

LUCIANO SATHLER DOS REIS

**CARACTERIZAÇÃO DO RESÍDUO OZONIZADO DA MICROALGA  
*Scenedesmus obliquus* BR003 E SUA UTILIZAÇÃO EM NOVOS CULTIVOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2014

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

Reis, Luciano Sathler dos, 1985-  
R375c            Caracterização do resíduo ozonizado da microalga  
2014            *Scenedesmus obliquus* BR003 e sua utilização em novos cultivos  
                  / Luciano Sathler dos Reis. – Viçosa, MG, 2014.  
                  xiii, 52f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Marcio Arêdes Martins.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Inclui bibliografia.

1. Biocombustíveis. 2. Energia - Fontes alternativas.  
3. Microalgas. 4. *Scenedesmus obliquus*. 5. Ozônio.  
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Engenharia  
Agrícola. Mestrado em Engenharia Agrícola. II. Título.

CDD 22. ed. 662.88

LUCIANO SATHLER DOS REIS

**CARACTERIZAÇÃO DO RESÍDUO OZONIZADO DA MICROALGA  
*Scenedesmus obliquus* BR003 E SUA UTILIZAÇÃO EM NOVOS CULTIVOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA:

---

Cláudio Homero Ferreira da Silva

---

Adriano Nunes Nesi

---

Eduardo Basílio de Oliveira

---

Márcio Arêdes Martins  
(Orientador)

*“Sozinhos nós caminhamos mais rápido, unidos vamos mais longe.”*

Autor Desconhecido

## AGRADECIMENTOS

Agradeço meus pais Ruibran Januário dos Reis e Maria Inês Sathler dos Reis, pela educação, exemplo de caráter, honestidade e pelo financiamento da minha vida acadêmica.

À minha esposa Rebecca, pelo apoio nos momentos mais difíceis, e pela confiança durante essa jornada.

Aos meus irmãos e familiares pela compreensão durante o tempo dos estudos e pelo apoio incondicional nesta caminhada.

Especial agradecimento ao meu orientador professor Márcio Arêdes Martins, o principal responsável por todo esse sonho, pela atenção, experiência, paciência, sabedoria e confiança.

A meu coorientador Wagner Luiz Araujo, pelo apoio e auxílio prestado.

Ao professor Helio Garcia Leite por toda ajuda na dissertação.

Aos amigos do laboratório que prestaram uma ajuda especial nos momentos em que o tempo era curto e o trabalho era pesado.

Ao corpo técnico da Universidade, em especial aos servidores da oficina, da serralheria, ao Catitu, Edson, Zé Eustáquio e Zé Geraldo e todo o pessoal da secretaria, em especial à Graça.

À Universidade Federal de Viçosa, pela estrutura disponibilizada.

## **BIOGRAFIA**

LUCIANO SATHLER DOS REIS, filho de Ruiبران Januário dos Reis e Maria Ines Sathler dos Reis, nasceu em 14 de novembro de 1985, na cidade de Belo Horizonte, no Estado de Minas Gerais.

Graduou-se em Agronomia pela Universidade Federal de Viçosa em janeiro de 2009. Em março de 2013, ingressou no programa de mestrado pela mesma instituição, com experimentos voltados à produção de biodiesel a partir de microalgas, concluindo-o em agosto de 2014.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	vii
LISTA DE TABELAS .....	ix
RESUMO .....	x
ABSTRACT .....	xii
1. INTRODUÇÃO GERAL .....	1
1.1. Microalgas .....	2
1.2. Biodiesel .....	3
1.2.1. Biodiesel de microalgas .....	3
1.3. Ozônio e as microalgas .....	4
1.4. Referências .....	5
2. ARTIGO I: RECUPERAÇÃO DE NUTRIENTES A PARTIR DE BIOMASSA OZONIZADA DA MICROALGA <i>Scenedesmus obliquus</i> BR003. 8	
2.1. Introdução .....	10
2.2. Material e métodos .....	11
2.2.1. Cepa de microalga e sistema de cultivo .....	11
2.2.2. Determinação de massa seca livre de cinzas .....	12
2.2.3. Ozonização das microalgas .....	12
2.2.4. Determinação da concentração de ozônio .....	12
2.2.5. Determinação do perfil espectrofotométrico e da biomassa ozonizada .....	13
2.2.6. Determinação da concentração de nutrientes no meio ozonizado .....	13
2.2.6.1. Amônio .....	13
2.2.6.2. Nitrato .....	14
2.2.6.3. Fosfato .....	14
2.2.7. Perfil eletroforético das proteínas por eletroforese em gel de poliacrilamida .....	15

2.2.8.	Análises estatísticas .....	15
2.3.	Resultados e discussão .....	16
2.3.1.	Perfil espectrofotométrico.....	16
2.3.2.	Massa seca .....	19
2.3.3.	Análise do perfil proteico em gel de poliacrilamina.....	22
2.3.4.	Concentração de nutrientes.....	24
2.3.4.1.	Nitrogênio .....	24
2.3.4.2.	Fosfato.....	25
2.4.	Conclusões e considerações para experimentos futuros .....	27
2.5.	Referências.....	27
3.	ARTIGO II: CULTIVO DE <i>Scenedesmus obliquus</i> BR003 NO EXTRATO DE MICROALGAS OZONIZADO .....	32
3.1.	Introdução .....	34
3.2.	Material e métodos.....	35
3.2.1.	Cepa de microalga e sistema de cultivo.....	35
3.2.2.	Ozonização das microalgas.....	35
3.2.3.	Planejamento do experimento de reutilização de nutrientes.....	36
3.2.4.	Determinação da concentração de ozônio .....	37
3.2.5.	Determinação de massa seca livre de cinzas .....	37
3.2.6.	Monitoramento do crescimento .....	38
3.2.7.	Determinação do teor de lipídios.....	38
3.2.8.	Determinação dos Pigmentos.....	40
3.2.9.	Custo da ozonização e obtenção de lipídios .....	40
3.3.	Resultados e discussão .....	41
3.4.	Conclusões e considerações para experimentos futuros .....	46
3.5.	Referências.....	47
4.	CONCLUSÕES GERAIS .....	51

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Cadeia produtiva do biodiesel a partir de microalgas (Adaptado de MATA et al., 2010).....	4
Figura 2 – Perfil espectrofotométrico de <i>Scenedesmus obliquus</i> BR003, durante diferentes tempos de ozonização, com destaque para os picos de absorção, carotenoides e clorofila <i>a</i> . ....	16
Figura 3 – Relação tempo de ozonização versus absorbância nos comprimentos 470 nm (a) associado aos carotenoides, 436 nm (b) e 680 nm (c), associados à clorofila <i>a</i> , com indicação do valor do tempo ótimo de ozonização (K) em minutos, estimados por regressão segmentada.....	18
Figura 4 – Determinação da massa seca algal, ao longo do processo de ozonização com indicação do valor do tempo ótimo de ozonização (K) em minutos.....	19
Figura 5 - Aspecto das células da microalga <i>Scenedesmus obliquus</i> BR003. (a) antes da ozonização; (b) após 10 minutos de ozonização; (c) 20 minutos e (d) 50 minutos após a ozonização.....	21
Figura 6 - Aspecto das microalgas durante o processo de ozonização: (a) início da ozonização; (b) após 10 minutos; (c) 20 minutos; (d) 50 minutos e (e) 5 minutos após o término da ozonização. ....	22
Figura 7 - Análise eletroforética das proteínas da microalga <i>Scenedesmus obliquus</i> BR003 antes e após ozonização do material a 2,5 mg O <sub>3</sub> L <sup>-1</sup> . Os tratamentos foram: antes (anterior a ozonização); 10 min, 20 min e 50 min (minutos de ozonização). (A) e (B) representam diferentes bandas peptídicas com distintos comportamentos em relação à oxidação pelo ozônio.....	23
Figura 8 – Concentração de NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (a) e NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (b), durante a ozonização de <i>Scenedesmus obliquus</i> BR003. ....	24
Figura 9 – Concentração de PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> , durante a ozonização de <i>Scenedesmus obliquus</i> BR003. ....	26

Figura 10 – Cultivo de <i>Scenedesmus obliquus</i> BR003 em diferentes meios, definidos no delineamento inteiramente casualizado, em 4 repetições.....	37
Figura 11 – Leituras de absorvância a 750 nm durante diferentes cultivos de <i>Scenedesmus obliquus</i> BR003. ....	41
Figura 12 – Massa seca final para os diferentes tratamentos estudados. ....	42
Figura 13 – Plasticidade fenotípica entre os diferentes tratamentos pela microscopia de luz. (a) BG11, (b) BG11(-N+E), (C) BG11(-P+E), (d) BG11(-NP+E), (e) E, (f) BG11(+E).....	44

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Tratamentos realizados no delineamento inteiramente casualizado com 24 unidades experimentais.....	36
Tabela 2 – Clorofila <i>a</i> , <i>b</i> , carotenoides, pigmentos totais e razão clorofila <i>a/b</i> para os tratamentos estudados.....	45
Tabela 3 – Teor e concentração final de lipídeos.....	45

## RESUMO

REIS, Luciano Sathler, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, outubro de 2014.  
**Caracterização do resíduo ozonizado da microalga *Scenedesmus obliquus* BR003 e sua utilização em novos cultivos.** Orientador: Márcio Arêdes Martins.  
Coorientador: Wagner Luiz Araujo.

A busca pela redução no custo de produção de biodiesel a partir de microalgas é um fator essencial para viabilizar a utilização desta fonte de energia na matriz energética mundial. Diante desta questão, verificou-se a possibilidade da utilização do gás ozônio na recuperação dos nutrientes assimilados pela microalga *Scenedesmus obliquus* BR003, durante seu cultivo em meio BG11 e posterior reuso em cultivo subsequente. O espectro de absorbância no visível da microalga durante a ozonização revelou que, a partir de 34 minutos de tratamento não ocorrem variações significativas nos valores de absorbância. Os picos de absorção encontrados foram de 436, 470 e 680 nm, que representam a clorofila *a* (436 e 680 nm) e os carotenóides (470 nm). Para os resultados de massa seca durante o processo de ozonização, o tempo de estabilização dos valores foi similar, durando cerca de 35 minutos. Após análise do perfil eletroforético em gel de poliacrilamida, foi possível identificar a oxidação das proteínas ao longo da ozonização. Para os nutrientes, os teores disponibilizados de amônio, nitrato e fosfato, após 50 minutos de ozonização, foram de 1,1, 5,7 e 1,2 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente, evidenciando a possibilidade de recuperação dos nutrientes presentes nas células de microalgas. O cultivo realizado somente com o extrato decorrente da ozonização de microalgas, obteve biomassa final de 0,64 g L<sup>-1</sup>, resultado semelhante ao cultivo em meio BG11 suplementado com o mesmo extrato (0,66 g L<sup>-1</sup>) e três vezes superior ao meio BG11 sem suplementação (0,21 g L<sup>-1</sup>). De forma geral, os tratamentos em que o nitrogênio presente no meio BG11 não foi aplicado apresentaram maiores teores de lipídios. Outro indicador de estresse por falta de nitrogênio foram os teores de clorofila *a*, clorofila *b* e carotenóides totais, em que, os tratamentos com baixo teores de nitrogênio apresentaram menores concentrações destes pigmentos. O custo estimado de ozonização das microalgas para se obter um litro de lipídios ficou em R\$ 5,75, contudo com o aumento da escala e melhorias na produtividade de lipídios este

custo caiu para R\$ 2,33. Ressalta-se que, o aumento da eficiência do processo de ozonização pode permitir a redução do custo destes valores. Os resultados obtidos neste trabalho indicam a possibilidade da utilização do gás ozônio, no processo de reaproveitamento de nutrientes a partir do cultivo da microalga *Scenedesmus obliquus*.

## ABSTRACT

REIS, Luciano Sathler, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, October, 2014. **Characterization of ozonated residue of *Scenedesmus acuminatus* BR003 and subsequent cultivation.** Adviser: Márcio Arêdes Martins. Co-Adviser: Wagner Luiz Araujo.

The need of reducing the cost of microalgae-based biodiesel production is a crucial factor to turn its adoption feasible in the world energy matrix. Faced with this issue, an experiment was set up to investigate the potential use of ozone gas on recovering nutrients assimilated by the microalgae *Scenedesmus obliquus* BR003 during its subsequent cultivation in BG11 medium. After 34 min of ozonization, analyzes of absorbance in the visible spectrum of the microalgae revealed that no significant variation in absorbance values was observed. Absorption peaks were found at 436, 470 and 680 nm, which represents chlorophyll a (436 and 680 nm), and carotenoids (470 nm). Moreover, assessment of dry mass weights during the ozonization process showed similar values for stabilization period of approximately 35 minutes. The polyacrylamide gel electrophoresis showed the oxidation in proteins bands along the process of ozonation. For nutrients, the levels of available ammonium, nitrate and phosphate, after 50 minutes of ozonization, were 1.1, 5.7 and 1.2 mg L<sup>-1</sup>, respectively; therefore, indicating that nutrients present in the microalgae cells can be potentially recovered. The cultivation carried out solely with the extract obtained after microalgae ozonization resulted in 0.64 g L<sup>-1</sup> of final biomass. Similar results were found when BG11 culture medium supplemented with the same extract were used (0.66 g L<sup>-1</sup>); however, values were three-fold higher when BG11 medium without supplementation was adopted (0.21 g L<sup>-1</sup>). Generally, the treatments with no nitrogen supplementation showed higher levels of lipids. Furthermore, other indicators of nitrogen deficiency such as low levels of chlorophyll a, chlorophyll b and carotenoids were noticed. Accordingly, the treatment with low levels of nitrogen showed lower concentrations of these pigments. The estimated cost to produce one liter of lipids via microalgae ozonization was R\$ 5.75, even though this cost decreased to R\$ 2.33 per liter when large production scales and improvement of lipids yield was adopted. Consequently, increasing the efficiency

of the ozonization process might enable further reduction of the costs previously calculated. The results obtained in this study, indicate the possibility of the use of ozone gas in the process of nutrient recycling, from the cultivation of microalgae *Scenedesmus obliquus*.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

Atualmente, cerca de 80% da demanda mundial de energia é atendida pela utilização de combustíveis fósseis (CHEN et al., 2011). Entretanto, o uso intensivo destas fontes de energia não renováveis tem resultado em problemas relacionados à degradação ambiental, com impacto nas mudanças climáticas e na saúde da população (HALLENBECK e BENEMANN, 2002). Estudos indicam que o petróleo irá acabar nas próximas décadas e mesmo com a descoberta de novas fontes, a grande dependência dos países ao petróleo é um fator de alto risco (SHAFIEE e TOPAL, 2009). Com isso, torna-se imprescindível a busca por fontes energéticas alternativas, para reduzir a dependência dos combustíveis fósseis e a incerteza da oferta e preço que esta fonte de energia não renovável terá nos próximos anos.

No Brasil, segundo a Empresa de Pesquisa Energética (EPE) no Balanço Energético Nacional de 2013, o setor de transportes demandou 30,8% de toda a energia gerada em 2012, sendo os derivados do petróleo, responsáveis por 85,1% do seu suprimento total, demonstrando a grande dependência aos combustíveis não renováveis. Entretanto, uma alternativa a este cenário são os biocombustíveis, embora outras tecnologias como motores movidos a eletricidade, gás natural e hidrogênio possuam essa capacidade de suprimento, os biocombustíveis são os únicos com presente potencial para atender qualquer tipo de demanda para transporte, inclusive para o setor de aviação (SANDER e MURTHY, 2010).

Nos dias atuais, o principal biocombustível utilizado no setor de transportes é o etanol que no Brasil é produzido a partir da cana de açúcar (BAKE et al., 2009) e nos Estados Unidos é produzido a partir do milho (MALLORY et al., 2012). Contudo, críticos colocam em questionamento a viabilidade de suprir a demanda energética para o setor utilizando este tipo de fonte, devido a competição por insumos e terras agricultáveis com o setor de alimentação. Neste contexto, as microalgas representam uma fonte de matéria prima para os biocombustíveis, além da possibilidade dos cultivos serem realizados em áreas inaptas a agricultura (SANDER e MURTHY, 2010; PARMAR et al., 2011).

## 1.1. Microalgas

As microalgas são organismos unicelulares fotossintetizantes capazes de fornecer uma grande variedade de fontes alternativas para a produção de biocombustíveis. Devido a sua capacidade de acumular proteínas, carboidratos e lipídeos, além de outros compostos bioativos, como pigmentos, antioxidantes, ácidos graxos poliinsaturados, agentes antivirais e antibacterianos, a biomassa de microalgas pode ser utilizada para produzir etanol, biogás, combustíveis para aviação e o biodiesel (HANNON et al., 2010; PARMAR et al., 2011; ADENLE et al., 2013).

