser incorporado nas células. Nas microalgas, duas enzimas podem metabolizar a uréia, uréase e uréia amidolase, também conhecida como uréia carboxilase, (UALse) (RICHMOND, 1986).

2.2.2.4 Assimilação de Fósforo

O fósforo é um macronutriente requerido pelas microalgas, sendo necessário para todos os organismos e está concentrados nos ácidos nucleicos, membranas lipídicas, e moléculas de ATP das células (PECCIA, 2013). As formas de fósforo: PO_4^{3-} , H_2PO_4^- e $\text{H}_2\text{PO}_4^{2-}$, são as fontes inorgânicas mais importantes para as algas (ALCAINE, 2010).

O fósforo intracelular pode ser utilizado pelas microalgas para um número de processos. As duas vias principais são a produção de polifosfato e a produção de substâncias tais como fosfolipídios ou RNA, que são necessários para o metabolismo. Isto significa que a quantidade de fosfolipídios disponível para a produção de polifosfato é dependente da velocidade de absorção de fosfato através da parede da célula e a subsequente utilização de fósforo para o crescimento (POWELL, 2009).

A taxa de crescimento de microalgas aumenta com o aumento da concentração de P, e o inverso ocorre quando a concentração é muito

elevada, o que pode ser devido a mudança da relação N/P que inibe a divisão celular de microalgas (WEN, 2009).

O fósforo também afeta a absorção de carbono e as atividades enzimáticas. O aumento da atividade da enzima ocorre concomitantemente com o crescimento da cultura e a utilização fotoquímica de luz. Em geral, o estresse em microalgas e cianobactérias pelo composto resultaram em aumento do teor de carboidrato intracelular (GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, BALLESTEROS, 2012).

Na Figura 1 apresenta três esquemas diferentes quanto à assimilação de fósforo.

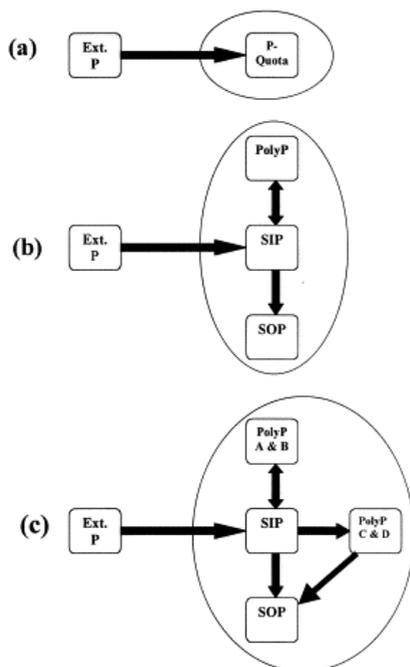


Figura 1 - Representação esquemática para três modelos de alternativas de transporte e assimilação de P. A) modelo convencional contendo um único nutriente; B) modelo contendo diferentes tipos de fósforo, separados em inorgânico solúvel (SIP), polifosfato (PoliP) e P orgânico estrutural e solúvel (SOP); C) Esquema modificado a partir do proposto por Miyachi et al.(1964), com duas alternativas distintas, a partir dos quais um SOP é sintetizado diretamente.

Fonte: John e Flynn, 2000.

2.3 REÚSO DE ÁGUA PROVENIENTE DA SUINOCULTURA

Normalmente não se tem o conhecimento do custo da água numa criação de animais e para calculá-lo é necessário que haja a medição do consumo. A grande razão pela falta do conhecimento do custo se deve ao entendimento de que o custo é inexistente e baixo. O custo da água é comumente usado como um indicador para avaliar a viabilidade econômica do uso e o conhecimento deste possibilita a correta gestão financeira e técnica da criação, sendo que o custo está intimamente relacionado as condições locais, dessa forma não se pode ter relações diretas entre o custo e as condições hidrológicas (FAO, 1996; EMBRAPA, 2014).

A agricultura utiliza maior quantidade de água e pode tolerar águas de qualidade mais baixa que a indústria e o uso doméstico (AYERS, WESTCOT 1987). Em um sistema de criação de suínos, a quantidade diária de efluentes gerada depende, dentre outros fatores, do número e da idade dos animais e, principalmente, da quantidade de água gasta na higienização das baias (OLIVEIRA et. al., 2000).

Cerca de 70% de água consumida no Brasil é destinada à agricultura e até o final desta década este índice deve chegar aos 80%. Para isso é necessário o reúso consciente e planejado de águas de baixa qualidade, ou seja, provenientes de drenagem agrícola, águas salobras, de chuva e esgotos domésticos e agroindustriais (HESPANHOL, 2003).

Na suinocultura, além do consumo de água para dessedentação dos animais e higienização das baias de criação, as águas residuárias geradas possuem grande potencial poluente. A produção diária de águas residuárias varia de 12 a 15 L por suíno, sendo que elas contêm matéria orgânica, nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, sódio, magnésio, manganês, ferro, zinco, cobre e outros elementos incluídos nas dietas dos animais (MATOS, 2006).

A reutilização de águas residuárias na sua maioria permite: o uso sustentável dos recursos hídricos; minimiza a poluição hídrica nos mananciais; estimula o uso racional de águas de boa qualidade; permite evitar a tendência de erosão do solo e processos de desertificação; possibilita a economia de dispêndios com fertilizantes e matéria orgânica; provoca aumento da produtividade agrícola; gera aumento da produção de alimentos; e permite maximizar a infraestrutura de sistemas de abastecimento de água e tratamento de esgotos pela utilização múltipla da água diminuída (BERNARDI, 2003; KLAUTAU; GONÇALVES, 2007).

2.4 LEGISLAÇÃO AMBIENTAL

Como citado anteriormente, a atividade da suinocultura é considerada efetivamente degradadora do meio ambiente. Dos vários problemas que o processo de concentração e intensificação da produção de suínos provoca está a falta de área onde o dejetos produzido possa ser lançado. Estas áreas têm diminuído à proporção que os produtores abdicam a diversificação de atividades, e os que mantem lavouras preferem fertilizantes químicos, devido o seu preço ou pela menor carga de trabalho (GUIVANT; MIRANDA, 1999).

Nos projetos de lagoas e/ou esterqueiras deve ser previsto um período mínimo de armazenamento de 180 dias, segundo Instrução Normativa IN-11 da FATMA (Fundação do Meio Ambiente) de 14/11/2014. O tempo de armazenamento de cada esterqueira ou lagoa deve ser equivalente ao intervalo entre retiradas do dejetos para distribuição nas áreas agrícolas licenciadas para aplicação do fertilizante orgânico. Desde que as esterqueiras sejam impermeabilizadas evitando infiltrações no solo e prevenindo risco de poluição das fontes de água.

Além disso, a regulação ambiental define uma série de padrões de armazenamento e uso dos dejetos. Dessa forma os volumes dos dejetos produzidos são calculados pela capacidade máxima das pocilgas e recomenda-se a instalação de sistemas de calhas e cisternas, visando o aproveitamento das águas pluviais para uso nas pocilgas (AFONSO, 2013).

Conforme a Lei Federal nº 9.605/98, Lei dos crimes ambientais, que dispõe sobre as sanções penais e administrativas derivadas de condutas e atividades lesivas ao meio ambiente, através do art. 60 estabelece que obras ou serviços potencialmente poluidores, como a suinocultura, se instalados ou operados indevidamente é caracterizado como crime ambiental.

A resolução do CONAMA nº 430/2011, que dispõe sobre condições e padrões de lançamento de efluentes, estabelece que os valores máximos admissíveis de nitrogênio amoniacal total é de 20,0 mg L⁻¹. Consoante à resolução do CONAMA nº 357/05, que estabelece a classificação dos corpos de água e as diretrizes ambientais para o seu enquadramento, as condições exigíveis para águas doces de classes 1 e 2, quando o nitrogênio for fator limitante para eutrofização, o valor de nitrogênio total (após oxidação) não deverá ultrapassar 1,27 mg L⁻¹ para ambientes lênticos e 2,18 mg L⁻¹ para ambientes lóticos, na vazão de referência.

No que se refere ao fósforo, em águas doces de classe 3, maioria dos mananciais presente na região no Oeste Catarinense, a concentração de fósforo total para ambiente lêntico deve ser de 0,05 mg L⁻¹ e para ambiente intermediário de 0,075 mg L⁻¹. Para as concentrações de nitrato e nitrito os valores máximos devem ser de 10,0 mg L⁻¹ e 1,0 mg N L⁻¹, respectivamente.

Segundo Lei nº 14.675/09 do Estado de Santa Catarina, que institui o Código Estadual do Meio Ambiente, no que diz respeito aos lançamentos em trechos de lagoas, lagunas e estuários, o valor limite de fósforo total é de 4,0 mg L⁻¹, sendo que o efluente deve atender aos valores de concentração estabelecidos ou os sistemas de tratamento, que devem operar com a eficiência mínima de 75% na remoção de fósforo, desde que não altere as características dos corpos de água previstas em lei.

2.5 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DAS MICROALGAS

As microalgas têm uma vasta gama de aplicações em diferentes indústrias. As áreas mais pesquisadas atualmente são indústrias de biocombustível, farmacêutica (cosméticos) e nutrição humana e animal, devido à sua composição química (THAJUDDIN, SUBRAMANIAN, 2005; SPOLAORE, et al., 2006; PRIYADARSHANI, RATH, 2012; BILLER, ROSS 2014; GUO et al., 2014).

Dessa forma, as microalgas podem apresentar substâncias celulares de interesse tais como, lipídios, carboidratos, proteínas e pigmentos com composições e concentrações variáveis, o que reflete a natureza do organismo, a influência das condições e o estado fisiológico da cultura (TOKUŞOĞLU, ÜUNAL, 2003; ZEPKA, 2008).

2.6 BIOSÍNTESE DE LIPÍDIOS, CARBOIDRATOS E PROTEÍNAS.

Os carboidratos e lipídios são os dois principais compostos de carbono e de armazenamento de energia que aparecem em células de microalgas, particularmente em resposta às condições de estresse. Para a síntese de lipídios e carboidratos, quatro processos são envolvidos no metabolismo: ACCase catalisa o primeiro passo para a conversão irreversível da acetil-CoA para malonil-CoA na síntese de ácido graxo; AGPase catalisa o passo limitante da velocidade da síntese do carboidrato a partir da glucose-1-fosfato e ATP em ADP-glucose e

pirofosfato e a β -amilase e iso-amilase desempenham papéis críticos na hidrólise dos grânulos de amido que hidrolisam as ligações 1,4- e 1,6-glicosídicas, respectivamente (SMITH, 2011; CRONAN; WALDROP, 2002; BALL; MORELL, 2003; TONG, 2005; ZEEMAN, et al., 2010; LIU; BENNING; 2013).

Na biossíntese de lipídios, juntamente com os carboidratos e proteínas, são envolvidas reações enzimáticas (Figura 2), que podem ser divididas em quatro partes: (I) Ocorre as reações fotossintéticas, incluindo a clara e a escura, onde a clorofila transforma a energia luminosa em ATP e NADPH, que podem então ser usados para converter CO_2 em gliceraldeído 3-fosfato (G3P); (II) A biossíntese de carboidratos: parte da G3P é utilizada para produzir os carboidratos, tais como glicose e amido através de uma série de reações; (III) O processo de formação de proteína: parte de G3P é transformado em piruvato e acetil-CoA, através da ação da glicólise com a catálise de piruvato desidrogenase; (IV) A acumulação de lipídios: catalisada por acetil-CoA carboxilase (ACCase), a acetil-CoA é convertida para malonil-CoA, seguido do alongamento da cadeia de ácidos graxos depois de ciclos contínuos. A acumulação de lipídios é atribuída aos ácidos graxos e G3P (JIAN-MING, et al., 2010).

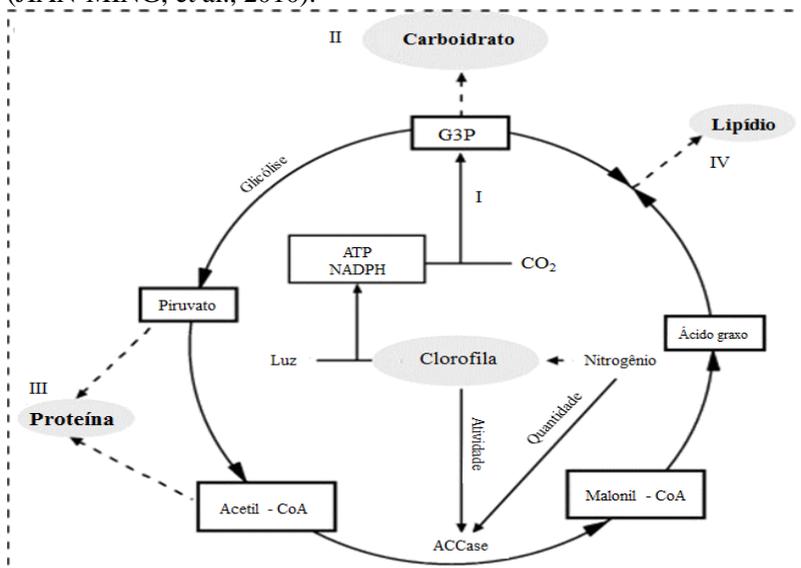


Figura 2 - Rotina de biossíntese de componentes bioquímicos para *Chlorella vulgaris*.

Fonte: Jian-Ming et al., (2010).

Em geral, a energia necessária para a síntese de carboidratos é dominada por a energia necessária para a redução do carbono pelo Ciclo de Calvin-Benson. No total, a energia necessária para a síntese de amido é de 4,2 ATP/carbono e 2 NADPH/carbono. Assim, em uma base por carbono, o ATP e NADPH, requisitos para a síntese de amido, são 50% e 45% inferiores, respectivamente, do que as requeridas para a síntese de TAG, que requer para a síntese 6,3 ATP/carbono e 2,9 NADPH/carbono (SUBRAMANIAN, et al., 2013). Dessa forma o gasto energético para armazenamento de energia é mais vantajoso na forma de carboidratos. Entretanto, quando os lipídios são oxidados através da via β -oxidação e do ciclo do ácido cítrico, a recuperação de energia é cerca de 6,6 equivalentes de ATP/C. Para a oxidação da glicose através da glicólise e do ciclo de ácido cítrico, a recuperação de energia é de 5 equivalentes de ATP/carbono. Assim, a recuperação de energia a partir da oxidação de lipídios é 32% maior do que a glicose (carboidratos) de oxidação (BUCHANNAN, et al., 2000).

As microalgas são capazes de melhorar o conteúdo nutricional de alimentos convencionais e, portanto, afetam positivamente a saúde dos seres humanos e animais. Isto é devido à sua composição química original (SPOLAORE, et al., 2006). Na Tabela 1 apresenta uma comparação entre as composições gerais de fontes de alimentos usadas para alimentação humana com diferentes espécies de microalgas.

Tabela 1 - Composição geral de diferentes fontes de alimentos humanos e algas (% da matéria seca).

Produto/Microalga	Carboidratos	Lipídios	Proteínas
Carne	1	34	43
Leite	38	34	26
Arroz	77	2	8
Soja	30	20	30
<i>Anabaena cylindrica</i>	25-30	4-7	43-56
<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	23	3	62
<i>Arthrospira maxima</i>	13-16	6-7	60-71
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	17	21	48
<i>Chlorella vulgaris</i>	12-17	14-22	51-58
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	20-70	13-15	20-60
<i>Chlorella minutissima</i>	14-42	31-57	9-24
<i>Chlorella emersonii</i>	11-41	29-63	28-32
<i>Dunaliella salina</i>	32	6	57
<i>Euglena gracilis</i>	14-18	6	39-61
<i>Nannochloropsis</i> sp.	5-17	9-62	23-59
<i>Porphyridium cruentum</i>	40-57	9-14	28-39
<i>Protothecoides auxenochlorella</i>	41-52	11-23	36-38
<i>Scenedesmus obliquus</i>	10-17	12-14	13-16
<i>Spirogyra</i> sp.	33-64	11-21	6-20
<i>Spirulina maxima</i>	13-16	6-7	60-71
<i>Spirulina platensis</i>	8-14	4-9	43-63
<i>Synechococcus</i> sp.	15	11	63

Fonte: Illman, et al. 2000; Becker, 2004; Hu, Gao; 2006; Becker, 2007; Bruton, et al., 2009; Zhang, et al., 2014

A composição química celular das microalgas pode sofrer alterações conforme variações: físicas como modificações no pH (TARALDSVIK; MYKLESTAD, 2000; KHALIL, et al., 2010) luz (CARVALHO, et al., 2009; FERNANDES, et al., 2010; WAHIDIN, et al., 2013; NOGUEIRA, et al., 2014; GEORGE, et al., 2014) e temperatura (DE OLIVEIRA, et al., 1999; RENAUD, et al., 2002; CONVERTI, et al., 2009; ROLEDA, et al., 2013) e químicas (diferentes

concentrações de N e P) (CHU, et al., 2013; GUO, et al., 2014; ADAMS; BUGBEE, 2014; ROOPNARAIN, et al., 2014; SINGH, et al., 2014; WUA, H.; MIAO, 2014; CHU, et al., 2014), salinas (AN, et al., 2013), íons metálicos (LIU, et al., 2008; RUANGSOMBOON, et al., 2013) e regimes de cultivos autotrófico-heterotrófico (LU, et al., 2010; GAO, et al.; 2010; MSANNE, et al., 2012).

A alta concentração de lipídios é geralmente inversamente proporcional com a produtividade de biomassa. Se a alta velocidade de crescimento e teor de lipídios fossem combinados, as microalgas se tornaria uma matéria-prima promissora para a produção de biocombustíveis, especialmente para biodiesel (CHEN, et al., 2015). O acúmulo de lipídios em microalgas, especialmente TAGs (triacilgliceróis), sob condições de estresse é considerado um mecanismo adaptativo, uma vez que estes compostos podem servir como compostos de energia/carbono, além de serem um importante aceptor de elétrons (LIU et al., 2012).

A composição lipídica contém principalmente ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poli-insaturados composto por 12-22 átomos de carbono (MOSER, 2014), sendo os ácidos graxos saturados preferíveis para a produção de biodiesel (ABDEL BAKY, 2012). As microalgas, quando submetidas à limitação de nutrientes, alteram a sua composição celular, como por exemplo, a limitação de nitrogênio pode levar a uma diminuição no teor de proteína e um aumento relativo em carboidratos e/ou armazenamento de lipídios (GIORDANO, et al., 2001; DEAN, et al., 2010). Entretanto, a limitação de nitrogênio pode resultar numa diminuição na velocidade de crescimento e eficiência fotossintética (PARKHILL, et al., 2001).

Os carboidratos são acumulados nos plastídios como materiais de reserva (amido), e se tornam o principal componente da parede celular (celulose, pectina, e polissacarídeos sulfatados). No entanto, a composição e o metabolismo dos carboidratos (amido e celulose) em microalgas podem diferir significativamente de espécie para espécie (RANGEL-YAGUI, et al., 2004; RISMANI-YAZDI, et al., 2011).

As vias metabólicas de moléculas ricas em carboidratos e lipídios (energia) estão intensamente ligadas. Alguns estudos demonstraram que existe uma competição entre o lipídio e a síntese de amido porque o precursor principal de triacilgliceróis (TAG) é a síntese de glicerol-3-fosfato, que é produzido através do catabolismo da glicose (glicólise) (HO, et al., 2012). Assim é vital compreender e manipular os metabolismos relacionados, para alcançar o acúmulo de carboidratos microalgal, através de estratégias como o aumento de armazenamento

de polissacarídeos, dessa forma diminuindo a degradação do amido (RADAKOVITS, et al., 2010).

A síntese de proteínas é o processo mais complicado em todas as células. O processo de síntese da proteína é composto principalmente da síntese de aminoácidos, o peptídeo de condensação de reação em cadeia (transcrição e tradução) e modificação da proteína primária. Velocidade de síntese de ácidos aminados pode ser ajustado pela alteração nos níveis de expressão das enzimas envolvidas. A velocidade de síntese das enzimas envolvidas pode ser alterado mudando as atividades do gene relacionado (MERRICK, 1992).

2.6.1 Usos da biomassa

Devido às microalgas acumularem grandes quantidades de compostos ricos em energia (lipídios e carboidratos) em condições favoráveis, esses compostos podem ser convertidos em biodiesel (lipídios) e bioetanol (carboidrato).

Os biocombustíveis avançados, tais como os obtidos a partir de microalgas, são amplamente desejáveis como opções para atingir as metas de incorporação de energias renováveis e fontes de combustíveis não-alimentares para o setor de transporte, superando os problemas de uso do solo, devido à produção de biocombustível (RIBEIRO, et al., 2015). Os biocombustíveis, que são produzidos a partir de biomassa, atualmente são vistos como uma das alternativas energéticas mais viáveis para reduzir a nossa dependência dos combustíveis fósseis, apresentando várias vantagens sobre os mesmos, incluindo a sustentabilidade, não toxicidade, biodegradabilidade, e extremamente baixas emissões de CO₂ (LAM; LEE, 2012).

O biodiesel é um potencial substituto para o combustível diesel convencional. Este biocombustível pode ser obtido a partir de diversas matérias-primas, por um processo chamado transesterificação ou esterificação. A reação de transesterificação pode ser realizada utilizando, processos enzimáticos, catalisada por ácido ou alcalino-catalisada (FUKUDA, et al., 2001; VASUDEVAN; BRIGGS, 2008; XUAN, et al., 2009)

A aplicação de microalgas produtoras de carboidratos gera uma fonte de biomassa alternativa para a produção de etanol. A produção de etanol a partir da biomassa por fermentação de carboidratos é composta por dois processos, a sacarificação e fermentação, sem que a

sacarificação requeira enzimas para hidrolisar os carboidratos antes da fermentação (MATSUMOTO, 2003).

As microalgas têm a genética, o metabolismo e características enzimáticas para fotoprodução de hidrogênio. A sua capacidade de síntese está ligada à exposição do cultivo de microalgas a determinadas condições. A produção fotobiológica de hidrogênio pode ser aumentada de acordo com o teor de carbono da biomassa (BENEMANN, 1997; SAKURAI; 2010; BRENNAN; OWENDE. 2010). Em condições anaeróbicas, as microalgas eucarióticas produzem hidrogênio como doador de elétrons no processo fixação de CO₂. Durante a fotossíntese, as microalgas convertem moléculas de água em íons de hidrogênio (H⁺) e oxigênio. Os íons hidrogênio são, então, convertidos em H₂ pela enzima hidrogenase (GHIRARDI, 2000; HAHN, et al., 2004; LEE, et al., 2004).

