



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Letícia Moraes Pereira Bignon

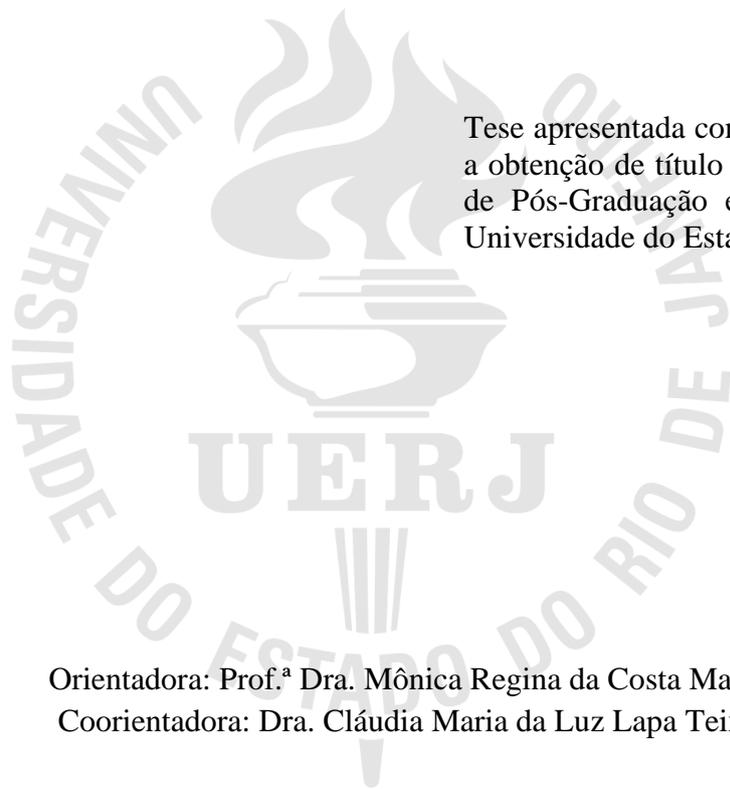
**Avaliação da produção de biomassa de microalgas em meios alternativos e
sua utilização como bioestimulante vegetal**

Rio de Janeiro
2023

Letícia Moraes Pereira Bignon

**Avaliação da produção de biomassa de microalgas em meios alternativos e sua utilização
como bioestimulante vegetal**

Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção de título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Meio Ambiente, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.



Orientadora: Prof.^a Dra. Mônica Regina da Costa Marques
Coorientadora: Dra. Cláudia Maria da Luz Lapa Teixeira

Rio de Janeiro
2023

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ / REDE SIRIUS / BIBLIOTECA CTC-A

B593 Bignon, Letícia Moraes Pereira.
Avaliação da produção de biomassa de microalgas em meios alternativos e sua utilização como bioestimulante vegetal/ Letícia Moraes Pereira Bignon. – 2023.
139 f. : il.

Orientadora: Mônica Regina da Costa Marques.
Coorientadora: Cláudia Maria da Luz Lapa Teixeira
Tese (Doutorado em Meio Ambiente) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

1. Microalgas - Teses. 2. Spirulina - Teses. 3. Estimulantes - Teses. I. Marques, Mônica Regina da Costa. II. Teixeira, Cláudia Maria da Luz Lapa. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. IV. Título.

CDU 582.26

Patricia Bello Meijinhos CRB7/5217 - Bibliotecária responsável pela elaboração da ficha catalográfica

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte

Assinatura

Data

Letícia Moraes Pereira Bignon

**Avaliação da produção de biomassa de microalgas em meios alternativos e sua utilização
como bioestimulante vegetal**

Tese apresentada, como requisito parcial para
obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-
Graduação em Meio Ambiente da Universidade do
Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 26 de junho de 2023.

Orientadores:

Prof^a. Dra. Mônica Regina da Costa Marques
Instituto de Química – UERJ

Dra. Cláudia Maria Luz Lapa Teixeira
Instituto Nacional de Tecnologia

Banca Examinadora:

Dr. Paulo Sérgio Souza
Fundação Osório – Ministério da Defesa

Prof. Dr. Antônio Carlos Augusto da Costa
Instituto de Química - UERJ

Prof. Dr. Carlos Rodrigues Pereira
Universidade Federal Fluminense

Prof. Dr. Fábio Merçon
Instituto de Química - UERJ

Rio de Janeiro

2023

AGRADECIMENTOS

À Deus, primeiramente, que me sustentou ao longo desses anos, que me deu forças, sabedoria, discernimento e capacidade de concluir esse trabalho que tanto me desafiou.

Ao meu marido, Leandro Bignon, meu companheiro de tantos anos, que foi impecável em todos os momentos de aperto, sempre me apoiando e me dando forças. Você é um exemplo para mim de dedicação, esforço e companheirismo. Te amo.

Ao meu filho, Daniel Bignon, que mesmo sem saber me deu forças para continuar. Ele nasceu no meio da pandemia e no meio do doutorado e foi a melhor coisa que poderia ter acontecido na minha vida, meu ponto de equilíbrio. Não sei descrever o tamanho do meu amor por você.

Aos meus pais, Paulo Mouzarte e Lenilce Porto, por sempre me apoiarem e acreditarem em mim, vocês são exemplos de trabalho duro e perseverança. Obrigada por todas as orações, mãe! Agradeço aos meus irmãos, Lorena e Paulo, vocês foram muito importantes para minha formação.

A minha orientadora, Prof. Dra. Mônica Marques, que mesmo com todas as minhas dificuldades em todos esses anos, nunca desistiu de mim. Sabendo sempre o momento de puxar minha orelha e de me acolher. Obrigada por tudo.

A minha coorientadora, Dra. Cláudia Teixeira, que sempre acreditou no meu projeto, sempre orientando o melhor caminho, aconselhando e cuidando para que tudo saísse da melhor forma possível. Obrigada por tudo.

As pessoas maravilhosas que marcaram a minha vida ao longo dessa jornada: Mariana, Isabela, Ana Clara, Laura, Andressa, Marina. Minha passagem pelo Labim não seria a mesma sem vocês. Um agradecimento todo especial à Alenne e Camylle. Agradeço a Deus pela vida de vocês, me constrangeram com tanto carinho, atenção e bondade na reta final.

Aos ic's que me ajudaram grandemente no Labtam (UERJ): Felipe e Rennan, vocês foram incríveis. Imensa gratidão por toda a ajuda.

A Cristiane Fernandes que chegou ao finalzinho desse trajeto mas foi essencial para me dar o gás que faltava para a conclusão. Obrigada por compartilhar experiências nessa loucura de vida acadêmica e maternidade, com certeza fez muita diferença saber que não estava sozinha nas madrugadas.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela bolsa de estudos.

RESUMO

BIGNON, Leticia Moraes Pereira. *Avaliação da produção de biomassa de microalgas em meios alternativos e sua utilização como bioestimulante vegetal*. 2023. 140 f. Tese (Doutorado em Meio Ambiente) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2023.

O cultivo de microalgas no mundo tem ganhado destaque devido ao seu potencial como fonte versátil e sustentável e biomassa, além de suas aplicações em diversos setores, como alimentação, energia, saúde e meio ambiente. A busca por cultivo desses microorganismos com baixo custo é alvo de vários estudos científicos. A utilização de águas de reúso com a finalidade de reduzir custo de produção é uma opção viável. Como foi visto neste estudo, os custos relacionados a nutrição da espécie foram reduzidos em 90% quando utilizada a água de reúso suplementada com NPK para o cultivo das microalgas. Na presente tese, foram cultivadas quatro microalgas em água de reúso com NPK: *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus ecornis*, *Spirulina platensis* e *Spirulina labyrinthiformis*. A concentração em biomassa da *Chlorella vulgaris* aumentou de 0,28 g/L (em WC) para 0,55 g/L (em água de reúso). A concentração em biomassa da *Spirulina platensis* também apresentou aumento, de 0,52 g/L (em Zarrouk) para 0,92 g/L (em água de reúso). A *Scenedesmus ecornis* apresentou uma redução na concentração em biomassa. A *Spirulina labyrinthiformis* manteve a concentração igual nos dois meios utilizados. Para um maior rendimento dos compostos foi feita extração seriadas na biomassa. A ficocianina, no caso da *Spirulina platensis* e *Spirulina labyrinthiformis*, chegou uma concentração de 98,5 % e 101,6 %, respectivamente. Não houve um aumento na produção de lipídios neutros em nenhuma das microalgas. A concentração de carotenoides variou de acordo com a espécie. Foi realizado testes ecotoxicológicos para determinar se o cultivo em água de reúso poderia causar modificações nas células ou se deixavam resquícios na biomassa a ponto de causarem toxicidade ao serem lançadas ao meio ambiente. A *Spirulina labyrinthiformis* apresentou comportamento tóxico em sementes de alface. Para testes posteriores foi escolhida a *Spirulina platensis* para ser utilizada em todos os experimentos da presente tese. Ao final da etapa das extrações dos compostos, foi realizado experimentos em incubadora com a biomassa residual da *Spirulina platensis* para avaliar o potencial bioestimulante em sementes de tomate. Foi apresentado comportamento estimulante na biomassa quando utilizada na germinação de sementes de tomate.