Assim como as plantas vasculares, as microalgas demandam três componentes básicos para o crescimento: luz, água e nutrientes. Além de possuírem crescimento rápido, as microalgas são mais eficientes fotossinteticamente do que as plantas vasculares e podem ser produzidas em cultivos simples, suplementados com nutrientes e em larga escala (SCRAGG et al., 2002; HANNON et al., 2010). Sob condições específicas, algumas espécies de microalgas podem apresentar entre 20 a 50 % de lipídeos em massa seca (MATA et al., 2010). A produtividade de óleo por hectare esperada excede cerca de 10 vezes a produtividade da palma (5.000 kg ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup>) (EMBRAPA, 2002), considerada a espécie terrestre mais produtiva em óleo, sendo uma alternativa de expressivo potencial para a produção de biocombustíveis (ZIOLKOWSKA e SIMON, 2014).

Devido ao seu rápido crescimento, as microalgas são eficientes fixadoras de carbono atmosférico, fixando mais carbono via fotossíntese, em muito menos tempo. Estima-se que cada tonelada de biomassa algal produzida em determinado intervalo de tempo consome duas toneladas de CO<sub>2</sub> por meio da fotossíntese. Isso representa de dez a vinte vezes mais carbono do que o absorvido pelas culturas oleaginosas (BENEMANN, 1997).

Segundo Batan et al. (2010), para gerar 1 kg de massa seca de microalgas, são necessários, 0,147 kg de nitrogênio e 0,020 kg de fósforo. Yang et al. (2011), reciclaram os nutrientes residuais do cultivo e reduziram a necessidade de aplicação destes compostos no novo cultivo em 55%, além de reduzir em 84% o gasto com água. O valor de redução da necessidade de nutrientes foi obtido pelos mesmos autores, somente ao reciclar a água utilizada no cultivo. Espera-se que este valor seja ainda maior se, além de reciclar a água, seja reciclado o resíduo de microalgas após a

extração dos lipídeos, que contém os nutrientes assimilados durante a multiplicação celular.

Uma grande vantagem das microalgas é que a produção de biocombustíveis a partir destes micro-organismos não compete com a indústria de alimentos, uma vez que esta requer áreas de cultivo menos extensas e por poder ser cultivada em regiões que não são de interesse para a agricultura (ADENLE et al., 2013). Além disso, por atuarem naturalmente como fixadoras de CO<sub>2</sub>, seu cultivo pode ser conectado às linhas de emissão de gás carbônico das indústrias, tais como fábricas de cimento, de papel e celulose, usinas siderúrgicas e unidades de geração termoeletrica, que são grandes emissoras de gás carbônico (FULKE et al., 2013; TEBBANI et al., 2013).

## **1.2. Biodiesel**

Entre as diversas fontes de energia renovável, os biocombustíveis tem se apresentado como uma alternativa que vem se aproximando da viabilidade técnica e econômica (NASIR et al., 2013). Dentro da classe dos biocombustíveis, o biodiesel possui alto potencial devido à possibilidade de sua utilização em motores de combustão de ciclo diesel, possuindo tecnologias de produção e utilização bastante consolidadas. O biodiesel de uso comercial tem sido produzido a partir de óleos vegetais, de óleos residuais de frituras, de alimentos e de gorduras animais. Os óleos vegetais são fontes importantes de triacilglicerídeos para a produção de biodiesel, tanto pela qualidade quanto pela disponibilidade destes óleos (CHEN et al., 2011).

### **1.2.1. Biodiesel de microalgas**

A Figura 1 apresenta um esquema da cadeia de produção do biodiesel a partir das microalgas, adaptado de Mata et al. (2010). A primeira etapa consiste na seleção da cepa de microalgas, fatores como o clima, o tipo de nutrientes disponíveis e técnicas de cultivo (tanques abertos ou fotobiorreatores) devem ser observados (LARKUM et al., 2012). O próximo passo é o cultivo das microalgas em que, posteriormente a colheita a água presente no cultivo é reciclada. Em seguida, ocorre a separação da biomassa e a subsequente extração do óleo, sendo o resíduo de extração passível de recuperação de nutrientes. Por fim, ocorre a transformação do óleo extraído em biodiesel, usualmente pelo processo de transesterificação, que

consiste na reação entre os lipídios com álcool de cadeia curta (etanol ou metanol), formando uma mistura de mono alquil ésteres e como subproduto, o glicerol (SING et al., 2011).

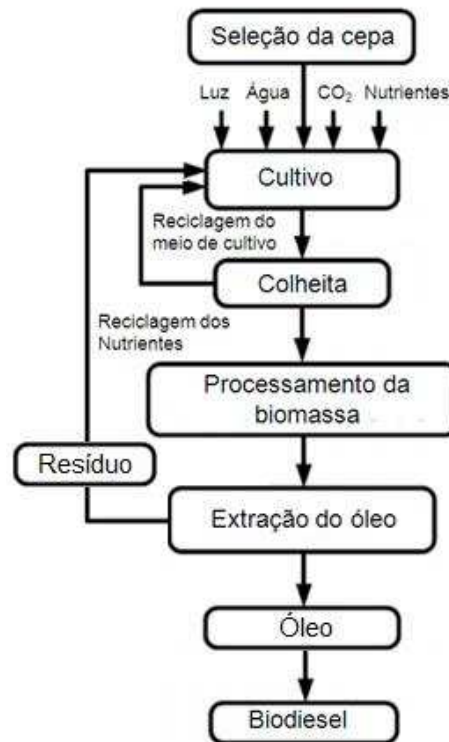


Figura 1 – Cadeia produtiva do biodiesel a partir de microalgas (Adaptado de MATA et al., 2010).

### 1.3. Ozônio e as microalgas

O ozônio possui um elevado potencial de oxidação, por isso, vem sendo utilizado em processos de tratamento de água e de efluentes. Ele é aplicado para remover compostos orgânicos e inorgânicos (KASPRZYK-HORDERN et al., 2003), além de promover a eliminação de bactérias, fungos e outros microrganismos (ALENCAR et al., 2012; TALBOT et al., 2012).

Ao coletar as microalgas, o meio de cultivo residual consiste em água, microrganismos contaminantes, nutrientes e excretas do metabolismo algal. Para se reutilizar o meio de cultivo, é importante sua desinfecção, evitando a contaminação subsequente. Existem estudos utilizando o ozônio na etapa de colheita das microalgas, pelo processo de flotação (CHENG et al., 2011) e como pré-tratamento

para extração de lipídios com o objetivo de atuar no rompimento celular (NGUYEN et al., 2013). Kim et al. (2014) publicaram um estudo sobre a ozonização de resíduos da suinocultura e posterior utilização das microalgas como tratamento para reduzir o seu potencial de contaminação.

Espera-se que as microalgas sejam capazes de reciclar os nutrientes presentes no meio ozonizado, reduzindo assim a necessidade de aplicação de fertilizantes, principalmente o nitrogênio e fósforo. Este fato, aliado ao seu poder de desinfecção, oferece ao ozônio um elevado potencial para compor a cadeia de processos do biodiesel a partir de microalgas.

Este trabalho tem como objetivo avaliar a possibilidade de se reutilizar os nutrientes assimilados pelas microalgas durante seu cultivo, através da ozonização da biomassa formada, em cultivo subsequente. Os resultados principais serão divididos em dois artigos, o primeiro consiste na caracterização físico-química do extrato de microalgas ozonizado. Já o segundo artigo, apresenta os resultados do cultivo de *Scenedesmus obliquus* BR003 no extrato ozonizado.

#### 1.4. Referências

ADENLE, A. A.; HASLAM, G. E.; LEE, L. Global assessment of research and development for algae biofuel production and its potential role for sustainable development in developing countries. **Energy Policy**, v. 61, p. 182–195, 2013.

ALENCAR, E. R. et al. Efficacy of ozone as a fungicidal and detoxifying agent of aflatoxins in peanuts. **Journal of the science of food and agriculture**, v. 92, n. 4, p. 899–905, 2012.

BAKE, J. D. V. et al. Explaining the experience curve: Cost reductions of Brazilian ethanol from sugarcane. **Biomass and Bioenergy**, v. 33, n. 4, p. 644–658, 2009.

BATAN, L. et al. Net Energy and Greenhouse Gas Emission Evaluation of Biodiesel Derived from Microalgae. **Environmental Science & Technology**, v. 44, n. 20, p. 7975–7980, 2010.

BENEMANN, J. R. CO<sub>2</sub> Mitigation with microalgae systems. v. 38, n. 96, p. 475–479, 1997.

CHEN, C.-Y. et al. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: a critical review. **Bioresource technology**, v. 102, n. 1, p. 71–81, 2011.

CHENG, Y.-L. et al. Harvesting of *Scenedesmus obliquus* FSP-3 using dispersed ozone flotation. **Bioresource technology**, v. 102, n. 1, p. 82–7, 2011.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). Projeto de dendê/palma Amazonas: Programa de apoio ao desenvolvimento da agroindústria do dendê no Amazonas. 2002. Disponível em: <<http://www.cpaa.embrapa.br/portfolio/sistemadeproducao/dende/projetodendepalmaamazonas.pdf>> Acesso em: 11 de abril de 2013.

EMPRESA DE PESQUISA ENERGÉTICA (EPE). Balanço Energético Nacional 2013: Ano base 2012. **Empresa de Pesquisa Energética**. Rio de Janeiro - Brasil, 2013.

FULKE, A. B. et al. Potential of wastewater grown algae for biodiesel production and CO<sub>2</sub> sequestration. **African Journal of Biotechnology**. v. 12, n. 20, p. 2939–2948, 2013.

HALLENBECK, P.; BENEMANN, J. Biological hydrogen production; fundamentals and limiting processes. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 27, p. 1185–1193, 2002.

HANNON, M. et al. Biofuels from algae: challenges and potential. **Biofuels**, v. 1, n. 5, p. 763–784, 2010.

KASPRZYK-HORDERN, B.; ZIÓLEK, M.; NAWROCKI, J. Catalytic ozonation and methods of enhancing molecular ozone reactions in water treatment. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 46, n. 4, p. 639–669, 2003.

KIM, H. et al. Bioresource Technology Ozonation of piggery wastewater for enhanced removal of contaminants by *S. quadricauda* and the impact on organic characteristics. **Bioresource technology**, v. 159, p. 128–135, 2014.

LARKUM, A. W. D. et al. Selection, breeding and engineering of microalgae for bioenergy and biofuel production. **Trends in biotechnology**, v. 30, n. 4, p. 198–205, 2012.

MALLORY, M. L.; IRWIN, S. H.; HAYES, D. J. How market efficiency and the theory of storage link corn and ethanol markets. **Energy Economics**, v. 34, n. 6, p. 2157–2166, 2012.

MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 1, p. 217–232, 2010.

NASIR, N. F. et al. Process system engineering in biodiesel production: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 22, p. 631–639, 2013.

NGUYEN, T. et al. Effects of ozone and peroxone on algal separation via dispersed air flotation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 105, p. 246–250, 2013.

PARMAR, A. et al. Cyanobacteria and microalgae: a positive prospect for biofuels. **Bioresource technology**, v. 102, n. 22, p. 10163–72, 2011.

SANDER, K.; MURTHY, G. S. Life cycle analysis of algae biodiesel. **The International Journal of Life Cycle Assessment**, v. 15, n. 7, p. 704–714, 2010.

SCRAGG, A. et al. Growth of microalgae with increased calorific values in a tubular bioreactor. **Biomass and Bioenergy**, v. 23, p. 67–73, 2002.

SHAFIEE, S.; TOPAL, E. When will fossil fuel reserves be diminished? **Energy Policy**, v. 37, n. 1, p. 181–189, 2009.

SING, S. F. et al. Production of biofuels from microalgae. **Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change**, v. 18, n. 1, p. 47–72, 2011.

TALBOT, P. et al. Ozone inactivation of resistant microorganisms: Laboratory analysis and evaluation of the efficiency of plants. **Water research**, v. 46, n. 18, p. 5893–903, 2012.

TEBBANI, S. et al. Nonlinear predictive control for maximization of CO<sub>2</sub> bio-fixation by microalgae in a photobioreactor. **Bioprocess and biosystems engineering**, v. 37, n. 1, p. 83–97, 2013.

YANG, J. et al. Life-cycle analysis on biodiesel production from microalgae: water footprint and nutrients balance. **Bioresource technology**, v. 102, n. 1, p. 159–65, 2011.

ZIOLKOWSKA, J. R.; SIMON, L. Recent developments and prospects for algae-based fuels in the US. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 29, p. 847–853, 2014.

## 2. ARTIGO I: RECUPERAÇÃO DE NUTRIENTES A PARTIR DE BIOMASSA OZONIZADA DA MICROALGA *Scenedesmus obliquus* BR003.

**Resumo:** A busca pela redução no custo de produção de biodiesel a partir de microalgas é um fator essencial para a utilização desta fonte de energia na matriz energética mundial. Diante desta questão, verificou-se a viabilidade tecno-econômica da utilização do gás ozônio na recuperação dos nutrientes absorvidos pela microalga *Scenedesmus obliquus* BR003, durante seu cultivo em meio BG11. O perfil de absorbância da microalga ao longo do tempo de ozonização revelou que a partir de 34 minutos de tratamento, não ocorreram variações significativas nos valores de absorção. Os picos encontrados foram 436, 470 e 680 nm, que representam a clorofila *a* (436 e 680 nm) e os carotenoides (470 nm). Para os resultados de massa seca durante o processo de ozonização, o tempo de estabilização dos valores foi similar, durando cerca de 35 minutos. O comportamento entre teor de nutrientes versus tempo de ozonização, também foi estudado. Para amônio, nitrato e fosfato, após 50 minutos de ozonização, a concentração final foi de 1,1, 5,7 e 1,2 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente, evidenciando a possibilidade de recuperação dos nutrientes presentes nas células de microalgas.

**Palavras-chave:** Microalgas, *Scenedesmus obliquus*. BR003, nutrientes, ozônio.

**Abstract:** The need of reducing the cost of microalgae-based biodiesel production is a crucial factor to turn its adoption feasible in the world energy matrix. Faced with this issue, an experiment was set up to investigate the possibility to reuse the absorbed nutrients by the microalgae *Scenedesmus obliquus* BR003 by ozonation to obtain the ozonated-algae extract that was used in a subsequent cultivation . After 34 min of ozonation, analyzes of absorbance in the visible spectrum of the microalgae revealed that no significant variation in absorbance values was observed. Absorption peaks were found at 436, 470 and 680 nm, which represents chlorophyll *a* (436 and 680 nm), and carotenoids (470 nm). Moreover, assessment of dry mass weights during the ozonation process showed similar values for stabilization period of

approximately 35 minutes. Interestingly, the levels of available ammonium, nitrate and phosphate, after 50 minutes of ozonization, were 1.1, 5.7 and 1.2 mg L<sup>-1</sup>, respectively; therefore, indicating that nutrients present in the microalgae cells can be potentially recovered.

**Key words:** Microalgae, *Scenedesmus obliquus* BR003, nutrients, ozone.

## 2.1. Introdução

As microalgas são organismos unicelulares capazes de fornecer uma grande variedade de fontes alternativas de combustíveis, devido a sua capacidade de acumular proteínas, carboidratos e lipídeos, além de outros compostos bioativos, como pigmentos, antioxidantes, ácidos graxos poli-insaturados, agentes antivirais e antibacterianos. Estes compostos produzidos pelas microalgas podem ser utilizados para produzir etanol, biogás, combustíveis para aviação e biodiesel (HANNON et al., 2010; PARMAR et al., 2011; ADENLE et al., 2013).

A produção de biodiesel a partir de microalgas apresenta limitações para que o processo seja economicamente viável, destacando-se o elevado consumo de fertilizantes. Segundo Batan et al. (2010), para gerar 1 kg de massa seca de microalgas, são necessários 147 g de nitrogênio e 20 g de fósforo. Yang et al. (2011) reciclaram os nutrientes do meio de cultura e reduziram a necessidade de aplicação destes compostos no novo cultivo em 55%, além de reduzir em 84% o gasto com água. O valor de redução da necessidade de nutrientes foi obtido pelo mesmo autor, somente ao reciclar a água utilizada no cultivo. Espera-se que este valor seja ainda maior se, além de reciclar a água, seja reciclado o resíduo de microalgas após extração do óleo, que contém os nutrientes assimilados durante o processo produtivo.