A qualidade nutricional da proteína é determinada pelo seu perfil de aminoácidos, a maioria de microalgas, o perfil de aminoácidos é comparável ao perfil padrão para a nutrição humana, proposto pela OMS e FAO, porque as células de microalgas têm capacidade de sintetizar os aminoácidos essenciais e não-essenciais (SAFI, et al., 2013; SAFI, et al., 2014). As microalgas em geral possuem mais de 54 oligoelementos, necessários para as funções fisiológicas do corpo humano, em quantidades superiores daqueles às encontradas em legumes e outras plantas terrestres (DHARGALKAR, VERLECAR, 2009).

Muitas microalgas são utilizadas diversamente na aquicultura, mas suas principais aplicações estão relacionadas à nutrição, sendo um componente único ou como um aditivo alimentar para o suprimento de nutrientes, devido o alto teor de proteínas, vitaminas e antioxidantes. Isso os torna uma fonte de alimento essencial na criação de todas as fases de moluscos bivalves marinhos (mariscos, ostras, vieiras), estágios larvais de alguns gastrópodes marinhos, larvas de várias espécies de peixes e camarão marinho e o zooplâncton (MULLER-FEUGA, 2000).

Para além da importância em aquicultura, pesquisas demonstraram que o seu uso pode substituir até 50% das dietas de proteína em rações existentes de uso animal (SPOLAORE, et al., 2006). Ginzberg et al. (2000) estudaram o papel das microalgas, como suplemento alimentar no metabolismo de frango e verificaram que o colesterol de gema de ovo foi reduzido em cerca de 10%. Além disso, um estudo sobre a adição de microalgas na suplementação alimentar em suínos relatou que houve um ganho de peso corporal de até 10%, numa base diária e ainda concluiu que podem ser utilizadas como aditivo em

alimentos para suínos, sendo benéficas tanto para o controle de DDI (distúrbios por deficiência de iodo) quanto para a melhoria na produção de suíno (HE, et al., 2002).

O uso de microalgas com a finalidade para a nutrição humana e animal tem sido amplamente reportado. Por apresentarem atividade antioxidante, ajudam a controlar o peso corporal, redução de sintomas em sujeitos com hipertensão ligeira à moderada, reduz a absorção de lipídios e impede a hiperlipidemia e aterosclerose e ainda possuem propriedades antivirais, anticancerígenas e antiulcerativas (NOMOTO, et al., 1983; HASEGAWA, et al., 1995; TANAKA, et al., 1997; MERCHANT, et al., 2000; MIRANDA, et al., 2000; HIDAKA, et al., 2004; CHERNG; SHIH, 2005).

3 MATERIAL E METODOS

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Análises Físico-Químicas, setor de Experimentação e Análise Ambientais da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Suínos e Aves, localizada em Concórdia/SC. Foram realizados ensaios de produção de biomassa microalgal, consumo de substrato e avaliação de proteínas, carboidratos e lipídios presentes na biomassa.

3.1 ESTAÇÃO DE TRATAMENTOS DE DEJETOS SUÍNOS (ETDS)

O efluente utilizado para o cultivo de microalgas foi obtido da Estação de Tratamento de Dejetos Suínos (ETDS) da Embrapa Suínos e Aves, localizada no município de Concórdia/SC.

Na Figura 3 é representado o fluxograma do processo de tratamento de efluentes. Na estação de tratamento, o dejetos proveniente da atividade suinícola é recebido e armazenado em um tanque com volume de aproximadamente 6 m³. A seguir, o efluente passa por uma peneira de escovas rotativas (1), que realiza a separação de sólidos grosseiros (> 2 mm); posteriormente, o dejetos segue por gravidade até o tanque de equalização (2), onde ocorre a homogeneização do material residual. Após a passagem pelo tanque de equalização, o dejetos é bombeado para o flotodecantador onde ocorre um tratamento físico-químico, realizado pela adição de agentes coagulantes/floculantes (tanino e poliácridamida). O sobrenadante desta etapa é conduzido por gravidade até o reator biológico anaeróbico com manta de lodo de fluxo ascendente – Upflow Anaerobic Sludge Blanket (UASB) (4), onde os sólidos orgânicos suspensos são quebrados, biodegradados e digeridos através de uma transformação anaeróbica, resultando na produção de biogás e no crescimento da biomassa bacteriana. Os gases gerados no processo são armazenados e queimados na Câmara de Biogás. O efluente do reator UASB alimenta o Lodos Ativados (LA) (5), cuja capacidade é de 80 m³, e seu funcionamento é baseado no processo de lodos ativados, tendo por finalidade degradar biologicamente a matéria orgânica remanescente sob condições aeróbicas e promover a oxidação do nitrogênio amoniacal. Após a passagem pelo LA, o efluente é deslocado para o Decantador Secundário (DS) (6), onde sobrevém a separação do sólido-líquido, sendo que ao fundo o lodo é depositado (7) e a fração líquida tratada (8) segue para o corpo receptor (PEREIRA et al., 2010; DELABARY, 2011).

Os pontos P1 e P2 representam a saída do UASB (biodigestor) e do decantador secundário (LA), respectivamente onde foi coletado o efluente e realizados posteriormente os testes. Os mesmos foram armazenados a uma temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

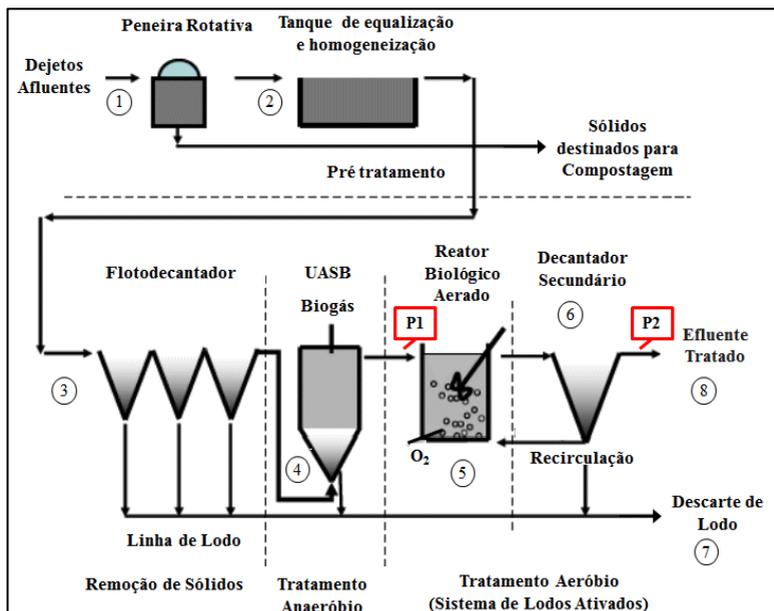


Figura 3 - Fluxograma do processo de tratamento de efluentes na ETDS da Embrapa Suínos e Aves.

Fonte: Adaptado de Pereira et al., 2010.

3.2 OBTENÇÃO DO INÓCULO DE MICROALGAS

O inóculo de microalgas foi coletado na lagoa facultativa do sistema de tratamento de dejetos suínos da Embrapa Suínos e Aves, localizada no município de Concórdia/SC. Primeiramente o inóculo foi submetido a um peneiramento em tela de aço com abertura de $0,088\text{ mm}$ para retenção de material grosseiro. Em seguida passou por um período de aclimação em um fotobiorreator. Como se tratava de uma cultura natural foi verificado a predominância de várias espécies de microalgas. Como o objetivo era a obtenção de uma cultura que apresentasse maior resiliência, o meio foi alimentado com elevadas concentrações de

efluente (10% v/v de sobrenadante UASB), a fim de fazer uma seleção artificial.

3.3 CULTIVO DE MICROALGAS

O presente estudo foi dividido em duas etapas: escala laboratorial, a fim de simular o processo de fitorremediação; e em escala piloto, com o propósito de obtenção de biomassa para avaliação da composição química celular.

Os volumes máximos de efluentes utilizados para cada sistema foram previamente testados a fim de não provocar inibição pelo substrato e crescimento das microalgas. Dessa forma foram testadas diferentes concentrações para os efluentes em frascos erlenmeyers de 0,25 L, com fotoperíodo de 12 horas com agitação magnética. Os volumes de cada ensaio estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2 - Relações das diluições para cada ensaio.

Efluente	% (v/v)	Inóculo % (v/v)	Água destilada % (v/v)
UASB	2	30	68
	4	30	66
	6	30	64
	8	30	62
LA	10	30	60
	20	30	50
	30	30	40
	40	30	30
	50	30	20
	60	30	10

3.3.1 Escala laboratorial

As microalgas foram cultivadas fototroficamente (fotoperíodo de 12 h) em batelada, sob condições não estéreis, em quatro recipientes

idênticos de vidro e de forma cilíndrica com 18,6 cm de diâmetro interno, 60 cm de altura, capacidade máxima de 16,45 L espessura do vidro de 0,5 cm, sendo que o experimento teve um volume útil de 12 L em cada cilindro. Cada FBR continha agitação mecânica constantemente, fornecida por um agitador de aquário “*aquarium pump*” (S300, Sarlobetter®, BR). Os FBR’s foram iluminados por uma fonte luminosa fornecida por três lâmpadas fluorescentes tipo luz do dia, distribuídas uniformemente, com potencia de 40 W ($44,8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) temperatura de 23 °C. Os ensaios foram realizados em triplicata.

3.3.2 Escala piloto

Para melhor simular as condições de escala de campo, experiências também foram realizadas dentro de uma casa de vegetação. Neste caso, foi utilizado reservatório circular de 500L (Ø 121,2 cm e altura 58,4 cm) (Figura 4) sob a luz natural (variação de 90-733 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e temperatura ambiente, variando de 15,4-48 °C. Esses reservatórios foram mantidos sob agitação contínua (Bombetec, BMX 1.0 DR).



Figura 4 - Reator utilizado para cultivo de microalgas sob condições naturais.

Para os ensaios da composição química da biomassa, após o processo de centrifugação, o cultivo foi realizado utilizando efluente do UASB (6% v/v), por um período de 4 dias. No entanto, para os experimentos de privação de nutrientes, o consórcio foi previamente cultivada durante 4 dias no mesmo meio de cultura (UASB 6% v/v) e em seguida centrifugou-se. No cultivo livre de nutrientes a biomassa foi ressuspendida somente em água. Nos ensaios privando um nutriente (N ou P), as células foram suspensas em água e utilizou-se concentrações

iniciais de N e P conforme Tabela 33. Além disso, foram feitas reinjeções a fim de o cultivo permanecer com as concentrações iniciais.

Tabela 3 - As concentrações de nitrato e fosfato nos meios de cultura.

Concentrações iniciais (mg L ⁻¹)	Deficientes N e P	Deficiente N	Deficiente P
N (NO ₃ ⁻ -N)	0	0	50
P (PO ₄ ³⁻ -P)	0	10	0

3.3.3 Monitoramento da comunidade microalgal

A verificação dos micro-organismos envolvido no processo foi acompanhada com um microscópio Nikon Eclipse E200 equipado com uma câmera Moticam 1000 1.3 MP.

3.4 MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

O método de coloração com o Vermelho do Nilo (Nile Red) foi usado para visualizar os lipídios intracelulares (NATUNEN, et al., 2014). O Nile Red (9-dietilamino-5H-benzo [α] phenoxa-fenoxazina-5-ona) e DMSO (dimetil sulfóxido) foram adquiridos da Sigma-Aldrich. Alíquotas (2 mL) de amostras foram centrifugadas a 3.500 xg (Scilogex, D3024R) durante 1 minuto, o pellet celular foi novamente ressuspensão em 450 μ L com água ultrapura. Em seguida, foi adicionado 50 μ L de DMSO. Após a adição de 6 μ L de solução de Nile Red (0,25 mg mL⁻¹ em DMSO), as amostras foram incubadas no escuro à temperatura ambiente durante 30 minutos, e imediatamente observadas por microscopia de fluorescência (Zeiss, AxioObserver.Z1).

3.5 SEPARAÇÃO DA BIOMASSA

Para avaliar possíveis alterações na composição química celular como resultado de abordagens de colheita, foram avaliados dois métodos convencionais. A biomassa de microalgas cultivadas no reservatório 500L foi separada por centrifugação (EVODOS, T10, Holanda) ou floculação química utilizando tanino, polímero orgânico catiónico segundo Mezzari, et al., (2014). Após a separação por

centrifugação e floculação química secou-se a biomassa num liofilizador (JJ Científica LJI-030, Brasil).

3.6 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS

Na Figura 5 descreve as matrizes e suas respectivas análises.

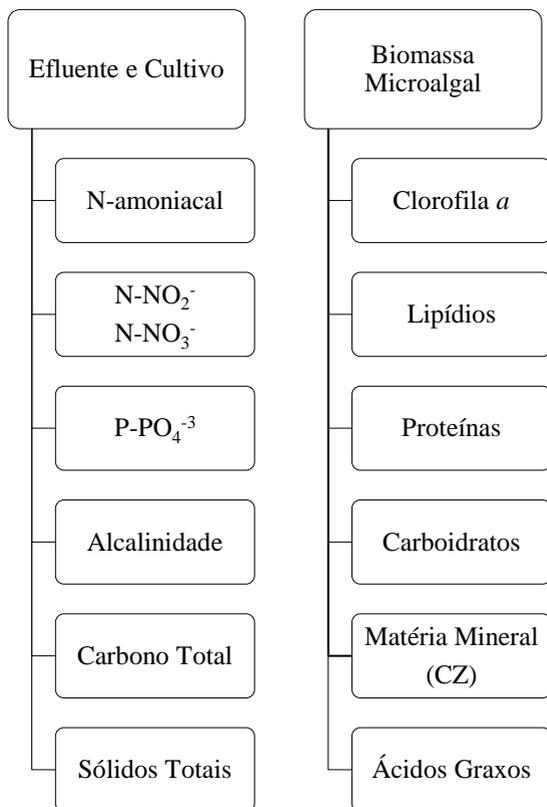


Figura 5 – Matriz e respectivas análises

3.6.1 Determinação de nitrogênio amoniacal

A análise de nitrogênio amoniacal total foi realizada com eletrodo de íon seletivo da marca Thermo, segundo APHA (2012), pelo

método potenciométrico. A concentração de amônia livre foi calculada segundo Anthonisen, et al. (1976) (Equação 1):

$$[NH_3] = \frac{17}{14} \left(\frac{[Total\ de\ am\^onia\ como\ N] \times 10^{pH}}{e^{\left(\frac{6344}{(273+C)}\right)} + 10^{pH}} \right) \quad (\text{Equa\c{c}\~ao\ 1})$$

3.6.2 Determina\c{c}\~ao\ de Nitrito e Nitrato

Na determina\c{c}\~ao\ de nitrito foi utilizado o m\^etodo colorim\^etrico no sistema de an\^alise por inje\c{c}\~ao\ em fluxo conforme APHA (2012), modificado conforme Neto et al. (2006).

Para tanto, utilizou-se um Sistema Multicanal FIALab – 2500 com cabos de fibra \^otica (SMA 200 mm) que ligam a c\^elula de rea\c{c}\~ao\ ao espectrofot\^ometro (Ocean-optics S2000 – escala \^otica de 200 a 850 nm). Como carreador foi utilizado \^agua destilada e como reagente de cor uma solu\c{c}\~ao\ contendo sulfanilamida, \^acido ortofosf\^orico e n-1-naftiletilenodiamina dihidracloroto.

Exclusivamente para an\^alise de nitrato foi utilizado uma coluna com aproximadamente 5 g de c\^admio para redu\c{c}\~ao\ do nitrato a nitrito e uma solu\c{c}\~ao\ de cloreto de am\^onio e EDTA sal diss\^odico como reagente tamp\^ao (NETO, et al. 2006).

3.6.3 Determina\c{c}\~ao\ de F\^osforo

A determina\c{c}\~ao\ de f\^osforo foi realizada atrav\^es do m\^etodo do \^acido asc\^orbico, de acordo com APHA (2012). O m\^etodo consiste primeiramente na convers\~ao\ do f\^osforo em ortofosfato sol\^uvel, dessa forma o ortofosfato reage com molibdato de am\^onio e antimonil tartarato de pot\^assio em meio acido, reduzindo o \^acido fosfomolibdico formando um complexo azul. A intensidade da cor deste composto \^e proporcional \^a concentra\c{c}\~ao\ de ortofosfato. A leitura foi realizada no espectrofot\^ometro UV-Vis\^ivel (VARIAN, INC. Cary® 50 UV-Vis) a um comprimento de onda de 880 nm.

3.6.4 Determinação de carbono total

Foi analisado pelo princípio da queima a 950°C e medido CO₂ por um detector NDIR de infravermelho pelo equipamento de análise elementar Multi Elementar Analytic® Multi C/N 2100 marca Analytik Jena.

3.6.5 Determinação da Temperatura, Oxigênio Dissolvido e pH

As determinações de pH foram realizadas com pHmetro portátil da marca Hanna Instruments HI 98183 pH/ORP Meter. A temperatura e o Oxigênio dissolvido foram medidos duas vezes ao dia com o equipamento portátil HANNA 9146 Oxigênio Dissolvido Meter.

3.6.6 Alcalinidade Total

Para determinação de alcalinidade, utilizou-se do método titulométrico (APHA, 2012). Este método é aplicável à determinação da presença de carbonato e bicarbonatos em sistemas de tratamento de água e efluentes em geral.

Utilizou-se um titulador automático Methohm 848 Titrino Plus. Para a análise, foi utilizado uma solução padrão de H₂SO₄ 0,05 mol L⁻¹, onde o valor de alcalinidade foi obtido segundo a Equação 2:

$$CaCO_3 \cdot L^{-1} = \frac{M \cdot A \cdot 100000}{V} \quad (\text{Equação 2})$$

Onde:

M = molaridade do ácido padronizado (mol L⁻¹);

A = volume de ácido padronizado gasto para reduzir o pH para 4,5 (mL);

V = volume de amostra (mL).

3.6.7 Determinação da Clorofila *a*

A clorofila *a* foi determinada segundo a metodologia descrita por Porra et al (1989). As amostras foram coletadas diariamente em duplicata e armazenadas a -20°C em ambiente escuro, para que não houvesse degradação da clorofila *a* pela luminosidade. As leituras de

absorbância foram feitas no espectrofotômetro VARIAN, INC. Cary® 50 UV-Vis. Os comprimentos de ondas utilizados para análise espectrofotométrica das amostras foram de 665 e 652 nm.

Os resultados obtidos foram submetidos à Equação 3:

$$\text{Clorofila } mg \text{ ml}^{-1} = (16,29 \times OD_{665nm}) - (8,54 \times OD_{652nm})$$

(Equação 3)

Onde:

OD: densidade óptica.

3.6.8 Determinação de turbidez e sólidos totais

Para a determinação de turbidez foi utilizado um turbidímetro Hach Model 2100P Portable Turbimeter, com medidas de turbidez de 0,01 a 1000 NTU, procedendo conforme descrito no APHA (2012). As determinações de sólidos totais (ST, SV e SF), foram realizadas por gravimetria conforme APHA (2012).

3.6.9 Determinação de cinzas ou matéria mineral (CZ)

O procedimento analítico para determinação do conteúdo de cinzas (matéria mineral) foi baseado no método nº 36, descrito no Compêndio Brasileiro de Alimentação Animal (CBAA, 2009). A determinação da matéria mineral foi realizada por gravimetria de acordo com a Equação 4:

$$CZ(\%) = \frac{m_{RM}}{m_i} \times 100 \quad (\text{Equação 4})$$

Onde:

CZ: conteúdo de resíduo mineral, em % (m/m), após calcinação por 3 h;

m_{RM} : massa de resíduo mineral (g);

m_i : massa inicial de amostra (g).

Para caracterização da cinza ou material mineral todas as amostras (Na, K, P, Ca, Mg, Cu, Zn, Fe, Mn) foram submetidas a abertura. O processo analítico para abertura de amostras minerais foi

realizado por solubilização ácida de acordo com método oficial 965.09 (AOAC, 1995) e no procedimento nº 38 (CBAA, 2009).

3.6.9.1 Determinação de Na e K

A determinação analítica dos elementos Na e K por fotometria de emissão foi baseada no método oficial 956.01 (AOAC, 1995) e nos procedimentos 3500-Na e 3500-K conforme (APHA, 2012). A quantificação dos elementos foi realizada por aspiração direta da solução da amostra em um fotômetro de chama Micronal B462 (São Paulo, Brasil). O equipamento foi operado com chama de Ar comprimido-GLP (pressão de ar: 12,5 psi) e com taxa de aspiração média de 6 mL/min. A detecção das emissões do Na e K foi realizadas, respectivamente, a 589 e 766 nm.

3.6.9.2 Determinação de P

A determinação da concentração de P foi realizada conforme descrito item 3.6.3, pelo método do de ácido ascórbico.

3.6.9.3 Determinação de Ca, Mg, Cu, Zn, Fe e Mn

A quantificação dos elementos Ca, Mg, Cu, Zn, Fe e Mn foi feita por espectrofotometria de absorção atômica em chama - EAA Varian SpectrAA 220 (Melbourne, Vic, Australia) baseada no método oficial 975.03 (AOAC, 1995). A quantificação dos elementos foi realizada por aspiração direta da solução da amostra. O equipamento opera com chama de Ar comprimido-Acetileno e com taxa de aspiração média de 7 mL/min. Nas determinações são utilizadas lâmpadas de catodo-oco monoelementares. Especificamente para os elementos Ca e Mg, utilizou-se La^{3+} a 1% (m/v) como agente de liberação na curva analítica e na solução da amostra.

3.6.10 Determinação de lipídios - Extrato Etéreo (EE)

O procedimento analítico para determinação de extrato etéreo foi baseado no método oficial AOCS Am 5-04 aprovado pela American

Oil Chemists Society. A amostra foi extraída com éter de petróleo (faixa de destilação de 30-70 °C) sob alta pressão a 90 °C por 90 minutos em sistema Ankom XT15 (Macedon, NY, USA), o conteúdo de extrato etéreo (constituído, predominantemente, por triacilgliceróis) foi determinado indiretamente por gravimetria de acordo com a Equação 5.

$$EE(\%) = \frac{(m_1 - m_2)}{(m_3 - m_4)} \times 100 \quad (\text{Equação 5})$$

Onde:

EE: conteúdo de extrato etéreo em %;

m_1 : massa da amostra seca a 105 °C por 3 h + massa da bolsa filtro (g);

m_2 : massa da amostra extraída e seca a 105 °C por 3 h + massa da bolsa filtro (g);

m_3 : massa inicial da amostra + massa da bolsa filtro (g);

m_4 : massa da bolsa filtro (g).