Palavras-chave: *Spirulina platensis*. Bioestimulante. Germinação. Água de reúso.

ABSTRACT

BIGNON, Leticia Moraes Pereira. *Avaliação da produção de biomassa de microalgas em meios alternativos e sua utilização como bioestimulante vegetal*. 2023. 140 f. Tese (Doutorado em Meio Ambiente) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2023.

The cultivation of microalgae in the world has gained prominence due to its potential as a versatile and sustainable source of biomass, in addition to its applications in various sectors, such as food, energy, health and the environment. The search for low-cost cultivation of these micro-organisms is the subject of several scientific studies. The use of reused water in order to reduce the cost of production is a viable option. In this study, costs related to species nutrition were reduced by 90% when using reuse water supplemented with NPK for microalgae cultivation. In this thesis, four microalgae were cultivated in reuse water with NPK: *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus ecornis*, *Spirulina platensis* and *Spirulina labyrinthiformis*. The biomass concentration of *Chlorella vulgaris* is increased from 0.28 g/L (in WC) to 0.55 g/L (in reuse water). The biomass concentration of *Spirulina platensis* also increased, from 0.52 g/L (in Zarrouk) to 0.92 g/L (in reuse water). *Scenedesmus ecornis* showed a reduction in biomass concentration. *Spirulina labyrinthiformis* maintained an equal concentration in the two media used. For a greater yield of the compounds, serials in the biomass were made to order. Phycocyanin, in the case of *Spirulina platensis* and *Spirulina labyrinthiformis*, reached a concentration of 98.5% and 101.6%, respectively. There was no increase in the production of neutral lipids in any of the microalgae. The concentration of carotenoids varies according to the species. Ecotoxicological tests were carried out to determine whether the cultivation in reuse water could cause changes in the cells or if it allowed residues in the biomass to the point of causing toxicity when released into the environment. *Spirulina labyrinthiformis* showed toxic behavior in lettuce seeds. For further tests, *Spirulina platensis* was chosen to be used in all experiments of this thesis. At the end of the compound extraction stage, experiments were carried out in an incubator with residual biomass of *Spirulina platensis* to evaluate the biostimulant potential in tomato seeds. Stimulating behavior was presented in the biomass when used in the germination of tomato seeds.

Keywords: *Spirulina platensis*. Biostimulant. Germination. Reuse water.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Concentração relativa a gás carbônico, bicarbonato e carbonato de sódio (%) em função do pH.....	27
Figura 2 -	Compostos produzidos pelas microalgas.....	34
Figura 3 -	Fórmula estrutural do pigmento ficocianina.....	43
Quadro 1 -	Etapas realizadas no presente trabalho.....	50
Figura 4 -	Microalgas vistas no microscópio.....	51
Figura 5 -	Cultivo da <i>Spirulina platensis</i> feito em garrafão.....	55
Figura 6 -	Esquema de produção de inóculo.....	56
Figura 7 -	Medição de radícula.....	58
Figura 8 -	Cultivo da <i>Spirulina labyrinthiformis</i> (A) e <i>Chlorella vulgaris</i> (B) em água de reúso com formações de grumos, impossibilitando acompanhamento do crescimento por densidade óptica.....	61
Quadro 2 -	Etapas dos experimentos seguidos no presente trabalho.....	66
Figura 9 -	Concentração em biomassa nas microalgas cultivadas em água de reúso e no meio controle (WC e Zarrouk).....	69
Figura 10 -	Concentração de lipídios neutros nas microalgas cultivadas em água de reúso e no meio controle (WC e Zarrouk).....	75
Figura 11 -	Concentração de carotenoides totais nas microalgas cultivadas em água de reúso e no meio controle (WC e Zarrouk).....	78
Figura 12 -	Concentração de ficocianina nas microalgas cultivadas em água de reúso e no meio controle (WC e Zarrouk).....	80
Figura 13 -	Recipientes com terra e biomassa em incubadora.....	83
Figura 14 -	Semente germinada com raiz desenvolvida da com biomassa da <i>Scenedesmus ecornis</i> em água de reúso retirando os extratos.....	86
Figura 15 -	Semente de alface germinada com raiz não desenvolvida quando utilizada a biomassa da <i>Spirulina labyrinthiformis</i>	87
Figura 16 -	Teste de toxicidade feito em laboratório.....	88
Figura 17 -	Experimento preliminar realizado em laboratório: (A) Sementes embebidas nas soluções em diferentes concentrações; (B) Sementes embebidas por 24 na solução 1; (C) Início de experimento,	

	sementes em placa Petri na incubadora.....	98
Figura 18 -	Resultados do experimento preliminar para determinação de concentração de biomassa. Percentual de germinação (%G), número de raízes laterais, energia de germinação (EG) e comprimento de radícula (CR).....	99
Figura 19 -	Comprimento das radículas (CR) das sementes de tomate germinadas.....	102
Figura 20 -	Resultados do experimento com a biomassa residual da <i>Spirulina platensis</i> : Percentual de germinação (%G), número de raízes laterais, energia de germinação (EG) e comprimento de radícula (CR).....	103

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Composição bioquímica das espécies de microalgas.....	22
Tabela 2 -	Macronutrientes e micronutrientes e suas funções biológicas.....	31
Tabela 3 -	Produtividade de espécies em diferentes águas residuais.....	33
Tabela 4 -	Produtos e Perspectivas de mercado.....	35
Tabela 5 -	Comparação entre algumas oleaginosas e as microalgas.....	37
Tabela 6 -	Condições e Perfil Lipídico.....	39
Tabela 7 -	Aplicação das Microalgas com Atividades Bioestimulantes.....	46
Tabela 8 -	Dados dos cultivos iniciais.....	53
Tabela 9 -	Condições do experimento com a <i>Spirulina platensis</i> em água de torneira com NPK.....	55
Tabela 10 -	Sequências das extrações testadas na <i>Spirulina platensis</i> e <i>Chlorella vulgaris</i>	56
Tabela 11 -	Condições testadas nas análises de toxicidade.....	58
Tabela 12 -	Sequências testadas na <i>Chlorella vulgaris</i>	67
Tabela 13 -	Sequências de extração na biomassa da <i>Spirulina platensis</i>	67
Tabela 14 -	Resultados dos cultivos feitos com as microalgas <i>Chlorella vulgaris</i> , <i>Scenedesmus ecornis</i> , <i>Spirulina platensis</i> e <i>Spirulina labyrinthiformis</i>	71
Tabela 15 -	Testes preliminares de germinação com três concentrações de biomassa.....	81
Tabela 16 -	Resultados dos testes preliminares de toxicidade com <i>Spirulina platensis</i> e <i>Chlorella vulgaris</i>	82
Tabela 17 -	Condições testadas para cada microalga.....	83
Tabela 18 -	Resultado das análises dos testes com as quatro microalgas.....	84
Tabela 19 -	Cultivo feito em garrafão da <i>Spirulina platensis</i> na condição Zarrouk e Água de torneira com NPK.....	90
Tabela 20 -	Tabela comparativa dos valores da concentração em biomassa nos cultivos da 1ª etapa do trabalho e da 3ª etapa nos cultivos com AR e AT, respectivamente.....	92

Tabela 21 -	Tabela comparativa dos valores da concentração de lipídios neutros nos cultivos da 1ª etapa do trabalho e da 3ª etapa nos cultivos com AR e AT, respectivamente.....	94
Tabela 22 -	Tabela comparativa dos valores da concentração de carotenoides totais nos cultivos da 1ª etapa do trabalho e da 3ª etapa nos cultivos com AR e AT, respectivamente.....	95
Tabela 23 -	Tabela comparativa dos valores da concentração de ficocianina nos cultivos da 1ª etapa do trabalho e da 3ª etapa nos cultivos com AR e AT, respectivamente.....	96
Tabela 24 -	Resultados dos testes preliminares com diferentes concentrações de biomassa.....	98
Tabela 25 -	Condições testadas no experimento de bioestimulante.....	100
Tabela 26 -	Resultados dos experimentos com biomassa residual de <i>Spirulina platensis</i>	101
Tabela 27 -	Cálculo do valor por litro do meio de cultivo Zarrouk e o meio alternativo com NPK.....	105

LISTA ABREVIATURAS E SIGLAS

AR	Água de reúso
AT	Água de torneira
CV	<i>Chlorella vulgaris</i>
SC	<i>Scenedesmus ecornis</i>
SP	<i>Spirulina platensis</i>
SL	<i>Spirulina labyrinthiformis</i>
CEDAE	Companhia Estadual de Águas e Esgotos do Rio de Janeiro
ETE	Estação de tratamento de esgoto
pH	Potencial hidrogeniônico
SANASA	Sociedade de Abastecimento de Água e Saneamento
%G	Percentual de germinação
EG	Energia de germinação
CR	Comprimento de radícula
RL	Raízes laterais