A reciclagem do meio de cultivo e dos nutrientes é citada por alguns autores, porém, pouco se conhece sobre como deve ser realizada ou a viabilidade deste procedimento. (CHISTI, 2008; MATA et al., 2010; YANG et al., 2011; JONES e MAYFIELD, 2012). Uma potencial alternativa para essa lacuna no processo produtivo das microalgas é a utilização do gás ozônio como agente de desinfecção, que devido ao seu potencial oxidante, pode viabilizar a reutilização da água e nutrientes reciclados.

O processo de ozonização de água, resíduos industriais e urbanos vem sendo largamente estudado por pesquisadores de todo o mundo. Por ser um forte agente oxidante e desinfectante, o ozônio é utilizado no tratamento de água para consumo humano (AL-ATTAS e AHMED, 2013) e resíduos, na eliminação de patógenos, metais pesados, poluentes orgânicos e químicos (ZHANG et al., 2009). A reação entre o ozônio e a matéria orgânica em ambientes aquosos pode se dar em duas formas, a primeira, pela reação direta com a molécula de ozônio ( $O_3$ ) via cicloadição ou pela reação eletrofílica. A segunda ocorre de maneira indireta, em que radicais

livres ( $\cdot\text{OH}$ ), que são produzidos pela decomposição do ozônio, reagem com os compostos orgânicos (MASTEN e DAVIES, 1994).

O ozônio reage com os compostos orgânicos de diferentes formas que dependem do pH do meio, temperatura, concentração e de cada tipo de composto (HOIGNÉ E BADER, 1983; YAO E HAAG, 1991). Após a ozonização de materiais orgânicos espera-se que ocorra uma redução na taxa de carbono orgânico, devido à oxidação até  $\text{CO}_2$ . Contudo, pesquisas evidenciam que nem todos os compostos se oxidam completamente, permanecendo o carbono ainda na forma orgânica. Pesquisas relacionadas ao tratamento de esgotos e água contaminada com excesso de matéria orgânica utilizam a ozonização como pré-tratamento ou adotam o uso de catalisadores, visando aumentar a eficiência de oxidação dos compostos orgânicos e inorgânicos (ERNST et al., 2004; ABOUZLAM et al. 2013; JEONG et al. 2014).

Este trabalho possui o objetivo de estudar alterações físico-químicas que ocorrem durante o processo de ozonização da microalga *Scenedesmus obliquus* BR003, a fim de verificar a possibilidade de reutilização dos nutrientes assimilados durante o cultivo.

## **2.2. Material e métodos**

### **2.2.1. Cepa de microalga e sistema de cultivo**

A microalga *Scenedesmus obliquus* BR003 foi utilizada no experimento, uma vez que esta cepa tem apresentado bons resultados para a produção de biomassa, lipídeos, ser resistente a contaminação por microorganismos e se manter dominante em cultivos abertos (SOARES, 2012). Foi utilizado o meio de cultivo BG11 proposto por Allen e Stanier (1968).

A cepa de microalga foi obtida junto à Coleção de Cianobactérias e Microalgas do Banco de Microalgas do Projeto Petrobrás, localizada na Unidade de Crescimento de Plantas (UCP) do Departamento de Biologia Vegetal (DBV) da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

Os cultivos foram realizados em frascos de vidro com 10 L de capacidade e volume útil de 7 L. Os cultivos foram mantidos sob agitação constante utilizando-se injeção de ar através de um compressor a uma taxa de 0,04 vvm (volume de ar por volume de cultivo por minuto). A temperatura foi mantida a  $27 \pm 2$  °C, com

fotoperíodo de 16:8 h (luz:escuro), pH  $7,0 \pm 0,5$ , controlado diariamente pela adição de soluções de HCl ou NaOH 2 M.

### **2.2.2. Determinação de massa seca livre de cinzas**

A massa seca livre de cinzas (biomassa) foi determinada por gravimetria e descontada das cinzas após calcinação. Foram filtrados 15 mL de cada amostra, utilizando membranas com porosidade de  $0,22 \mu\text{m}$  previamente secas em estufa a  $60^\circ\text{C}$  e pesadas. Após a filtração, uma solução 0,5 M de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  foi utilizada para a lavagem do filtrado, com a finalidade de eliminar resíduos inorgânicos que possam causar um incremento na biomassa e no teor de cinzas. A membrana foi colocada em estufa a  $60^\circ\text{C}$  até atingir massa seca constante. Em seguida, as membranas foram retiradas da estufa e, imediatamente acondicionadas em dessecador para que a temperatura ambiente fosse atingida. Após esse período, as membranas foram pesadas e a massa seca foi determinada, descontando-se o valor da massa da membrana.

Para obtenção do valor da biomassa livre de cinzas, as membranas contendo a massa seca, filtradas e previamente pesadas foram colocadas em cadinho de porcelana já calcinados e acondicionadas em mufla a  $575^\circ\text{C}$  por 1 h. Após nova calcinação e o resfriamento, o cadinho contendo as cinzas foi disposto em dessecador. O conjunto foi então pesado e o teor de cinzas determinado. Este procedimento foi realizado em triplicata.

### **2.2.3. Ozonização das microalgas**

O processo de ozonização das microalgas foi efetuado por meio de um gerador de ozônio (Ozone & Life, modelo O&L 50.0 RD-CO, Brasil). A concentração de ozônio utilizada foi de  $2,5 \text{ mg L}^{-1}$ , o pH das amostras foi previamente corrigido para  $7,0 \pm 0,5$  e a massa seca determinada.

### **2.2.4. Determinação da concentração de ozônio**

Para determinar a concentração de ozônio no meio, utilizou-se o método iodométrico de titulação indireta (Clescerl et al., 2000), que consiste na reação entre

o ozônio e uma solução de 50 mL de iodeto de potássio (KI) padronizada a 1N, em que será formado iodo ( $I_2$ ) a partir da oxidação do iodeto  $I^-$  em meio ácido ( $H_2SO_4$  1N). A solução é então titulada com tiosulfato de sódio ( $Na_2S_2O_3$ ) 0,005 N, utilizando uma solução a 1% de amido como indicador.

#### **2.2.5. Determinação do perfil espectrofotométrico e da biomassa ozonizada**

Para a determinação do perfil espectrofotométrico e da biomassa ozonizou-se 2 L de cultivo com massa seca livre de cinzas de  $0,474\text{ g L}^{-1}$ . Foram retiradas alíquotas de 60 mL em intervalos de tempo pré-estabelecidos (0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 e 110 min). Em seguida, as amostras foram levadas a um espectrofotômetro UV-visível (Thermo Scientific, Multiskan GO, Finlândia), onde se realizou a leitura entre os comprimentos de onda de 350 a 750 nm, com intervalo de medição de 1nm. Afim de se reduzir a interferência da turbidez nos resultados de absorvância, os valores obtidos foram subtraídos pelo resultado da leitura a 750 nm (PANCHA et al., 2014). A cada coleta, os valores de biomassa foram determinados. As análises foram conduzidas com 3 repetições cada.

#### **2.2.6. Determinação da concentração de nutrientes no meio ozonizado**

Para a determinação dos nutrientes, foi ozonizado 2 L de cultivo, com massa seca livre de cinzas de  $0,22\text{ g L}^{-1}$ . Retiraram-se alíquotas de 50 mL, em intervalos de tempo pré-estabelecidos (0, 5, 10, 15, 20, 30, 40 e 50 min).

##### **2.2.6.1. Amônio**

O método proposto por Riley (1953) foi adaptado para quantificação da concentração de amônio utilizando-se pequenas quantidades de amostra, com leituras de absorvâncias em microplacas. Uma amostra centrifugada a 4500 rpm de 1 mL de cada cultivo foi adicionada a um microtubo de 2 mL. Em seguida, acrescentou-se 266  $\mu\text{L}$  da solução de fenato de sódio, 133  $\mu\text{L}$  de solução de NaClO, 66  $\mu\text{L}$  da solução de  $MnSO_4$  e, por fim, 200  $\mu\text{L}$  de água deionizada. Após a homogeneização, as amostras foram acondicionadas em banho termostatizado a  $70^\circ\text{C}$  por 45 minutos.

Após o resfriamento, alíquotas de 300 µL foram dispostas em microplaca para leitura de absorbância a 625 nm em espectrofotômetro. A curva padrão foi realizada com sulfato de amônio 0,4736 g L<sup>-1</sup> que contém 100 µg de NH<sub>4</sub> mL<sup>-1</sup>.

#### 2.2.6.2. Nitrato

Para determinação da concentração de nitrato foi utilizado o método APHA-4500-NO<sub>3</sub>-C adaptado por Oliveira (2007). As amostras foram submetidas à leitura em espectrofotômetro, utilizando-se microplacas de poliestireno, nos comprimentos de onda 210, 220 e 230 nm. Leituras com água deionizada foram utilizadas como branco. Posteriormente efetuou-se a leitura da absorbância da amostra a 210, 220 e 230 nm. Em paralelo, uma curva-padrão foi preparada, utilizando diferentes concentrações de nitrato de potássio para estimativa da concentração de nitrato.

$$SD = (Abs_{210} - Abs_{220}) - (Abs_{220} - Abs_{230}) \quad (1)$$

em que,

*SD* = segunda derivada;

*Abs*<sub>210</sub> = absorbância a 210 nm;

*Abs*<sub>220</sub> = absorbância a 220 nm; e,

*Abs*<sub>230</sub> = absorbância a 230 nm.

#### 2.2.6.3. Fosfato

Para determinação da concentração de fosfato foi utilizado o método proposto por Murphy e Riley (1958). Alíquotas de 1 mL de cada unidade experimental foram acondicionadas em microtubos de 2 mL. Em seguida foram adicionados 200 µL do reagente A, composto por 5 N de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, solução 4 % (m/v) de (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>·4H<sub>2</sub>O e 0,1 M de ácido ascórbico. Posteriormente, adicionou-se 50 µL de água deionizada. Após homogeneização, a amostra foi acondicionada em banho termostatizado a 60 °C por 30 minutos. Após o resfriamento, alíquotas de 300 µL foram dispostas em

uma microplaca para leitura de absorvância a 827 nm em espectrofotômetro. A curva padrão foi realizada com diferentes concentrações de dihidrogenofosfato de potássio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>).

### 2.2.7. Perfil eletroforético das proteínas por eletroforese em gel de poliacrilamida

Para investigar a degradação de proteínas pela ação do ozônio, realizou-se eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida, antes (testemunha) e após a ozonização do resíduo de microalgas, nos períodos de 10, 20, e 50 minutos. Foi utilizado um cultivo com biomassa inicial de 2,18 g L<sup>-1</sup>, ozonizado a uma concentração de 2,5 mg L<sup>-1</sup>, quatro amostras foram retiradas com três repetições.

Para este procedimento, utilizou-se o protocolo proposto por Carpentier et al. (2005). As proteínas totais extraídas foram solubilizadas em tampão contendo ureia 7 M, tiourea 2 M e chaps 4 %. A quantificação proteica foi feita utilizando o reagente Bradford (Sigma). Para separação, foi realizada eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida 12,5%, coradas com coomassie colloidal e visualizadas pelo Image Scanner III.

### 2.2.8. Análises estatísticas

O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado com três repetições. Quando necessário foi realizada a análise de regressão linear segmentada, representada pela seguinte equação:

$$y = \beta_0 + \beta_1 t + \beta_2 \lambda(t - K) + \varepsilon \quad (2)$$

em que,

$y$  = massa seca (mg L<sup>-1</sup>);

$t$  = tempo de ozonização (min);

$K$  = tempo ótimo de ozonização ou antemão da regressão (min);

$\lambda = 1$  se  $t > K$ ; e,

$= 0$  se  $t \leq K$ .

O tempo ótimo de ozonização (k) foi obtido pela minimização da soma de quadrados dos resíduos. Para isto, foi utilizado o método de Gauss-Newton não linear, por meio do Solver do Microsoft Excel.

## 2.3. Resultados e discussão

### 2.3.1. Perfil espectrofotométrico

Avaliando o espectro de absorção obtido para diferentes tempos de ozonização (Figura 2) verifica-se que a absorbância decresceu até o tratamento de 50 minutos. Após este período, a ozonização resultou em poucas alterações na absorbância.

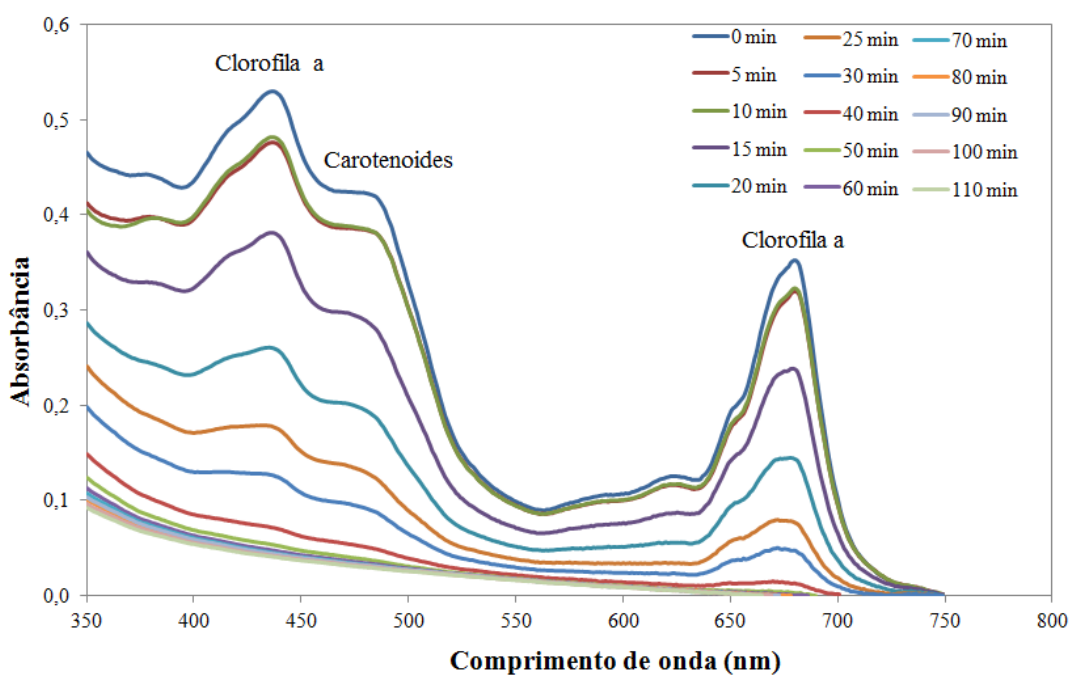


Figura 2 – Perfil espectrofotométrico de *Scenedesmus obliquus* BR003, durante diferentes tempos de ozonização, com destaque para os picos de absorção, carotenoides e clorofila *a*.

Por meio da Figura 2, observa-se picos de absorbância ao longo dos comprimentos de onda de 350 a 750 nm que caracterizam a clorofila *a* (436 e 680 nm) e os carotenoides (470 nm). Este comportamento foi observado por outros

autores, podendo haver alterações em seus valores devido ao tipo de microorganismo e as condições de cultivo (WU et al., 2013; GRIFFITHS et al., 2011; NICKLISH, 1998).

Griffiths (2011), encontrou absorvância máxima para cultivos de *Chlorella vulgaris* nos comprimentos de onda de 443, 487 e 684 nm. Este mesmo autor mediu a absorvância somente dos pigmentos extraídos das células e os picos encontrados foram em posições similares (436, 461 e 680 nm), concluindo que os picos de absorvância representam os pigmentos celulares. Observou-se no presente trabalho, um comportamento semelhante, com picos de absorvância nos comprimentos de onda de 436, 470 e 680 nm.

Na Figura 3, observa-se o efeito do tempo de ozonização nos valores de absorvância dos principais picos absorvativos. Nota-se a similaridade do comportamento para os mesmos comprimentos de onda. A análise de regressão segmentada sugere que para os três comprimentos de onda estudados a estabilização do declínio da absorvância ocorre por volta dos 34 minutos de ozonização.