3.6.11 Determinação do perfil de ácidos graxos

Os lipídios foram extraídos com diclorometano e metanol e o processo de volatilização foi utilizando hidróxido de sódio e metanol e analisado na forma de ésteres por cromatografia gasosa (GC-FID) (Varian, CP-3800).

3.6.12 Determinação de proteínas - Nitrogênio em amostras sólidas pelo método de combustão (NTD)

O teor de proteína bruta nas células das microalgas foi determinado utilizando o método indireto descrito por Becker (1993). Para tanto foi utilizado a correlação do "conteúdo de proteína = conteúdo de nitrogênio \times 6,25" que descreve a relação entre o teor de proteína e nitrogênio.

A concentração de N foi determinada em analisador Leco FP-528 (St. Joseph, Michigan, USA). O gerenciamento do instrumento foi realizado com o software Leco FP-528. O equipamento opera com tempo aproximado de análise de 3 minutos. A amostra é introduzida automaticamente em um forno de decomposição a 850 °C com atmosfera rica em O₂ para rápida combustão. Sob fluxo de He ultrapuro (200 mL/minuto) e ação catalítica de Cu metálico a 750 °C, as espécies

de NO_x geradas são reduzidas a N_2 . O CO_2 e a H_2O produzidos na combustão são removidos por filtração sobre suportes de Lecosorb (20-30 mesh) e Anhydron (10-16), respectivamente. O N_2 remanescente em fluxo de He é, então, detectado em célula de condutividade térmica.

3.6.13 Determinação de carboidratos

A determinação de carboidratos foi calculada pela diferença total da matéria, de acordo com Bi et al. (2013), conforme Equação 6:

$$\text{Carboidratos (\%)}: (100 - \text{conc. CZ} - \text{conc. lípidios} - \text{conc. proteínas}) \times 100 \quad (\text{Equação 6})$$

3.7 ANALISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados por meio de análise de variância de via única (ANOVA) $p < 0,05$, utilizando o OriginPro 8, com três repetições para cada ensaios.

3.8 CALCULOS REALIZADOS

3.8.1 Remoção de nutrientes

Como os ensaios foram realizados em batelada, a remoção dos nutrientes de nitrogênio e fósforo foi realizada a partir da equação:

$$\eta = \frac{(C_i - C_f)}{C_i} \times 100 \quad (\text{Equação 7})$$

Onde:

η : Remoção do nutriente em porcentagem (%);

C_i : Concentração inicial do nutriente (mg L^{-1});

C_f : Concentração final do nutriente (mg L^{-1}).

3.8.2 Velocidade Específica de Crescimento Celular (μ_x)

A equação utilizada para calcular a velocidade específica de crescimento celular foi obtida a partir do balanço de massa para as células:

$$\text{Acúmulo} = (\text{Entrada} - \text{Saída}) + (\text{Gerado} - \text{Consumido})$$

A partir da equação geral do balanço de massa são observados os componentes presentes no cultivo do tipo batelada para realizar o balanço de massa para as células, sendo (Eq. 8):

$$\begin{aligned} \frac{dX}{dt} &= (0 - 0) + \{(\mu_x \cdot X) - 0\} && \text{(Equação 8)} \\ \int_x^{x_0} \frac{dX}{X} &= \mu_x \int_t^{t_0} dt \\ \ln \frac{X}{X_0} &= \mu_x \cdot t \\ \mu_x &= \frac{\ln \frac{X}{X_0}}{t} \end{aligned}$$

Onde:

μ_x : velocidade específica de crescimento (d^{-1});

X : concentração celular inicial (g);

X_0 : concentração celular final (g);

t : tempo de duração do cultivo (d).

As análises de clorofila a foram utilizadas para determinar o crescimento da biomassa ao longo do período experimental. Uma satisfatória correlação através da clorofila a e biomassa seca foi obtida ($r^2=0.99$) conforme Figura 6.

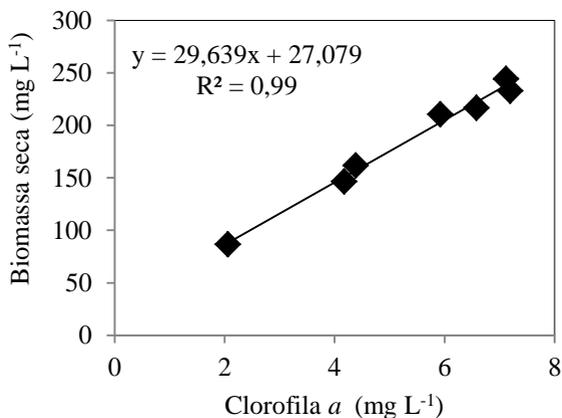


Figura 6 – Correlação das concentrações de biomassa seca e clorofila *a*.

3.8.3 Produtividade de biomassa

A produtividade de biomassa microalgal, em mg L⁻¹ d⁻¹ foi estimada segundo a Equação 9.

$$P = (X_t - X_0)/(t_x - t_0) \quad (\text{Equação 9})$$

Onde:

P: produtividade;

X_t: concentração de biomassa seca final (mg L⁻¹);

X₀: concentração de biomassa seca inicial (mg L⁻¹);

t_x: tempo de duração do cultivo (d);

t₀: tempo inicial (d).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO DOS EFLUENTES

As características físico-químicas dos dois digestato bruto utilizados como meio de cultura para o crescimento de microalgas estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 – Caracterização dos efluentes utilizados

Parâmetros	UASB	LA
pH	7,7 ± 0,2	7 ± 0,5
P-PO ₄ ³⁻ <i>soluvel</i> (mg L ⁻¹)	50,9 ± 4,6	18,9 ± 6,2
N-amoniaco (mg L ⁻¹)	750,4 ± 49,7	55,7 ± 16,9
N-NO ₂ ⁻ (mg L ⁻¹)	4 ± 6,8	30,6 ± 2,7
N-NO ₃ ⁻ (mg L ⁻¹)	-	7,5 ± 0,5
COT* (mg L ⁻¹)	1936 ± 136,9	263 ± 8,9
Alcalinidade (CaCO ₃ L ⁻¹)	1940 ± 98,5	1042 ± 15,1
Turbidez (NTU)	1063,5 ± 18,8	530,3 ± 2,9
ST** (g L ⁻¹)	9,8 ± 0,2	2,8 ± 0,2

* Carbono orgânico total

** Sólidos totais

É importante ressaltar que o UASB apresenta altas concentrações de N-amoniaco, fósforo, turbidez e sólidos se comparado com a saída do sistema LA o que pode causar efeito inibitório para o cultivo de microalgas, embora não tenha sido reportada que a elevada concentração de P-PO₄³⁻, provoque inibição ao crescimento.

4.2 TESTE DE INIBIÇÃO PELO SUBSTRATO

Esse teste teve como finalidade avaliar as máximas concentrações que poderiam causar a inibição do crescimento das microalgas. Na Tabela 5 apresenta o crescimento obtido pelas microalgas em todas as concentrações avaliadas.

Tabela 5 – Resultado inibição do crescimento pelos diferentes digestatos

Efluente	% (v/v)	Crescimento microalgas
UASB	2	+
	4	+
	6	+
	8	-
LA	10	+
	20	+
	30	+
	40	+
	50	+
	60	-

As máximas diluições de efluentes suportadas que não acarretaram inibição do crescimento das microalgas foram de 6 e 50% (v/v) (Tabela 5) para o efluente proveniente do UASB e LA (Figura 7), respectivamente. A inibição a partir de 6% v/v do efluente do UASB foi provavelmente da alta concentração de sólidos ($9,8 \pm 0,2 \text{ g L}^{-1} \text{ ST}$) e turbidez ($1063,5 \pm 18,8 \text{ NTU}$) que impediu adequada penetração da luz no sistema, comparado ao efluente do LA com concentração de sólidos ($2,8 \pm 0,2 \text{ g L}^{-1} \text{ ST}$) e turbidez ($530,3 \pm 2,9 \text{ NTU}$).

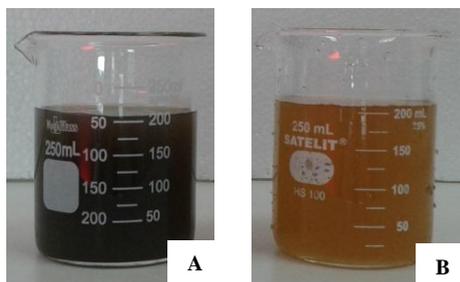


Figura 7 - Efluentes utilizados no cultivo: (A) UASB e (B) LA

Segundo González-Fernández et al. (2011), o impacto das características de efluentes e o efeito relacionado com as condições de cultivo são pouco reportadas, enquanto uma das principais dificuldades

inerentes ao uso de efluentes de digestores como substrato para a cultura de microalgas é a cor escura do efluente. Dessa forma, a turbidez e a concentração de sólidos reduzem a penetração da luz e, portanto, a quantidade de luminosidade disponível para o crescimento autotrófico de microalgas, para tanto requerem a sua diluição, principalmente para promover a penetração da luz (AZOV e GOLDMAN, 1982).

4.3 MONITORAMENTO DAS ESPÉCIES DE MICROALGAS

Segundo Lau et. al. (1995) e Martinez et al. (2000), a presença de bactérias, protozoários e outros predadores em águas residuárias e a diferente composição química dos efluentes (sintéticos ou bruto) interferem diretamente no crescimento de microalgas. Num outro contexto, a penetração da luz, pode ser responsável por uma alteração na composição das espécies (BARTOSH, BANKS, 2007).

Dessa maneira em todos os ensaios realizados foram feitas verificações das espécies presente no meio de cultivo no decorrer dos experimentos, pois, como não se tratava de uma cultura pura, poderia haver crescimento de diferentes espécies de microalgas decorrentes das condições de cultivo. Neste sentido, não foi observado mudança nas espécies durante o período de ensaios, onde as espécies que prevaleceram foram a *Chlorella* spp. e *Scenedesmus* spp.

A Figura 8 mostra microfotografias das espécies predominantes no cultivo.

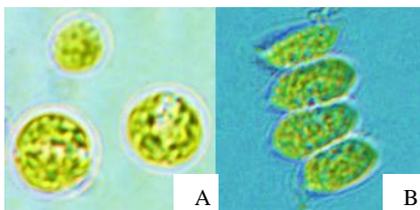


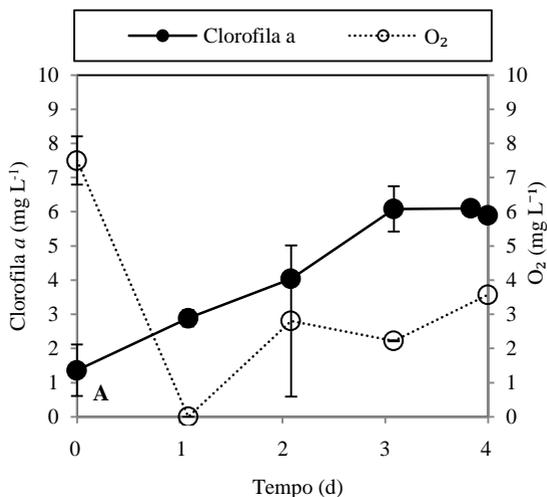
Figura 8 - Fotografias de microscopia óptica mostrando as microalgas (1000x): (A) *Chlorella* spp. (B) *Scenedesmus* spp.

4.4 CRESCIMENTO DAS MICROALGAS E REMOÇÃO DE NITROGÊNIO, FÓSFORO E CARBONO.

A seguir, as Figuras 7 a 12 apresentam os perfis de remoção de compostos e crescimento utilizando efluente UASB e LA durante um período de 4 dias.

4.4.1 Crescimento das microalgas e clorofila *a*

A produção de clorofila está relacionada com o estado fisiológico das células. Conforme a Figura 9a e Figura 9b houve um incremento de clorofila num período de 74 h, a concentração máxima observada foi de 6,1 e 5,1 mg L⁻¹, com UASB e LA, respectivamente.



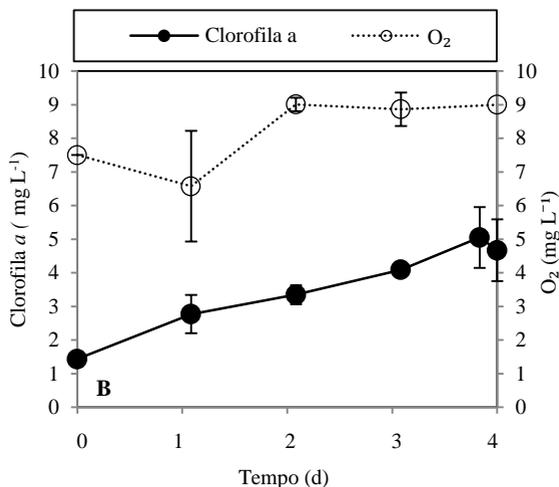


Figura 9 - Clorofila *a* e perfil de concentração de oxigênio dissolvido. (A) 6% v/v do efluente UASB e (B) 50% v/v do efluente LA

A concentração média de oxigênio dissolvido no cultivo com UASB foi de $3,2 \text{ mg L}^{-1}$ (Figura 9a), no entanto, o oxigênio no primeiro dia foi de zero devido o efluente não ser esterilizado e conter bactérias que acabam consumindo para o processo de respiração. Já o cultivo com LA o oxigênio se manteve mais elevado em concentração média de 8 mg L^{-1} (Figura 9b).

A média da concentração de clorofila está de acordo com o relatado por Honda et al. (2012) e Wang et al. (2014). Apesar deste estudo se apresentarem inferiores aos estudados por Ruiz-Martinez, et al. (2012) e Cheirsilp; Torpee (2012). Outros estudos sugerem que o baixo crescimento pode ser atribuído pela concentração de sólidos presente no cultivo, que interferem na síntese da clorofila que é induzida pela intensidade de luz (GEIDER, 1986; RUIZ-MARTINEZ, et al., 2012). Ainda outros autores propõem que a absorção da luz por microalgas é uma função da célula e do tamanho da colônia bem como a concentração de pigmento intracelular, um aumento no número de colônia conduziria a um aumento no sombreamento das células diminuindo a irradiância (FINKEL, et al., 2011; SUTHERLAND, et al., 2014).

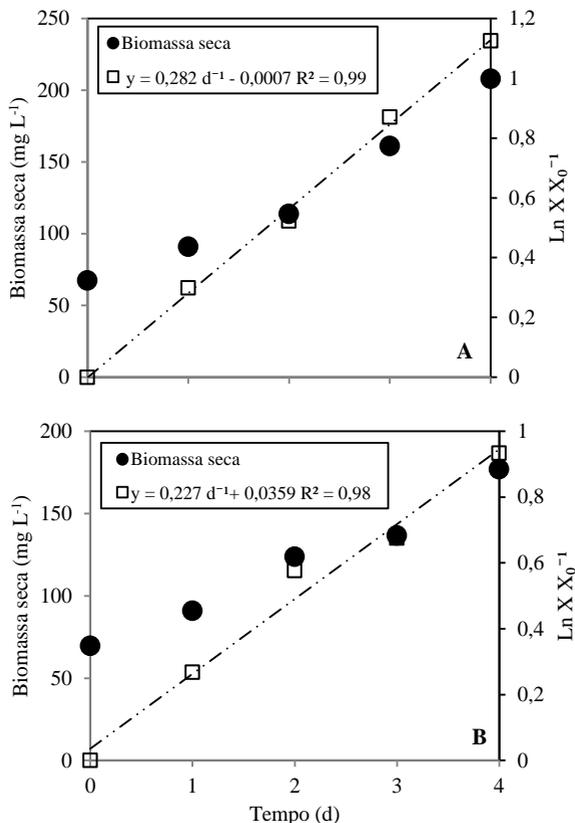


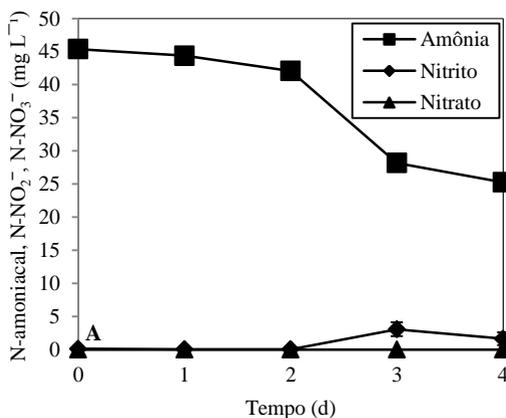
Figura 10 – Biomassa seca e velocidade específica de crescimento. (A) 6% v/v do efluente UASB e (B) 50% v/v do efluente LA.

A velocidade de crescimento pode variar dependendo das condições de cultivo (temperatura, composição do meio). No entanto, as microalgas demonstraram crescimento eficaz em ambos os efluentes testados, devido à alta concentração de nutrientes (N e P) consumido, sendo assim as velocidades de crescimento específicas foram 0,282 e 0,227 d⁻¹, com substrato do UASB e LA, respectivamente (Figura 10a e Figura 10b). Esses valores da concentração da biomassa são semelhantes aos defendidos por Hu et al. (2012), Zhu et al. (2013) e WANG et al. (2014), que estudaram o crescimento de *Chlorella sp.* e sua capacidade de remoção de nutriente de águas residuárias. A baixa velocidade de crescimento se deve principalmente a turbidez nas águas residuais, o que diminui a penetração da luz. Uma vez que o efluente

suinícola possui a matéria suspensa, grande parte é atribuída a alguma matéria orgânica e inorgânica finamente particulada, bem como compostos orgânicos solúveis (WANG, et al., 2012). A produtividade de biomassa com UASB foi de $30,3 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, quando cultivadas com meio da saída do sistema LA foi $23,4 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$.

4.4.2 Remoção de nitrogênio

O íon amônio é a forma mais reduzida dos compostos nitrogenados e preferido pelas microalgas para o seu metabolismo, devido a sua assimilação e absorção consumir menos energia que outras fontes de nitrogênio (PEREZ-GARCIA, et al., 2011). De acordo com a Figura 11a houve uma eficiência de remoção de nitrogênio amoniacal de 44,3% com digestato do UASB, sendo que o valor obtido com o efluente proveniente do sistema LA (Figura 11b) foi superior com uma remoção de 76,7% após 96h de ficorremediação. A maior parte N-amoniacal foi absorvida durante o período de cultura de quatro dias. Isso ocorreu porque microalgas começaram a crescer a partir do dia 1 até dia 4 (Figura 10a e Figura 10b). Para ambos os substratos a concentração N-amoniacal diminuiu após o dia 1, sendo que a amônia do cultivo com LA foi mais consumida comparada com o UASB, embora o meio com efluente do UASB apresentou um melhor crescimento.



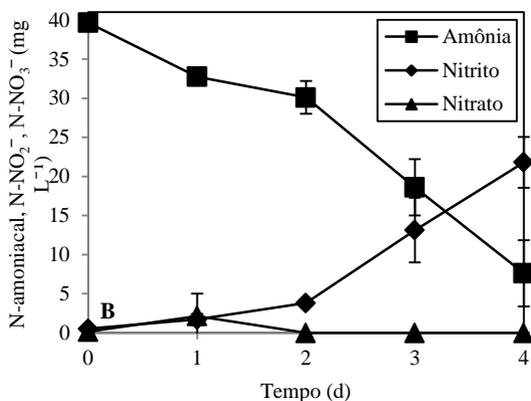


Figura 11 - Perfil de remoção de nitrogênio amoniacal. (A) 6% v/v do efluente UASB e (B) 50% v/v do efluente LA.

As remoções de N-amoniacal com meio LA (Figura 11b) foi de $32,1 \text{ mg L}^{-1}$ ao longo de 4 dias, são semelhantes ao encontrado por Ruiz-Marin et al., (2010) que observaram o crescimento e a remoção de nutrientes utilizando duas espécies de microalgas *C. vulgaris* e *S. obliquus*. No entanto valores superiores de eficiência foram verificados por Wang et al., (2012) que apresentaram 95% de remoção com concentração de amônia superior relatada e o mesmo resultado foi alcançado por Wong et al., (2010) com a microalga *Chlamydomonas reinhardtii*.

Com base nos resultados apresentados, houve uma remoção de nitrogênio amoniacal de $20,1 \text{ mg L}^{-1}$ (Figura 11a) do cultivo utilizando efluente tratado anaerobicamente num período de 4 dias. Aslam e Kapdan (2006) obtiveram remoção de nitrogênio amoniacal de 20 e 100 mg L^{-1} em 10 dias com *Chlorella vulgaris*. Na mesma linha de pesquisa Hu et al., (2012) e Yan et al., (2013) cultivaram *Chlorella* sp., alcançando taxas de remoção de 80 mg L^{-1} em 5 dias e 300 mg L^{-1} em 6 dias, respectivamente. No entanto há um equilíbrio dependente do pH entre o íons amônio solúvel (NH_4) e amônia (NH_3). O alto pH favorece a volatilização do nitrogênio amoniacal por dirigir o equilíbrio do NH_4^+ para NH_3 . Conforme Markou et al. (2014) o equilíbrio entre as formas de íons amônio (sob a forma ionizada) e isenta de amoníaco (a forma gasosa ionizada presente na solução) depende principalmente do pH. A

valores de pH maior que 9,25 ($pK = a\ 25\ ^\circ C$) a espécie dominante é a amônia livre.

Conforme a Figura 11a e a Figura 11b a diminuição da concentração de nitrogênio amoniacal pode ser atribuída pela volatilização, que segundo Gerloff-Elias et al., (2006) e Escudero, et al. (2014) em culturas contendo efluente com pH acima 8. O decréscimo de $N-NH_4$ é parcialmente devido à volatilização em forma de $N-NH_3$. Franchino et al., (2013) cultivaram microalgas com efluente tratado por via anaeróbia com concentrações iniciais de $N-NH_4$ de 68 e 170 $mg\ L^{-1}$ e alcançaram uma remoção de 30 e 78 $mg\ N-NH_4\ L^{-1}$, respectivamente, em 10 dias, com *C. vulgaris*, *Scenedesmus obliquus* e *Oleoabundans neochloris*. Estes autores atribuíram 4% da remoção pelo processo de volatilização do nitrogênio amoniacal.