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	17
1	OBJETIVOS	20
1.1	Objetivo geral	20
1.2	Objetivo específico	20
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1	Microalgas	21
2.1.1	<u>Gêneros <i>Spirulina</i> e <i>Arthrospira</i></u>	22
2.1.2	<u>Gênero <i>Chlorella sp.</i></u>	23
2.1.3	<u>Gênero <i>Scenedesmus sp.</i></u>	24
2.2	Cultivo das microalgas	25
2.3	Fatores que afetam o crescimento das microalgas	26
2.3.1	<u>Temperatura</u>	26
2.3.2	<u>pH</u>	27
2.3.3	<u>Energia Luminosa</u>	28
2.3.4	<u>Nutrientes</u>	28
2.4	Tecnologias alternativas para cultivo de microalgas	31
2.5	Aplicações das microalgas	33
2.5.1	<u>Tratamento complementar de efluentes de ETE</u>	35
2.5.2	<u>Biocombustíveis</u>	36
2.5.3	<u>Biofertilizantes</u>	39
2.5.4	<u>Bioestimulante</u>	40
2.5.5	<u>Pigmentos presentes nas microalgas</u>	41
2.6	Atividade bioestimulante vegetal	44
2.7	Cultivo em água de reúso: vantagens e desvantagens	47
3	METODOLOGIA	50
3.1	Coleta da água de reúso	51
3.2	Micro-organismos	51
3.3	Meio de cultivo e condições experimentais	52
3.3.1	<u>Produtos químicos</u>	52
3.3.2	<u>Equipamentos</u>	52

3.3.3	<u>Condições experimentais: 1ª Etapa</u>	53
3.3.4	<u>Condições experimentais: 3ª Etapa</u>	54
3.4	Experimentos de extração sequencial dos bioprodutos produzidos em um conceito de biorrefinaria	56
3.5	Teste de germinação de semente em solo	57
3.5.1	<u>Índice de velocidade de germinação – IVG</u>	58
3.5.2	<u>Percentual de germinação – G (%)</u>	59
3.5.3	<u>Índice de germinação – IG (%)</u>	59
3.6	Avaliação do potencial bioestimulante	60
3.6.1	<u>Energia de germinação (EG)</u>	60
3.7	Determinações Analíticas	61
3.7.1	<u>Determinação de Massa seca</u>	61
3.7.2	<u>Lipídios Neutros</u>	62
3.7.3	<u>Pigmentos</u>	63
3.7.3.1	Ficocianina.....	63
3.7.3.2	Carotenoides totais e clorofila.....	63
3.8	Análises estatísticas	65
4	RESULTADO E DISCUSSÃO	66
4.1	Cultivo das microalgas <i>Chlorella vulgaris</i>, <i>Scenedesmus ecornis</i>, <i>Spirulina platensis</i> e <i>Spirulina labyrinthiformis</i> em água de reúso com NPK e extração seriada dos compostos: Ficocianina, lipídeos e carotenoides: 1ª Etapa	66
4.1.1	<u>Extração sequencial dos compostos em diferentes sequências</u>	66
4.1.2	<u>Produção de biomassa das microalgas em AR</u>	69
4.1.3	<u>Produção de lipídios neutros</u>	73
4.1.4	<u>Produção de carotenoides totais</u>	75
4.1.5	<u>Produção de ficocianina</u>	78
4.2	Testes de toxicidade em semente de alface (<i>Lactuca sativa</i>): 2ª Etapa	80
4.3	Cultivo em garrafão da <i>Spirulina platensis</i> e extração seriada dos compostos: 3ª Etapa	88
4.3.1	<u>Concentração em biomassa</u>	90
4.3.2	<u>Lipídios neutros</u>	93

4.3.3	<u>Produção de carotenoides totais</u>	94
4.3.4	<u>Produção ficocianina</u>	96
4.4	Teste em incubadora de potencial bioestimulante da biomassa em sementes de tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>): 4ª Etapa	97
4.4.1	<u>Teste preliminar para determinação de concentração de biomassa</u>	97
4.4.2	<u>Testes do potencial bioestimulante com a biomassa de <i>Spirulina platensis</i> em todas as condições pré-determinadas</u>	100
4.5	Custos do cultivo da <i>Spirulina platensis</i> em água de reúso	104
	CONCLUSÃO	107
	REFERÊNCIAS	108
	APÊNDICE - Gráficos dos experimentos de toxicidade feito com a biomassa das microalgas <i>Chlorella vulgaris</i> , <i>Scenedesmus ecornis</i> , <i>Spirulina platensis</i> e <i>Spirulina labyrinthiformis</i>	133
	ANEXO A - Composição do meio Zarrouk utilizado para cultivo da <i>Spirulina platensis</i> e <i>Spirulina labyrinthiformis</i>	137
	ANEXO B - Composição do meio WC utilizado para cultivo da <i>Chlorella vulgaris</i> e <i>Scenedesmus ecornis</i>	138
	ANEXO C – Caracterização do solo arenoso.....	139

INTRODUÇÃO

As microalgas são microrganismos unicelulares fotossintetizantes que podem ser encontrados em ambientes marinhos e de água doce. Vivem de forma isolada ou associada a outros organismos, como fungos e bactérias. Representam uma grande variedade de espécies que podem viver em uma ampla gama de ambientes. As microalgas precisam de três componentes principais para seu crescimento, incluindo luz solar, água e uma fonte de carbono (SIGN & PARTIDAR, 2018; RIZWAN, 2018). O termo microalga não está ligado a taxonomia de seus integrantes e, por isso, podemos incluir as cianobactérias (DERNER *et al.*, 2006).

O aumento do interesse na produção de microrganismos como as microalgas, se deve ao fato deles serem importantes em diversas cadeias tróficas, pois são produtores primários na cadeia alimentar, e na perspectiva de aplicação comercial em várias áreas como nutrição humana, alimentação animal, em cosméticos, pigmentos, biofertilizantes, isótopos bioquímicos estáveis e para a produção de antivirais, antibacterianos e antimicrobianos. As microalgas são capazes de produzir diferentes tipos de antioxidantes, carotenóides, lipídios, corantes naturais, ácido graxo poliinsaturado, peptídeo, toxina e esteróis, que são utilizados em vários produtos industriais (SUNGANYA *et al.* 2017; MORENO-GARCIA, 2016).

Devido à variabilidade na sua composição bioquímica somado ao melhoramento de tecnologia de cultivo em grande escala, as microalgas vêm ganhando espaço em diversas áreas de mercado. A *Spirulina*, por exemplo, apresenta alto teor de proteína, alta digestibilidade e seus aminoácidos essenciais equilibrados. Já a *Chlorella vulgaris* apresenta a capacidade de acumular quantidades importantes de lipídios, especialmente após a privação de nitrogênio com um perfil de ácidos graxos adequado para a produção de biodiesel (LUPATINI *et al.*, 2016; SAFI *et al.* 2014)

O cultivo de microalgas apresenta várias vantagens em comparação às culturas tradicionais e aos cultivos de outros micro-organismos em relação à ampla gama de compostos que podem ser produzidos por esses micro-organismos e com alta produtividade. Porém, em grande escala a forma de nutrição das espécies é custosa para o processo produtivo, essa etapa envolve cerca de 60% dos custos de produção de biomassa, e os custos com processos de colheita e secagem representam 20-30% dos custos de produção (BARROS, 2015). A viabilidade econômica em cultivos de grandes proporções é um desafio para determinadas aplicações da biomassa. Visando a redução de custos desta produção pode-se

pensar na utilização de águas residuárias de indústrias e estações de tratamento como fonte de nitrogênio e de fósforo (CHIU *et al.*, 2015).

O uso de águas residuais para culturas de microalgas é benéfico para minimizar o uso de água doce e produzir uma biomassa com potencial para a produção de biocombustíveis e produtos de alto valor comercial. Existem três fontes principais de águas residuais: águas residuais municipais (domésticas), agrícolas e industriais. São considerados um recurso valioso pois podem conter nutrientes necessários para a proliferação e multiplicação em massa de algas (CHINNASAMY *et al.*, 2010; GULDHE *et al.*, 2017).

Um dos compostos produzidos pelas microalgas da classe dos lipídios podem ser convertidos através de uma reação química em biodiesel. A produção de biodiesel a partir de microalgas é considerada como uma das estratégias mais eficazes para a geração de biocombustíveis pela alta produtividade em óleo comparativamente àquela alcançada pelas oleaginosas, sendo, assim, vista como uma alternativa atraente para atender às demandas atuais por combustíveis alternativos. Além disso, a substituição de combustíveis fósseis por biodiesel ou outros produtos biocombustíveis da conversão da biomassa de microalgas pode contribuir para a redução das emissões de CO₂ pela diminuição da combustão dos combustíveis fósseis (CHIU *et al.* 2015).