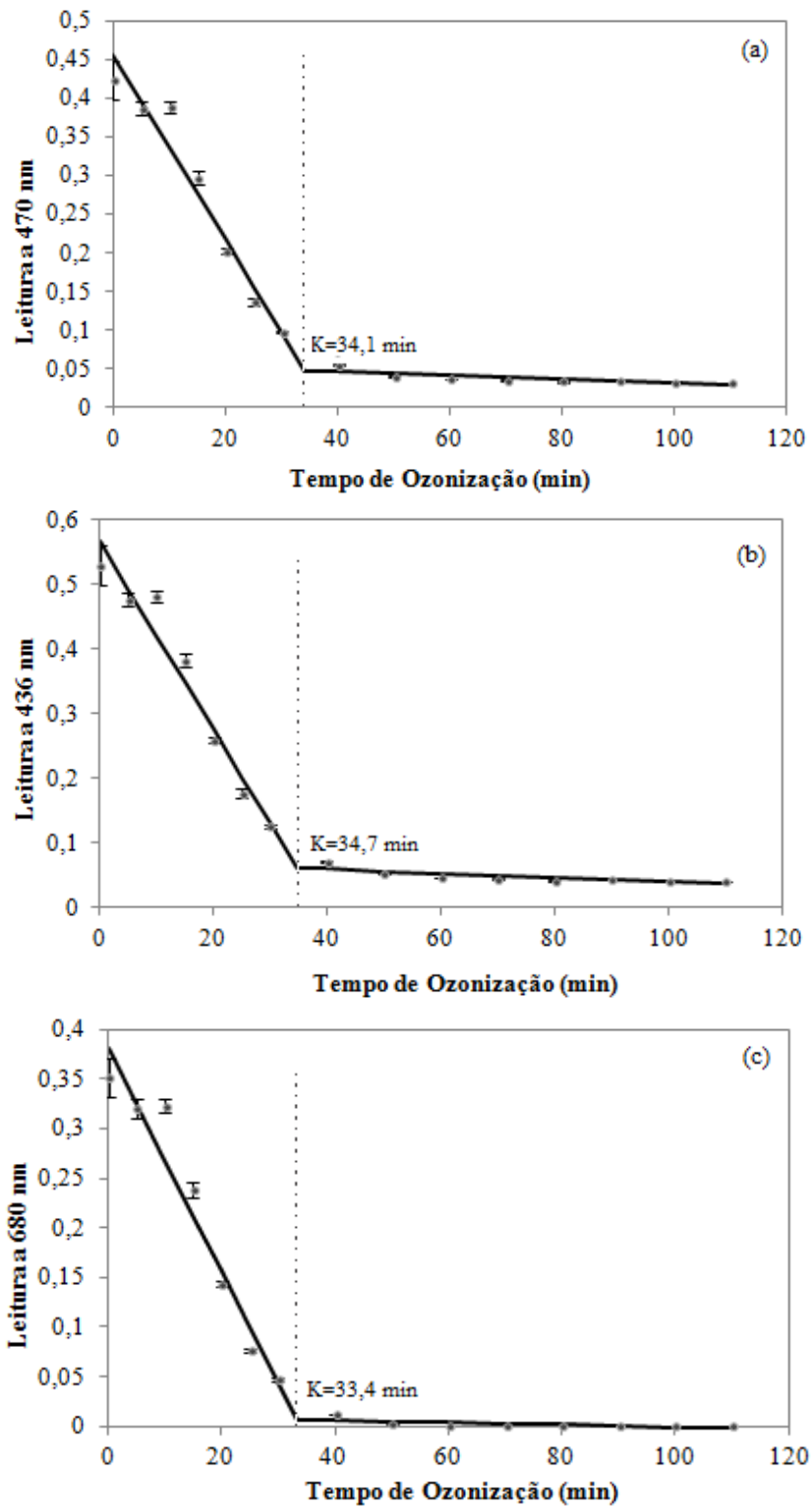


Figura 3 – Relação tempo de ozonização versus absorvância nos comprimentos 470 nm (a) associado aos carotenoides, 436 nm (b) e 680 nm (c), associados à clorofila *a*, com indicação do valor do tempo ótimo de ozonização (K) em minutos, estimados por regressão segmentada.

Ao longo da ozonização percebe-se que a amplitude dos picos foi diminuindo, ou seja, os pigmentos foram oxidados pelo ozônio até chegarem a um ponto onde alterações na absorbância se tornaram imperceptíveis. A redução nas leituras de absorbância com consequente aumento da transmitância é um fator crucial para a produção de microalgas, pois um dos fatores limitantes é a penetração da luz no cultivo (BRENNAN e OWENDE 2010; CHEIRSILP e TORPEE, 2012). Por este motivo, os valores de absorbância são importantes indicadores no processo de ozonização, visando à reutilização do material em cultivos subsequentes.

A busca pelo menor tempo de ozonização se dá basicamente em função ao custo desta prática, tornando necessário identificar até que ponto acréscimos de massa de ozônio resultam em alterações significativas e, a partir de determinado momento, essas alterações tornam-se desnecessárias.

### 2.3.2. Massa seca

Assim como os valores de absorbância reduziram-se com o aumento do tempo de ozonização, a biomassa também diminuiu (60%), e o tempo ótimo de ozonização foi de 35,3 minutos (Figura 4).

Trabalhos com ozonização de água de esgoto também mostram a diminuição da massa seca ao longo do tratamento, este fenômeno é explicado pela quebra dos compostos orgânicos e sua solubilização no meio aquoso (ISAZADEH et al., 2014; ZHANG et al., 2009; MASTEN e DAVIES, 1994).

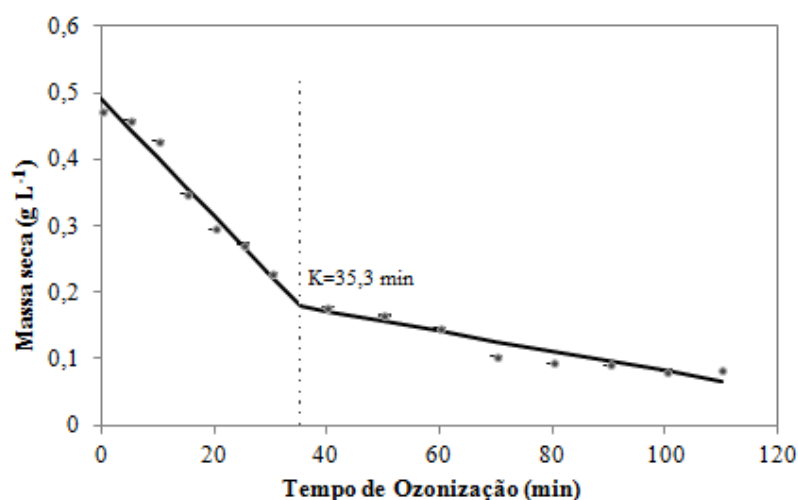


Figura 4 – Determinação da massa seca algal, ao longo do processo de ozonização com indicação do valor do tempo ótimo de ozonização (K) em minutos.

A presença de matéria orgânica após a ozonização das microalgas evidencia um possível potencial para contaminação de novos cultivos reutilizando este material. Contudo, este carbônico orgânico pode ser utilizado pelas próprias microalgas em cultivos heterotróficos ou mixotróficos. Kim et al. (2014) utilizou o ozônio como pré tratamento de resíduo da suinocultura e posterior cultivo de *Scenedemus quadriculata* para redução de contaminantes. O processo de ozonização foi capaz de mineralizar alguns compostos orgânicos ou quebrar os compostos em moléculas menores, o que facilitou sua assimilação pela microalga, este fato aliado ao aumento da transmitância do meio proporcionou um aumento de concentração de massa seca do cultivo superior a 80%, comparado ao cultivo em resíduo não ozonizado.

O tempo de ozonização ótimo, considerando os resultados de absorvância e de massa seca encontrados foram em média de 34,4 minutos ( $\pm 0,81$ ); ou seja, a ozonização do meio a partir do tempo limite resulta em alterações mínimas ou imperceptíveis, para os indicadores estudados. O valor similar entre os valores de K verificados sugere que o ozônio é capaz de romper estruturas da parede celular, o que expõe o conteúdo celular às moléculas de ozônio. Caso o ozônio fosse transportado com poucos danos à membrana os valores de K calculados pelo decaimento dos pigmentos seriam superiores àquele calculado pelo decaimento do teor de massa seca. Este tipo de análise mostra-se promissora para a ozonização de outros tipos de resíduos, pois o tempo de ozonização está diretamente relacionada ao custo final do processo.

A Figura 5 apresenta fotomicrografias de *Scenedesmus obliquus* BR003 cultivado em meio BG11 (5a) e após ozonização por 10 (5b), 20 (5c) e 50 minutos (5d). Antes do processo de ozonização, observa-se uma elevada presença de cenóbios (5a) e logo após o início da ozonização (5b) ocorre um desarranjo das microalgas que, após 20 minutos (5c) não possui cenóbios visíveis. Observa-se também um processo de despigmentação das microalgas. Na figura (5d), não se observam células com a cor característica esverdeada. Durante o processo de ozonização, ocorre o rompimento da parede celular e o conteúdo intracelular é exposto, ocorrendo assim a oxidação de seus componentes (HE et al., 2006).

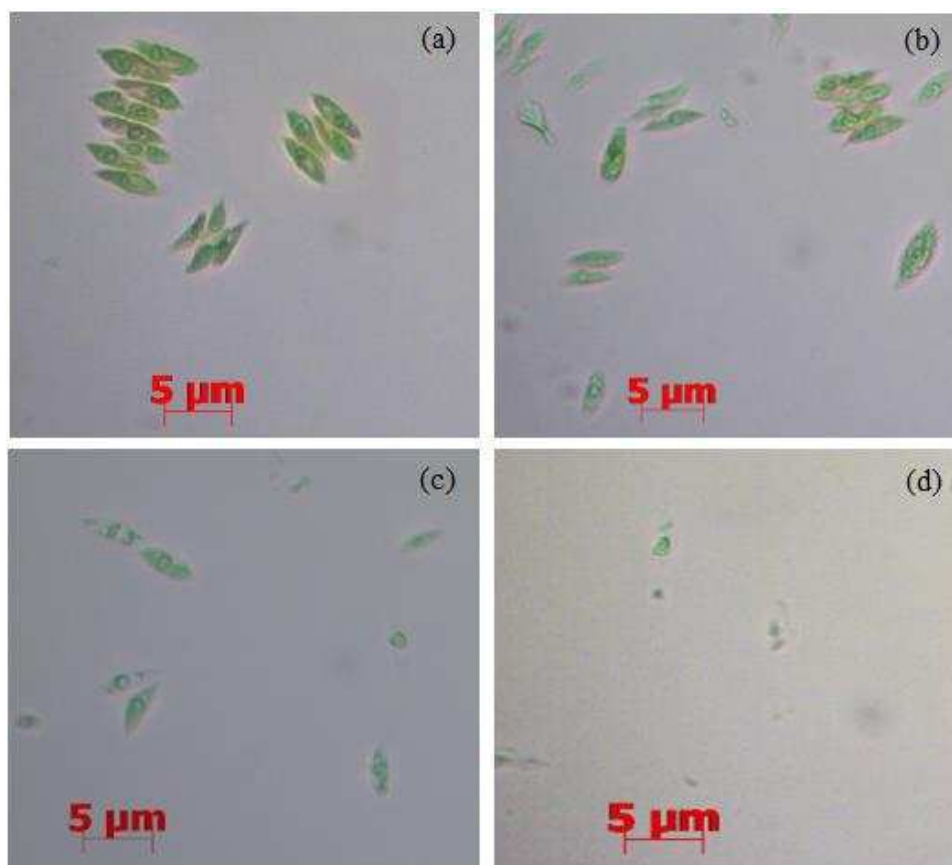


Figura 5 - Aspecto das células da microalga *Scenedesmus obliquus* BR003. (a) antes da ozonização; (b) após 10 minutos de ozonização; (c) 20 minutos e (d) 50 minutos após a ozonização.

A descoloração e oxidação dos pigmentos celulares são visíveis ao longo do processo de ozonização (Figura 6). Observa-se a coloração verde escura, característica dos cultivos de microalgas verdes antes da ozonização (Figura 6a). Após o início da injeção de  $O_3$ , ocorre a despigmentação (Figuras 6b e 6c) e no tempo de 50 minutos, as microalgas apresentam uma coloração marrom-salmão (Figura 6d). Esta coloração rosada deve-se à oxidação do manganês formando o permanganato, íon que está presente no meio de cultivo utilizado (BG11).

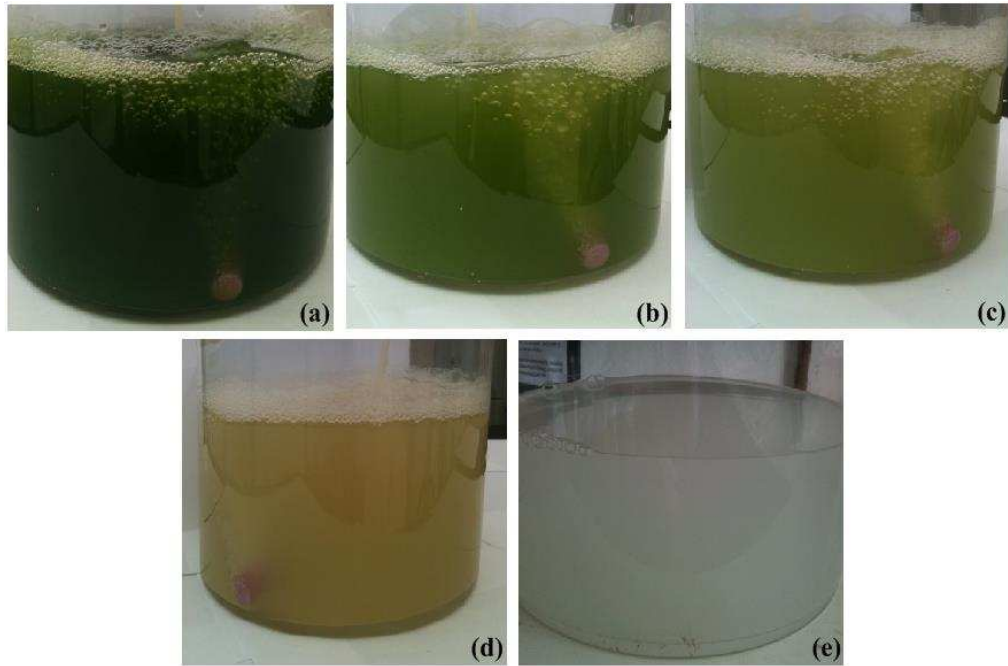


Figura 6 - Aspecto das microalgas durante o processo de ozonização: (a) início da ozonização; (b) após 10 minutos; (c) 20 minutos; (d) 50 minutos e (e) 5 minutos após o término da ozonização.

### 2.3.3. Análise do perfil proteico em gel de poliacrilamina

A imagem do gel obtido a partir da análise eletroforética de extratos proteicos da microalga *Scenedesmus obliquus* BR003 em gel de poliacrilamina, após ozonização, apresenta o comportamento das diferentes bandas que variam entre 14 a 97 kDa (Figura 7). Observa-se ao longo do processo de ozonização a diminuição das bandas peptídicas e sua concentração. No tratamento 50 min quase já não se pode identificar bandas visíveis, indicando a degradação das proteínas pela ação do ozônio.

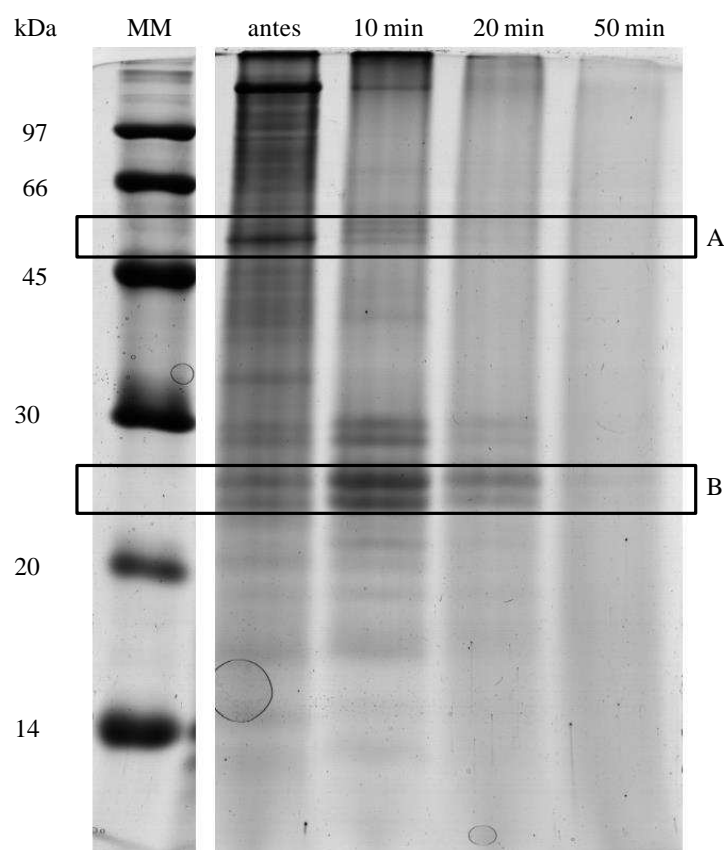


Figura 7 - Análise eletroforética das proteínas da microalga *Scenedesmus obliquus* BR003 antes e após ozonização do material a 2,5 mg O<sub>3</sub> L<sup>-1</sup>. Os tratamentos foram: antes (anterior a ozonização); 10 min, 20 min e 50 min (minutos de ozonização). (A) e (B) representam diferentes bandas peptídicas com distintos comportamentos em relação à oxidação pelo ozônio.