A concentração de nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-) (Figura 10a e Figura 10b) aumentaram ao longo do tempo muito provavelmente devido aos processos de nitrificação por ação bacteriana, que ocorrem simultaneamente. A concentração de oxigênio dissolvido entre 2,2 e $>8,50\ mg\ L^{-1}$ (Figura 9a e Figura 9b) nos FBRs resultante dos processos intrínsecos da fotossíntese estimula a nitrificação, que geralmente é limitada pela concentração de oxigênio no meio (MEZZARI, et al., 2013). O oxigênio molecular a partir da fotossíntese das microalgas é utilizado como acceptor de elétrons por bactérias para degradar a matéria orgânica (SUBASHCHANDRABOSE, et al., 2011).

A fotossíntese que é um conjunto de reações e pode ser inibida pelo excesso de oxigênio dissolvido. A supersaturação de oxigênio dissolvido pode ser tão elevada que pode inibir o crescimento de microalgas (KUMAR et al., 2010). Mas, o consumo bacteriano de O_2 reduz essa tensão, melhorando as células e conduzindo a condições mais favoráveis para o crescimento das microalgas (MOUGET et al., 1995). No entanto, o crescimento de microalgas, também pode inibir a atividade bacteriana, liberando metabolitos tóxicos, aumentando a temperatura e mantendo elevados níveis de O_2 causando inibição das bactérias (SKULBERG, 2000).

No cultivo com efluente UASB verificou-se uma máxima concentração de NO_2^- de 3,3 $mg\ N-NO_2\ L^{-1}$. No terceiro dia, a formação de NO_3^- não foi evidenciada ao longo período. Contudo no meio utilizando efluente LA foi observado no 4º dia uma concentração de nitrito de 24,1 $mg\ L^{-1}$ e nitrato de 4,2 $mg\ L^{-1}$ no segundo dia. Embora o nitrito possa ser absorvido e utilizado como uma fonte de N, em concentrações elevadas tem efeitos tóxico. Yang et al. (2004) observaram que uma concentração de 56 $mg\ L^{-1}$ de nitrito estendido a

fase de latência nas culturas de *Botryococcus braunii*, enquanto que um aumento de nitrito de 112 mg L^{-1} provoca uma inibição total do crescimento de microalgas. No estudo de Chen et al. (2011), em que *Microcystis aeruginosa* foi cultivada num meio com $50 \text{ mg N-NO}_3^- \text{ L}^{-1}$, a adição de NO_2^- de 0 a 15 mg L^{-1} teve um efeito negativo sobre o crescimento celular.

4.4.2.1 Amônia livre

A Figura 12a e Figura 12b apresentam os perfis de amônia livre ao longo do tempo.

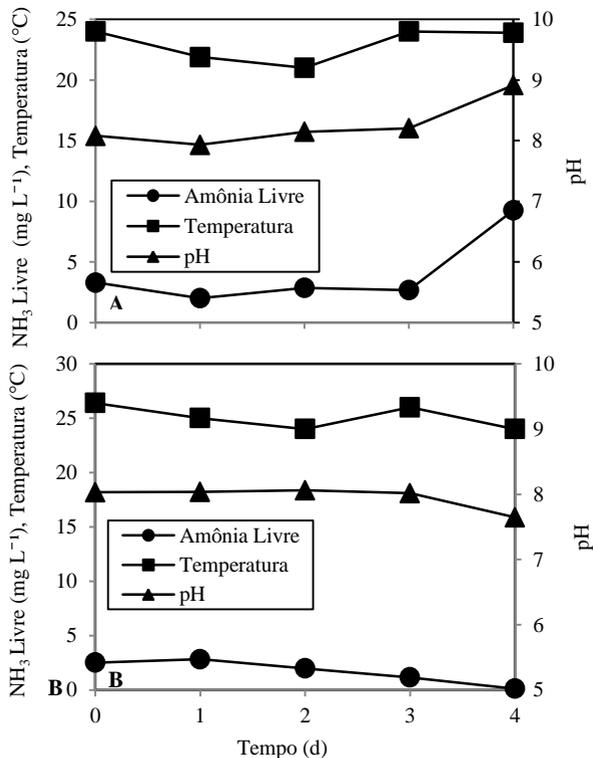


Figura 12 - Perfil de amônia livre em função da temperatura e pH. (A) 6% v/v do efluente UASB e (B) 50% v/v do efluente LA

Observa-se na Figura 12a e Figura 12b, que a concentração de NH_3 Livre varia de acordo com o pH e temperatura. Sendo que as concentrações máximas de amônia livre presente foram de 9,2 e 2,5 mg L^{-1} cultivadas com UASB e LA, respectivamente. Para cultivo com digestato do UASB o pH variou entre 8,0-9,0 e uma média temperatura aproximada de 23°C , já o cultivo com sistema LA o pH esteve próximo de 8,0 e temperatura próximo aos 25°C . Uma vez que é de fundamental importância verificar a concentração de amônia livre, devido sua toxicidade e capacidade de provocar inibição no crescimento das microalgas, entretanto, as concentrações testadas não foram responsáveis pela inibição, pois estas podem suportar aproximadamente até 20 $\text{mg N-NH}_3 \text{ L}^{-1}$, concentração efetiva onde a velocidade de crescimento pode ser reduzida em 50% (COLLOS, HARRISON, 2014).

A restrição grave ao utilizar amônia/amônio é a toxicidade potencial. O meio isento do íon amônio tem efeitos prejudiciais sobre microalgas em concentrações relativamente baixas de 28 $\text{mg N-NH}_3 \text{ L}^{-1}$ e pH superior a 8,0 (ABELIOVICH, AZOV, 1976). As microalgas que utilizam nitrogênio amoniacal, metabolizam íons amônio ativamente, por mecanismos de transporte e podem assim controlar as concentrações intracelulares. Mas amônia livre difunde passivamente nas células, que têm, portanto, pouco controle sobre as concentrações intracelulares, que às vezes pode se tornar tóxica. A amônia livre afeta o sistema de fotossíntese e, em particular, induz danos foto do fotossistema II (AZOV, GOLDMAN, 1982; DRATH, et al., 2008).

4.4.3 Remoção de fósforo

Durante o metabolismo celular o fósforo é utilizado para a formação dos ácidos nucleicos, membranas lipídicas e moléculas de ATP nas células (PECCIA, et al., 2013). Na Figura 13a e Figura 13b observa-se que o consumo de fósforo foi significativo: a eficiência da remoção de fósforo da cultura com UASB alcançou 89,6%, em contraste, a remoção do meio com LA foi inferior correspondente a 76,5% até o fim do experimento. O rápido consumo do fósforo principalmente nos primeiros dias é justificado porque as microalgas são capazes de absorverem grandes quantidades de fósforo, 8-16 vezes a mais que a concentração mínima do elemento, o que permite o crescimento mesmo em períodos de privações (LOURENÇO, 2006).

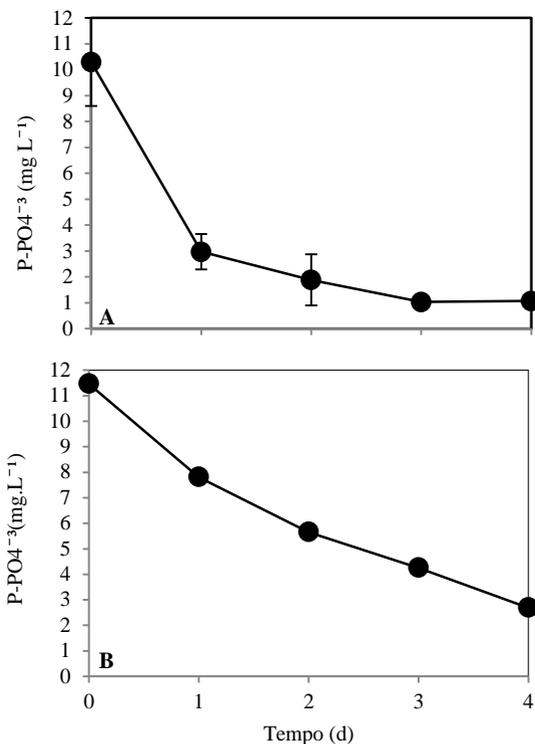


Figura 13 - Perfil de remoção de fósforo. (A) 6% v/v do efluente UASB e (B) 50% v/v do efluente LA

As eficiências de remoção de fósforo alcançados neste estudo foram maiores em comparação com alguns a outros estudos publicados. Por exemplo, *Chlorella kessleri* absorveu apenas 8-20% de fósforo sob o ciclo de luz/escuro com concentração de 12 mg P-PO₄L⁻¹ (Lee e Lee, 2001). Uma redução significativa (62,5-74,7%) do total de fósforo também foi encontrada para as amostras com *C. vulgaris* no cultivo com dejetos digeridos anaerobicamente (Wang et al., 2010). Olguín et al. (2003) obtiveram o máximo de remoção de P-PO₄ de 72-87% por *Spirulina* sp. com efluente anaeróbico diluído em 2% (v/v) a partir de águas residuais da suinocultura sob condições tropicais. No trabalho de Wang et al. (2012) a remoção máxima atingida foi de 77 % de fósforo total, obtido com o crescimento mixotrófico da microalga *C. pyrenoidosa* com efluente de suíno diluído. Gonzales et al. (1997) alcançaram 55% de remoção de fósforo de efluente agroindustrial com a

concentração de fósforo total de 111 mg L⁻¹ por 216h de cultivo com *C. vulgaris* e *Scenedesmus dimorphus*.

Wu et al. (2013) conseguiram uma remoção de fósforo superior a 98,9%, com *Nannochloropsis oculata* cultivada com água residuária da suinocultura tratada por via anaeróbia e aeróbia. An et al., (2003) verificaram que a cultura foi capaz de consumir uma concentração de 29 mg P-PO₄ L⁻¹ em 6 dias quando operado em batelada.

O mecanismo de remoção de fósforo tem relação significativa com a mudança de pH, a precipitação de fósforo é evidenciada quando o pH está acima de 9 (NURDOGAN e OSWALD 1995). O aumento do pH é devido a fotossíntese e a alcalinização do meio de cultura, cátions polivalentes, tais como Ca⁺ e Mg⁺ podem precipitar com fosfatos (HARTLEY et al., 1997 e HOFFMANN, 1998) e isto pode reduzir a disponibilidade de fósforo. De acordo com a Figura 12a e Figura 12b o pH das culturas ficou inferior a 9 no tempo 4 dias. Embora seja difícil quantificar a proporção da precipitação de fósforo, os resultados indicam que a absorção pelas microalgas ainda é o principal mecanismo de eliminação do fósforo neste estudo.

4.4.4 Remoção de alcalinidade

Na Figura 14a e Figura 14b observa-se a remoção da alcalinidade. O cultivo com LA consumiu aproximadamente 142,6 mg CaCO₃L⁻¹, enquanto que com UASB a foi inferior, cerca de 90 mg CaCO₃L⁻¹. Contudo, os valores de alcalinidade (como CaCO₃) não sejam muito reportado em estudos com microalgas que utilizam efluente que apresentem essa característica, essa diminuição dos valores se atribui principalmente pelo consumo das microalgas e bactérias.

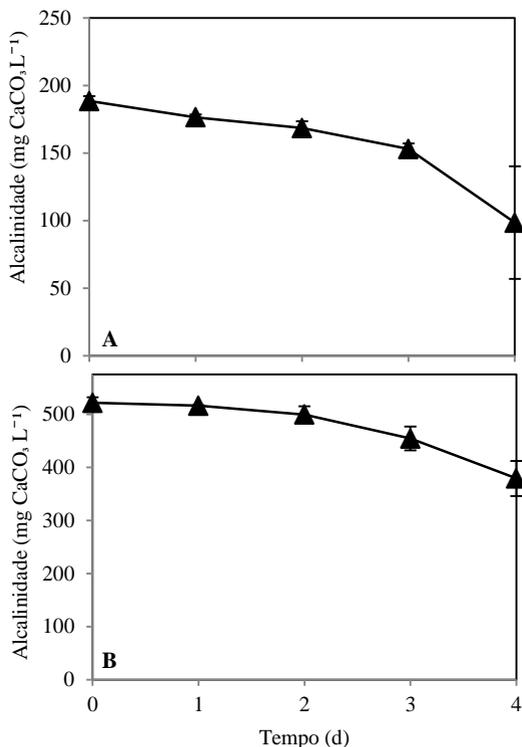


Figura 14 - Perfil de remoção de alcalinidade. (A) 6% v/v do efluente UASB e (B) 50% v/v do efluente LA.

Dessa forma, como as microalgas são micro-organismos autotróficos acabam utilizando parte da alcalinidade como fonte de carbono inorgânico (GOLDMAN, et al., 1972). Segundo Ramaraj et al., (2014), que investigaram as relações entre o crescimento da biomassa de microalgas e variáveis ambientais, observaram que a biomassa tem relação de regressão com a alcalinidade. Outro fator que podemos atribuir é ao processo de nitrificação autotrófica na qual há consumo de alcalinidade, como é evidenciado na Figura 11a e Figura 11b, em que as bactérias acabam utilizando para completar o processo, sendo que a falta desta pode estar limitando a velocidade do processo (YAMAMOTO, et al., 2006).

4.4.5 Remoção de carbono

Durante o período de 4 dias de cultura, ambos os experimentos demonstraram a redução de carbono (inorgânico e orgânico). Conforme a Figura 15a, o meio com 6% (v/v) contendo o efluente tratado anaerobicamente apresentou uma remoção de 14,5, 45,1 e 27,6% de carbono inorgânico, orgânico e total, respectivamente. Contudo, o meio com dejetos do sistema LA resultou uma remoção de 32,9, 36,1 e 31,9% de carbono inorgânico, orgânico e o total (Figura 15b) respectivamente. O COT foi rapidamente removido em testes com crescimento ativo das microalgas. Para Perez-Garcia et al., 2011, isso se deve porque algumas espécies de microalgas, tais como, *Chlorella* e *Scenedesmus*, têm a capacidade de alternar entre o metabolismo fototrófico e heterotrófico, dependendo das condições ambientais.

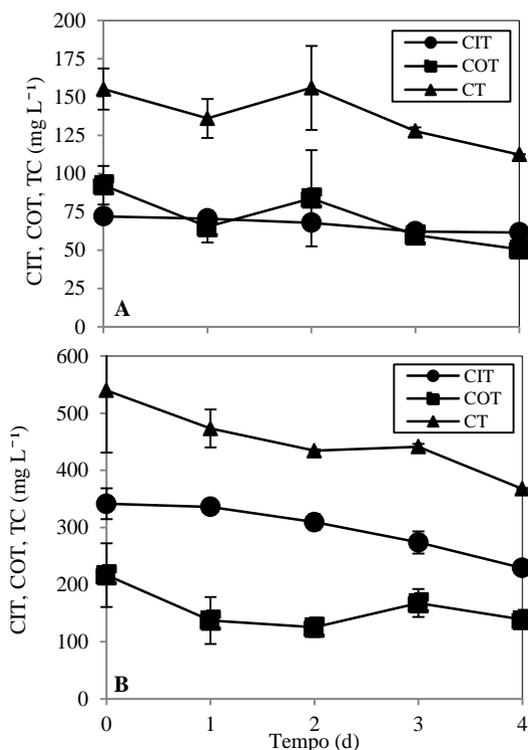


Figura 15 - Perfil de remoção de carbono inorgânico, orgânico e total. (A) 6% v/v do efluente UASB e (B) 50% v/v do efluente LA

Entretanto essa variação de remoção de carbono, isto é, a fração de carbono prontamente biodegradável, é conhecida por impactar significativamente no consumo e assimilação de carbono, isso é decorrente das características do efluente, tais como, tipo de tratamento. As práticas de gestão da exploração agrícola de dejetos de suínos (limpeza das granjas, condições de armazenamento dos resíduos) e nutrição de suínos geralmente respondem pelas diferentes biodegradabilidades observada, o que pode variar de 0% a 80% (BOURSIER, et al., 2005; GONZÁLEZ, et al., 2008).

Em contraste, o consumo de carbono pode ser atribuído por bactérias heterotróficas que ocorrem naturalmente em águas residuais da suinocultura em conjunto com microalgas, podendo aumentar ainda mais a eficiência de remoção de carbono devido a muitos sinergismos importantes em consórcios combinados de microalga-bactérias (HERNÁNDEZ, et al., 2013).

Godos et al. (2010) obtiveram uma taxa de remoção de COT de 52, 3, 66 e 56 mg C L⁻¹ d⁻¹, respectivamente, em testes com águas residuais de pocilga diluída 8 vezes com *E. viridis*, *S. obliquus*, *C. sorokiniana* juntamente com consórcio de bactérias.

4.5 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DA ÁGUA RESIDUÁRIA PÓS TRATAMENTO E POTENCIAL REÚSO

Observa-se na Tabela 6 os resultados obtidos através da análise físico-química da água residuária originada após o processo de fitorremediação seguida de separação por centrifugação.

Tabela 6 – Qualidade da água residuária pós tratamento

Parâmetros	UASB (6% v/v)		LA (50% v/v)	
	Inicial	Final	Inicial	Final
pH	7,7 ± 0,2	6,5	7 ± 0,5	6,5
P-PO ₄ ³⁻ (mg L ⁻¹)	50,9 ± 4,6	0,3 ± 0,2	18,9 ± 6,2	1,2
N-NH ₃ (mg L ⁻¹)	750,4 ± 49,7	15,4 ± 0,7	55,7 ± 16,9	6,3 ± 0,2
N-NO ₂ ⁻ (mg L ⁻¹)	4 ± 6,8	-	30,6 ± 2,7	21,8 ± 0,1
N-NO ₃ ⁻ (mg L ⁻¹)	-	-	7,5 ± 0,5	-
COT* (mg L ⁻¹)	1936 ± 136,9	53,6 ± 2,1	263 ± 8,9	146,7 ± 24,7
Turbidez (NTU)	1063,5 ± 18,8	0,89 ± 0,5	530,3 ± 2,9	2,28
ST ^{**} (g L ⁻¹)	9,8 ± 0,2	-	2,8 ± 0,2	-

* Carbono orgânico total

** Sólidos totais

De modo geral, o tratamento se mostrou eficiente tendo ao final do processo um efluente com baixa concentração de nutriente e clarificado após centrifugação, Conforme a Resolução CONAMA 430/2011 as concentrações de nitrogênio amoniacal (15,4 mg L⁻¹ e 6,3 mg L⁻¹ e pH 6,5) estão de acordo com os padrões de lançamentos de efluentes, sendo concentração máxima de 20 mg L⁻¹ e 5 a 9 de nitrogênio amoniacal e pH, respectivamente. Já para a concentração de fósforo estabelecida pela Lei nº 14.675/09, são de 4 mg L⁻¹, ou eficiência mínima de 75% na remoção de fósforo. Dessa forma a concentração de 0,3 e 1,2 mg L⁻¹ ou 100 e 89% com UASB e LA, respectivamente, estando de acordo com limite exigido.

De acordo com as características físico-químicas (Tabela 6), a água residuária pós tratamento apresenta um potencial de reuso, no entanto, esta qualidade deve ser verificada. Entretanto pode ser reutilizada no cultivo de microalgas, usada para diluir o meio, dessa forma não só assegurando que o processo seja sustentável e ecológico, mas também que é viável.

4.6 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DAS MICROALGAS

4.6.1 Composição química após fitorremediação

A composição química das microalgas cultivadas em diferentes efluentes suinícolas, foi avaliada, a fim de investigar os efeitos das condições nutricionais. A biomassa de microalgas a partir de águas residuais da suinicultura, diluída com diferentes substratos (UASB e LA) foi colhida no final da experiência. Os teores de carboidratos, proteínas e lipídios da biomassa de microalgas, após 4 dias de fitorremediação estão mostrados na Tabela 7. A composição da biomassa microalgal cultivada a partir do UASB apresentou 56,1, 34,4 e 1,7% de proteínas, carboidratos e lipídios respectivamente (Tabela 7). No entanto, verificou-se teores de 44, 41,9 e 2% em proteínas, carboidratos e lipídios, respectivamente utilizando LA (Tabela 7). Os teores de proteínas, carboidratos e cinzas apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os cultivos com UASB e LA.

As concentrações de cinzas com UASB (Tabela 8) foram de 7,8%, ricas em fósforo (1%) e potássio (0,9%) conforme Tabela 8. Quando cultivadas com LA (Tabela 7) foi verificado um teor de 12%,

um aumento de 1,5 vezes, a matéria mineral é rica em fósforo (1,1%), potássio (1,6%), cálcio (0,5%) e magnésio (0,4%) (Tabela 8). Essa variação é devida as características do efluente, no qual as microalgas foram cultivadas, entretanto, essa composição é importante para utilização da biomassa como biofertilizantes. Segundo Gómes et al. (2013), as microalgas são capazes de assimilarem e incorporarem minerais, que por sua vez essa biomassa possui alto valor na produção de biofertilizantes. Além disso, do ponto de vista econômico, esse processo permite uma redução no custo, reduzindo o uso de água e fertilizantes artificiais frescos, que têm um alto preço.

Não houve diferença significativa na percentagem de lipídios entre as microalgas cultivadas nos diferentes substratos ($p < 0,693$), embora tenha sido verificado que o conteúdo de proteínas aumentou 1,3 vezes e os carboidratos diminuíram 1,2 vezes, quando cultivados com efluente do UASB em comparação ao LA. O aumento da concentração de nitrogênio na forma de nitrogênio amoniacal em ambos os efluentes testados provocou uma produção substancial de proteínas e carboidratos e baixa de lipídios.

Tabela 7 - Composição química celular após 4 dias de fitorremediação com diferentes substratos.