Outro produto de alto valor agregado é a ficocianina, uma proteína da família da ficobiliproteína caracterizada por sua intensa cor azul. Possui várias propriedades farmacológicas, tais como anticancerígena, antioxidante, antiviral e antiinflamatórias. Como resultado, a ficocianina é considerada como um agente terapêutico potente que pode proteger de uma grande variedade de doenças. Além das aplicações terapêuticas, a ficocianina também é usada como corantes naturais e marcadores fluorescentes (MANIRAFASHA, 2018). Um composto que dependendo da pureza e das variações do mercado, pode chegar ao valor de até 26 US\$.mg⁻¹ (PROZYME, 2018).

Embora haja muitos estudos mostrando o desempenho das microalgas em cultivos com águas residuais, estudos sobre a utilização desta biomassa como matéria prima para o setor da agricultura ainda são poucos (MÓGOR *et al.*, 2018). Os extratos celulares de diversas espécies de microalgas possuem fitohormônios que são conhecidos por desempenhar um papel crucial no desenvolvimento da planta (TARAKHOVSKAYA *et al.*, 2007). O uso da biomassa microalgal como bioestimulante vegetal já vem sendo estudado e é uma alternativa para aplicação na agricultura (CASTRO, 2006; DU JARDIN, 2015; MORAES, 2015b).

Os conceitos e as aplicações dos micro-organismos e técnicas utilizados nesse estudo já são bem estabelecidos, a inovação se encontra na junção de todas as técnicas pois um

problema comumente encontrado em diversos processos de produção é o não aproveitamento de todas as frações úteis e valiosas da biomassa. Diante dessa problemática, vem sendo utilizado o conceito de biorefinaria em estudos como uma forma de estimular a indústria de microalgas. A aplicação do conceito de biorefinaria viabiliza a produção de diferentes produtos partindo de uma mesma matéria prima. É um conceito que se aplica muito bem ao cultivo de microalgas, devido à variedade de produtos produzidos por esses micro-organismos (CHIA *et al*, 2018). O conceito de economia circular também foi aplicado no presente estudo, pois se opõe ao processo produtivo da economia linear, onde os resíduos são insumos para a produção de novos produtos.

O presente estudo pretende apresentar um cultivo feito em água residual com posterior extração dos compostos de interesse e aproveitando a biomassa residual da extração dos compostos como bioestimulante vegetal. A junção de todos os conhecimentos e técnicas já estudadas até hoje permitiu um aproveitamento quase que integral das frações úteis da biomassa microalgal em um mesmo cultivo.

1. OBJETIVOS

1.1 Objetivo Geral

Esse trabalho tem como objetivo avaliar a produtividade em biomassa e em bioprodutos de interesse comercial de microalgas cultivadas em água de reúso e avaliar o potencial bioestimulante da biomassa residual da extração desses bioprodutos.

1.2 Objetivos específicos

- Avaliar o crescimento das microalgas *Chorella vulgaris*, *Scenedesmus ecornis*, *Spirulina labyrinthiformis* e *Spirulina platensis* em diferentes condições de cultivo em águas de reúso;
- Avaliar a concentração dos compostos em diferentes sequencias de extração;
- Avaliar a produtividade em biomassa e nos compostos de interesse;
- Avaliar a toxicidade da biomassa das microalgas através de testes de germinação com alface (*Lactuca sativa*);
- Avaliar o potencial bioestimulante da biomassa residual pós extração em incubadora nas sementes de tomate;

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Microalgas

As microalgas compõem o grupo de microrganismos fotossintéticos, presentes tanto em ambientes marinhos como em ambientes de água doce. Devido ao fato do processo de fotossíntese se assemelhar ao das plantas, e a sua estrutura celular ser simples (sem folhas, caules ou raízes) e por achar-se em ambiente aquático, tem maior eficiência na conversão de energia solar em biomassa (GOUVEIA, 2011). Elas apresentam mais de 40.000 espécies conhecidas em diversos meios de cultura (SAFI et al., 2014). E mesmo com muitas espécies existentes, poucas cepas têm sido amplamente estudadas ao decorrer dos anos (CARDENAS, 2018). A microalga pode ser reconhecida de acordo com a cor, a forma, a textura e o tamanho da célula (NIE, 2020). Em geral, possui uma alta taxa de crescimento, o que permite uma grande produção de biomassa em pouco tempo. Os sistemas microalgais apresentam maiores produtividade do que culturas agrícolas (PULZ e GROSS, 2004).

Algumas microalgas sobrevivem em ambientes extremos (GONÇALVES, 2011): (i) com baixa luminosidade; (ii) temperaturas extremas, de climas desérticos a climas polares; (iii) ambientes hipersalinos; e (iv) meios básicos e ácidos extremos.

A composição bioquímica das microalgas é bastante diversificada, sendo composta por: carboidratos, proteínas, lipídios diversificados, incluindo ácidos graxos, carotenóides etc. Os fatores ambientais dos cultivos, o meio de cultura utilizado e a natureza das espécies são fatores que influenciam diretamente na composição bioquímica (Tabela1) (MIAO; WU, 2006; ZAMALLOA *et al.*, 2011). De acordo com Mata *et al.*, (2010) esses microrganismos podem mudar suas rotas metabólicas como respostas a mudanças do ambiente em que estão inseridos, fazem com que excretem uma variedade de compostos, incluindo inibidores de crescimento de outros microrganismos.

As microalgas são utilizadas para a produção de vários compostos a partir da sua biomassa, como carboidratos, proteínas, lipídios, ácidos graxos insaturados, pigmentos, enzimas, vitaminas, extratos para produção de fertilizantes, biocombustível, ou como biorremediador em águas residuais (CARDENAS, 2018; ARRIADA; ABREU, 2014).

As microalgas são agrupadas em diferentes classes e são diferenciadas, basicamente, pela pigmentação, estrutura celular e ciclo de vida. De acordo com Ravenet *al.*(2005), em termos de abundância, as principais linhagens de microalgas são:

- a. Diatomáceas (*Bacillariophyta*) - há cerca de 100.00 espécies e é considerada o grupo de domínio do filoplâncton dos oceanos; mas, podem ser encontradas também em ambientes de água doce. A sua parede celular apresenta sílica em sua composição e sua reserva de carboidrato é óleo ou polímeros de carboidratos.
- b. Algas verdes (*Chlorophyceae*) - formado por aproximadamente 17.000 espécies, geralmente encontradas em ambientes marinhos ou de águas doce. A reserva de energia é, na grande maioria, amido.
- c. Algas azuis (*Cyanophytas*) – são destacadas pelo seu importante papel para a biofixação de gás carbônico da atmosfera. Engloba 2.000 espécies e são encontrados em vários ambientes.

Tabela 1: Composição bioquímica das espécies de microalgas

Espécie de Microalga	Proteína (%)	Carboidrato (%)	Lipídio (%)
<i>Tetraselmis sp.</i>	14 - 58	12 - 43	8 - 33
<i>Spirulina platensis</i>	43 - 77	8 - 22	4 - 14
<i>Scenedesmus sp.</i>	31 - 56	6 - 28	8 - 21
<i>Porphyridium cruentum</i>	27 - 57	12 - 39	5 - 13
<i>Nannochloropsis sp.</i>	18 - 47	7 - 40	7 - 48
<i>Haematococcus pluvialis</i>	10 - 52	34	15 -40
<i>Dunaliella sp.</i>	27 - 57	14 - 41	6 - 22
<i>Chlorella pyrenoidas</i>	57 - 60	4 - 26	2 - 37
<i>Chlorella vulgaris</i>	38 - 53	8 - 27	5 - 28
<i>Anabaena cylindrica</i>	43 - 56	25 - 30	4 - 7
<i>Diacronema vikianum</i>	24 - 39	15 - 31	18 - 39
<i>Nitzschia sp.</i>	16,8	9,2	12,1 - 16
<i>Batryococcus braunii</i>	22	14,1	5 - 25
<i>Euglena gracilis</i>	39 - 61	14 - 18	14 - 38

Fonte: Li *et al.*, 2019, Bernaerts *et al.*, 2019

2.1.1 Os gêneros *Spirulina* e *Arthrospira*

O gênero *Spirulina* compreende cianobactérias filamentosas com alto teor de proteínas (Montenegro *et al.*, 2010). A disposição dos tricomas multicelulares cilíndricos em uma

hélice esquerda aberta ao longo do seu comprimento é a sua principal característica morfológica (TOMASELLI, 1997). As dimensões celulares, o comprimento do filamento e o grau de ondulação variam de acordo com a espécie.

O gênero *Spirulina* é filogeneticamente distinto da *Arthrospira*, mas como o habitat e a forma helicoidal são semelhantes, habituou-se a usar os dois termos para nomear essa cianobactéria filamentosa que é bastante conhecida pelas características morfológicas do gênero (SPILLER *et al.*, 2010). Em relação à nomenclatura da espécie *Arthrospira platensis* há certo equívoco, pois pesquisadores do tema ao redor do mundo utilizaram o termo *Spirulina* para denominar o gênero desses microrganismos, porém originalmente as espécies alvo de estudos pertenciam ao gênero *Arthrospira*. O termo *Spirulina* ainda aparece em trabalhos científicos por questões históricas, porém a comunidade científica reconhece que as espécies estudadas são pertencentes ao gênero *Arthrospira* (HABIB *et al.*, 2018).