Sibaja (2014) realizou a eletroforese de *Scenedesmus acuminatus* em gel de poliacrilamida para separar e identificar as proteínas presentes. Em seu estudo, foi observado uma banda proteica de elevada intensidade com massa molar aproximadamente de 62 kDa, após análise por espectrometria de massa, a proteína destacada apresentou homologia com a Ribulose 1,5-Bifosfato Carboxilase Oxigenase (RubisCO). Esta mesma banda pode ser identificada na Figura 7 no tratamento 0 min, observa-se sua oxidação ao longo dos tratamentos com ozônio (A).

O ozônio é capaz de oxidar as proteínas tornando-as biologicamente inativas, em que, sua degradação ocorre de acordo com o tipo de estrutura molecular. O ozônio pouco reage com as ligações peptídicas das proteínas, mesmo com elevadas

concentrações de ozônio, essas ligações permanecem inalteradas (CATALDO 2003; SHARMA e GRAHAM 2010). Segundo Cataldo (2006) existem diferentes tempos de reação entre as moléculas de ozônio e as proteínas, esta constatação pode ser observada no tratamento 20 min, em que a banda A não é mais observada e a banda B ainda continua presente.

### 2.3.4. Concentração de nutrientes

A liberação de nutrientes pelo processo de ozonização está relacionada diretamente com a relação entre a dose de ozônio utilizada, a quantidade de massa seca ozonizada e ao tempo de exposição do material ozonizado (MENG et al., 2013). Alguns trabalhos evidenciam aumentos dos teores de nitrogênio e fósforo no meio de cultivo após a ozonização de água de esgoto (CHU et al 2008; HE et al., 2006).

#### 2.3.4.1. Nitrogênio

Com o aumento do tempo de ozonização houve um acréscimo da concentração de nitrogênio na forma inorgânica, tanto para o  $\text{NH}_4^+$  (Figura 8a), quanto para o  $\text{NO}_3^-$  (Figura 8b). A concentração de  $\text{NO}_3^-$  no tempo de 50 minutos foi de  $5,7 \text{ mg L}^{-1}$  e aparenta estabilizar-se após 20 minutos de ozonização. Já a concentração final de  $\text{NH}_4^+$  foi de  $1,1 \text{ mg L}^{-1}$ , entretanto, apresenta uma tendência crescente de aumento da concentração até o tempo final.

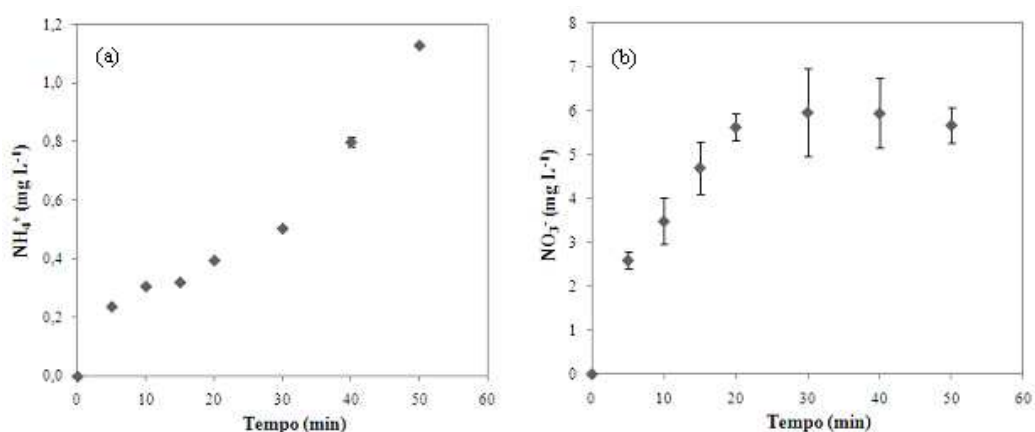


Figura 8 – Concentração de  $\text{NH}_4^+$  (a) e  $\text{NO}_3^-$  (b), durante a ozonização de *Scenedesmus obliquus* BR003.

A relação massa seca ozonizada com nutriente recuperado foi de 200:1 para amônio e 31:1 para nitrato, ou seja, para as condições estudadas, necessita-se de 200 mg de massa seca para cada mg de amônio recuperado. Como não foram adicionados  $\text{NH}_4^+$  e  $\text{NO}_3^-$  ao meio de cultivo, o nutriente recuperado em ambos os casos, foi proveniente da ozonização das microalgas.

Estudos com a ozonização de esgotos evidenciam um aumento do nitrogênio total (amônio, nitrito, nitrato, nitrogênio orgânico e reduzido) no meio (MENG et al., 2013). Zhang et al. (2009) ao ozonizarem esgoto urbano obtiveram um aumento de 169 % nas concentrações de nitrogênio total. Entretanto, a maior parte do acréscimo do nitrogênio total é proveniente de nitrogênio orgânico, principalmente pelas proteínas, que são liberadas ao meio após a ruptura da parede celular (CHU et al., 2008).

O nitrogênio é encontrado nas microalgas principalmente na forma de proteínas, em menor escala, encontra-se nitrogênio nos ácidos nucleicos, aminas, glucosaminas, e alguns componentes de parede celular. Em *Scenedesmus obliquus*, o conteúdo de nitrogênio não proteico pode chegar a 12% (BECKER, 2007). Dessa forma, espera-se que a maior parte do nitrogênio ainda esteja presente no meio, na forma de proteínas oxidadas (SHARMA e GRAHAN, 2010)

#### **2.3.4.2. Fosfato**

A concentração de fosfato aumentou durante o tratamento com o ozônio cerca de 276 %, considerando o tempo de 50 minutos (Figura 9). Este mesmo comportamento foi observado por He et al. (2006), em que observaram um aumento na concentração de fosfato superior a 350 %, sendo que 45,4 % do fósforo total se encontraram na forma de  $\text{PO}_4^{3-}$ , neste caso, parte do fósforo na forma orgânica foi oxidado a fosfato.

A relação massa seca ozonizada com fosfato recuperado foi de 278:1, em outras palavras, são necessários 278 mg de massa seca para recuperar 1 mg de fosfato.

Segundo Saktaywin et al. (2005), em estudos com água de esgoto, o aumento da concentração de fosfato no meio durante a ozonização ocorre devido a solubilização dos fosfolipídeos, componentes da membrana celular dos

microorganismos, porém, a forma mais abundante de fósforo no meio provém dos polifosfatos, que são solubilizados após a ruptura da parede celular.

O polifosfato é um polímero linear composto por resíduos de ortofosfato, unidos por ligações fosfoanidrílicas, considerado o precursor da adenosina trifosfato (ATP). As microalgas podem acumular uma grande quantidade de polifosfatos internamente na forma de grânulos (EIXLER et al., 2005; SHARIA et al., 2002). Acredita-se que exista ainda polifosfatos em abundância no meio, contudo, o método analítico empregado não é capaz de mensurar este componente.

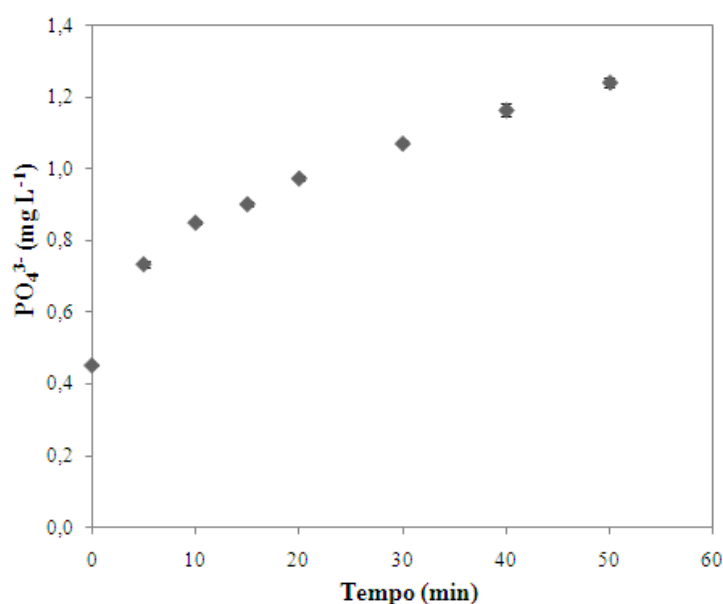


Figura 9 – Concentração de PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>, durante a ozonização de *Scenedesmus obliquus* BR003.

A concentração inicial de fosfato de aproximadamente 0,4 mg L<sup>-1</sup> encontrada pode ser explicada pela liberação de ortofosfato para o meio que não continha fosfato. Jansson (1993) observou a liberação de ortofosfato para o meio em cultivo de *Scenedesmus quadricauda* e concluiu que possivelmente essa liberação é resultado da regulação do fósforo celular das microalgas.

Um fator que pode afetar significativamente o processo de recuperação de fósforo a partir da ozonização é a concentração de fosfato utilizada no cultivo da microalga. Sabe-se que o gênero *Scenedesmus* é capaz de armazenar fósforo no interior celular além do necessário ao seu metabolismo, este fenômeno é chamado de consumo de luxo (POWELL et al., 2008; POWELL et al., 2009). Este fator é

importante do ponto de vista econômico, visto que se as microalgas absorvem o fosfato como consumo de luxo, num cultivo sem o reaproveitamento do meio de cultura, esse fosfato é perdido. Entretanto, ozonizando-se as microalgas este fosforo poderá ser reutilizado em cultivos subsequentes.

#### **2.4. Conclusões e considerações para experimentos futuros**

Este trabalho teve por objetivo de estudar alterações físico-químicas que ocorrem durante o processo de ozonização da microalga *Scenedesmus obliquus* BR003, a fim de verificar a possibilidade de reutilização dos nutrientes assimilados durante o cultivo.

Foi realizada uma análise do perfil espectrofotométrico durante a ozonização de *Scenedesmus obliquus* BR003 e os principais picos encontrados foram 436, 470 e 680 nm, que representam clorofila *a* e carotenoides.

O método estatístico de regressão linear segmentada foi utilizado para identificar o tempo ótimo de ozonização, onde foram analisados cada pico de absorção separadamente, além dos resultados de massa seca. Considerando os resultados obtidos o tempo de ozonização médio de 34,4 minutos ( $\pm 0,81$ ).

A biomassa diminuiu consideravelmente, cerca de 60% após 35 minutos de ozonização, sendo uma evidência que este processo foi capaz de romper a parede celular das microalgas e oxidar parte dos compostos orgânicos.

A análise do perfil eletroforético evidenciou o ocorrência de oxidação das bandas ao longo do processo de ozonização. No tempo de 50 minutos de ozonização, não foi possível identificar nenhuma banda visível.

É possível recuperar nutrientes pela ozonização das microalgas. Após o tratamento com ozônio por 50 minutos, a concentração amônio, nitrato e fosfato foram 1,1, 5,7 e 1,2 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente.

#### **2.5. Referências**

ABOUZLAM, M. et al. An optimal control of wastewater treatment reactor by catalytic ozonation. **Control Engineering Practice**, v. 21, n. 1, p. 105–112, 2013.

ADENLE, A. A.; HASLAM, G. E.; LEE, L. Global assessment of research and development for algae biofuel production and its potential role for sustainable development in developing countries. **Energy Policy**, v. 61, p. 182–195, 2013.

ALLEN, M. M.; STANIER, R. Y. Growth and Division of Some Unicellular Blue-green Algae. **Journal of general microbiology**, v. 51, p. 199–202, 1968.

AL-ATTAS, A. M. M. A.; AHMED, K. A. M. Study the Impact of Sunlight and Temperature on Drink Ozonated Water. **Journal of Basic and Applied Scientific Research**, v. 3, n. 10, p. 224–228, 2013.

APHA / AWWA / WEF: Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 21st. Ed., USA, APHA, 2006.

BATAN, L. et al. Net Energy and Greenhouse Gas Emission Evaluation of Biodiesel Derived from Microalgae. **Environmental Science & Technology**, v. 44, n. 20, p. 7975-7980, 2010.

BECKER, E. W. Micro-algae as a source of protein. **Biotechnology advances**, v. 25, n. 2, p. 207-10, 2007.

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.

CARPENTIER, S. C. et al. Preparation of protein extracts from recalcitrant plant tissues: An evaluation of different methods for two-dimensional gel electrophoresis analysis. **Proteomics**, v. 5, p. 2497-2507, 2005.

CATALDO, F. Ozone Degradation of Biological Macromolecules: Proteins, Hemoglobin, RNA, and DNA. **Ozone: Science & Engineering**, v. 28, n. 5, p. 317–328, 2006.

CATALDO, F. On the action of ozone on proteins. **Polymer Degradation and Stability**, v. 82, n. 1, p. 105–114, jan. 2003.

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. 510–6, 2012.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae beats bioethanol. **Trends in Biotechnology**, v. 26, p. 126-131, 2008.

CHU, L.-B. et al. Enhanced sludge solubilization by microbubble ozonation. **Chemosphere**, v. 72, n. 2, p. 205-12, 2008.

CLESCERL, L.S.; GREENBERG, A.E; EATON, A.D. Standard methods for the examination of water and wastewater. Denver: American Water Works Association, 1220 p., 2000.

EIXLER, S.; SELIG, U.; KARSTEN, U. Extraction and detection methods for polyphosphate storage in autotrophic planktonic organisms. **Hydrobiologia**, v. 533, p. 135-143, 2005.

ERNST, M.; LUROT, F.; SCHROTTER, J.-C. Catalytic ozonation of refractory organic model compounds in aqueous solution by aluminum oxide. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 47, n. 1, p. 15–25, 2004.

GRIFFITHS, M. J. et al. Interference by pigment in the estimation of microalgal biomass concentration by optical density. **Journal of microbiological methods**, v. 85, n. 2, p. 119-23, 2011.

HANNON, M. et al. Biofuels from algae: challenges and potential. **Biofuels**, v. 1, n. 5, p. 763-784, set. 2010.

HE, S.; XUE, G.; WANG, B. Activated sludge ozonation to reduce sludge production in membrane bioreactor (MBR). **Journal of Hazardous Materials**, v. 135, p. 406-411, 2006.

HOIGNÉ, J.; BADER, H. Rate Constants of Reactions of Ozone With Organic and Inorganic Compounds in Water - II. **Water research**, v. 17, n. 2, p. 185–194, 1983.

ISAZADEH, S. et al. New mechanistically based model for predicting reduction of biosolids waste by ozonation of return activated sludge. **Journal of hazardous materials**, v. 270, p. 160-168, 2014.

JANSSON, M. Uptake, exchange and excretion of orthophosphate in phosphate-starved *Scenedesmus quadricauda* and *Pseudomonas* K7. **Limnology and Oceanography**, v. 38, n. 6, p. 1162–1178, 1993.

JEONG, K. et al. Effects of ozonation and coagulation on effluent organic matter characteristics and ultrafiltration membrane fouling. **Journal of Environmental Sciences**, v. 26, n. 6, p. 1325–1331, 2014.

JONES, C. S.; MAYFIELD, S. P. Algae biofuels: versatility for the future of bioenergy. **Current opinion in Biotechnology**, v. 23, p. 346-351, 2012.

KIM, H.-C. et al. Ozonation of piggery wastewater for enhanced removal of contaminants by *S. quadricauda* and the impact on organic characteristics. **Bioresource technology**, v. 159, n. 3, p. 128–135, 2014.

MASTEN, S. J.; DAVIES, S. H. R. The use of ozonation to degrade organic contaminants in wastewaters. **American Chemical Society**, v. 28, n. 4, p. 180-185, 1994.

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

MENG, X. et al. A full scale anaerobic – anoxic – aerobic process coupled with low-dose ozonation for performance improvement. **Bioresource Technology**, v. 146, p. 240-246, 2013.

MURPHY, J.B.; RILEY, J.P. A single solution method for the determination of phosphate in natural waters. **Journal of Biological Marine Association of the United Kingdom**, v. 37, n. 1, p. 9-14, 1958.