Efluente	Teor (%)			
	Proteínas	Carboidratos	Lipídios	CZ
UASB	56,1 ± 0.7	34,4 ± 0.4	1,7 ± 0.7	7,8 ± 0.5
LA	44 ± 0,9	41,9 ± 0,3	2 ± 0.8	12 ± 1,4
<i>p</i>	0,00004	0,0021	0,6935	0,0085

n = 3

Tabela 8 - Composição mineral de biomassa de microalgas após fitorremediação

Descrição	Ca (%)	Mg (%)	P (%)	Cu (%)	Zn (%)	Mn (%)	Fe (%)	Na (%)	K (%)
UASB	0,39	0,24	1,1	0,009	0,2	0,01	0,22	0,24	0,9
LA	0,52	0,43	1,1	0,02	0,051	0,02	0,12	0,36	1,6

Os resultados obtidos demonstraram que a biomassa excedente de microalgas apresenta constituição bioquímica rica em proteínas e carboidratos que são de extremo interesse a indústria de rações.

Portanto, a produção de alimentos a partir da biomassa de microalgas pode ocorrer simultaneamente aos processos de tratamento terciário dos efluentes suinícolas.

Embora a maioria dos estudos realizados utilize meios de cultura sintéticos, há poucos relatórios sobre a composição química de microalgas colhidas a partir de dejetos líquidos de suínos ricos em nutrientes, sendo que a maioria utiliza efluentes esterilizados. Conforme Zhu et al. (2013), que estudaram o cultivo *Chlorella zofingiensis* com tratamento de águas residuais da suinocultura, e verificaram que o acúmulo de lipídios foi afetado pela concentração de nutrientes, a acumulação mais elevada de lipídios ocorreu no tratamento com a concentração inicial de DQO de 400 e 800 mg L⁻¹, chegando respectivamente 45,8% e 42,2%. Inversamente aconteceu com o teor de proteínas (15% e 12%), sendo que os carboidratos permaneceram constantes em média de 26%. *Chlorella*, *Chlamydomonas*, e *Scenedesmus* acumularam aproximadamente 31% quando cultivadas em águas residuárias em lipídios (ABOU-SHANAB, et al., 2013)

Para tanto, Shen et al. (2015), que verificaram a composição celular em *Scenedesmus* sp. cultivada com água residuária municipal, atingiu um conteúdo inicial de 50, 35 e 16% de proteínas, carboidratos e lipídios. Ao final do experimento houve uma diminuição de proteína (20%) e aumento de carboidratos (62%) e lipídios (18%) sugerindo que a concentração de nutrientes está diretamente ligada a composição química. Chen et al., (2012) investigaram a composição química de microalgas cultivadas em dejetos bovinos digeridos anaerobicamente num período de 50 dias, resultando no aumento do teor de proteína 19,4-26,1% e diminuição do conteúdo de carboidratos 26,9-4,7% sendo que não houve diferença no teor de lipídios (10%).

Outros estudos têm demonstrado a composição da biomassa. Dickinson et al. (2014) estudaram a remediação simultânea de nutrientes de digestores anaeróbicos com águas residuais municipais pela microalga *Scenedesmus* sp. AMDD, sendo que biomassa crescida nesse meio apresentou um teor de proteínas e carboidratos de 30 e 45% respectivamente, e a concentração de lipídios foi de 6,1%. Wang et al. (2012) evidenciaram a remoção de nutrientes num cultivo com *C. pyrenoidosa* a partir de águas residuais diluídas para produção de lipídios alcançando uma produtividade máxima de 6,3 mg L⁻¹ dia⁻¹. Lu et al. (2015) observaram diferença na composição química dos lipídios em um cultivo de *Chlorella* sp. utilizando dejetos bovinos associados a remoção de nutrientes.

4.6.2 Composição química após separação centrifugação vs coagulação química

O processo de colheita de microalgas é um fator importante que influencia o custo e a quantidade e qualidade dos produtos finais. No entanto, a maioria dos métodos de separação ainda têm desvantagens econômicas ou técnicas, tais como altos custos de energia, toxicidade de flocculante, ou não viabilidade de aumento em escala (HARRIS, MITCHELL, 1973; LEE, et al., 1998).

A fim de tornar o processo economicamente viável, várias abordagens têm sido desenvolvidas para reduzir o custo destes sistemas de colheita, todavia, é importante levar em consideração que a biomassa pode sofrer modificações na sua constituição celular e impactando diretamente na sua finalidade.

Os efeitos dos processos de separação da biomassa sobre a composição estão mostrados na Tabela 9.

Tabela 9 - Efeito do método de colheita na composição celular, após fitorremediação

Método de colheita	Teor (%)			
	Proteínas	Carboidratos	Lipídio	CZ
Coagulação-floculação	56,1 ± 0,4	34,4 ± 0,4	1,8 ± 0,6	7,7 ± 0,5
Centrifugação	58,9 ± 1,3	25,2 ± 0,9	3 ± 0,5	12,8 ± 0,6
<i>p</i>	0,0270	0,0001	0,05	0,0003

n = 3

Tabela 10 - Composição mineral de biomassa de microalgas a partir da centrifugação.

Descrição	Ca (%)	Mg (%)	P (%)	Cu (%)	Zn (%)	Mn (%)	Fe (%)	Na (%)	K (%)
Centrifugação	1,03	0,37	1,32	0,02	0,5	0,24	0,5	0,07	0,5

A composição da biomassa após a centrifugação constituiu-se de 58,9, 25,2 e 3% de proteínas, carboidratos e lipídios, respectivamente (Tabela 9). Não houve diferença significativa na percentagem de lipídios, quando comparando as células colhidas por coagulação química ($p>0,05$). No entanto os conteúdos de carboidratos, proteínas e matéria mineral demonstraram diferenças significativas ($p<0,05$). Embora o conteúdo de carboidrato tenha sido reduzido de 34,4% para um valor médio de 25,2% uma diminuição de 1,36 vezes. Essa diminuição dos carboidratos presente em microalgas é justificada pelo ato físico da centrifugação na biomassa, que altera a eficiência de recuperação da biomassa.

Após a colheita por centrifugação o teor de matéria mineral foi de 12,8%, um aumento de 1,6 vezes quando comparadas por precipitação química (Tabela 9) com concentração rica em cálcio, fósforo, zinco, ferro e potássio com 1, 1,3, 0,5, 0,5 e 0,5% respectivamente (Tabela 10).

Lee et al. (1998) testaram os efeitos de três métodos de floculação, por ajuste do pH da cultura, floculação por sulfato de alumínio e floculação com biopolímero sobre a microalga *Botryococcus braunii*, e concluíram que não houve diferença significativa entre os diferentes métodos utilizados para o teor de lipídios. Um estudo semelhante com *Nannochloropsis oculata* e *Thalassiosira weissflogii* também mostrou resultados semelhantes no teor de lipídios, no entanto, houve algumas diferenças no perfil de ácidos graxos (BORGES, et al., 2011).

Outro estudo relatou as quantidades de lipídios a partir de microalgas colhidas por flotação, que foram significativamente mais elevadas do que as colhidas por centrifugação (COWARD, et al., 2014). Os métodos de ozoflotação e centrifugação foram aplicados para colheita de microalgas, e verificaram que a quantidade de lipídios extraídos foi de 6 e 12% por centrifugação e ozoflotação, respectivamente, e o rendimento de ácidos graxos foi de 1,23% (centrifugação) para 3,23% (ozoflotação) (VELASQUEZ-ORTA, et al., 2014).

4.6.3 Composição química com deficiência de nutrientes

As microalgas sintetizam duas classes principais de lipídios: lipídios neutros, que compreendem os mono, di e triacilgliceróis; e

lipídios polares que incluem os fosfolipídios e galactolipídios (GUSCHINA; HARWOOD, 2006). Os lipídios polares são os principais componentes de membranas biológicas e representam a classe mais abundante de lipídios em microalgas, quando cultivada sob condições abundantes de nutrientes. Em contraste, a proporção de TAG, que é a principal fonte de biocombustível, representa apenas uma pequena fração do total de lipídios sob tais condições de crescimento (SIAUT, et al., 2011).

A possibilidade de engenharia metabólica fornece uma ferramenta importante para estudos da composição celular de microalgas cultivadas com água residuária da suinocultura. Juntamente com o uso de corantes tais como o vermelho do nilo, que permite a determinação rápida de lipídios neutros (BERTOZZINI, et al., 2011; NATUNEN, et al., 2014; RUMIN, et al., 2015).

Essa acumulação de lipídios acontece principalmente sob condições de privação de nutrientes. Muitas microalgas alteraram suas vias biossintéticas de lipídios para a formação e acumulação de lipídios neutros, principalmente sob a forma de TAGs, juntamente com pequenas quantidades de monoacilgliceróis, diacilgliceróis e esteróis ésteres (HU, et al., 2008).

O microscópio de fluorescência foi utilizado para observar as células de microalgas sob privação de N e P ao longo do tempo. As imagens (Figura 16) mostram que lipídios neutros (fluorescência amarelo avermelhado) aumentaram, sendo que a partir do 10 dia houve início da formação de grânulos de lipídios e do 16 dia já é nítido o acúmulo de lipídios se estendendo até final do experimento. Enquanto que nesse período a clorofila diminuiu (Apêndice B).

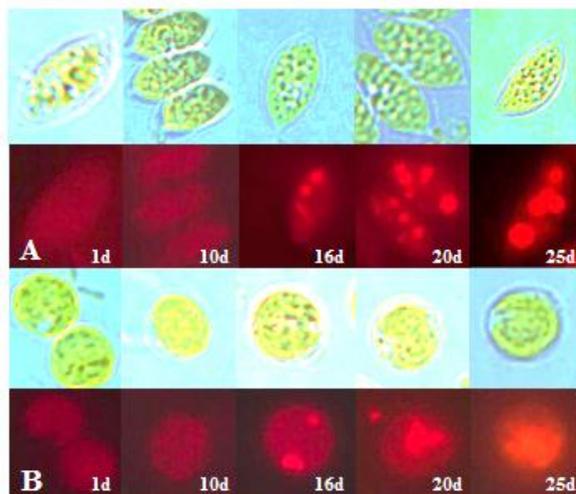


Figura 16 - Imagens de microscopia de fluorescência com consórcio de (A) *Scenedesmus* spp. e (B) *Chlorella* spp. coradas com Vermelho do Nilo e que mostram o acúmulo de lipídios neutros após 1, 10, 16, 20 e 25 dias cultivadas com deficiência de nitrogênio e fósforo.

A concentração de N e P afeta acumulação de lipídios no interior das células. Este fenômeno é particularmente interessante para melhorar a nossa compreensão atual do metabolismo e variações fisiológicas em microalgas como resultado de mudanças no meio de cultura, especialmente a partir de efluentes de águas residuais. Assim, enquanto a produção de biodiesel a partir dessa biomassa parece razoável, o seu uso para alimentação animal ou a produção de bioetanol pode ser interessante.

Os lipídios e carboidratos são dois grandes grupos de compostos de carbono de armazenamento de energia que aparecem nas células de microalgas, em resposta a condições de estresse (SIAUT, et al., 2011; ZHU, et al., 2014). Na Tabela 11 apresenta a composição química após 25 dias privadas de nitrogênio e fósforo. A biomassa das microalgas separadas a partir da privação de N e P mostraram 22, 56,8 e 16,3% de proteínas, carboidratos e lipídios, respectivamente. Em comparação com o controle, houve um aumento significativo ($p < 0,05$) em carboidratos e lipídios, aproximadamente 2,25 vezes em carboidratos, e 5,4 vezes em lipídios ao passo que as proteínas diminuíram 2,7 vezes (58,9% para 22%). Em contraste, a biomassa

privada de N e P proporcionou 4,8% em cinzas, tal matéria sendo rica em P (0,8%) e K (0,6%) de acordo com a Tabela 12.

Tabela 11 - Composição química de microalgas *Chlorella* spp. e *Scenedesmus* spp. cultivadas em diferentes condições.

Condições de Cultivo	Teor (%)							
	Proteínas	p	Carboidratos	p	Lipídios	p	CZ	p
Controle	58,9 ± 1,3		25,2 ± 0,9		3 ± 0,5		12,8 ± 0,6	
Def.* de N	52,3 ± 1,8	0,0159	35,3 ± 4,1	0,0208	4,8 ± 1,5	0,1256	7,6 ± 0,7	0,0031
Def.* de P	49,7 ± 0,1	0,0023	40,4 ± 0,1	0,0002	4,1 ± 0,2	0,0523	5,9	0,0005
Def.* de N/P	22 ± 3	0,0003	56,8 ± 3,2	0,0004	16,3 ± 0,8	0,0002	4,8 ± 0,6	0,0006

* Deficientes, n = 3

Tabela 12 - Composição mineral da biomassa de microalgas com diferentes concentrações de nutrientes.

Descrição	Ca (%)	Mg (%)	P (%)	Cu (%)	Zn (%)	Mn (%)	Fe (%)	Na (%)	K (%)
Def.* de N	0,6	0,5	0,8	0,005	0,1	0,03	0,23	0,13	0,6
Def.* de P	0,5	0,6	0,5	0,003	0,1	0,01	0,2	0,2	0,5
Def.* de N e P	0,3	0,3	0,8	0,004	0,05	0,01	0,3	0,03	0,6

* Deficientes

O esgotamento do nitrogênio leva a um aumento no teor de lipídios ou carboidratos, porque isso as obriga a converterem clorofila e proteína/peptídeos para lipídios/carboidratos em resposta ao ambiente extremo (JIAN-MING, et al., 2010; HO, et al., 2012; SUN, et al., 2014). É bem sabido que, em condições favoráveis de cultivo, muitas microalgas possuem um mecanismo de particionamento de carbono fotossintético que pode resultar em 8-15% de lipídios, 20-40% de carboidratos, 30-50% de proteína. Quando as condições de cultura mudam, estas microalgas também podem ter a capacidade de sofrer mudanças programáticas na partição do carbono fotossintético e composição química (DEAN, et al., 2010). Esse mecanismo de mudança da composição química principalmente aumento de lipídios não foi verificado após 4 dias de fitorremediação, devido o mesmo estar relacionado as funções do estado fisiológico celular.

O mecanismo é desencadeado quando as células tendem a evitar o acúmulo de elétrons na membrana tilacoidal para minimizar a produção de radicais livres. O produto primário dessas reações de fixação de carbono é fosfato triose, que pode ser usada tanto para o amido ou a biossíntese de lipídios (WANG, et al., 2011). Os carboidratos e lipídios são sumidouros de armazenamento dominantes para redução de carbono e duas vias de concorrência para o armazenamento de carbono no âmbito de uma ampla variedade de condições. Quantidades significativas de lipídios se acumulam concomitantemente em condições de falta de nutrientes, especialmente N e P (SHEN, et al., 2015).

Especificamente, a repartição dos polissacarídeos de reserva (que ocorre, por exemplo, sob limitação de luz) normalmente gera energia através da glicólise que ocorre no citoplasma seguido pelo ciclo de ácido cítrico que ocorre na mitocôndria. No entanto, a limitação de N e P, pode desencadear um distúrbio no ciclo do ácido cítrico (isto é, através da inibição de NAD^+ -isocitrato desidrogenase) que conduz à acumulação de citrato na mitocôndria e, subsequentemente, a sua excreção no citosol, resultando no alongamento e formação de ácidos graxos precursores dos lipídios (MÜHLROTH, et al., 2013; BELLOU, et al., 2014).

A síntese de amido a partir de 3-fosfoglicerato requer 6 NADPHs e 9 ATP para cada molécula de 18 carbonos, que é energeticamente mais econômica comparado com a síntese de lipídios, assim especula-se que a acumulação de carboidrato atua como uma resposta rápida ao estresse ambiental. No entanto, como o lipídio tem cerca de 2,25 vezes mais energia em comparação com o valor de energia

de carboidrato, é digno de acreditar que as microalgas tendem a produzir lipídio como um mecanismo de armazenamento a longo prazo, em resposta a prolongado estresse ambiental (Han et al., 1987; Li et al., 2011, SUBRAMANIAN, et al., 2013).

A maioria das pesquisas empregando o método de estimulação com privação de N para a produção de lipídio, geralmente ignoram o papel do P, e esta é uma razão possível para a uma menor produtividade lipídica sob condições de depleção de N. Não está claro se é universalmente aplicável em todas as microalgas que é necessário deficiência de nitrogênio para uma maior produtividade de lipídios com suficiente fornecimento de fósforo para além do que é necessário para o crescimento (RODOLFI et al., 2009; WIDJAJA et al., 2009)

Resultado semelhante foi demonstrado por Chu, et al. (2014), que estudaram o cultivo com microalga *Scenedesmus obliquus*, onde a concentração de proteínas foi rapidamente reduzida de 52,8% para um valor médio de 17,9%, o nível de carboidratos aumentou 25,6% e o acúmulo de lipídios foi incrementado de 13 para 35% com privação de N e P por um período de 16 dias. A acumulação de lipídios acompanhada por aumento de carboidratos foi também observada em outras espécies de microalgas, tais como *S. obliquus*, *Chlorella zofingiensis*, *Phaeodactylum tricornutum* e *Neochloris oleoabundans*, e todos, sem exceção, mostraram que a acumulação de lipídios ficou aquém dos carboidratos (BREUER, et al., (2012).

Uma maior concentração de lipídios (55,8%) foi obtida sob a codeficiência de N e P, aproximadamente 3,70 vezes mais do que a de controle em *C. protothecoides* (LI, et al., 2014). *Chlorella vulgaris* cultivada em meio deficiente de N/P mostraram 2,23 vezes mais lipídios comparadas com meio rico em nutrientes (CHU, et al., 2013). O estresse de nitrogênio e fósforo não teve efeitos sobre composição química, mas influenciou negativamente a produtividade de biomassa em *Nannochloropsis* sp. (MAYERS, et al., 2014).

Li et al. (2011) sugeriram que *Pseudochlorococcum* utilizou o amido como um produto primário de armazenamento de energia e deslocou a partição de carbono em lipídios neutros como um produto de armazenamento secundário após o esgotamento de N. Duas estirpes de *C. reinhardtii* do tipo selvagem primeiro acumularam carboidrato e após acumulação foi induzida a síntese lipídica sob a privação de nutrientes (CAKMAK et al., 2012).

Sob condições de deficiência de nitrogênio, mais abundante em P, relevantes mudanças na composição química foram observadas (Tabela 11). Os teores encontrados na biomassa foram de 35,3, 4,8 e

52,3% de carboidratos, lipídios e proteínas, respectivamente. O teor de proteínas apresentou uma diferença significativa ($p < 0,05$), passando de 58,9 para 52,3% e os carboidratos aumentaram 25,2 para 35,3% em relação ao controle quando cultivadas em meio rico em N e P. Entretanto, foi verificada uma redução de lipídios 16,3 para 4,8% e carboidratos 56,8 para 35,3% e o conteúdo de proteínas aumentou significativamente ($p < 0,05$) de 22 para 52,3% em relação às cultivadas com meio deficiente N e P (Tabela 11). A porcentagem de cinzas da biomassa foi de 7,6%, apresentou concentração de cálcio (0,6%), magnésio (0,5%), fósforo (0,8%) e potássio (0,6%) conforme Tabela 12, comparativamente com o controle a matéria mineral reduziu 5,2%.

Msanne et al. (2012) demonstraram que o esgotamento de N desencadeia um padrão semelhante na síntese inicial de carboidrato seguida pela acumulação de lipídio em duas diferente microalgas *C. reinhardtii* e *Coccomyxa* sp. C-169. Recht et al. (2012) sugeriram que a maior resposta imediata ao estresse de *Haematococcus pluvialis* foi a produção intensiva de carboidratos, que depois foram convertidos em ácidos graxos. Note-se que a degradação do carboidrato proporciona metabólitos para a produção de lipídios (LI et al., 2011; RISMANI-YAZDI et al., 2011).

A limitação de nitrogênio influencia os teores de lipídios, carboidratos e proteínas e depende de cada espécie (WU, et al., 2014). A concentração de lipídios (19-35,5%) e carboidratos (30-41%) aumentou significativamente com a falta de N ao longo do tempo e o nível de proteínas (42-16%) e clorofila diminuíram drasticamente (SUN, et al., 2014). Ikarán, et al. (2015) constataram em *Chlorella vulgaris* que a concentração de proteína diminuiu de 45% para 16%, houve um rápido aumento em carboidratos 23-53% e lipídios incrementou 25% após o esgotamento de nitrogênio.

A privação de N em *Scenedesmus obliquus* CNW-N fez com que diminuísse o nível de proteínas 50,4-25%, no entanto, o conteúdo de carboidratos aumentaram 20,9-49,36% (HO, et al., 2013). Bondioli, et al. (2012) e Su, et al., (2011) o teor de lipídios aumentou 10-48% e 39-69% em *Nannochloropsis* spp. e *Tetraselmis suecica* após esgotamento de N, respectivamente.

O teor de proteínas em *C. vulgaris* FSP-E, *C. vulgaris* ESP-6, e *C. orbicularis* Tai-04 diminuiu 60,4-21,1%, 47,8-22,8%, e 34-20,2%, respectivamente. Em contraste, o teor de carboidratos da *C. vulgaris* FSP-E, *C. vulgaris* ESP-6, e *C. orbicularis* Tai-04 aumentou 12,2-54,1%, 18,2-48,6%, e 34,1-47,3%, respectivamente, o teor lipídio também aumentou durante a privação de nitrogênio, mas foi menos

significativo, quando comparado com o de carboidrato (HO, et al., 2013).

O fósforo é usado para a formação de ácidos nucleicos, membranas lipídicas e das moléculas de ATP em células (PECCIA, et al., 2013). A deficiência de P pode afetar a síntese bioquímica (KILHAM, et al., 1997). Para compreender a variação da composição química durante a privação de fósforo, os teores de proteína e carboidratos/lipídios foram avaliados. Conforme a Tabela 11 a composição química das microalgas cultivadas em meio rico em N e deficientes de P, foi de 40,4, 4,1 e 49,7% em carboidratos, lipídios e proteínas, respectivamente. Houve uma diminuição significativa ($p < 0,05$) no teor de proteína 58,9 para 49,7% e aumento significativo ($p < 0,05$) nos carboidratos 25,2 para 40,4% e um acréscimo nos lipídios 3 para 4,1% em relação ao controle (Tabela 11). Todavia as microalgas cultivadas com privação de N/P as concentrações de carboidratos e lipídios diminuíram 56,8 para 40,4% e 16,3 para 4,1%, respectivamente (Tabela 11). O decréscimo de lipídios foi de 4 vezes. Entretanto, não foi verificada diferença com as cultivadas somente com P, privadas de N (Tabela 11)

A matéria mineral representou 5,9% da composição celular das microalgas cultivadas com deficiência de P e enriquecido com N sendo é rica em minerais tais como, Ca (0,5%), Mg (0,6%), P (0,5%) e K (0,5%). Em relação ao controle as cinzas diminuíram cerca de 6,9% (Tabela 12).