São microrganismos planctônicos, que têm como habitat corpos de água tropical e subtropical definidos por alto níveis de carbonato e bicarbonato e elevado pH. Elas são identificadas nos mais diversos ambientes como águas salobras, lagoas salinas, mar e também em águas sub-árticas, lagoas tropicais e fontes de águas termais. Mostrando assim, um grande potencial de adaptação a condições ambientais extremas.

Os membros do gênero *Spirulina* são fotoautotróficos, não fixam nitrogênio atmosférico, efetuam fotossíntese aeróbia, com exceção da *Spirulina labyrinthiformis* a qual foi relatado possuir capacidade de realizar fotossíntese anoxigênica à custa de sulfuretos (CIFERRI e TIBONI, 1985).

Possuem necessidades nutricionais bastante simples e sua biomassa pode ser utilizada para a obtenção de biocompostos que podem ser aplicados em diversas áreas, entre elas: nutricionais (HENRIKSON, 1994) e saúde (AMBROSI *et al.*, 2008). Há relatos também de aplicações em tratamento de efluentes (MEZZOMO *et al.*, 2010), em produção de biocombustível (BARATA, 2006) e em processos de biossorção (TEDESCO, 2011; DAL MAGRO *et al.*, 2012).

O meio de cultura comumente utilizado para o cultivo de *Spirulina* spp. e *Arthrospira platensis* é o Zarrouk..

2.1.2 Gênero *Chlorella*

As microalgas do gênero *Chlorella* são um grande grupo de microrganismos eucarióticos, unicelulares, fotossintetizantes, largamente distribuídos em ambientes de águas doce. Pertencem ao phylum: Chlorophyta, domínio: Eukaryota, classe: Trebouxiophyceae, ordem: Chlorellales e família: Chlorellaceae. As espécies do gênero são indivíduos solitários e de vida livre. Sua forma, em geral, é esférica, elipsoidal ou ovóide, mas também pode ser reniforme ou um pouco assimétrica. O gênero é representado por habitantes, principalmente por plâncton, de sistema de águas paradas ou lóxicas (lagos ou reservatório), mas também podem ser coletadas no solo, de ambientes subaéreos (BICUDO; MENEZES, 2006).

Chlorella apresenta uma rica composição em carotenoides, como β e α caroteno, neoxantina, luteína, violaxantina e zeaxantina, que se incorporam nas lamelas dos cloroplastos. Devido à presença de pigmentos de clorofila a e b nos cloroplastos, possuem coloração verde.

Suas células são capazes de utilizar carbono de matéria orgânica dissolvida, na forma de açúcares, ácidos aminados e outras moléculas pequenas, o que possibilita os cultivos heterotrófico e mixotrófico (LOURENÇO, 2006); esta característica demonstra que ela é dotada de uma importante flexibilidade metabólica em resposta às condições ambientais.

A *Chlorella vulgaris* é uma das espécies mais usadas para a remoção de nutrientes de efluentes com resultados satisfatórios para remoção de N e P. Isso se deve ao fato dessa espécie ter uma tolerância elevada e capacidade de adaptação para cada tipo de efluentes, além de acumular nutrientes destes (PITMAN *et al.*, 2011)

Por ser um gênero com elevada taxa de crescimento, e possuir, portanto, grande potencial biotecnológico para produção industrial de biomassa (LEE, 2001), a *Chlorella vulgaris* tem sido alvo de vários estudos; além disto, produz produtos de alto interesse comercial e de alto valor agregado (PULZ e GROSS, 2004).

O meio de cultura geralmente utilizado para o cultivo da *Chlorella sp.* é o W.C.. A *Chlorella vulgaris* apresenta em sua composição vitaminas do complexo B, principalmente B12 (BHUVANA *et al.*, 2019). Além de 42 a 58% de 18 proteínas em biomassa seca, apresenta também 5 a 40% de lipídios, constituído principalmente de fosfolipídios, glicolipídios, hidrocarbonetos, ceras e ácidos graxos, que são sintetizados pelo cloroplasto (CORONADO-REYES *et al.*, 2020)

2.1.3 Gênero *Scenedesmus sp.*

O gênero *Scenedesmus* é composto por indivíduos coloniais. A colônia sempre plana é formada, em geral, por 2, 4, 8, 16 ou, mais raramente, 32 células dispostas lado a lado, com seus eixos mais longos paralelos entre si (BICUDO e MENEZES, 2006).

As espécies de *Scenedesmus* e *Chlorella* vêm sendo apontadas como eficientes no processo de fixação de CO₂ acoplado ao tratamento de águas residuais e à síntese de lipídios para a produção de biodiesel (BLERSCH et al., 2013; TANG et al., 2012). Este gênero pertence à família Scenedesmaceae, Ordem Chlorococcales, Classe Chlorophyceae e divisão Chlorophyta (LEE et al., 2008). Possui clorofila a e b, xantofilas (luteína e prasinoxantina) e os carotenóides α , β e γ . O produto fotossintético de armazenamento é o amido, que é composto de amilose e amilopectina e, ao contrário de outras algas, é formado dentro do cloroplasto (REYNOLDS, 2006).

O teor de lipídios das microalgas *Scenedesmus sp.* pode variar de 11 a 20 %, em cultivos padrões, entretanto esse teor de lipídios pode ser superior a 70%, como descreveu Matsunaga (2009) onde a microalga *Scenedesmus rubescens* apresentou conteúdo lipídico de 73,0% sem adição de nutrientes.

O meio de cultura utilizado no cultivo dessa microalga é o WC, o mesmo utilizado no cultivo da *Chlorella vulgaris*.

2.2 Cultivo de microalgas

A classificação do cultivo das microalgas pode ser feita pela tecnologia utilizada e também pela sua via metabólica que proporciona seu crescimento. O desenvolvimento das microalgas tem como base três tipos de metabolismo, cuja classificação depende do tipo de fontes de carbono e de energia utilizadas (BRENNAN & OWENDE, 2010; CHEN *et al.*, 2011):

- Autotrófico: utiliza carbono inorgânico (ex.: bicarbonato HCO₃ e CO₂) como fonte de carbono, e fonte de luz como de energia, onde a produção de energia química é realizada pela fotossíntese;
- Heterotrófico: emprega compostos orgânicos como fonte de carbono e a respiração celular para obtenção de energia;

- **Mixotrófico:** utiliza carbono orgânico e inorgânico como fonte de carbono, e luz e respiração celular como fonte de obtenção de energia, dependendo da concentração em compostos orgânicos do meio e disponibilidade de luz, respectivamente.

Há uma diferença singular entre os cultivos mixotrófico e heterotrófico no que diz respeito à fonte de energia para seu crescimento e a produção de metabolitos específicos. Dessa maneira, no cultivo heterotrófico somente se utilizam compostos orgânicos como fonte de carbono e energia, o que possibilita maior percentual de biomassa e produtividade. E nos cultivos mixotróficos a fotossíntese é a principal fonte de energia, mesmo que a presença de compostos orgânicos seja fundamental (PEREZ-GARCIA *et al.*, 2010).

2.3 Fatores que afetam o crescimento das microalgas

2.3.1 Temperatura

A temperatura do cultivo é um dos fatores ambientais que mais influenciam para a determinação da composição bioquímica desses micro-organismos (RICHMOND, 2004). Autores relatam (Nishida e Murata, 1996) que uma diminuição da temperatura de cultivo abaixo do nível indicado, de modo geral, aumenta o grau de insaturação dos sistemas de membranas lipídica das células.

A temperatura ideal para crescimento varia de espécie para espécie (RICHARD *et al.*, 1998). Segundo Lourenço (2006), as temperaturas constantes são desejáveis para o cultivo de microalgas, visto que propiciam maior constância nos experimentos, maior reprodutibilidade e previsibilidade das respostas das espécies. Em cultivos laboratoriais, para se ter o controle da temperatura é utilizada sala climatizada. Em cultivos de grande escala é grande o grau de dificuldade para o controle da temperatura; porém, em cultivos em fotobiorreatores há formas de se ter um razoável controle da temperatura, e em tanques, apesar do controle não ser tão apurado como nos fotobiorreatores, a temperatura não ultrapassa determinada faixa por conta da evaporação da água.