NICKLISCH, A. Growth and light absorption of some planktonic cyanobacteria, diatoms and Chlorophyceae under simulated natural light fluctuations. **Journal of Plankton Research**, v. 20, p. 105-119, 1998.

OLIVEIRA, F. M. Aplicação e testes do método Apha-4500-NO<sub>3</sub>-C para determinação de nitratos em águas por leitura em uv com segunda-derivada. **Revista Analytica**, v. 27, p. 80-88, 2007.

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.

PARMAR, A. et al. Cyanobacteria and microalgae: a positive prospect for biofuels. **Bioresource technology**, v. 102, n. 22, p. 10163-72, 2011.

POWELL, N. et al. Factors Influencing Luxury Uptake of Phosphorus by Microalgae in Waste Stabilization Ponds. **Environmental Science & Technology**, v. 42, p. 5958-5962, 2008.

POWELL, N. et al. Towards a luxury uptake process via microalgae - defining the polyphosphate dynamics. **Water research**, v. 43, n. 17, p. 4207-13, 2009.

RILEY, J.P. The spectrophotometric determination of ammonia in natural waters with particular reference to sea-water. **Analytica-Chimica**, 9, 575-589, 1953.

SAKTAYWIN, W. et al. Advanced sewage treatment process with excess sludge reduction and phosphorus recovery. **Water research**, v. 39, n. 5, p. 902-10, 2005.

SHARI'A, A.E.N.; NASCIMENTO, A.E.; LIMA, M.A.B.; TAKAKI, G.M.C.; SOUZA, W. Polyphosphate in Zygomycetes: A Cytochemical Study. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, p. 119-126, 2002.

SHARMA, V. K.; GRAHAM, N. J. D. Oxidation of amino acids, peptides and proteins by ozone: A Review. **Ozone: Science & Engineering**, v. 32, n. 2, p. 81-90, 2010.

SIBAJA, K. V. M. Quantificação e caracterização de proteínas da microalga *Scenedesmus* sp. BR003 com potencial de emprego na indústria de alimentos. 2014. 49 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2014.

SOARES, J. Desenvolvimento de meios de cultura a partir de fertilizantes agrícolas para cultivos de microalgas. 93f. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Programa de Pós-Graduação em Botânica, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2012.

WU, D. et al. Algae (*Microcystis* and *Scenedesmus*) absorption spectra and its application on Chlorophyll a retrieval. **Frontiers of Earth Science**, v. 7, n. 4, p. 522-530, 2013.

YANG, J. et al. Life-cycle analysis on biodiesel production from microalgae: Water footprint and nutrients balance. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 159-165, 2011.

YAO, C. C. D.; HAAG, W. R. Rate constants for direct reactions of ozone with several drinking water contaminants. **Water research**, v. 25, n. 7, p. 761-773, 1991.

ZHANG, G. et al. Sludge ozonation: disintegration, supernatant changes and mechanisms. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 1505-1509, 2009.

### 3. ARTIGO II: CULTIVO DE *Scenedesmus obliquus* BR003 NO EXTRATO DE MICROALGAS OZONIZADO

**Resumo:** A busca por alternativas e processos de produção, que visam reduzir os custos e a diminuição da dependência de adubos químicos em cultivos de microalgas é um fator crucial para alcançar a viabilidade econômica. Neste contexto, buscou-se reutilizar os nutrientes absorvidos pela microalga *Scenedesmus obliquus* BR003, através da sua ozonização e obtenção do extrato de microalgas ozonizado que, posteriormente foi utilizado em um novo cultivo. Microalgas cultivadas somente com o extrato algal ozonizado tiveram biomassa final de  $0,64 \text{ g L}^{-1}$ , resultado semelhante ao cultivo com o meio BG11 suplementado com o mesmo extrato ( $0,66 \text{ g L}^{-1}$ ) e três vezes superior ao meio BG11 sem suplementação ( $0,21 \text{ g L}^{-1}$ ). De uma forma geral, os tratamentos em que o nitrogênio presente no meio BG11 não foi aplicado, apresentaram teores de lipídios maiores. Outro indicador de estresse por falta de nitrogênio foram os teores de clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides totais, em que, os tratamentos com baixo teores de nitrogênio apresentaram menores concentrações destes pigmentos, como o caso do BG11(sem nitrogênio e com extrato ozonizado) que possuiu teores de clorofila *a*, *b* e carotenoides totais de 1,95, 1,37 e  $1,37 \text{ mg L}^{-1}$ , contra 5,11, 2,88 e  $3,00 \text{ mg L}^{-1}$  obtido no tratamento BG11 (sem fósforo e com extrato ozonizado), respectivamente. O custo de ozonização das microalgas para se obter um litro de lipídios, ficou em R\$ 5,75, contudo o aumento de escala e melhorias na produtividade de lipídios, este custo caiu para R\$ 2,33.

**Palavras-chave:** *Scenedesmus obliquus* BR003, microalgas, ozônio, reaproveitamento de nutrientes.

**Abstract:** The need for reducing the cost of microalgae-based biodiesel production is a crucial factor to turn its adoption feasible in the world energy matrix. Faced with this issue, an experiment was set up to investigate the potential use of ozone gas on recovering nutrients assimilated by the microalgae *Scenedesmus obliquus* BR003 during its subsequent cultivation in BG11 medium. The cultivation carried out solely with the extract obtained after microalgae ozonization resulted in 0.64 g L<sup>-1</sup> of final biomass. Similar results were found when BG11 culture medium supplemented with the same extract were used (0.66 g L<sup>-1</sup>); however, values were three-fold higher when BG11 medium without supplementation was adopted (0.21 g L<sup>-1</sup>). Generally, the treatments with no nitrogen supplementation showed higher levels of lipids. Furthermore, other indicators of nitrogen deficiency such as low levels of chlorophyll *a*, chlorophyll *b* and carotenoids were noticed. Accordingly, the treatment with low levels of nitrogen showed lower concentrations of these pigments. For instance, the content of chlorophyll *a*, chlorophyll *b*, and carotenoids were 1.95, 1.37 and 1.37 mg L<sup>-1</sup> in the BG11 treatment (without nitrogen and extract added), respectively. On the other hand, higher values of pigments were found in the treatment BG11 (without phosphorus and extract added) 5.11, 2.88, and 3.00 mg L<sup>-1</sup>, respectively. The estimated cost to produce one liter of lipids via microalgae ozonization was R\$ 5.75, even though this cost decreased to R\$ 2.33 per liter when large production scales and improvement of lipids yield was adopted. Consequently, increasing the efficiency of the ozonization process might enable further reduction of the costs previously calculated.

**Keywords:** *Scenedesmus obliquus* BR003, microalgae, ozone, nutrients reuse.

### 3.1. Introdução

As microalgas são uma fonte promissora de matéria prima para produção de biocombustíveis devido ao seu elevado potencial produtivo, além de apresentarem menor impacto ambiental em relação aos combustíveis fósseis. Para se desenvolverem, necessitam basicamente nutrientes, água e luz, dependendo da espécie, podem ser de água doce ou salgada. O suprimento externo destes elementos torna-se necessário para estimular seu crescimento, aumentando assim a produtividade (BOHUTSKYI et al. 2014).

Existem fatores que impedem esta alternativa de se tornar economicamente viável, como a elevada necessidade de fertilizantes e fontes de carbono, além da necessidade de melhorias nas etapas de colheita e processamento, com subsequente redução de custos (COLLET et al. 2014; ZIOLKOWSKA e SIMON, 2014).

Segundo Dermibas (2010), as microalgas possuem a capacidade de produzir entre 10 a 20 vezes mais biodiesel que a colza. Entretanto, as microalgas necessitam 55 a 111 vezes mais nitrogênio, cerca de 8 a 16 toneladas por hectare por ano. Essa elevada necessidade de nutrientes pelas microalgas torna fundamental a busca por fontes alternativas capazes de suprir esta demanda, reduzindo-se os custos de produção e a competição destes compostos com a agricultura.

Uma forma que vem sendo amplamente estudada é o aproveitamento dos nutrientes presentes em águas residuárias e esgotos urbanos, que podem apresentar teores de amônia e fósforo total na ordem de 264 mg L<sup>-1</sup> e 530 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente (MIN et al., 2011; DONG et al., 2014; GUERRERO-CABRERA et al., 2014). Contudo, estes nutrientes podem se apresentar de diversas formas, como por exemplo o nitrogênio, que aparece como amônio, nitrito, nitrato ou na forma orgânica ( HE;XUE;WANG, 2006; GIRARD et al. 2014). Além disso, é necessário a utilização de pré-tratamentos para eliminar os contaminantes presentes no meio, o que pode encarecer bastante o processo produtivo (CAI; PARK; LI, 2013).

Outro método de reciclagem dos nutrientes pode ser realizado pela digestão anaeróbica do resíduo, com produção de metano e mineralização dos nutrientes. Porém, este processo possui dificuldades devido a toxicidade do nitrogênio em elevadas concentrações, inibição da digestão anaeróbica pela presença de sódio e também exigir a realização de pré-tratamentos (SIALVE et al., 2009).

Muitos trabalhos citam a importância de se reutilizar não só os nutrientes

como também a água no processo produtivo de microalgas. Esta constatação pode ser observada nos estudos reportados por Chisti (2008), Mata et al. (2010), Yang et al. (2011), Jones e Mayfield (2012). Uma alternativa para essa lacuna no processo produtivo das microalgas é a utilização do gás ozônio como agente de desinfecção, podendo viabilizar a reutilização da água e nutrientes reciclados.

Neste trabalho estudou-se reutilizar os próprios nutrientes assimilados pelas microalgas durante o cultivo subsequente de *Scenedesmus obliquus* BR003, utilizando o gás ozônio para esterilização e oxidação do material.

### **3.2. Material e métodos**

#### **3.2.1. Cepa de microalga e sistema de cultivo**

A microalga *Scenedesmus obliquus* BR003 foi utilizada no experimento, uma vez que esta cepa tem apresentado bons resultados para a produção de biomassa, lipídeos, ser resistente a contaminação por microorganismos e se manter dominante em cultivos abertos.

A espécie *Scenedesmus obliquus* BR003 foi obtida junto à Coleção de Cianobactérias e Microalgas do Banco de Microalgas do Projeto Petrobrás, localizada na Unidade de Crescimento de Plantas (UCP) do Departamento de Biologia Vegetal (DBV) da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

O meio de cultivo utilizado para multiplicação das microalgas foi o BG11 (ALLEN e STANIER, 1968). Os cultivos foram realizados em Erlenmeyers de 10 L, com volume cultivado de 7 L, no qual foram mantidos sob agitação utilizando-se injeção de ar através de um compressor. A temperatura foi mantida a  $27 \pm 2$  °C, com fotoperíodo de 16:8 h (luz:escuro), pH entre  $7,0 \pm 0,5$ , controlado pela adição de soluções de HCl ou NaOH 2M.

#### **3.2.2. Ozonização das microalgas**

O processo de ozonização das microalgas, para obtenção do extrato ozonizado, se realizou utilizando-se um ozonizador (Ozone & Life, O&L 50.0 RD-CO, Brasil). O pH das amostras foi previamente corrigido ( $7,0 \pm 0,5$ ) e a massa seca pré-determinada.

Para o experimento de reutilização dos nutrientes, ozonizou-se 5 litros de cultivo de *Scenedesmus obliquus* BR003, a concentração de ozônio utilizada foi de 2,5 mg L<sup>-1</sup> e a biomassa das microalgas de 0,65 g L<sup>-1</sup>, por um período de 60 minutos (Figura 6).

### 3.2.3. Planejamento do experimento de reutilização de nutrientes

O experimento de reaproveitamento dos nutrientes foi conduzido segundo o delineamento inteiramente casualizado, com 6 tratamentos e 4 repetições (Tabela 1). Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 1 – Tratamentos realizados no delineamento inteiramente casualizado com 24 unidades experimentais.

<b>Código</b>	<b>Tratamento</b>
BG11	Cultivo de microalgas em BG11 (controle)
BG11(-N+E)	Cultivo de microalgas em BG11 sem Nitrogênio (N) + extrato ozonizado
BG11(-P+E)	Cultivo de microalgas em BG11 sem Fósforo (P) + extrato ozonizado
BG11(-NP+E)	Cultivo de microalgas em BG11 sem N e P + extrato ozonizado
E	Cultivo de microalgas no extrato ozonizado
BG11(+E)	Cultivo de microalgas em BG11 + extrato ozonizado

Os cultivos foram realizados em Erlenmeyers de 250 mL, com volume cultivado de 200 mL (Figura 10). Os Erlenmeyers foram mantidos sob agitação em BOD a 120 rpm para evitar a decantação das microalgas. A temperatura foi mantida a  $27 \pm 2$  °C, com fotoperíodo de 16:8 h (luz:escuro), irradiância média de 100  $\mu\text{mol s}^{-1}$  proveniente de lâmpadas fluorescentes brancas de 40 W, pH entre 7,0 e 7,5, controlado pela adição de soluções de HCl ou NaOH 2M. O carbono foi fornecido na forma de bicarbonato de sódio, adicionado na forma de solução estoque a 0,7 g L<sup>-1</sup>. Utilizou-se 40 mg L<sup>-1</sup> de *Scenedesmus obliquus* BR003 como inóculo e o experimento foi conduzido durante 16 dias.



Figura 10 – Cultivo de *Scenedesmus obliquus* BR003 em diferentes meios, definidos no delineamento inteiramente casualizado, em 4 repetições.

#### 3.2.4. Determinação da concentração de ozônio

Para determinar a concentração de ozônio no meio, utilizou-se o método iodométrico de titulação indireta (Clescerl et al., 2000), que consiste na reação entre o ozônio e uma solução de 50 mL de iodeto de potássio (KI) padronizada a 1N, em que será formado iodo ( $I_2$ ) a partir da oxidação do iodeto  $I^-$  em meio ácido ( $H_2SO_4$  1N). A solução é então titulada com tiosulfato de sódio ( $Na_2S_2O_3$ ) 0,005 N, utilizando uma solução a 1% de amido como indicador.

#### 3.2.5. Determinação de massa seca livre de cinzas

A massa seca livre de cinzas (biomassa) foi determinada por gravimetria e descontada das cinzas após calcinação. Foram filtrados 15 mL de cada amostra, utilizando membranas com porosidade de 0,22  $\mu m$  previamente secas em estufa a 60 °C e pesadas. Após a filtração, uma solução 0,5 M de  $NH_4HCO_3$  foi utilizada para a lavagem do filtrado, com a finalidade de eliminar resíduos inorgânicos que possam causar um incremento na biomassa e no teor de cinzas. A membrana foi colocada em estufa a 60 °C até atingir massa constante. Em seguida, as membranas foram retiradas da estufa e imediatamente acondicionadas em dessecador para que a

temperatura ambiente fosse atingida. Após esse período, as membranas foram pesadas e a massa seca foi determinada, descontando-se o valor da massa da membrana.

Para obtenção do valor da biomassa livre de cinzas, as membranas contendo a massa seca, filtradas e previamente pesadas foram colocadas em cadinho de porcelana já calcinados e acondicionadas em mufla a 575 °C por 1 h. Após nova calcinação e o resfriamento, o cadinho contendo as cinzas foi disposto em dessecador. O conjunto foi então pesado e o teor de cinzas determinado. Este procedimento foi realizado em triplicata.

### 3.2.6. Monitoramento do crescimento

O crescimento das células nos cultivos foi monitorado diariamente por meio da leitura de absorbância no comprimento de onda de 750 nm, utilizando-se um espectrofotômetro UV-visível (Thermo Scientific, Multiskan GO, Finlândia). Descontou-se a leitura em branco da microplaca dos resultados obtidos. Foram realizadas três repetições diárias para cada tratamento.

### 3.2.7. Determinação do teor de lipídios

A determinação de lipídios foi realizada por gravimetria, seguindo o método J:Schmid-Bondzynski-Ratzlaff (INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION, 1986), modificado pelo grupo de pesquisa em microalgas da Universidade Federal de Viçosa em parceria com a Petrobrás (Euclides, 2013). Devido às alterações realizadas no protocolo, este será descrito passo a passo:

- 1) Pesar um béquer de 250 mL previamente seco em estufa a 102 °C e resfriado em dessecador. Anotar a massa do béquer ( $m_1$ ).
- 2) Pesar (0,5 a 1 g da amostra liofilizada de microalga ( $m_2$ )) diretamente no frasco de extração de Mojonnier ou em béquer de 100 mL.
- 3) Adicionar 10 mL da solução de ácido clorídrico 8 M ao frasco de extração ou ao béquer contendo a amostra e agitar manualmente levemente para promover a dispersão do material. Observar ao microscópio para se certificar que as membranas das algas foram rompidas.