A atividade do CCMs (mecanismo de concentração de CO_2) em *Chlorella emersonii* foi marcadamente regulada sob condições limitadas de fosfato, uma vez que levou a uma velocidade de crescimento lento e um aumento de carbono inorgânico. Aquisição de carbono é um processo que requer ATP. É provável que os resultados de limitação de P nos níveis de ATP diminuiu, reduzindo a atividade de CCMs, e assim, diminuindo a produtividade de lipídios (YOUNG; BEARDALL, 2005).

Supõe-se que o fósforo assimilado em condições de carência de N, é utilizado pela célula para sintetizar compostos metabolicamente constituídos por proteínas (nomeadamente enzimas para a síntese de lipídios), ADN, ARN, ATP e metabólicos intermediários. Todos estes materiais fornecem uma fonte de energia para a acumulação de lipídios sob deficiência de N (CHU et al., 2013).

Chu et al. (2014) apresentaram resultados similares a esse estudo com *Scenedesmus obliquus*, embora a biomassa tivesse composição inicial diferente. Esses autores observaram que as proteínas diminuíram 52,8-45%, e o conteúdo lipídico teve um pequeno

incremento de 13-15%. Todavia a concentração de carboidratos diminuiu 16-14%.

Para tanto Chu, et al. (2013) obtiveram resultados contrários a esse estudo, em *Chlorella vulgaris* o teor total em lipídios aumentou de 24,6 para 37,7% em 14 dias somente cultivadas com P.

Em *Chlorella* sp., quando inoculadas num meio de cultura com baixo nível fósforo (32 μM), a acumulação de lipídios (23,6%) foi mais elevada do que as células não limitada (240 μM). O teor de proteína não foi alterado de forma significativa, embora tenha ocorrido um decréscimo ao longo do tempo, enquanto que os carboidratos foram dependentes da concentração de fósforo (LIANG et al., 2013). *Isochrysis galbana* acumulam até 50% de lipídios quando deficientes de P e a redução da concentração de clorofila e acúmulo de carotenóides (ROOPNARAIN et al., 2014). Em contraste, constatou-se também que o conteúdo de carboidratos em *Dunaliella parva* foi significativamente reduzido em resposta à limitação de fósforo (SAID et al., 2009).

A variação de fósforo no meio de cultivo da microalga *Arthrospira Spirulina platensis* não afetou o teor lipídico das células. Porém, o nível de carboidratos apresentou um aumento de até 60% para concentrações de 10 mg L⁻¹ de fósforo (MARKOU et al., 2012).

Em *S. costatum*, o nível de lipídios totais celulares aumentou sob limitação de fósforo, mas não por limitação de nitrogênio. Os carboidratos foram acumulados sob a limitação de N e P e o teor total de proteína foram significativamente mais baixos do que os tratamentos de alta concentração de nutrientes (ZHAO et al., 2009).

4.6.4 Composição dos ácidos graxos de microalgas privadas de N e P.

O conteúdo e a composição dos lipídios e ácidos graxos em microalgas podem ser influenciados por fatores como luz, temperatura, concentração de nutrientes, concentração de dióxido de carbono e ainda por diferentes espécies (KRZEMIŃSKA, et al. 2015; TALEBI, et al. 2013).

Na Tabela 13, apresentam-se as concentrações de ácidos graxos saturados, ácidos graxos insaturados e ácidos graxos poli-insaturados, em relação ao total dos ácidos graxos analisados.

Tabela 13 – Perfil de ácidos graxos (%)

C12:0	0,02
C14:0	0,5
C14:1	0,1
C15:0	0,5
C16:0	26,9
C16:1	0,4
C17:0	0,3
C17:1	0,2
C18:0	4,6
C18:1n9t	0,06
C18:1n9c	34,8
C18:1n7c	0,03
C18:2n6t	5,3
C18:2n6c	8,1
C18:3n6_Gama	0,2
C18:3n3_Alfa	17,1
C20:0	0,2
C20:1n9c	0,4
C22:0	0,2

Os ácidos palmítico (C16:0), *cis*-oleico (C18:1n9c), *cis*-linoleico (ω -6) (C18:2n6c) e α -linolénico (ω -3) (C18:3n3_Alfa) foram entre os ácidos mais abundantes visto no consórcio representando uma concentração de 26,9, 34,8, 8,1 e 17,1%, respectivamente (Tabela 13). Entretanto outros ácidos foram encontrados em menores concentrações. Na Tabela 14 são mostrados dados comparativos do perfil de ácido graxo de diferentes espécies.

Tabela 14 – Comparação do perfil de ácido graxo com outras espécies reportadas na literatura

Microalga	Ácido graxo (%)			Referências
	C16:0	C18:1	C18:2 C18:3	
<i>Chlorella zofingiensis</i>	32	26	29 11	Zhu et al., 2014
<i>Chlorella zofingiensis</i>	39	-	29,2 13,9	Zhu et al., 2013
<i>Botryococcus</i> sp.	19,1	24,4	8,4 19	Zhila et al., 2005
<i>Scenedesmus obliquus</i>	23,5	58,9	8,3 -	Wu et al., 2014
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	34,2	35,9	18,8 -	Wu et al., 2015
<i>Scenedesmus</i> sp.	25,2	15,3	17,3 -	Sun et al., 2014
<i>N. oleoabundans</i>	19,9	24,6	13,1 12,3	Sun et al., 2014
<i>Chlorella</i> spp. e <i>Scenedesmus</i> spp.	26,6	34,8	8,1 17,1	Este estudo

Ácidos graxos como ômega-3 representam um importante componente estrutural das membranas celulares humanas, particularmente células neurais. O consumo desse suplemento tem demonstrado a prevenção de doenças cardiovasculares, nos sistemas nervosos e inflamatórias. Com relação à saúde cardiovascular, o consumo regular de ω -3 os ácidos graxos podem ajudar a reduzir o risco de hipertensão, trombose, enfarte do miocárdio e arritmias cardíacas (SIJTSMA L; SWAAF, 2004; BRUNNER, 2006 HORROCKS; YEO, 1999). Outros estudos mostraram que uma proporção equilibrada de ω 6/ ω 3 na dieta diminui as doses de medicamentos farmacêuticos necessários. (SIMOPOULOS, 2002).

Além dessas vantagens, alguns ácidos graxos de microalgas tem a capacidade de para interferir no crescimento bacteriano. Estudos de estrutura e função têm indicado que tal atividade antimicrobiana depende tanto da sua cadeia e grau de insaturação. Os ácidos gordos com comprimentos de cadeia superiores a 10 átomos de carbono pode induzem a lise de protoplastos bacterianos (GUEDES, et al., 2011). Já o ácido *cis*-oleico têm excelentes propriedades de liquidez e de fluidez, como fazem muitos dos seus derivados. A cadeia longa provoca uma barreira resistente a água, que é uma propriedade explorada em aplicações tão diversas como aditivos, tratamentos de pele e cremes. Ainda seus derivados são usados na formulação de detergentes, cosméticos e lubrificantes, e na produção de intermediários, tais como surfactantes, solventes e produtos químicos finos (NAIK, 1995; MILLICAN; BROWN, 1944).

5 CONCLUSÕES

O crescimento das microalgas foi inibido em meio contendo efluentes do UASB e LA com concentrações acima de 6 e 50% v/v, respectivamente.

As eficiências de remoção de nitrogênio amoniacal dos efluentes foram de 44,3% (UASB) e 77,6% (LA). Já a eficiência de remoção de fósforo foi de 90 e 77% para os efluentes UASB e LA, respectivamente.

A qualidade da água após fitorremediação apresenta um potencial para reutilização no processo produtivo de suínos.

A biomassa de microalgas a partir de processos de tratamento terciário de efluentes da suinocultura são ricas em proteínas ($\geq 44\%$) e carboidratos ($\geq 34\%$) mas com baixo teor lipídico ($\geq 2\%$).

O processo de colheita altera a composição da biomassa, a centrifugação diminui cerca 1,4 vezes o teor de carboidratos. Em resposta a condições de estresse da privação de N e P as microalgas acumularam lipídios (16,3%) e carboidratos (56,8%).

Privando de N ou P não apresentaram diferenças nos teores de lipídios, mas houve variação nas proteínas e carboidratos. As microalgas limitadas de N e P se demonstraram serem ricas em ω -3 e ω -6.

6 REFERENCIAS

ABDEL-BAKY, H. H., et al. Enhancement of lipid accumulation in *Scenedesmus obliquus* by optimizing CO₂ and Fe³⁺ levels for biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 119, p. 429–432, 2012.

ABDEL-RAOUF, N., et al. Microalgae and wastewater treatment. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 19, n. 3, p. 257-275, 2012.

ABELIOVICH, A.; AZOV, Y. Toxicity of ammonia to algae in sewage oxidation ponds. **Applied and environmental microbiology**, v. 31, n. 6, p. 801-806, 1976.

ABOU-SHANAB, R. A. et al. Microalgal species growing on piggery wastewater as a valuable candidate for nutrient removal and biodiesel production. **Journal of environmental management**, v. 115, p. 257-264, 2013.

ADAMS, C.; BUGBEE, B. Nitrogen retention and partitioning at the initiation of lipid accumulation in nitrogen-deficient algae. **Journal of Phycology**, v. 50, n. 2, p. 356-365, 2014.

AFONSO, E. R. et al. Licenciamento Ambiental na Suinocultura Brasileira. In: **III Simpósio de Sustentabilidade e Ciência Animal**. 2013.

ALCAINE, A. **Biodiesel from microalgae**. Royal School of Technology. Chemical Engineering and Technology 2010.

AMBRÓSIO, C. L. B. et al. Carotenóides como alternativa contra a hipovitaminose A. **Revista. Nutrição**, v. 19, n. 2, p. 233-243, 2006.

AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY; FIRESTONE, David. **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society**. Champaign, IL,US: AOCS, 1989.

AN, J.Y. et al. Hydrocarbon production from secondarily treated piggery wastewater by the green alga *Botryococcus braunii*. **Journal of Applied Phycology**, v. 15, n. 2-3, p. 185-191, 2003.

AN, M. et al. Expression of fatty acid desaturase genes and fatty acid accumulation in *Chlamydomonas* sp. ICE-L under salt stress. **Bioresource Technology**, v. 149, p. 77-83, 2013.

ANTHONISEN, A. C., et al. Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid. **Journal of the Water Pollution Control Federation**, v. 48, p.835-852, 1976.

AOAC - Association of Official Analytical Chemists. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 16th ed. 1995.

APHA – American Public Health Association. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 22 ed. Washington, DC: American Public Health Association, 2012.

ARANTES A. et al. **Comparação de meios de cultivo autotróficos, mixotróficos e heterotróficos para produção de biomassa de microalgas com foco em biocombustíveis e coprodutos**. Universidade Federal do Paraná – UFPR. 2011.

ASLAN, S. KAPDAN, I. K. Batch kinetics of nitrogen and phosphorus removal from synthetic wastewater by algae. **Ecological Engineering**, v. 28, n. 1, p. 64-70, 2006.

ASSIS, F. O. Bacia hidrográfica do rio Quilombo: Dejetos de suínos e impactos ambientais. **Raega - O Espaço Geográfico em Análise**. Curitiba, n. 8, p. 107-122, 2004.

ABPA - Associação Brasileira de Proteína Animal. Relatório anual. 2015

AYERS, R.S.; WESTCOT, D.W. La calidad del agua en la agricultura. Roma: FAO, 1987. 174 p.

AZOV, Y.; GOLDMAN, J. C. Free ammonia inhibition of algal photosynthesis in intensive cultures. **Applied and environmental microbiology**, v. 43, n. 4, p. 735-739, 1982.

BALL, S. G.; MORELL, M. K. From bacterial glycogen to starch: understanding the biogenesis of the plant starch granule. **Annual review of plant biology**, v. 54, n. 1, p. 207-233, 2003.

BARTOSH, Y.; BANKS, C. J. Algal growth response in a range of light and temperature conditions: implications for non-steady-state conditions in waste stabilisation ponds. **Water science and technology**, v. 55, n. 11, p. 211-218, 2007.

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

BECKER, W. **Microalgae in human and animal nutrition**. A. Richmond (Ed.), Handbook of microalgal culture., Blackwell, Oxford (2004), p. 312–351, 2004.

BELLOU, S. et al. Microalgal lipids biochemistry and biotechnological perspectives. **Biotechnology advances**, v. 32, n. 8, p. 1476-1493, 2014.

BENEMANN, J. R. Feasibility analysis of photobiological hydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 22, n. 10, p. 979-987, 1997.

BERNARDI, C. C. **Reuso de água para irrigação**. Monografia em Especialização Lato-Sensu modalidade MBA. Programa de Gestão Sustentável da Agricultura Irrigada. Área de concentração em Planejamento Estratégico. ISEA-FGV/ECOBUSINESS SCHOOL, Brasília, DF. 52p, 2003.

BERTOZZINI, E. et al. Application of the standard addition method for the absolute quantification of neutral lipids in microalgae using Nile red. **Journal of microbiological methods**, v. 87, n. 1, p. 17-23, 2011.

BI, Z. et al. Characterization of microalgae for the purpose of biofuel production. **American Society of Agricultural and Biological Engineers**, v. 56, n. 4, p. 1529-1539, 2013.

BILLER, P.; ROSS A.B. Pyrolysis GC–MS as a novel analysis technique to determine the biochemical composition of microalgae. **Algal Research**, v.6, p. 91-97, 2014.

BONDIOLI, P. et al. Oil production by the marine microalgae *Nannochloropsis* sp. F&M-M24 and *Tetraselmis suecica* F&M-M33. **Bioresource Technology**, v. 114, p. 567-572, 2012.

BOURSIER, H. et al. Piggery wastewater characterisation for biological nitrogen removal process design. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 3, p. 351-358, 2005.

BRASIL. Lei dos Crimes Ambientais nº 9.605, de 12 de fevereiro de 1998. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 12 fev. 1998. Seção 13, p.2. Retificado no Diário Oficial da União. 1998 seção 17, p.2.

BRASIL. Resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA nº 357, de 17 de Março de 2005. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 18 mar. 2005. n. 053, p.58-63.

SANTA CATARINA. Lei do Código Estadual do Meio Ambiente nº 16.342, de 21 de janeiro de 2014. **Diário Oficial do Estado**, Florianópolis, SC, 12 jan. 2014. n. 19.742, p. 2-11.

BRENNAN, L.; OWENDE, P. Biofuels from microalgae—a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renewable and sustainable energy reviews**, v. 14, n. 2, p. 557-577, 2010.

BREUER, G. et al. The impact of nitrogen starvation on the dynamics of triacylglycerol accumulation in nine microalgae strains. **Bioresource Technology**, v. 124, p. 217-226, 2012.

BRUNNER E. Oily fish and omega 3 fat supplements. **BMJ**, v. 332, n.7544, p. 739–740, 2006.

BRUTON, T., et al. A review of the potential of marine algae as a source of biofuel in Ireland. Dublin: **Sustainable Energy Ireland-SEI**, 2009.

BUCHANAN B. et al. **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**. Rockville, MD: American Society of Plant Biologists; 2000.

CAI, T. et al. Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: status and prospects. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 19, p. 360-369, 2013.

CAKMAK, T. et al. Differential effects of nitrogen and sulfur deprivation on growth and biodiesel feedstock production of *Chlamydomonas reinhardtii*. **Biotechnology and bioengineering**, v. 109, n. 8, p. 1947-1957, 2012.

CANIZARES, R. O.; DOMINGUEZ, A. R. Growth of *Spirulina maxima* on swine waste. **Bioresource Technology**, v. 45, n. 1, p. 73-75, 1993.

CARVALHO, A.P.; et al. Simultaneous effect of irradiance and temperature on biochemical composition of the microalga *Pavlova lutheri*. **Journal of Applied Phycology**, v. 21, n. 5, p. 543-552, 2009.

CBAA - Compêndio Brasileiro de Alimentação Animal. **Método nº 36**. Cinzas ou Matéria mineral, p. 137, 2009.

CHEIRSILP, B.; TORPEE, S. Enhanced growth and lipid production of microalgae under mixotrophic culture condition: effect of light intensity, glucose concentration and fed-batch cultivation. **Bioresource Technology**, v. 110, p. 510-516, 2012.

CHEN, G. Q.; CHEN, F. Growing phototrophic cells without light. **BioTechnology letters**, v. 28, n. 9, p. 607-616, 2006.

CHEN, G., et al. Enhancing the productivity of microalgae cultivated in wastewater toward biofuel production: A critical review. **Applied Energy**, v. 137, p. 282-291, 2015.

CHEN, R. et al. Freshwater algal cultivation with animal waste for nutrient removal and biomass production. **Biomass and Bioenergy**, v. 39, p. 128-138, 2012.

CHEN, W. et al. Effect of nitrite on growth and microcystins production of *Microcystis aeruginosa* PCC7806. **Journal of applied phycology**, v. 23, n. 4, p. 665-671, 2011.

CHERNG, J.Y.; SHIH, M.F. Preventing dyslipidemia by *Chlorella pyrenoidosa* in rats and hamsters after chronic high fat diet treatment. **Life sciences**, v. 76, n. 26, p. 3001-3013, 2005.

CHIA, M. A., et al. Lipid composition of *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae) as a function of different cadmium and phosphate concentrations. **Aquatic Toxicology**, 128-129, p. 171-182, 2013.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **BioTechnology advances**, v. 25, n. 3, p. 294-306, 2007.

CHU, F. F., et al. Effect of phosphorus on biodiesel production from *Scenedesmus obliquus* under nitrogen-deficiency stress. **Bioresource technology**, v.152, p. 241–246, 2014.

CHU, F. F., et al. Phosphorus plays an important role in enhancing biodiesel productivity of *Chlorella vulgaris* under nitrogen deficiency. **Bioresource technology**, v. 134, p. 341-346, 2013.

COLAK, O.; KAYA Z. A study on the possibilities of biological wastewater treatment using algae. **Doga Biyolji Serisi**. v. 12, n.1, p. 18–29, 1988.

COLLOS, Y., HARRISON, J. Acclimation and toxicity of high ammonium concentrations to unicellular algae. **Marine pollution bulletin**, v. 80, n. 1, p. 8-23, 2014.

CONVERTI, A., et al. Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 48, n. 6, p. 1146-1151, 2009.

CÒRDOBA, L.; HERNÁNDEZ, E. S. Final treatment for cattle manure using immobilized microalgae. II. Influence of the recirculation. **Resources, conservation and recycling**, v. 13, n. 3, p. 177-182, 1995.

COWARD, T et al. Harvesting microalgae by CTAB-aided foam flotation increases lipid recovery and improves fatty acid methyl ester characteristics. **Biomass and Bioenergy**, v. 67, p. 354-362, 2014.

CRONAN, J. E.; WALDROP, G. L. Multi-subunit acetyl-CoA carboxylases. **Progress in lipid research**, v. 41, n. 5, p. 407-435, 2002.

DARTORA, V. et al. **Manejo de dejetos suínos**. Concórdia: EMBRAPA CNPSA/ EMATER/RS, 41 p., 1998.

DE LA NOÛE, J. et al. Algae and waste water. **Journal of applied phycology**, v. 4, n. 3, p. 247-254, 1992.

DE LA NOÛE, J.; BASSERES, A. Biotreatment of anaerobically digested swine manure with microalgae. **Biological wastes**, v. 29, n. 1, p. 17-31, 1989.

DE LA NOUE, J.; DE PAUW, N. The potential of microalgal bioTechnology: a review of production and uses of microalgae. **BioTechnology advances**, v. 6, n. 4, p. 725-770, 1988.

DE OLIVEIRA, M. A. C. L., et al. Growth and chemical composition of *Spirulina maxima* and *Spirulina platensis* biomass at different temperatures. **Aquaculture International**, v. 7, n. 4, p. 261-275, 1999.

DE PAUW, N. et al. Tertiary treatment of swine manure by mass culturing of algae Mitt. Inter Nat. Verein. **Limnology**. v. 21, p. 405-506, 1978.

DE PAUW, N. et al. **Heated and unheated outdoor cultures of marine algae with animal manure**. In: SHELEF, G., SOEDER, C.J. (Eds.). *Algae Biomass*. Elsevier/North Holland Biomedical Press:Amsterdam, p. 315-341, 1980.

DEAN, A. P. et al. Using FTIR spectroscopy for rapid determination of lipid accumulation in response to nitrogen limitation in freshwater microalgae. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 12, p. 4499-4507, 2010.

DELABARY, G. S et al. **Avaliação do crescimento de três microalgas para a remoção de nutrientes de efluentes de estação de tratamento de dejetos de suínos**. Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC, p. 111. 2013.

DHARGALKAR, V. K.; VERLECAR, X. N. Southern Ocean seaweeds: A resource for exploration in food and drugs. **Aquaculture**, v. 287, n. 3, p. 229-242, 2009.

DICKINSON, K. E. et al. Simultaneous remediation of nutrients from liquid anaerobic digestate and municipal wastewater by the microalga *Scenedesmus* sp. AMDD grown in continuous chemostats. **Journal of applied microbiology**, v. 118, n. 1, p. 75-83, 2014.

DRATH, M. et al. Ammonia triggers photodamage of photosystem II in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. **Plant physiology**, v. 147, n. 1, p. 206-215, 2008.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Gestão Ambiental na Agropecuária**. 2014.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Sistema Brasileiro de Classificação de Solos**. 2005.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Tecnologias para o Manejo de Resíduos na Produção de Suínos - Manual de Boas Práticas**. 2004.

ESCUADERO, A. et al. Ammonium removal from anaerobically treated effluent by *Chlamydomonas acidophila*. **Bioresource Technology**, v. 153, p. 62-68, 2014.

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Water for animals**. 1996.

FATMA – Fundação do Meio Ambiente. **Instrução Normativa IN-11**. Portaria Intersecretorial nº 01/04, de 24.03.2004. Florianópolis: FATMA, 2004.

FERNANDES, B. D., et al. Light regime characterization in an airlift photobioreactor for production of microalgae with high starch content. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 161, n. 1-8, p. 218-226, 2010.

FERNANDEZ, E.; GALVAN, A. Nitrate assimilation in *Chlamydomonas*. **Eukaryotic cell**, v. 7, n. 4, p. 555-559, 2008.