2.3.2 pH

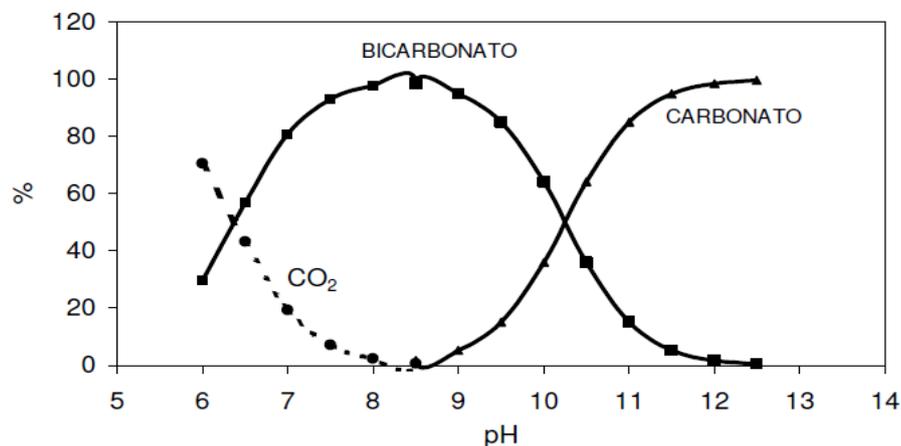
O pH é uma variável que interfere no crescimento microbiano. A variação da produção de biomassa em relação ao pH do cultivo se deve à influência deste fator na disponibilidade de nutrientes, na atividade de estruturas celulares e de suas enzimas. Em cultivos de *Spirulina*, a condição alcalina dificulta a sobrevivência de outros microrganismos que se encontram no meio, sendo um diferencial para assegurar a qualidade de um cultivo aberto em larga escala (HU, 2004), pois determinados micro-organismos não sobrevivem nessas condições.

Na figura 1, pode-se observar que em baixos valores de pH (abaixo de 6) prevalece a forma de CO_2 ; em valores de pH entre 6 e 10, domina a forma de HCO_3^- e a forma CO_3^{2-} é predominante em pH a partir de 10 e particularmente acima de 13. Portanto, basta balancear as concentrações desses íons para obter um determinado pH.

Liam *et al.* (2017) descrevem o efeito do pH do meio de cultura no crescimento da microalga *Chlorella vulgaris* e relatam que, no cultivo em efluente não esterilizado, a cepa utilizada se adaptou bem ao pH 3, uma vantagem para inibição de outros contaminantes bióticos (por exemplo, fungos) que poderia apresentar no meio de cultura de águas residuais.

O uso de tampões permite que o pH varie de forma discreta, porém pensando em sistemas de produção em larga escala o uso de tampões eleva o custo da produção. Uma forma de amenizar as variações de pH é a aeração dos cultivos, com bombeamento de ar atmosférico ou com ar enriquecido de CO_2 (LOURENÇO, 2006).

Figura 1: Concentração relativa a gás carbônico, bicarbonato e carbonato de sódio (%) em função do pH



Fonte: Sassano (2004)

2.3.3 Energia luminosa

A luz é essencial para o crescimento das microalgas, pois é por meio da fotossíntese que as microalgas fixam carbono necessário para produção de biomassa. O fornecimento de luz afeta não apenas a fotossíntese de microalgas, a composição de células e as vias metabólicas, mas também a eficiência econômica do processo de cultivo de microalgas (Blanken et al., 2013; He et al., 2015).

Vários fatores interferem na quantidade de luz absorvida pelas células, como a densidade celular, distribuição das células e pigmentação. Existem limitações no emprego de efluentes em cultivos de microalgas pois a cor e turbidez do meio podem limitar a penetração de luz e comprometer o crescimento algal (RUBIO *et al.*, 2008). Mesmo que a taxa de crescimento das microalgas em condições de luminosidade crescente seja definida como função da ação conjunta com outros fatores, há um ponto máximo de densidade de fluxo fotônico, a partir do qual pode ser observado o decaimento da taxa de crescimento, o que configura uma condição de fotoinibição.

A luz utilizada pelas algas é absorvida pelos pigmentos fotossintetizantes (unidades fotossintéticas). Esses pigmentos são classificados em três grupos: as clorofilas, os carotenóides e as ficobilinas, sendo cada uma diferente entre si pela composição química e apresentam diferentes capacidades de absorver a luz em determinado comprimento de onda (SUH & LEE, 2003).

Em cultivos fotoautotróficos, a quantidade de energia luminosa recebida pelo sistema fotossintético irá refletir na quantidade de carbono que pode ser fixado, apontando assim a produção de biomassa e a taxa de crescimento das culturas microalgais. Todavia, para algumas culturas, a elevação da concentração celular, ao longo do cultivo, gera o efeito de auto-sombreamento entre as células, reduzindo a quantidade de luz disponível para as célula (DERNER, 2006; TZOVENIS *et al.*, 2003).

2.3.4 Nutrientes

Basicamente três componentes compõem o meio de cultivo para as microalgas: macronutrientes, micronutrientes, elementos traços e vitaminas. De acordo com Sunda *et al.*

(2005), os macronutrientes são adicionados em quantidade relativamente alta, visto que sua toxicidade é baixa, e a necessidade dos mesmos para a produção da biomassa é alta. Os macronutrientes principais são carbono, nitrogênio e fósforo.

Entre os elementos traços destacam-se o ferro e o manganês, cobre, zinco, cobalto, molibdênio. Mesmo estando presente em baixas quantidades no meio, os micronutrientes têm grande importância para o crescimento porque exercem funções críticas em diversas funções metabólicas e sua falta pode ser fator limitante de crescimento. Porém, quando presentes em grandes quantidades são tóxicos (SUNDA *et al.*, 2005).

A distribuição de elementos químicos nos ambientes naturais aquáticos não é uniforme, devido às variáveis ambientais. Sendo assim, alguns elementos estão presentes em maiores concentrações, já outros podem apresentar baixas disponibilidades. Já nos meios de cultivo, é possível o controle das concentrações dos nutrientes, principalmente nos meios, de forma a fornecer as melhores condições de crescimento das células. Na tabela 3 são apresentados alguns macronutrientes e suas respectivas funções biológicas.

a) Carbono

Por ser o elemento constituinte de todas as substâncias orgânicas sintetizadas pelas células (proteínas, carboidratos, ácidos nucleicos, lipídeos, vitaminas, etc), o carbono é o elemento necessário em altas concentrações para as microalgas (LOURENÇO, 2006).

No cultivo, o carbono é considerado como macronutriente mais importante, pois constitui cerca de 50% da biomassa das microalgas. Em geral, o crescimento das células é limitado por esse composto (GROBBELAAR, 2004).

Em ambientes naturais ou em meios de culturas, o carbono inorgânico pode estar na forma de CO_2 , H_2CO_3 , HCO_3^- ou CO_3^{2-} e estes equilíbrios são diretamente dependentes do pH. Segundo Soares-Gomes e Figueiredo (2002), bicarbonato e carbonato são as formas de maior concentração nos oceanos, principalmente por conta do pH ser normalmente entre 8,2 e 8,6. As microalgas têm preferência pela forma de CO_2 , pois se difunde de forma rápida da água para o interior da célula e é diretamente usado no processo de fixação. O bicarbonato gera um gasto de energia para suportar o processo, pois é incorporado ativamente (RAVEN, 1988).

b) Nitrogênio

Após o carbono, o nitrogênio é o nutriente que tem maior contribuição para a produção de biomassa. Um comportamento típico em resposta a supressão desse nutriente é a

descoloração das células e acúmulo de alguns compostos. O nitrogênio encontra-se em uma enorme gama de substâncias biológicas importantes, como clorofila, peptídeos e proteínas, moléculas de transferências de energia (ATP e ADP), enzimas e material genético (DNA e RNA). As fontes inorgânicas desse nutriente são nitrato (NO_3), nitrito (NO_2^-), o amônio (NH_4^+) e amoníaco (NH_3) e o nitrogênio gasoso (N_2) (CAI *et al.*, 2013).

A forma de assimilação preferencial das microalgas é o amônio, pois não requer tanta energia, já que não necessita de uma reação redox. Porém, a forma que predomina no meio é nitrato que também é assimilada na ausência de amônio. Desse modo, efluentes com NH_4^+ beneficiam o crescimento de microalgas (CAI *et al.*, 2013).

Com relação aos efeitos do nitrogênio no crescimento das microalgas e na produção de lipídios, o autor relata que se o fornecimento de nitrogênio é elevado no cultivo, tem-se também uma elevada concentração de proteínas e clorofila nas células. Entretanto, quando há limitação de nitrogênio, há acumulação de compostos de carbono (produtos de reserva), como polissacarídeos e lipídios, além da redução da concentração de proteínas e de clorofila (BECKER, 2008; LOURENÇO, 2006).

c) Fósforo

O fósforo também é um nutriente essencial no metabolismo das microalgas, sendo necessário para todos os organismos e está concentrado nos ácidos nucleicos, fosfoproteínas e membranas lipídicas (PECCIA, 2013). As fontes inorgânicas mais importantes para as algas são as seguintes formas de fósforo: PO_4^{3-} ; HPO_4^{2-} , H_2PO_4^- (ALCAINE, 2010).

De acordo com Larsdotter (2006), as microalgas têm capacidade de armazenar fósforo em excesso, na forma de polifosfato, o que possibilita o crescimento na privação de fósforo. Da mesma forma à absorção do nitrogênio, a remoção do P não depende somente da absorção celular, mas de outras condições, como pH e oxigênio dissolvido. Para elevados valores de pH e oxigênio dissolvido, ocorrerá precipitação de fosfato na solução (CAI *et al.*, 2013).