- 4) Aquecer em banho-maria ou placa de aquecimento a 70 °C por 10 min, para completa digestão das células.
- 5) Deixar o frasco em repouso por 10 min a 25 °C. Se a digestão foi feita no frasco de extração ou tubo falcon de centrifugação, adicionar 10 mL de álcool etílico e misturar o conteúdo do frasco agitando-se manualmente por 30 s. Se a digestão tiver sido realizada em béquer, erlenmeyer ou frasco de vidro com tampa de 25 mL, transferir seu conteúdo para um frasco de extração. Nesse caso, deve-se lavar o béquer sucessivamente com os solventes utilizados no processo de extração considerando seus respectivos volumes (10 mL de álcool etílico, 25 mL de éter etílico e 25 mL de éter de petróleo).
- 6) Após adicionar ao frasco de extração 25 mL de éter etílico e 25 mL de éter de petróleo, tampar e agitar manualmente por 1 min na posição horizontal, com o bulbo menor voltado para cima. A separação da fase etérea deve ser feita usando pipeta . Deixar em repouso por 15 min.
- 7) Transferir a fase etérea para um funil de separação e lavar com água destilada para retirar o HCl. Repetir o procedimento até que a fase aquosa apresente pH entre 6 e 7.
- 8) Verter a fase etérea lavada para o béquer previamente tarado ( $m_1$ ) e acondicioná-lo em banho termostático a 65 °C até a completa evaporação do solvente.
- 9) Repetir 3 vezes o item 6 (Etapa de extração) para garantir a migração do óleo retido no resíduo de microalgas para o solvente.
- 10) Após a remoção dos solventes por evaporação, acondicionar o béquer de 250 mL em estufa a  $102 \pm 2$  °C durante 1 h. Esfriar em dessecador e pesar.
- 11) Repetir a operação de secagem e pesagem até massa constante ( $m_3$ ).

O percentual de lipídios será determinado pela seguinte equação:

$$\% \text{Lipídios} = 100 \frac{(m_3 - m_1)}{m_2} \quad (3)$$

em que,

$\% \text{Lipídios}$  = percentual de lipídios extraídos na amostra;

$m_1$  = massa do recipiente (g);

$m_2$  = massa da amostra (g);

$m_3$  = massa do recipiente com o material extraído (g).

### 3.2.8. Determinação dos Pigmentos

Para análise dos teores de pigmentos foram utilizadas três alíquotas de 1 mL de cada unidade experimental, centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos e ressuspendidas três vezes com água deionizada. A extração foi realizada utilizando 1,5 mL de metanol em banho termostatizado a 60 °C por 30 minutos. Após a extração, pipetou-se 200 µL em uma microplaca para obtenção da absorbância em espectrofotômetro (Thermo Scientific, modelo Multiskan GO, Finlândia). Os comprimentos de onda (OD) das leituras realizadas foram: 665, 652 e 470 nm. As concentrações de clorofila *a*, *b*, carotenoides e pigmentos totais foram obtidas por meio das seguintes expressões (WELLBURN, 1994; GRIFFITHS et al., 2011):

$$CHLa = (16.72 \times OD_{665}) - (9.16 \times OD_{652}) \quad (4)$$

$$CHLb = (34.09 \times OD_{652}) - (15.28 \times OD_{665}) \quad (5)$$

$$CaroT = [(1000 \times OD_{470}) - (1.63 \times CHLa) - (104.96 \times CHLb)] \div 221 \quad (6)$$

$$PigT = CHLa + CHLb + CaroT \quad (7)$$

em que,

$CHLa$  = Clorofila *a* (mg L<sup>-1</sup>);

$CHLb$  = Clorofila *b* (mg L<sup>-1</sup>);

$CaroT$  = Carotenoides totais (mg L<sup>-1</sup>);

$PigT$  = Pigmentos totais (mg L<sup>-1</sup>);

### 3.2.9. Custo da ozonização e obtenção de lipídios

Para o cálculo do custo, foi considerada a obtenção de um litro de lipídios, a partir do uso do extrato ozonizado como fonte de nutrientes. Os parâmetros adotados foram: 16,6 kW h kg<sup>-1</sup> O<sub>3</sub><sup>-1</sup> (MASSCHELEIN, 1991), energia elétrica a 0,39642 R\$ kW h<sup>-1</sup> (Cemig), tempo de ozonização de 35 minutos, concentração de biomassa de 1,0 g L<sup>-1</sup> com 20 % de lipídios.

### 3.3. Resultados e discussão

Analisando os resultados de absorvância (Figura 11), observa-se que a dinâmica de crescimento das microalgas foi similar entre todos os tratamentos, com exceção ao BG11, que apresentou uma fase lag (de indução do crescimento) maior. Já a fase estacionária, ou seja, de estabilização do crescimento, ocorreu após as 200 horas de cultivo (8 dias), para todos os tratamentos. Este mesmo comportamento foi reportado por Xin et al. (2010) ao cultivarem *Scenedesmus* sp. em diferentes concentrações de nitrogênio e fósforo.

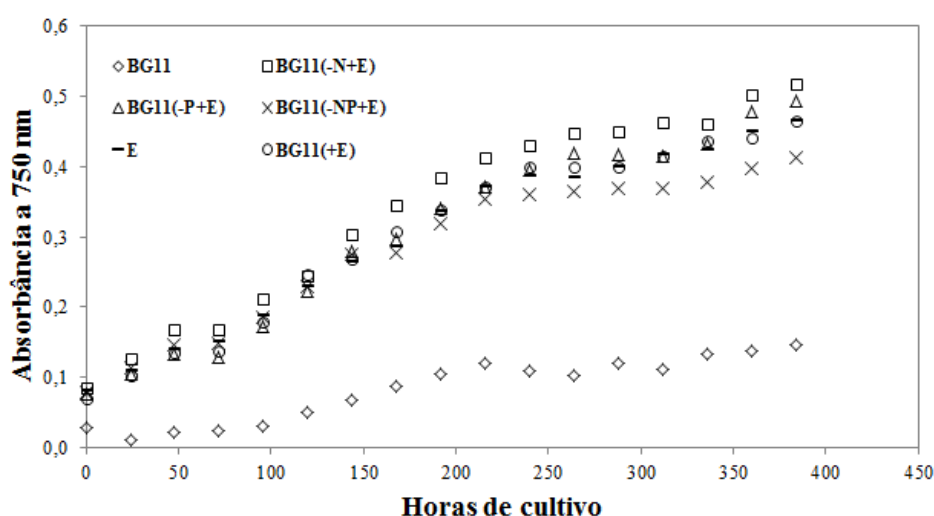
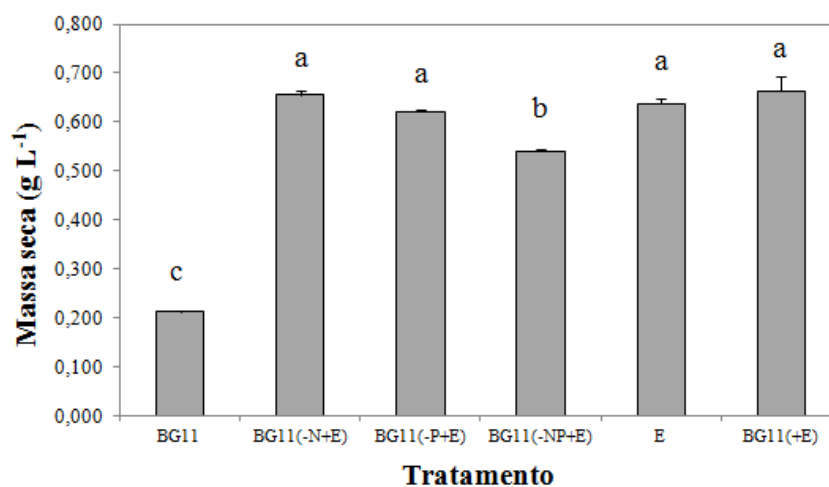


Figura 11 – Leituras de absorvância a 750 nm durante diferentes cultivos de *Scenedesmus obliquus* BR003.

Andruleviciute et al. (2013) cultivaram *Scenedesmus* sp. em meio mixotrófico com diferentes concentrações de glicerina, complementados com BG11 e obtiveram uma fase lag e estacionária de 3 e 12 dias, respectivamente. Estes valores foram maiores aos encontrados no presente trabalho, em que a fase lag durou menos que 24 horas e a fase estacionária se iniciou por volta do 9º dia em todos os tratamentos.

Por meio da massa seca final produzida, conclui-se que os melhores tratamentos foram o BG11(-N+E), BG11(-P+E), E e BG11(+E), em que apresentaram valores superiores aos demais e estatisticamente similares entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey, seguidos pelo tratamento BG11(-NP+E) e BG11 (Figura 12). Estes resultados evidenciam que a utilização do extrato ozonizado

foi responsável pelo aumento da produção de biomassa, comparado ao cultivo somente com BG11.



\*Médias seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey. ( $p < 0,05$ )

Figura 12 – Massa seca final para os diferentes tratamentos estudados.

Entre os meios de cultivo onde o extrato ozonizado foi utilizado, somente o tratamento BG11(-NP+E) apresentou biomassa um pouco inferior comparado aos demais valores. A similaridade entre o tratamento E e o tratamento BG11(+E) evidencia que, de alguma forma, as microalgas foram capazes de assimilar os nutrientes e o carbono necessário para seu crescimento, mesmo para o meio E, em que não houve nenhum suprimento adicional de nutrientes além do extrato ozonizado.

O resultado de biomassa para o meio BG11 (+E), comparado ao resultado obtido somente utilizando o meio BG11, permite inferir que o extrato ozonizado foi responsável pelo aumento do ganho em massa seca. Sabe-se que o extrato ozonizado é composto basicamente por carbono orgânico e nutrientes (na forma orgânica e mineral).

Diversas fontes de carbono orgânico são estudadas como fonte de carbono para cultivos de microalgas, como por exemplo: o lodo formado com o tratamento de esgotos, resíduos de granja de porcos, glicerina (obtido como resíduo da produção de biodiesel), melão de cana de açúcar, resíduos da indústria de queijo, entre outros (WANG et al., 2009; PITTMAN; DEAN; OSUNDEKO, 2011; EL-SHEEKH; ABOMOHR; HANELT, 2013; GIRARD et al., 2014).

Além de absorverem o carbono orgânico, algumas espécies de microalgas são capazes de assimilarem os nutrientes ligados a estes compostos, principalmente o nitrogênio e o fósforo, neste caso encontra-se o gênero *Scenedesmus* (DAVIS e WILCOMB, 1967; NEILSON; LARSON, 1980; BERMAN e CHAVA, 1999).

Kim et al. (2014) ao ozonizarem resíduos da produção de porcos não encontraram redução significativa na demanda bioquímica de oxigênio, que é um indicador de presença de matéria orgânica. Contudo, em cultivo posterior com *Scenedesmus quadricauda*, o resíduo com maior tempo de ozonização obteve uma maior assimilação de carbono pela microalga. Atribuiu-se a esse fenômeno a conversão dos compostos orgânicos altamente condensados em frações de menor peso molecular e assim facilmente assimiláveis pelas microalgas.

A Figura 13 apresenta imagens de microscopia de luz dos cultivos estudados logo após o término do experimento. As microalgas apresentam alterações na sua morfologia que variam entre formação ou não de cenóbios, coloração, comprimento e largura celular de acordo com as condições em que se encontram. Fatores que influenciam estas alterações são principalmente o pH, o fotoperíodo, a temperatura e os nutrientes utilizados no seu cultivo (MASI e MELIS, 1997; PANCHA et al., 2014).

O gênero *Scenedesmus* possui por característica o corpo achatado, capacidade de formar cenóbios de 2 a 16 células (comum 2 ou 4) e podem apresentar espinhos nas células terminais (GODINHO, 2009). Segundo Pancha et al. (2014), em cultivos com baixo teor de nitrato, foi observado que as células se modificaram morfológicamente de unicelulares, passando a configurar cenóbios de duas ou quatro células. O comprimento e o número de espinhos também aumentaram com a redução do nitrato no meio, além disso, o tamanho das células cresceu cerca de 18%.

Os tratamentos em que nitrogênio mineral foi adicionado junto ao meio sintético BG11 apresentaram menor formação de cenóbios, são eles: BG11, BG11(-P+E) e BG11(+E) (Figura 13). Já nos demais tratamentos, observa-se a maior presença de cenóbios com duas ou quatro células. Esta constatação é um indício que pode ter havido em algum momento, estresse por falta de nitrogênio durante o cultivo, contudo, outros indicadores serão analisados posteriormente.

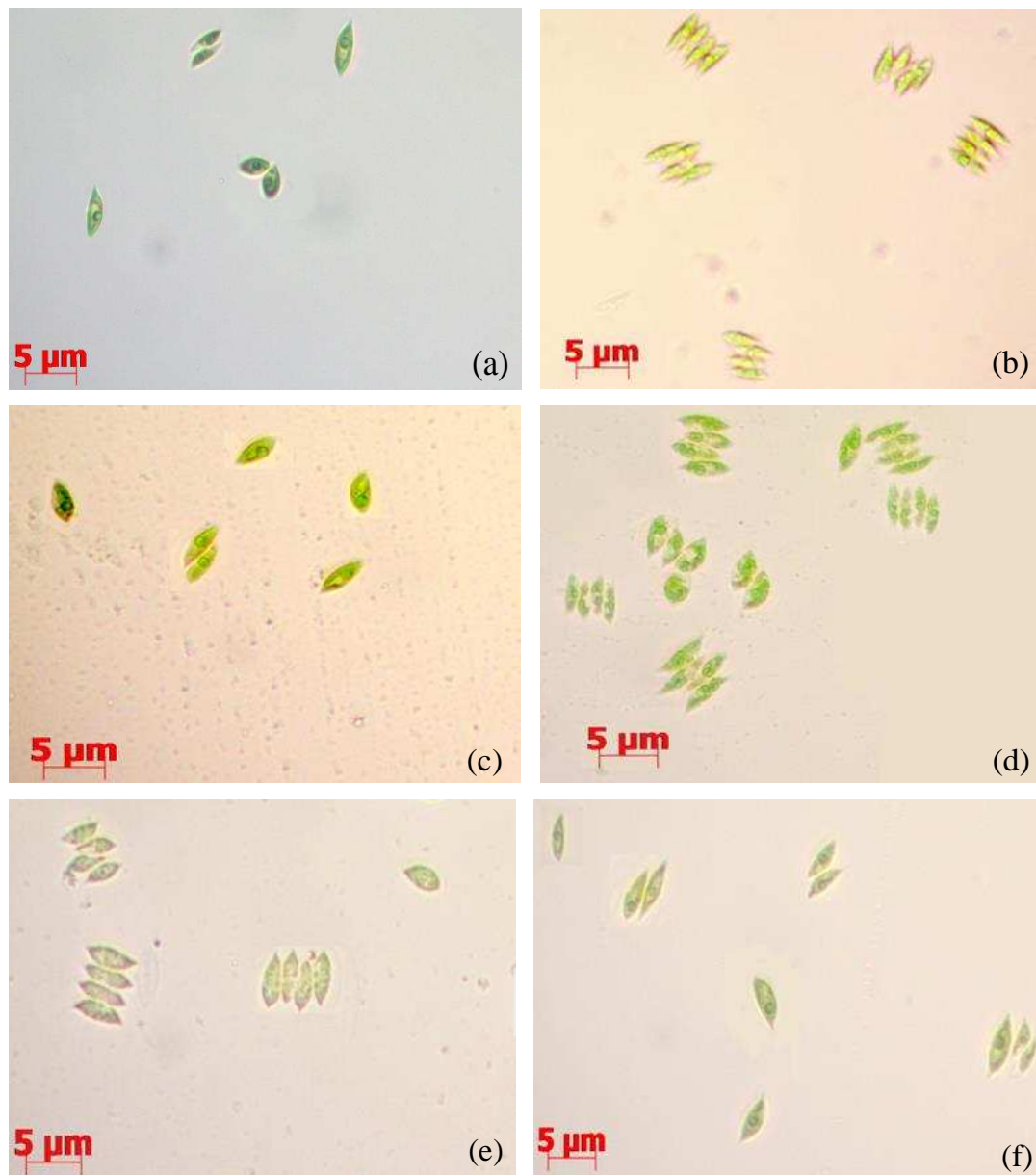


Figura 13 – Plasticidade fenotípica entre os diferentes tratamentos pela microscopia de luz. (a) BG11, (b) BG11(-N+E), (c) BG11(-P+E), (d) BG11(-NP+E), (e) E, (f) BG11(+E).