FINKEL, Z. V. et al. Phytoplankton in a changing world: cell size and elemental stoichiometry. **Journal of Plankton Research**, v. 32, n. 1, p. 119–137, 2011.

FRANCHINO, M. et al. Growth of three microalgae strains and nutrient removal from an agro-zootechnical digestate. **Chemosphere**, v. 92, n. 6, p. 738-744, 2013.

FUKUDA, H. et al. Biodiesel fuel production by transesterification of oils. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 92, n. 5, p. 405-416, 2001.

GANTAR, M.; et al. Nutrient removal and algal succession during the growth of *Spirulina platensis* and *Scenedesmus quadricauda* on swine wastewater. **Bioresource Technology**, v. 36, n. 2, p. 167-171, 1991.

GAO, C., et al. Application of sweet sorghum for biodiesel production by heterotrophic microalga *Chlorella protothecoides*. **Applied Energy**, v. 87, n. 3, p. 756-761, 2010.

GARCÍA, C. et al. Mixotrophic growth of the microalga *Phaeodactylum tricorutum*: influence of different nitrogen and organic carbon sources on productivity and biomass composition. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 1, p. 297-305, 2005.

GEIDER, R. J. Light and temperature dependence of the carbon to chlorophyll a ratio in microalgae and cyanobacteria: implications for physiology and growth of phytoplankton. **New Phytologist**, p. 1-34, 1987.

GEORGE, B., et al. 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.

GERLOFF-ELIAS, A. et al. Temperature-and pH-dependent accumulation of heat-shock proteins in the acidophilic green alga *Chlamydomonas acidophila*. **FEMS microbiology ecology**, v. 56, n. 3, p. 345-354, 2006.

GHIRARDI, M. L. et al. Microalgae: a green source of renewable H₂. **Trends in biotechnology**, v. 18, n. 12, p. 506-511, 2000.

GINZBERG, A. et al. Chickens fed with biomass of the red microalga *Porphyridium* sp. have reduced blood cholesterol level and modified fatty acid composition in egg yolk. **Journal of Applied Phycology**, v. 12, n. 3-5, p. 325-330, 2000.

GIORDANO, M., et al. Fourier transform infrared spectroscopy as a novel tool to investigate changes in intracellular macromolecular pools in the marine microalga *Chaetoceros muellerii* (*Bacillariophyceae*). **Journal of Phycology**, v. 37, n. 2, p. 271-279, 2001.

GODOS, I. de et al. A comparative evaluation of microalgae for the degradation of piggery wastewater under photosynthetic oxygenation. **Bioresource technology**, v. 101, n. 14, p. 5150-5158, 2010.

GOLDMAN, J. C. et al. The effect of carbon on algal growth - its relationship to eutrophication. **Water research**, v. 6, n. 6, p. 637-679, 1972.

GÓMEZ, C. et al. Use of secondary-treated wastewater for the production of *Muriellopsis* ssp. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n.5, p.2239-49, 2013.

GONZÁLEZ, C. et al. Microalgae-based processes for the biodegradation of pretreated piggery wastewaters. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 80, n. 5, p. 891-898, 2008.

GONZÁLEZ, L. E. et al. Efficiency of ammonia and phosphorus removal from a colombian agroindustrial wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus dimorphus*. **Bioresource Technology**, v. 60, n. 3, p. 259-262, 1997.

GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, C. et al. Effect of operational conditions on the degradation of organic matter and development of microalgae–bacteria consortia when treating swine slurry. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 90, n. 3, p. 1147-1153, 2011.

GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, C. et al. Nitrogen transformations under different conditions in open ponds by means of microalgae–bacteria

consortium treating pig slurry. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 2, p. 960-966, 2011.

GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, C.; BALLESTEROS, M. Linking microalgae and cyanobacteria culture conditions and key-enzymes for carbohydrate accumulation. **BioTechnology advances**, v. 30, n. 6, p. 1655-1661, 2012.

GROBBELAAR, Johan U. Algal Nutrition–Mineral Nutrition. **Handbook of microalgal culture: BioTechnology and applied phycology**, p. 95-115, 2004.

GROENEWEG, J. et al. First results of outdoor treatment of pig manure with algal-bacterial systems. **Algae Biomass**, Elsevier-North Holland, Amsterdam, p. 255–264, 1980.

GUEDES, A. C. et al. Fatty acid composition of several wild microalgae and cyanobacteria, with a focus on eicosapentaenoic, docosahexaenoic and α -linolenic acids for eventual dietary uses. **Food research international**, v. 44, n. 9, p. 2721-2729, 2011.

GUEDES, A. C. et al. Microalgae as sources of carotenoids. **Marine drugs**, v. 9, n. 4, p. 625-644, 2011.

GUIVANT, J. S.; MIRANDA, C. As duas caras de Jano: agroindústrias e agricultura familiar diante da questão ambiental. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, v. 16, n. 3, p. 85-128, 1999.

GUO, F. et al. Special biochemical responses to nitrogen deprivation of filamentous oleaginous microalgae *Tribonema sp.* **Bioresource Technology**, v. 158, p. 19-24, 2014.

GUSCHINA, I. A.; HARWOOD, J. L. Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. **Progress in lipid research**, v. 45, n. 2, p. 160-186, 2006.

GUTERSTAN, B. TODD, J. Ecological engineering for wastewater treatment and its application in New England and Sweden. **Ambio**, v. 19, p. 173–175, 1990.

HAHN, et al. Effect of process variables on photosynthetic algal hydrogen production. **Biotechnology progress**, v. 20, n. 3, p. 989-991, 2004.

HAN, L. et al. Nutrient removal and lipid accumulation properties of newly isolated microalgal strains. **Bioresource Technology**, v. 165, p. 38-41, 2014.

HAN, Y. et al. Nutritive value of high oil corn for poultry. **Poultry Science**, v. 66, n. 1, p. 103-111, 1987.

HARRIS, R. H.; MITCHELL, R. The role of polymers in microbial aggregation. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 27, n. 1, p. 27-50, 1973.

HARTLEY, A. M. et al. Coprecipitation of phosphate with calcite in the presence of photosynthesizing green algae. **Water Research**, v. 31, n. 9, p. 2261-2268, 1997.

HASEGAWA, T. et al. Hot water extracts of *Chlorella vulgaris* reduce opportunistic infection with *Listeria monocytogenes* in C57BL/6 mice infected with LP-BM5 murine leukemia viruses. **International journal of immunopharmacology**, v. 17, n. 6, p. 505-512, 1995.

HAVLIK, I. et al. On-line monitoring of large cultivations of microalgae and cyanobacteria. **Trends in bioTechnology**, 2013.

HE, M. L.; et al. Supplementation of algae to the diet of pigs: a new possibility to improve the iodine content in the meat. **Journal of animal physiology and animal nutrition**, v. 86, n. 3-4, p. 97-104, 2002.

HERNÁNDEZ, D. et al. Treatment of agro-industrial wastewater using microalgae–bacteria consortium combined with anaerobic digestion of the produced biomass. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 598-603, 2013.

HESPANHOL, I. Potencial de reuso de água no Brasil: agricultura, indústria, município e recarga de aquíferos. **Reúso de água**. Baureri: Manole. p. 37-96. 2003.

HIDAKA, S. et al. A hot water extract of *Chlorella pyrenoidosa* reduces body weight and serum lipids in ovariectomized rats. **Phytotherapy Research**, v. 18, n. 2, p. 164-168, 2004.

HIGARASHI, M. M. et al. **Avaliação de um sistema compacto para o tratamento de efluentes suinícola**. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento. 2004.

HO, S. et al. Effect of light intensity and nitrogen starvation on CO₂ fixation and lipid/carbohydrate production of an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N. **Bioresource Technology**, v. 113, p. 244-252, 2013.

HO, S. H., et al. Characterization and optimization of carbohydrate production from an indigenous microalga *Chlorella vulgaris* FSP-E. **Bioresource technology**, 135, 157-165, 2013.

HOFFMANN, J. P. Wastewater treatment with suspended and nonsuspended algae. **Journal of Phycology**, v. 34, n. 5, p. 757-763, 1998.

HONDA, R. et al. Carbon dioxide capture and nutrients removal utilizing treated sewage by concentrated microalgae cultivation in a membrane photobioreactor. **Bioresource Technology**, v. 125, p. 59-64, 2012.

HORROCKS L.A.; YEO YK: Health benefits of docosahexaenoic acid (DHA). **Pharmacology Research**, v.40, n.3, p.211–225, 1999.

HU, B. et al. Enhanced mixotrophic growth of microalga *Chlorella sp.* on pretreated swine manure for simultaneous biofuel feedstock production and nutrient removal. **Bioresource technology**, v. 126, p. 71-79, 2012.

HU, H.; GAO, K. Response of growth and fatty acid compositions of *Nannochloropsis sp.* to environmental factors under elevated CO₂ concentration. **Biotechnology letters**, v. 28, n. 13, p. 987-992, 2006.

HU, Q. et al. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. **The Plant Journal**, v. 54, n. 4, p. 621-639, 2008.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Estatística da Produção Pecuária**. 2015.

IKARAN, Z. et al. The effect of nitrogen limitation on the physiology and metabolism of *Chlorella vulgaris* var L3. **Algal Research**, v. 10, p. 134-144, 2015.

ILLMAN, A. M. et al. Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium. **Enzyme and microbial technology**, v. 27, n. 8, p. 631-635, 2000.

JEONG, H. et al. Energy efficient growth control of microalgae using photobiological methods. **Renewable Energy**, v. 54, p. 161-165, 2013.

JIANG, Y. et al. Photosynthetic performance, lipid production and biomass composition in response to nitrogen limitation in marine microalgae. **Plant physiology and biochemistry**, v. 54, p. 70-77, 2012.

JOHN, E.; FLYNN, K. Modelling phosphate transport and assimilation in microalgae; how much complexity is warranted?. **Ecological Modelling**, v. 125, n. 2, p. 145-157, 2000.

KHALIL, Z. I., et al. Effect of pH on growth and biochemical responses of *Dunaliella bardawil* and *Chlorella ellipsoidea*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 7, p. 1225-1231, 2010.

KHAN, M. YOSHIDA, N. Effect of l-glutamic acid on the growth and ammonium removal from ammonium solution and natural wastewater by *Chlorella vulgaris* NTM06. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 3, p. 575-582, 2008.

KHAN, S. A. et al. Prospects of biodiesel production from microalgae in India. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 13, n. 9, p. 2361-2372, 2009.

KILHAM, S et al. Effects of nutrient limitation on biochemical constituents of *Ankistrodesmus falcatus*. **Freshwater Biology**, v. 38, n. 3, p. 591-596, 1997.

KINNUNEN, V. et al. Influence of temperature and pretreatments on the anaerobic digestion of wastewater grown microalgae in a laboratory-

scale accumulating-volume reactor. **Water research**, v. 57, p. 247-257, 2014.

KLAUTAU, J. P.; GONÇALVES, M. F. Reúso de água: um projeto e sua viabilidade aplicada a lava-jatos. In: **24º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental. Belo Horizonte-MG. 2007.**

KONG, Q. X. et al. Culture of Microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* in wastewater for biomass feedstock production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, n. 1, p. 9-18, 2010.

KONZEN, A.E. Fertilização de lavoura com dejetos de suínos e cama de aves. In: V Seminário Técnico da Cultura do Milho. **Anais...** Videira, SC, 15 p. 2003.

KRZEMIŃSKA, I. et al. Alterations of the lipid content and fatty acid profile of *Chlorella protothecoides* under different light intensities. **Bioresource technology**, v. 196, p. 72-77, 2015.

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

KUNZ, A et al. Tecnologias de manejo e tratamento de dejetos de suínos estudadas no Brasil. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, v. 22, n. 3, p. 651-665, 2005.

LAU, P. S. et al. Effect of algal density on nutrient removal from primary settled wastewater. **Environmental Pollution**, v. 89, n. 1, p. 59-66, 1995.

LAU, P. S. et al. Wastewater nutrients removal by *Chlorella vulgaris*: optimization through acclimation. **Environmental Technology**, v. 17, n. 2, p. 183-189, 1996.

LEE, J. W. et al. Algal H₂ - Production Systems: Creation of Designer Alga for Efficient and Robust Production of H₂. In: FY 2004 progress report. Oak Ridge National Laboratory Oak Ridge, TN. p. 82-86. 2004.

LEE, K.; LEE, C.G. Effect of light/dark cycles on wastewater treatments by microalgae. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 6, n. 3, p. 194-199, 2001.

LEE, S. J. et al. Effects of harvesting method and growth stage on the flocculation of the green alga *Botryococcus braunii*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 27, n. 1, p. 14-18, 1998.

LI, Y. et al. Photosynthetic carbon partitioning and lipid production in the oleaginous microalga *Pseudochlorococcum* sp.(*Chlorophyceae*) under nitrogen-limited conditions. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 1, p. 123-129, 2011.

LI, Y. et al. Potential lipid accumulation and growth characteristic of the green alga *Chlorella* with combination cultivation mode of nitrogen (N) and phosphorus (P). **Bioresource technology**, v. 174, p. 24-32, 2014.

LI, Y., et al. Regulation of lipid metabolism in the green microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophy–photoinduction cultivation regime. **Bioresource Technology**, 2014.

Liang, K. et al. Effect of phosphorus on lipid accumulation in freshwater microalga *Chlorella* spp. **Journal of Applied Phycology** v.25, p.311–318, 2013.

LIU, B.; BENNING, C. Lipid metabolism in microalgae distinguishes itself. **Current opinion in biotechnology**, v. 24, n. 2, p. 300-309, 2013.

LIU, W. et al. Formation of triacylglycerol in *Nitzschia closterium* f. *minutissima* under nitrogen limitation and possible physiological and biochemical mechanisms. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 418, p. 24-29, 2012.

LOURENÇO, S. O. **Cultivo de Microalgas Marinhas** – princípios e aplicações. 1. ed. São Carlos: RiMa, 2006.

LU, W. et al. Cultivation of *Chlorella* sp. Using Raw Dairy Wastewater for Nutrient Removal and Biodiesel Production: Characteristics Comparison of Indoor Bench-scale and Outdoor Pilot-scale Cultures. **Bioresource Technology**, 2015.

- LU, Y., et al. Biodiesel production from algal oil using cassava (*Manihot esculenta Crantz*) as feedstock. **Journal of Applied Phycology**, v. 22, n. 5, p. 573-578, 2010.
- JIAN-MING, L.V. et al. Enhanced lipid production of *Chlorella vulgaris* by adjustment of cultivation conditions. **Bioresource Technology** v. 101, p. 6797-6804, 2010.
- MACKIE, R. I. et al. Biochemical identification and biological origin of key odor in livestock waste. **Journal of Animal Science**. Savoy. v. 76, p. 1331 – 42, 1998.
- MARKOU, G. et al. Effects of phosphorus concentration and light intensity on the biomass composition of *Arthrospira (Spirulina) platensis*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 8, p. 2661-2670, 2012.
- MARKOU, G. et al. Microalgal and cyanobacterial cultivation: The supply of nutrients. **Water research**, v. 65, p. 186-202, 2014.
- MARTIN, C. et al. Intensive cultivation of freshwater microalgae on aerated pig manure. **Biomass**, v. 7, n. 4, p. 245-259, 1985.
- MARTINEZ, M. E. et al. Nitrogen and phosphorus removal from uLAn wastewater by the microalga *Scenedesmus obliquus*. **Bioresource Technology**, v. 73, n. 3, p. 263-272, 2000.
- MARTINS, F. M. et al. Caracterização de demandas tecnológicas na suinocultura na região sul do Brasil. In: **Congresso da sociedade brasileira de economia, administração e sociologia rural**. 2010.
- MATOS, A.T, et al. Características químicas e microbiológicas do solo, influenciadas pela aplicação de dejetos líquidos de suínos. **Revista Ceres**. Viçosa, v.44, n.254, p.399-410, 1997.
- MATOS, A.T. **Disposição de águas residuárias no solo**. Viçosa: Associação dos Engenheiros Agrícolas do Estado de Minas Gerais, DEA/UFV, 2006. 141p.

MATSUMOTO, M. et al. Saccharification of marine microalgae using marine bacteria for ethanol production. **Biotechnology for Fuels and Chemicals**. Humana Press, p. 247-254, 2003.

MAYERS, J et al. Influence of the N: P supply ratio on biomass productivity and time-resolved changes in elemental and bulk biochemical composition of *Nannochloropsis sp.* **Bioresource technology**, v. 169, p. 588-595, 2014.

MEHTA, S. K.; GAUR, J. P. Use of algae for removing heavy metal ions from wastewater: progress and prospects. **Critical Reviews in BioTechnology**, v. 25, n. 3, p. 113-152, 2005.

MERCHANT, R. E. et al. Nutritional supplementation with *Chlorella pyrenoidosa* for patients with fibromyalgia syndrome: a pilot study. **Phytotherapy Research**, v. 14, n. 3, p. 167-173, 2000.

MERRICK, W. C. Mechanism and regulation of eukaryotic protein synthesis. **Microbiological reviews**, v. 56, n. 2, p. 291-315, 1992.

MEZZARI, M. P. et al. Assessment of N₂O emission from a photobioreactor treating ammonia-rich swine wastewater digestate. **Bioresource technology**, v. 149, p. 327-332, 2013.

MEZZARI, M. P. et al. Assessment of a tannin-based organic polymer to harvest *Chlorella vulgaris* biomass from phycoremediation process treating swine wastewater digestate. **Water Science and Technology**, v. 70, n. 5, p. 888-894, 2014.

MILLICAN, R. C.; BROWN, J. B. The isolation and properties of some naturally occurring octadecenoic (oleic) acids. **Journal of Biological Chemistry**, v. 154, n. 2, p. 437-450, 1944.

MIRANDA, M. S. et al. Antioxidant activity of the microalga *Chlorella vulgaris* cultured on special conditions. **Bollettino chimico farmaceutico**, v. 140, n. 3, p. 165-168, 2000.

MIYACHI, S. et al. Metabolic roles of inorganic polyphosphates in *chlorella* cells. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 93, n. 3, p. 625-634, 1964.

MORRIS, I. Nitrogen assimilation and protein synthesis. W.D.P. Stewart (Ed.), **Algal Physiology and Biochemistry**, Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK , pp. 513–613, 1974.

MOSER, B. R. Impact of fatty ester composition on low temperature properties of biodiesel–petroleum diesel blends. **Fuel**, v. 115, p. 500-506, 2014.

MOUGET, J. L. et al. Algal growth enhancement by bacteria: is consumption of photosynthetic oxygen involved? **FEMS microbiology ecology**, v. 18, n. 1, p. 35-43, 1995.

MSANNE, J. et al. Metabolic and gene expression changes triggered by nitrogen deprivation in the photoautotrophically grown microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* and *Coccomyxa* sp. C-169. **Phytochemistry**, v. 75, p. 50-59, 2012.

MÜHLROTH, A. et al. Pathways of lipid metabolism in marine algae, co-expression network, bottlenecks and candidate genes for enhanced production of EPA and DHA in species of Chromista. **Marine drugs**, v. 11, n. 11, p. 4662-4697, 2013.

MULLER-FEUGA, A. The role of microalgae in aquaculture: situation and trends. **Journal of Applied Phycology**, v. 12, n. 3-5, p. 527-534, 2000.

NAIK, A. et al. Mechanism of oleic acid-induced skin penetration enhancement in vivo in humans. **Journal of controlled release**, v. 37, n. 3, p. 299-306, 1995.

NATUNEN, K. et al. Nile Red staining of phytoplankton neutral lipids: species-specific fluorescence kinetics in various solvents. **Journal of Applied Phycology**, p. 1-8, 2014.

NETO, G. F. S. et al. Análise por injeção em fluxo para determinação de nitrato e nitrito em amostras de águas e dejetos de animais. **In: XI Encontro Nacional sobre Metodologias de Laboratório da Embrapa**. Anais. Concórdia: EMBRAPA, p. 35-35, 2006.

NOGUEIRA, D. P. K. et al. Impact of temperature and light intensity on triacylglycerol accumulation in marine microalgae. **Biomass and Bioenergy**, 2014.

NOMOTO, K. et al. Antitumor activity of *Chlorella* extract, PCM-4, by oral administration. **Cancer & chemotherapy**, v. 10, n. 3, p. 781-785, 1983.

NURDOGAN, Y.; OSWALD, W. J. Enhanced nutrient removal in high-rate ponds. **Water Science and Technology**, v. 31, n. 12, p. 33-43, 1995.

OLGUÍN, E. J. et al. Annual productivity of *Spirulina* (*Arthrospira*) and nutrient removal in a pig wastewater recycling process under tropical conditions. **Journal of Applied Phycology**, v. 15, n. 2-3, p. 249-257, 2003.

OLIVEIRA, R. A. et al. Influência da aplicação de águas residuárias de suinocultura na capacidade de infiltração de um solo podzólico vermelho-amarelo. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola Ambiental**, v. 4, n. 2, 2000.

OSWALD, W.J. Microalgae and wastewater treatment. **Microalgal BioTechnology**. Cambridge Univ. Press, pp. 305–328, 1988.

PANCHA, I. et al. Nitrogen stress triggered biochemical and morphological changes in the microalgae *Scenedesmus* sp. CCNM 1077. **Bioresource Technology**, v. 156, p. 146-154, 2014.

PARK, Y.T. et al. Removal of metal from acid mine drainage using a hybrid system including a pipes inserted microalgae reactor. **Bioresource Technology**, v. 150, p. 242-248, 2013.

PARKHILL, J. P. et al. Fluorescence-based maximal quantum yield for PSII as a diagnostic of nutrient stress. **Journal of Phycology**, v. 37, n. 4, p. 517-529, 2001.

PASSOS, F. et al. Biogas production from microalgae grown in wastewater: Effect of microwave pretreatment. **Applied Energy**, v. 108, p. 168-175, 2013.

PECCIA, J. et al. Nitrogen supply is an important driver of sustainable microalgae biofuel production. **Trends in bioTechnology**, v. 31, n. 3, p. 134-138, 2013.

PEREIRA, L. S. F. P. et al. Análise do desempenho de um sistema de aeração por difusor poroso de bolha fina instalado no reator biológico aeróbio (LA) da estação de tratamento de dejetos suínos (ETDS) da EMBRAPA. In: **Congresso Brasileiro de Gestão Ambiental**. Bauru. Anais... Bauru: IBEAS, 2010.