Tabela 2: Macronutrientes e micronutrientes e suas funções biológicas

Componente	Funções Biológicas
Nitrogênio	Componente Estrutural de Macromoléculas
Fósforo	Realização do processo de troca energética (ATP)
Carbono	Componente estrutural de macromoléculas
Enxofre	Estruturação de proteína, como cisteína e metionina
Ferro	Participação da via de biosíntese da clorofila
Magnésio	Constituinte da Molécula de clorofila
Potássio	Regulação Osmótica

Fonte: Adaptado de Grobbelaar (2004).

2.4 Tecnologias alternativas para cultivo de microalgas

Sabe-se que o crescimento desordenado está diretamente relacionado com a escassez da água já que há uma grande concentração populacional em determinadas áreas. Como exemplo, a região sudeste representa a segunda menor área do país e é considerada a mais populosa. Mesmo que o país possua grandes reservas de água doce, a maior parte deste volume está concentrada na região norte, exatamente a menos habitada. Além disso, o crescimento das cidades, que causa a crescente impermeabilização das metrópoles agrava mais ainda esse cenário na região sudeste, já que, a água não é absorvida pelo solo de maneira adequada e com isso não há recarga dos seus aquíferos. As consequências da crise hídrica são alarmantes, uma vez que a água possui importância vital para os seres vivos e meio ambiente, além de afetar diretamente outros setores como a agricultura, pecuária, indústria e serviços, e com isso a economia (ARAUJO, SANTOS & SOUZA, 2017).

É essencial buscar alternativas que minimizem esta situação. A prática de reúso traz muitas vantagens ambientais e se apresenta como uma inteligente saída para este problema. Atualmente, o mercado brasileiro de produção de água de reúso ainda é muito recente, entretanto está ocorrendo uma crescente evolução neste assunto. De acordo com Araujo *et al* (2016) o Rio de Janeiro já faz uso desta prática nas Estações de tratamento de esgoto – ETE Alegria e Penha. Após o tratamento secundário a cloração é feita para a desinfecção de seu efluente sendo produzida água de reúso. A ETE Alegria destinou sua água de reúso na construção civil, na construção do Porto Maravilha, já a ETE Penha aplica seu efluente reusado principalmente na limpeza urbana (ARAUJO, SANTOS & SOUZA, 2017).

Existem algumas legislações estaduais e/ou municipais que abordam apenas alguns parâmetros de qualidade para a água de reúso. O principal instrumento utilizado no Brasil é a Norma Brasileira - NBR 13.969/97 (ABNT, 1997), e no item 5.6 levantam o tema com o título “Reúso Local”. No ano de 2005, o Conselho Nacional de Recursos Hídricos - CNRH instituiu a Resolução CNRH nº 54 (Brasil, 2005), que caracteriza as modalidades de reúso, porém não apresenta parâmetros de qualidade de água. A substituição da água potável por água de reúso, onde essa substituição for possível, ajuda a manter a sustentabilidade desse valioso recurso (SCHULZ & HENKES, 2013).

Nesse contexto, com a importância ambiental e econômica do reúso de águas residuais, visando à redução de consumo de água potável, o cultivo de microalgas a partir dessas águas de reúso se torna atraente, pois há geração de biomassa com potencial produção de bioprodutos de interesse comercial. O cultivo de microalgas em águas residuais tem sido reconhecido há muito tempo como uma opção viável para a produção sustentável de biomassa. O principal requisito nutricional para o crescimento de algas inclui nitrogênio (N), fósforo (P) e micronutrientes como ferro (Fe), magnésio (Mg) e cálcio (Ca) que podem estar presentes nessas águas (BATISTA *et al.*, 2014; BRENNAN E OWENDE, 2010; BROWN E SHILTON, 2014).

A maioria dos relatórios disponíveis sobre o cultivo de microalgas usando águas residuais é baseada em observações em escala de laboratório que pode não ser uma verdadeira representação do que acontece em grande escala. A natureza variável do efluente, vazão, composição de nutrientes, presença de metais pesados, interações microbianas, sólidos suspensos totais (SST) e fatores ambientais, como luz, pH e temperatura, são alguns dos desafios que podem ser encontrados em larga escala no cultivo de microalgas (CAI *et al.*, 2013). Recentemente, Lu *et al.* (2015) avaliaram a produtividade de biomassa da *Chlorella sp.* em águas residuais utilizando tanto fotobiorreatores de escala de bancada como de escala piloto ao ar livre. Os resultados mostraram um produtividade de biomassa de 260 mg.L⁻¹.d⁻¹ em cultura de escala de bancada quando comparadas com culturas de escala piloto ao ar livre, com biomassa de 110 mg.L⁻¹.d⁻¹. Estas diferenças podem ter resultado devido ao ambiente não controlado e fatores operacionais que podem ter afetado o crescimento das microalgas durante o cultivo ao ar livre. Da mesma forma, Cho *et al.* (2015) mostraram em seu estudo que os fatores mais significativos que afetaram a biomassa e a diversidade das microalgas foram as condições operacionais, tais como temperatura e carbono orgânico. Essas observações destacam a importância de um estudo de viabilidade detalhados sobre o cultivo de microalgas de águas residuais em sistemas de grande escala.

A limitação de nutrientes é um dos principais desafios para o cultivo de microalgas em águas residuais secundárias / terciárias. A suplementação de nutrientes é proposta como um método alternativo para superar as limitações de nutrientes. No entanto, a adição de nutrientes em forma química leva em custos extras para o cultivo de microalgas. Novas investigações são, portanto, necessárias para avaliar a viabilidade do uso de substratos de resíduos ricos em nutrientes baratos e métodos econômicos de pré-tratamento (SILVA *et al*, 2015; SHARMA *et al*, 2015). A estratégia de suplementação pode produzir altas produtividades de biomassa, no entanto, depende da composição de nutrientes das águas residuais usadas e dos requisitos da cepa de microalgas selecionada (ANSARI *et al*, 2017). A tabela 3 mostra alguns rendimentos de biomassa em cultivos de águas residuais.

Tabela 3: Produtividade de espécies em diferentes águas residuais

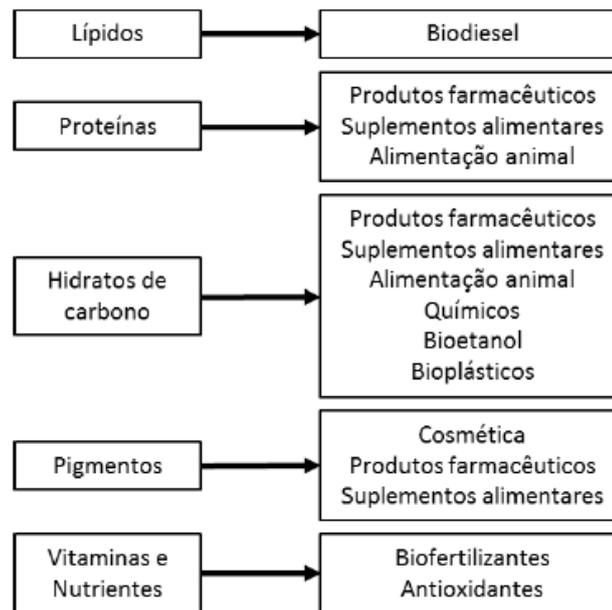
Microalga	Águas residuais	Concentração de biomassa/produtividade
<i>Chlorella sp.</i>	Água residual municipal - Tanque de decantação primário	1,58 g.L ⁻¹
<i>Chlorella sorokiniana</i>	Efluente doméstico com suplementação de Uréia	200 mg.L ⁻¹ .d ⁻¹
<i>Desmodesmus sp.</i>	Centros municipais	500 mg.L ⁻¹
<i>Chlorella vulgaris</i>	Efluente doméstico - Tratamento terciário + 12% CO ₂	197 g.L ⁻¹
<i>Nanochloropsis sp.</i>	Água residual municipal (50%) + Água do mar (50%)	212 mg.L ⁻¹ .d ⁻¹

Fonte: Modificado de Guldhe *et al.*, 2017

2.5 Aplicações das Microalgas

O aumento de interesse no estudo das microalgas se deve em grande parte na vasta gama de possibilidade de aplicação comercial (Figura 2), como saúde humana, animal, na nutrição, tratamento de água, obtenção de compostos de interesses industriais etc (GROBBELAAR, 2004; BRUNO, 2001).

Figura 2: Compostos produzidos pelas microalgas



Fonte: Adaptado de SAFI *et al.* (2014).

Uma aplicação muito comum das microalgas tem sido para a alimentação, de forma direta ou indireta, de animais. São cultivadas não somente como produtoras de biomassas, mas também algumas espécies são cultivadas por sua capacidade de sintetizar alguns compostos nutracêuticos, como ácidos graxos poli-insaturados e os pigmentos que possuem propriedades terapêuticas. Pode ser comercializado como suplemento alimentar, na forma de pó, cápsulas, extratos ou incorporada nos alimentos (DENER, 2006).