Outro indicador do estado nutricional das microalgas é o teor dos pigmentos fotossintéticos (clorofila *a*, *b* e carotenoides). A Tabela 2 apresenta a concentração dos pigmentos fotossintéticos para os tratamentos estudados. Observa-se que os tratamentos BG11(-N+E), BG11(-NP+E) e E, nos quais não foram adicionados nitrogênio suplementar ao meio, apresentaram uma concentração de pigmentos menor do que quando comparado aos tratamentos BG11(-P+E) e BG11(+E). Com exceção ao BG11, que apresentou concentração similar aos tratamentos sem

suplemento de nitrogênio, contudo, essa constatação pode ser explicada devido ao baixo nível de biomassa produzido comparado aos demais meios.

Tabela 2 – Clorofila *a*, *b*, carotenoides, pigmentos totais e razão clorofila *a/b* para os tratamentos estudados.

Pigmentos (mg L <sup>-1</sup> )	Tratamento					
	BG11	BG11(-N+E)	BG11(-P+E)	BG11(-NP+E)	E	BG11(+E)
Clorofila <i>a</i>	1,73c	1,95c	5,11b	1,52c	1,96c	5,64a
Clorofila <i>b</i>	1,01d	1,37c	2,88b	1,08cd	1,40c	3,47a
Carotenoides totais	1,09d	1,37c	3,00b	1,10cd	1,42c	3,47a
Pigmentos totais	3,83b	4,69b	10,99a	3,70b	4,78b	12,58a
Razão clorofila <i>a/b</i>	1,72a	1,42c	1,78a	1,40c	1,40c	1,62b

\*Médias seguidas pela mesma letra na linha, para cada tipo de tratamento, não diferem entre si pelo teste de Tukey. (p<0,05)

Pancha et al. (2014) observaram que ao reduzir a quantidade de nitrogênio do meio ou manter o cultivo com níveis baixos deste nutriente por alguns dias, a quantidade de clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides reduziram drasticamente. A redução do nitrogênio desencadeia uma série de respostas metabólicas como a degradação dos compostos nitrogenados, por exemplo, a própria clorofila, proteínas, DNA, entre outros. Além disso, esse estresse promove o acúmulo de reservas energéticas como os carboidratos e lipídios.

A Tabela 3 apresenta os valores de biomassa, percentual e concentração de lipídios. O tratamento E obteve os maiores valores para todos três os parâmetros mensurados. Para o teor de lipídio, o restante dos tratamentos apresentaram resultados estatisticamente iguais, contudo, ao analisarmos os resultados de concentração de lipídios, existe uma estratificação dos tratamentos com relação à quantidade de lipídios produzida.

Tabela 3 – Teor e concentração final de lipídeos.

Tratamento	Lipídio (%)	Lipídio (mg L <sup>-1</sup> )
BG11	12,4b	26,41d
BG11(-N+E)	13,59b	89,15b
BG11(-P+E)	11,81b	73,35bc
BG11(-NP+E)	10,76b	58,14c
E	21,45a	136,86a
BG11(+E)	9,84b	65,35bc

\*Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey. (p<0,05)

Ao longo dos anos, pesquisadores de diversas partes do mundo procuram por espécies ou formas de manejo que aumentem o percentual lipídico das microalgas. Há relatos de microalgas com 63% de lipídios em relação à massa seca (GOUVEIA e OLIVEIRA, 2008). Entretanto, não se pode deixar de considerar a massa seca produzida durante o processo, pois ela afeta diretamente a produtividade lipídica final. Exemplo disso pode-se observar que o tratamento BG11 possuiu o mesmo percentual de lipídios que o tratamento BG11(+E), de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade, porém ao se observar a quantidade de lipídios de fato extraída, percebe-se que o tratamento BG11 apresentou uma produção 2,5 vezes menor que o tratamento BG11(+E).

A limitação de nitrogênio é um importante fator utilizado para estimular a elevação dos níveis de lipídios nas microalgas. Esta prática deve ser utilizada de forma otimizada, ou seja, que não afete negativamente a biomassa final (BREUER et al. 2012).

O custo de ozonização para obtenção de 1 litro de lipídios ficou em R\$ 5,75, valor este, obtido de forma conservadora, visto que se o percentual lipídico aumentar para 30%, o custo cai para R\$ 3,83 e, além disso o custo com energia elétrica pode ser reduzido dependendo da escala de consumo e o custo final de 1 litro de lipídios ficaria em R\$ 2,33.

Outro fator que deve ser analisado é a redução no custo de produção de microalgas causada pelo reaproveitamento dos nutrientes no meio e também pelo uso do carbono orgânico. Segundo Slade e Bauen (2013), os custos com nutrientes e carbono podem representar mais de 50% do custo final da produção de microalgas.

### **3.4. Conclusões e considerações para experimentos futuros**

A utilização do extrato ozonizado de microalgas apresentou-se como uma promissora forma de reaproveitamento dos nutrientes assimilados pelas microalgas durante o seu cultivo.

As microalgas cultivadas somente com o extrato ozonizado apresentaram massa seca final de  $0,64 \text{ g L}^{-1}$ , resultado semelhante ao cultivo com o meio BG11 suplementado com o extrato ozonizado ( $0,66 \text{ g L}^{-1}$ ) e três vezes superior ao meio BG11 sem suplementação ( $0,21 \text{ g L}^{-1}$ ).

De uma forma geral, os tratamentos em que o nitrogênio presente no meio BG11 não foi aplicado, apresentaram teores de lipídios maiores. Este fato indica que houve indução da produção de lipídios, provavelmente pela falta de nitrogênio na fase estacionária.

Outro indicador de estresse por falta de nitrogênio foram os teores de clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides totais, em que, os tratamentos com baixo teor de nitrogênio apresentaram menores teores destes pigmentos, como o caso do BG11(-N+P) que possuiu 1,95 mg L<sup>-1</sup> de clorofila *a*, contra 5,11 mg L<sup>-1</sup> obtido no tratamento BG11 (-P+E).

O custo de ozonização das microalgas para se obter um litro de lipídios, ficou em R\$ 5,75, contudo, com aumento de escala e melhorias na produtividade de lipídios, este custo caiu para R\$ 2,33.

A reutilização do extrato ozonizado de microalgas abre um grande espaço para futuras pesquisas. Testes com diferentes dosagens de extrato ozonizado devem ser realizados para buscar uma produção de biomassa e lipídios ótima.

A ozonização de outros tipos de resíduos pode ser estudada de forma a complementar e auxiliar a busca por um meio completo e de baixo custo para produção das microalgas.

### 3.5. Referências

ALLEN, M. M.; STANIER, R. Y. Growth and division of some unicellular blue-green algae. **Journal of general microbiology**, p. 199–202, 1968.

ANDRULEVICIUTE, V. et al. Biomass and oil content of *Chlorella* sp., *Haematococcus* sp., *Nannochloris* sp. and *Scenedesmus* sp. under mixotrophic growth conditions in the presence of technical glycerol. **Journal of Applied Phycology**, v. 26, n. 1, p. 83–90, 24 2013.

BERMAN, T.; CHAVA, S. Algal growth on organic compounds as nitrogen sources. **Journal of Plankton Research**, v. 21, n. 8, p. 1423–1437, 1999.

BOHUTSKYI, P. et al. Mineral and non-carbon nutrient utilization and recovery during sequential phototrophic-heterotrophic growth of lipid-rich algae. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 98, n. 11, p. 5261–73, 2014.

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.

CAI, T.; PARK, S. Y.; LI, Y. Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: Status and prospects. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 19, p. 360–369, 2013.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae beats bioethanol. **Trends in Biotechnology**, v. 26, n. 3, p. 126–131, 2008.

CLESCERL, L.S.; GREENBERG, A.E; EATON, A.D. Standard methods for the examination of water and wastewater. Denver: American Water Works Association, 1220 p. 2000.

COLLET, P. et al. Biodiesel from microalgae – Life cycle assessment and recommendations for potential improvements. **Renewable Energy**, v. 71, p. 525–533, 2014.

DAVIS, E. M.; WILCOMB, M. J. Enzymatic degradation and assimilation of condensed phosphates by green algae. **Water Research**, v. 1, n. 5, p. 335–350, 1967.

DEMIRBAS, A.; DEMIRBAS, M. F. Algae Energy: algae as a new source of biodiesel. **Green Energy and Technology**, 199 p. 2010.

DONG, B. et al. Cultivation of *Nannochloropsis salina* in municipal wastewater or digester centrate. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 103, p. 45–53, 2014.

EL-SHEEKH, M.; ABOMOHR, A. E.-F.; HANELT, D. Optimization of biomass and fatty acid productivity of *Scenedesmus obliquus* as a promising microalga for biodiesel production. **World journal of microbiology & biotechnology**, v. 29, n. 5, p. 915–22, 2013.

EUCLIDES, T. M. Seleção e otimização de meios de cultura para o cultivo de microalgas. 89f. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Programa de Pós-Graduação em Botânica, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2013.

GIRARD, M. et al. A review of the environmental pollution originating from the piggery industry and of the available mitigation technologies: towards the simultaneous biofiltration of swine slurry and methane. **Canadian Journal of Civil Engineering**, v. 9, n. 1, p. 80–92, 2014.

GODINHO, L. R. Família Scenedesmaceae (Chlorococcales, Chlorophyceae) no Estado de São Paulo: levantamento florístico. 2009. 204 f. Tese (Doutorado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente) – Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo, São Paulo. 2009.

GOUVEIA, L.; OLIVEIRA, A. C. Microalgae as a raw material for biofuels production. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 36, n. 2, p. 269–274, 2009.

GRIFFITHS, M. J. et al. Interference by pigment in the estimation of microalgal biomass concentration by optical density. **Journal of microbiological methods**, v. 85, n. 2, p. 119–23, 2011.

GUERRERO-CABRERA, L. et al. Cultivation of *Monoraphidium* sp., *Chlorella* sp. and *Scenedesmus* sp. algae in Batch culture using Nile tilapia effluent. **Bioresource technology**, v. 161, p. 455–60, 2014.

HE, S.; XUE, G.; WANG, B. Activated sludge ozonation to reduce sludge production in membrane bioreactor (MBR). **Journal of hazardous materials**, v. 135, p. 406–11, 31 2006.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION 5B: cheese and processed cheese products: determination of fat content (gravimetric method - reference method). Brussels, Belgium, 1986.

JONES, C.; MAYFIELD, S. Algae biofuels: versatility for the future of bioenergy. **Current opinion in biotechnology**, v. 23, p. 346–351, 2012.

KIM, H.-C. et al. Ozonation of piggery wastewater for enhanced removal of contaminants by *S. quadricauda* and the impact on organic characteristics. **Bioresource technology**, v. 159, p. 128–35, 2014.

MASI, A.; MELIS, A. Morphological and molecular changes in the unicellular green alga *Dunaliella salina* grown under supplemental UV-B radiation: cell characteristics and Photosystem II damage and repair properties. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, v. 1321, n. 2, p. 183–193, 1997.

MASSCHELEIN, W. J. Ozone et ozonation des eaux. **Lavoisier Tec & Doc**. 1991.

MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 1, p. 217–232, 2010.

MIN, M. et al. Cultivating *Chlorella* sp. in a pilot-scale photobioreactor using centrate wastewater for microalgae biomass production and wastewater nutrient removal. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 165, n. 1, p. 123–37, 2011.

NEILSON, A.; LARSSON, T. The utilization of organic nitrogen for growth of algae: physiological aspects. **Physiologia Plantarum**, 1980.

PANCHA, I.; CHOKSHI, K.; GEORGE, B. Nitrogen stress triggered biochemical and morphological changes in the microalgae *Scenedesmus* sp. CCNM 1077. **Bioresource**, v. 156, p. 146–154, 2014.

PITTMAN, J. K.; DEAN, A. P.; OSUNDEKO, O. The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources. **Bioresource technology**, v. 102, n. 1, p. 17–25, 2011.

SIALVE, B.; BERNET, N.; BERNARD, O. Anaerobic digestion of microalgae as a necessary step to make microalgal biodiesel sustainable. **Biotechnology Advances** v. 27, n. 4, p. 409–416, 2009.

SLADE, R.; Bauen, A. Micro-algae cultivation for biofuels: Cost, energy balance, environmental impacts and future prospects. **Biomass & Bioenergy**, v. 53, p. 29-38, 2013.

WANG, Z. T. et al. Algal lipid bodies: stress induction, purification, and biochemical characterization in wild-type and starchless *Chlamydomonas reinhardtii*. **Eukaryotic cell**, v. 8, n. 12, p. 1856–1868, 2009.

WELLBURN, A. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, Using Various Solvents with Spectrophotometers of Different Resolution. **Journal of plant physiology**, v. 144, p. 307-313, 1994.

XIN, L. et al. Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. **Bioresource technology**, v. 101, n. 14, p. 5494–500, 2010.

YANG, J. et al. Life-cycle analysis on biodiesel production from microalgae: water footprint and nutrients balance. **Bioresource technology**, v. 102, n. 1, p. 159–165, 2011.

ZIOLKOWSKA, J. R.; SIMON, L. Recent developments and prospects for algae-based fuels in the US. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 29, p. 847–853, 2014.

#### 4. CONCLUSÕES GERAIS

Este trabalho teve o objetivo de estudar o comportamento das microalgas e seus nutrientes absorvidos durante seu cultivo após a ozonização. Foi realizada uma análise do perfil espectrofotométrico durante a ozonização de *Scenedesmus obliquus* BR003 e os principais picos encontrados foram 436, 470 e 680 nm, que representam a clorofila *a* e os carotenoides.

O método estatístico de regressão linear segmentada foi utilizado para identificar o tempo ótimo de ozonização, onde foram analisados cada pico de absorção separadamente, além dos resultados de massa seca. Considerando os resultados obtidos, o tempo de ozonização ótimo foi de 34,4 minutos ( $\pm 0,81$ ) minutos.

A biomassa diminuiu consideravelmente, cerca de 60%, após 35 minutos de ozonização, demonstrando que o processo foi capaz de romper a parede celular das microalgas e oxidar parte dos compostos orgânicos.

A análise do perfil eletroforético evidenciou a ocorrência de oxidação das bandas protéicas ao longo do processo de ozonização. No tempo de 50 minutos de ozonização, não foi possível identificar nenhuma banda visível.

É possível recuperar nutrientes pela ozonização das microalgas, após a ozonização por 50 minutos, a concentração amônio, nitrato e fosfato foram 1,1, 5,7 e 1,2 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente. Mesmos com aumentos significativos a concentração final encontrada evidencia que boa parte dos nutrientes ainda se encontra na forma orgânica.

A utilização do extrato ozonizado de microalgas apresentou-se como uma promissora forma de reaproveitamento dos nutrientes absorvidos pelas microalgas durante o seu cultivo.

As microalgas cultivadas somente com o extrato ozonizado apresentaram biomassa final de 0,64 g L<sup>-1</sup>, resultado semelhante ao cultivo com o meio BG11 suplementado com o extrato ozonizado (0,66 g L<sup>-1</sup>) e três vezes superior ao meio BG11 sem suplementação (0,21 g L<sup>-1</sup>).

De uma forma geral, os tratamentos em que o nitrogênio presente no meio BG11 não foi aplicado, apresentaram teores de lipídios maiores. Este fato indica que houve indução da produção de lipídios, provavelmente pela falta de nitrogênio na fase estacionária.

Outro indicador de estresse por falta de nitrogênio foram os teores de clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides totais, em que, os tratamentos com baixo teor de nitrogênio apresentaram menores teores destes pigmentos, como o caso do BG11(-N+E) que possuiu teores de clorofila *a*, *b* e carotenoides totais de 1,95, 1,37 e 1,37 mg L<sup>-1</sup>, contra 5,11, 2,88 e 3,00 mg L<sup>-1</sup> obtido no tratamento BG11 (-P+E), respectivamente.

A ozonização das microalgas se mostrou como uma promissora alternativa na busca pela redução do uso de fertilizantes agrícolas com a possibilidade de utilização dos nutrientes por elas absorvidos durante seu cultivo. Além disso, abre-se um novo leque para que pesquisas com a ozonização de outros tipos de resíduos possam ser realizadas.

Este trabalho mostrou a viabilidade de se utilizar a biomassa de microalgas ozonizada, em novos cultivos. Esta constatação possibilita que novos estudos sejam realizados, como por exemplo, ozonizar o resíduo formado a partir da retirada do óleo e reaproveitá-lo como fonte de nutrientes em novos cultivos. É importante investigar a viabilidade deste processo em diferentes cenários, utilizando-se outras espécies de microalgas.