PEREZ-GARCIA, O. et al. Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products. **Water research**, v. 45, n. 1, p. 11-36, 2011.

PHANG, S.M. Algal production from Agro-industrial and agricultural wastes in Malaysia. **Ambio**, v. 19, p. 415-418, 1990.

PILON, L. et al. Radiation transfer in photobiological carbon dioxide fixation and fuel production by microalgae. **Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer**, v. 112, n. 17, p. 2639-2660, 2011.

PORRA, R.J. et al. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, v. 975, p. 384-394, 1989.

POWELL, N. et al. Towards a luxury uptake process via microalgae—defining the polyphosphate dynamics. **Water research**, v. 43, n. 17, p. 4207-4213, 2009.

PRIYADARSHANI, I., RATH, B. Commercial and industrial applications of micro algae—A review. **J Algal Biomass Utiln**, v. 3, n. 4, p. 89-100, 2012.

PULZ, O.; GROSS, W. Valuable products from bioTechnology of microalgae. **Applied microbiology and bioTechnology**, v. 65, n. 6, p. 635-648, 2004.

RADAKOVITS, R. et al. Genetic engineering of algae for enhanced biofuel production. **Eukaryotic cell**, v. 9, n. 4, p. 486-501, 2010.

RAMARAJ, R. et al. An exploration of the relationships between microalgae biomass growth and related environmental variables. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 135, p. 44-47, 2014.

RANGEL-YAGUI, C. O. et al. Chlorophyll production from *Spirulina platensis*: cultivation with urea addition by fed-batch process. **Bioresource technology**, v. 92, n. 2, p. 133-141, 2004.

RANZI, T. J. D.; ANDRADE, M. A. N. Estudo de viabilidade de transformação de esterqueiras e bioesterqueiras para dejetos de suínos em biodigestores rurais visando o aproveitamento do biofertilizante e do biogás. **Proceedings of the 5th Encontro de Energia no Meio Rural**, 2004.

RASOUL-AMINI, S. et al. Removal of nitrogen and phosphorus from wastewater using microalgae free cells in bath culture system. **Biocatalysis and Agricultural BioTechnology**, v. 3, n. 2, p. 126-131, 2014.

RAZZAK, S.A. et al. Integrated CO₂ capture, wastewater treatment and biofuel production by microalgae culturing - a review. **Renew Sustain Energy**, v. 27, p. 622–653, 2013.

RECHT, L. et al. Patterns of carbohydrate and fatty acid changes under nitrogen starvation in the microalgae *Haematococcus pluvialis* and *Nannochloropsis* sp. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 94, n. 6, p. 1495-1503, 2012.

RENAUD, S. M. et al. Effect of temperature on growth, chemical composition and fatty acid composition of tropical Australian microalgae grown in batch cultures. **Aquaculture**, v. 211, n. 1, p. 195-214, 2002.

RIBEIRO, L. A. et al. Prospects of using microalgae for biofuels production: Results of a Delphi study. **Renewable Energy**, v. 75, p. 799-804, 2015.

RICHARDS, R. G.; MULLINS, B. J. Using microalgae for combined lipid production and heavy metal removal from leachate. **Ecological modelling**, v. 249, p. 59-67, 2013.

RICHMOND, A. **Handbook for Microalgal Mass Culture**, CRC Press, Boca Raton, USA. 1986.

RISMANI-YAZDI, H. et al. Transcriptome sequencing and annotation of the microalgae *Dunaliella tertiolecta*: pathway description and gene discovery for production of next-generation biofuels. **BMC genomics**, v. 12, n. 1, p. 148, 2011.

ROLEDA, M.Y. et al. Effects of temperature and nutrient regimes on biomass and lipid production by six oleaginous microalgae in batch culture employing a two-phase cultivation strategy. **Bioresource Technology**, v. 129, p. 439-449, 2013.

ROOPNARAIN, A. et al. Phosphorus limitation and starvation effects on cell growth and lipid accumulation in *Isochrysis galbana* U4 for biodiesel production. **Bioresource Technology**, 156, p. 408–411, 2014.

RUANGSOMBOON, S. et al. Effects of different nitrogen, phosphorus, and iron concentrations and salinity on lipid production in newly isolated strain of the tropical green microalga, *Scenedesmus dimorphus* KMITL. **Journal of Applied Phycology**, v. 25, n. 3, p. 867-874, 2013.

RUIZ-MARIN, A. et al. Growth and nutrient removal in free and immobilized green algae in batch and semi-continuous cultures treating real wastewater. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 1, p. 58-64, 2010.

RUIZ-MARTINEZ, A. et al. Microalgae cultivation in wastewater: nutrient removal from anaerobic membrane bioreactor effluent. **Bioresource Technology**, v. 126, p. 247-253, 2012.

RUSTAN, A. C.; DREVON, C. A. Fatty acids: structures and properties. **Encyclopedia Of Life Sciences**, 2005.

SAFI, C. et al. Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 35, p. 265–278, 2014.

SAFI, C. et al. Evaluation of the protein quality of *Porphyridium cruentum*. **Journal of Applied Phycology**, v. 25, n. 2, p. 497-501, 2013.

SAID, H. A. et al. Changes in levels of cellular constituents of *Dunaliella parva* associated with inorganic phosphate depletion. **Middle-East Journal of Scientific Research**, v. 4, n. 2, p. 94-99, 2009.

SAKURAI, H. et al. A Feasibility Study of Large-Scale Photobiological Hydrogen Production Utilizing Mariculture-Raised Cyanobacteria. **Recent Advances in Phototrophic Prokaryotes**. Springer New York, p. 291-303, 2010.

SEBASTIAN, S., NAIR, K. V. K. Total removal of coliforms and *E. coli* from domestic sewage by high-rate pond mass culture of *Scenedesmus obliquus*. **Environmental Pollution Series A, Ecological and Biological**, v. 34, n. 3, p. 197-206, 1984.

SHEN, Q. H. et al. Effect of carbon source on biomass growth and nutrients removal of *Scenedesmus obliquus* for wastewater advanced treatment and lipid production. **Bioresource technology**, v. 190, p. 257-263, 2015.

SIAUT, M. et al. Oil accumulation in the model green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: characterization, variability between common laboratory strains and relationship with starch reserves. **BMC biotechnology**, v. 11, n. 1, p. 7, 2011.

SIJTSMA L, SWAAF M.E: Biotechnological production and applications of the n-3 polyunsaturated fatty acid docosahexaenoic acid. **Applied Microbiol Biotechnology**, v. 64, n.2, p.146–153, 2004,

SIMOPOULOS, A.P. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. **Biomedicine & pharmacotherapy**, v. 56, n. 8, p. 365-379, 2002.

SINGH, B. et al. Towards a sustainable approach for development of biodiesel from plant and microalgae. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 29, p. 216-245, 2014.

SINGH, G.; THOMAS, P. B. Nutrient removal from membrane bioreactor permeate using microalgae and in a microalgae membrane photoreactor. **Bioresource Technology**, v. 117, p. 80-85, 2012.

SKULBERG, O. M. Microalgae as a source of bioactive molecules—experience from cyanophyte research. **Journal of Applied Phycology**, v. 12, n. 3-5, p. 341-348, 2000.

SMITH, Alison M. The biosynthesis of starch granules. **Biomacromolecules**, v. 2, n. 2, p. 335-341, 2001.

SPOLAORE, P., et al. Commercial applications of microalgae. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 101, n. 2, p. 87-96, 2006.

STREIT, N. M. et al. The chlorophylls. **Ciência Rural**, v. 35, n. 3, p. 748-755, 2005.

SU, C. H. et al. Factors affecting lipid accumulation by *Nannochloropsis oculata* in a two-stage cultivation process. **Journal of Applied Phycology**, v. 23, n. 5, p. 903-908, 2011.

SUBASHCHANDRABOSE, S. R. et al. Consortia of cyanobacteria/microalgae and bacteria: Biotechnological potential. **Biotechnology advances**, v. 29, n. 6, p. 896-907, 2011.

SUBRAMANIAN, S. et al. Comparative energetics and kinetics of autotrophic lipid and starch metabolism in chlorophytic microalgae: implications for biomass and biofuel production. **Biotechnology for biofuels**, v. 6, n. 1, p. 150, 2013.

SUN, X. et al. Effect of nitrogen-starvation, light intensity and iron on triacylglyceride/carbohydrate production and fatty acid profile of *Neochloris oleoabundans* HK-129 by a two-stage process. **Bioresource technology**, v. 155, p. 204-212, 2014.

SUTHERLAND, D. L. et al. Wastewater microalgal production, nutrient removal and physiological adaptation in response to changes in mixing frequency. **Water Research**, v. 61, p. 130–140, 2014.

TALEBI, A. F. et al. Fatty acids profiling: a selective criterion for screening microalgae strains for biodiesel production. **Algal Research**, v. 2, n. 3, p. 258-267, 2013.

TAM, N. F. Y.; WONG, Y. S. Wastewater nutrient removal by *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus sp.*. **Environmental Pollution**, v. 58, n. 1, p. 19-34, 1989.

TANAKA, K. et al. Oral administration of a unicellular green algae, *Chlorella vulgaris*, prevents stress-induced ulcer. **Planta medica**, v. 63, n. 5, p. 465-466, 1997.

TARALDSVIK, M.; MYKLESTAD, S. M. The effect of pH on growth rate, biochemical composition and extracellular carbohydrate production of the marine diatom *Skeletonema costatum*. **European Journal of Phycology**, v. 35, n. 02, p. 189-194, 2000.

THAJUDDIN, N.; SUBRAMANIAN, G. Cyanobacterial biodiversity and potential applications in bioTechnology. **Current Science-Bangalore**, v. 89, n. 1, p. 47, 2005.

TOKUŞOĞLU, Ö.; ÜUNAL, M. K. Biomass nutrient profiles of three microalgae: *Spirulina platensis*, *Chlorella vulgaris*, and *Isochrysis galbana*. **Journal of food science**, v. 68, n. 4, p. 1144-1148, 2003.

TONG, L. Acetyl-coenzyme A carboxylase: crucial metabolic enzyme and attractive target for drug discovery. **Cellular and Molecular Life Sciences CMLS**, v. 62, n. 16, p. 1784-1803, 2005.

TRAVIESO, L. et al. Experiments on immobilization of microalgae for nutrient removal in wastewater treatments. **Bioresource Technology**, v. 55, n. 3, p. 181-186, 1996.

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

USEPA - United States Environmental Protection Agency. **Unified National Strategy for Animal Feeding Operations**. Washington, 1999.

VASUDEVAN, P. T.; BRIGGS, M. Biodiesel production—current state of the art and challenges. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 35, n. 5, p. 421-430, 2008.

VELASQUEZ-ORTA, S. B. et al. Microalgae harvesting using ozoflotation: Effect on lipid and FAME recoveries. **Biomass and Bioenergy**, v. 70, p. 356-363, 2014.

VIGEOLAS, H. et al. Isolation and partial characterization of mutants with elevated lipid content in *Chlorella sorokiniana* and *Scenedesmus obliquus*. **Journal of biotechnology**, v. 162, n. 1, p. 3-12, 2012.

WAHIDIN, S., et al. The influence of light intensity and photoperiod on the growth and lipid content of microalgae *Nannochloropsis sp.* **Bioresource technology**, v. 129, p. 7-11, 2013.

WANG, H. et al. Mixotrophic cultivation of *Chlorella pyrenoidosa* with diluted primary piggery wastewater to produce lipids. **Bioresource technology**, v. 104, p. 215-220, 2012.

WANG, L. et al Anaerobic digested dairy manure as a nutrient supplement for cultivation of oil-rich green microalgae *Chlorella sp.* **Bioresource Technology**, v. 101, n. 8, p. 2623-2628, 2010.

WANG, M. et al. Kinetics of nutrient removal and expression of extracellular polymeric substances of the microalgae, *Chlorella sp.* and *Micractinium sp.*, in wastewater treatment. **Bioresource technology**, v. 154, p. 131-137, 2014.

WANG, S.T. et al. Characterization of a green microalga UTEX 2219-4: effects of photosynthesis and osmotic stress on oil body formation. **Botanical Studies**, v. 52, n. 3, p. 305-312, 2011.

WEN, S. et al. Modelo de resposta Tolerância de relações N / P para maré vermelha algas. **J. de Dalian Maritime University**, v. 35, n. 1, p. 118-122, 2009.

WILDE, E. W.; BENEMANN, J. R. Bioremoval of heavy metals by the use of microalgae. **BioTechnology Advances**, v. 11, n. 4, p. 781-812, 1993.

WILHELM, C. et al. The regulation of carbon and nutrient assimilation in diatoms is significantly different from green algae. **Protist**, v. 157, n. 2, p. 91-124, 2006.

WU, P. F. et al. Increasing algal biofuel production using *Nannochloropsis oculata* cultivated with anaerobically and aerobically treated swine wastewater. **Bioresource technology**, v. 133, p. 102-108, 2013.

WU, H. et al. Biodiesel quality and biochemical changes of microalgae *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus obliquus* in response to nitrate levels. **Bioresource technology**, v. 170, p. 421-427, 2014.

WUA, H.; MIAO, X. Biodiesel quality and biochemical changes of microalgae *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus obliquus* in response to nitrate levels. **Bioresource Technology**, v. 170, p. 421-427, 2014.

XUAN, J. et al. A review of biomass-derived fuel processors for fuel cell systems. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 13, n. 6, p. 1301-1313, 2009.

YAMAMOTO, T. et al. Novel Partial Nitritation Treatment for Anaerobic Digestion Liquor of Swine Wastewater Using Swim-Bed Technology. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 102, p. 497-503, 2006.

YAN, C. et al. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 79, p. 81-87, 2013.

YANG, C. et al. Energetics and carbon metabolism during growth of microalgal cells under photoautotrophic, mixotrophic and cyclic light-autotrophic/dark-heterotrophic conditions. **Biochemical engineering journal**, v. 6, n. 2, p. 87-102, 2000.

YANG, S. et al. Utilization of nitrite as a nitrogen source by *Botryococcus braunii*. **Biotechnology letters**, v. 26, n. 3, p. 239-243, 2004.

YOUNG, E. B.; BEARDALL, J. Modulation of photosynthesis and inorganic carbon acquisition in a marine microalga by nitrogen, iron,

and light availability. **Canadian Journal of Botany**, v. 83, n. 7, p. 917-928, 2005.

ZEEMAN, S. C. et al. Starch: its metabolism, evolution, and biotechnological modification in plants. **Annual review of plant biology**, v. 61, p. 209-234, 2010.

ZENG, X. et al. Microalgae bioengineering: From CO₂ fixation to biofuel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 15, n. 6, p. 3252-3260, 2011.

ZEPKA, L. Q. et al. Production and biochemical profile of the microalgae *Aphanothece microscopica* Nägeli submitted to different drying conditions. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 47, n. 8, p. 1305-1310, 2008.

ZHILA, N. O. et al. Influence of nitrogen deficiency on biochemical composition of the green alga *Botryococcus*. **Journal of Applied Phycology**, v. 17, n. 4, p. 309–315, 2005.

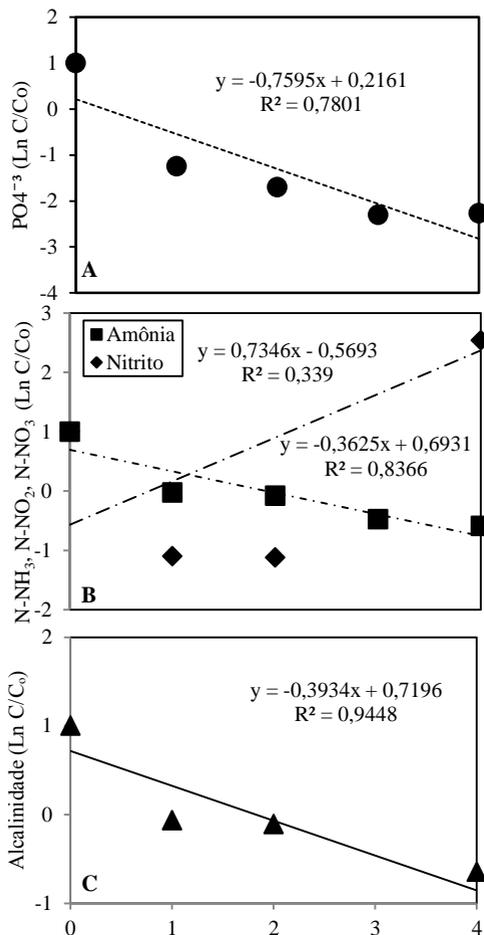
ZHANG W. et al. Effects of various organic carbon sources on the growth and biochemical composition of *Chlorella pyrenoidosa*. **Bioresource Technology**, v. 173, p. 52-58, 2014.

ZHU, L. et al. Scale-up potential of cultivating *Chlorella zofingiensis* in piggery wastewater for biodiesel production. **Bioresource technology**, v. 137, p. 318-325, 2013.

ZHU, S. et al. Metabolic changes of starch and lipid triggered by nitrogen starvation in the microalga *Chlorella zofingiensis*. **Bioresource technology**, v. 152, p. 292-298, 2014.

APÊNDICE A

Perfis de remoção utilizando 6% v/v do efluente UASB durante um período de 4 dias.



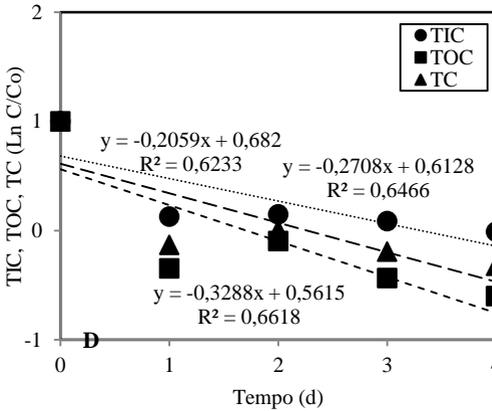
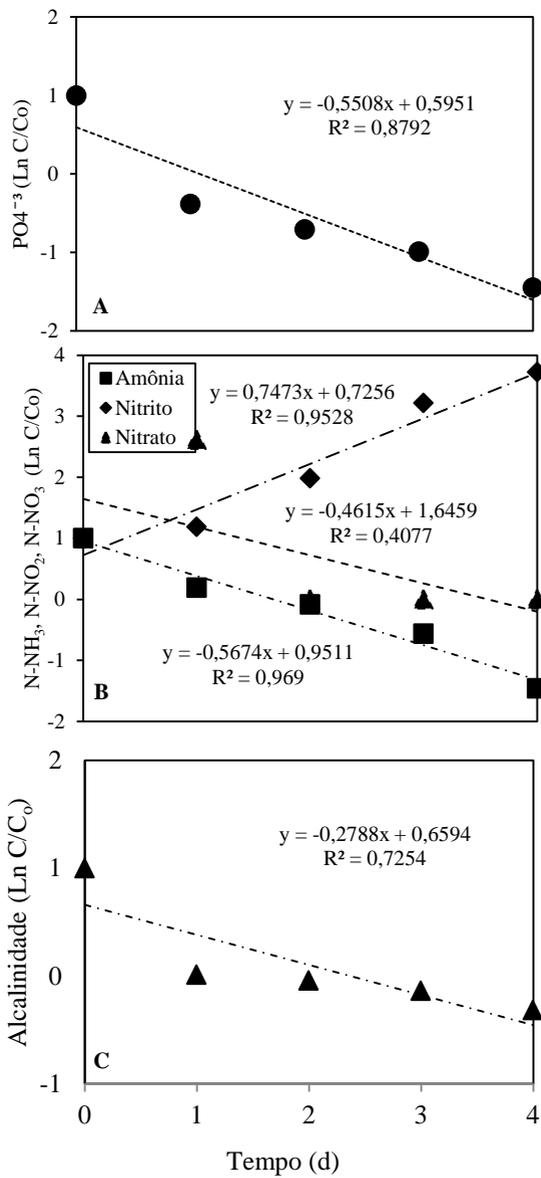


Figura 17 – (A) Perfil de remoção de fósforo. (B) Perfil de remoção de amônia. (C) Perfil de remoção de alcalinidade. (D) Perfil de remoção de carbono inorgânico, orgânico e total.

Tabela 15 - Concentrações iniciais com UASB - 6% (v/v).

Concentrações Iniciais – C ₀		
P-PO ₄ ⁻³	10,3	mg L ⁻¹
N-NH ₃	45,4	mg L ⁻¹
N-NO ₂	0,13	mg L ⁻¹
Alcalinidade	188,5	mg CaCO ₃ L ⁻¹
CIT	62,3	mg L ⁻¹
COT	92,5	mg L ⁻¹
CT	155,2	mg L ⁻¹

Perfis de remoção utilizando 50% v/v do efluente LA durante um período de 4 dias.



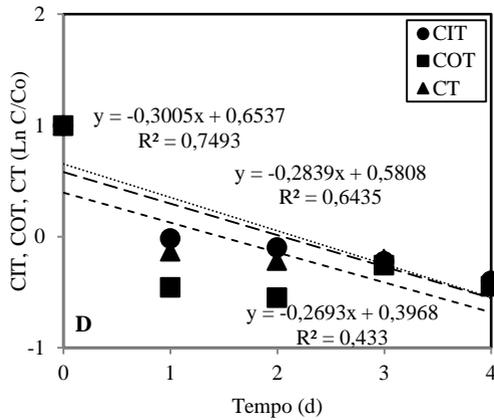


Figura 18 - (A) Perfil de remoção de fósforo. (B) Perfil de remoção de amônia. (C) Perfil de remoção de alcalinidade. (D) Perfil de remoção de carbono inorgânico, orgânico e total.

Tabela 16 - Concentrações iniciais com LA - 50% (v/v).

Concentrações Iniciais – C_0		
P- PO_4^{-3}	11,46	mg L ⁻¹
N-NH ₃	32,76	mg L ⁻¹
N-NO ₂	0,53	mg L ⁻¹
N-NO ₃	0,16	mg L ⁻¹
Alcalinidade	521,6	mg CaCO ₃ L ⁻¹
CIT	341,6	mg L ⁻¹
COT	216,6	mg L ⁻¹
CT	539,9	mg L ⁻¹

APÊNDICE B

Observação visual do cultivo com privação de N e P (A), deficiente de N (B) e deficiente de P (C) ao longo do tempo.