Para o uso de sua biomassa, bem como a extração de suas substâncias de interesse, é preciso um processo de separação do meio de cultivo da biomassa, o que implica, geralmente, em processos como a centrifugação ou filtração e posterior desidratação ou liofilização. E para a extração dos compostos de interesse da biomassa, em geral, são empregadas técnicas de rompimento celular por ultrassom, choque osmótico, enzimas, solvente, congelamento/descongelamento etc. seguido de alguma etapa de purificação, tais como ultrafiltração, precipitação, cromatografia etc (SILVEIRA *et al.*, 2007).

As microalgas produzem vários compostos importantes que são usados como matéria-prima para alimentos, combustíveis e outros produtos de valor agregado. No entanto, existem vários bioquímicos vitais que ainda estão por ser descobertos a partir de microalgas. As microalgas são utilizadas comercialmente como nutrição humana, alimentação animal, em produtos cosméticos, pigmentos, biofertilizantes, isótopos bioquímicos estáveis e para a síntese de drogas antimicrobianas, antivirais, antibacterianas e anticâncer. As espécies de microalgas são capazes de produzir diferentes tipos de antioxidantes, carotenoides, polímeros

enzimáticos, lipídios, corantes naturais, ácidos graxos poliinsaturados, peptídeos, toxinas e esteróis, que são utilizados em diversos produtos industriais (RIZWAN, 2018).

Alguns produtos obtidos a partir do cultivo das microalgas atualmente e suas aplicações são apresentados na tabela 4.

Tabela 4: Produtos e Perspectivas de mercado

Microalga	Produtos	Aplicação
<i>Spirulina platensis</i>	Ficocianina/Biomassa	Comida saudável/ cosméticos
<i>Chlorella vulgaris</i>	Biomassa/Ácido Ascórbico	Comida saudável/Suplementação alimentar
<i>Dunaliella salina</i>	β caroteno	Nutrição humana
<i>Haematococcus pluvialis</i>	Asxantina	Indústrias de nutracêuticos, cosméticos, alimentos e rações
<i>Cylindro spermum sp.</i>	Vitamina B ₁₂	Promoção de crescimento
<i>Porphyridium cruentum</i>	Polissacarídeos	Farmacêutica, cosmética e nutricional
<i>Isochrysis galbana</i>	Ácidos graxos	Nutrição animal

Fonte: Modificado de RIZWAN *et al*, 2018.

2.5.1 Tratamento complementar de efluentes de ETE

As microalgas podem ser usadas para o tratamento de águas residuais domésticas pois podem usar compostos orgânicos como nitrogênio e fósforo, que normalmente estão presentes nas mesmas após passar pela estação de tratamento. Além disso, microalgas podem reduzir o impacto negativo de lançamento do esgoto e águas residuais industriais que contêm resíduos nitrogenados, originários de tratamento de água. A sua utilização também pode evitar

problemas com eutrofização, removendo o azoto e o fósforo. O uso de nutrientes dos efluentes para o crescimento de microalgas vinculado ao tratamento de águas residuais tem um grande potencial, pois pode resultar na remoção de contaminantes orgânicos, produtos químicos, metais pesados e agentes patogênicos e produção de biocombustíveis (MATA *et al.*, 2010; ASLAN & KAPLAN, 2006).

Muitas espécies de microalgas são capazes de crescer em uma ampla variedade de águas residuais, como esgoto, escoamento agrícola e efluentes industriais, e têm provado ser eficientes na remoção de nitrogênio, fósforo e outros poluentes. Espécies de *Chlorella*, *Scenedesmus* e *Spirulina* são as espécies de microalgas mais amplamente utilizadas para a remoção de nutrientes (CAPORGNO *et al.*, 2015; CHINNASAMY *et al.*, 2010).

A microalga *Scenedesmus obliquus* foi estudada por Martínez *et al.* (2000) para remoção de nitrogênio e fósforo no efluente de tratamento terciário de esgoto e obteve-se uma remoção de 100% de amônia e 98% de fósforo. De acordo com Aslan e Kapdan (2006), *Chlorella vulgaris* tem uma remoção média de 72% para nitrogênio. Segundo Li *et al.* (2011), em experimentos de cultivo de *Chlorella* sp. em esgoto filtrado foi relatada a remoção de 93% de amônia, 89,1% de nitrogênio total, 80,1% de fósforo total.

Microalgas podem remover com sucesso metais pesados e poluentes das águas residuais. No entanto, durante o cultivo heterotrófico de microalgas, as bactérias podem crescer devido à sua alta taxa de crescimento. Para superar este problema, algas e bactérias podem ser combinadas para formar consórcios que podem ser utilizados para águas residuais. A biomassa de microalgas que é produzida em cultivos de águas residuais não é utilizado como alimento humano. No entanto, ele pode ser usado para produção de produtos químicos de alto valor (MUNOZ & GUIEYSSE, 2006; RIZWAN *et al.*, 2018).

Ramsundar *et al.* (2017) descreveram que a microalga *Chlorella sorokiniana* obteve remoção de 94,29% de NH_4 (concentração inicial de 35 mg.L^{-1}) e de 83,3% de PO_4 (concentração inicial de 24 mg.L^{-1}) em efluentes. *Chlorella pyrenoidosa* foi descrita por Yang *et al.* (2015) na remoção de N e F, com eficiência de 91,64% e 90,74%, respectivamente.

2.5.2 Biocombustíveis

O conceito de produção de energia partindo de microalgas provém da década de 1950 com a produção de metano, sendo sugerido na mesma época a utilização de esgoto como um

meio de crescimento alternativo (SHEERAN *et al.*, 1998). Porém, a produção em grande escala foi iniciada em 1960, no Japão, e durante a primeira crise do petróleo aumentou-se o interesse para o seu uso em geração de energia (MATA; MARTINS; CAETANO, 2010). Nos Estados Unidos, durante esse período, foram desenvolvidos programas específicos, os quais utilizaram espécies aquáticas para o estudo de combustíveis renováveis (SHEERAN *et al.*, 1998).

As microalgas possuem altas taxas de crescimento e produtividades quando são comparadas aos vegetais, plantas aquáticas e grãos, e necessita de área de produção bem menor que outras fontes de matéria prima para produção de bicomustíveis originadas da agricultura. Podem ser usadas como matéria-prima para diversos biocombustíveis como etanol, biodiesel, metano, hidrogênio, entre outros, os quais apresentam reduzida emissão de material particulado, monóxido de carbono e óxidos de enxofre quando queimados (MATA; MARTINS; CAETANO, 2010). A tabela 5 apresenta um comparativo do potencial de produção de biodiesel com origem em diferentes matérias-primas, entre elas, as microalgas.

Tabela 5: Comparação entre algumas oleaginosas e as microalgas

Fonte	Conteúdo de óleo/massa seca de biomassa (%)	Rendimento (L de óleo ha ⁻¹ ano ⁻¹)	Área necessária (m ² kg ⁻¹ de biodiesel)	Produtividade (kg biodiesel ha ⁻¹ ano ⁻¹)
Milho (<i>Zea mays</i> L.)	44	172	66	152
Soja (<i>Glycine Max</i> L.)	18	636	18	562
Canola (<i>Brassica napus</i> L.)	41	974	12	862
Girassol (<i>Helianthus annuus</i> L.)	40	1070	11	946
Microalgas	30 - 70	58700 - 136900	0,2 - 0,1	51927 - 121104

Fonte: Adaptado de MATA; MARTINS; CAETANO, 2010

As microalgas, assim como qualquer outra fonte de matéria prima energética, apresentam vantagens e desvantagens (BECKER, 1994; CHISTI, 2007). Algumas vantagens são listadas a seguir:

- Produção ao longo de todo ano;
- Não há competição com culturas alimentares;
- Permite a utilização de águas impróprias para consumo e agricultura;

- Permite o aproveitamento de nutrientes que podem ser obtidos de efluentes domésticos e industriais, e de CO₂ residual;
- Permite a utilização de terrenos marginais.

Algumas desvantagens são citadas abaixo:

- Pequena dimensão celular o que implica em elevado custo na colheita;
- Baixo rendimento em sistemas abertos de cultivo;
- Possibilidade de fotoinibição e evaporação do meio quando exposto ao ar livre.

As microalgas são uma excelente fonte de lipídios devido ao fato de seu conteúdo em óleo poder passar de 80% do seu peso total (peso seco), mesmo que o mais comum seja atingir os níveis de 20 a 50% (CHISTI, 2007). O teor de lipídio pode ser alterado caso haja modificação nas condições de cultura, como redução da concentração dos elementos químicos necessários para o crescimento e divisão celular (nitrogênio, fósforo, silício). De acordo com Illman *et al.* (2000), o teor de lipídios pode aumentar em até duas vezes. Feng *et al.* (2012) relataram testes com manipulação de N e P na *Chlorella zofingiensis*, e os resultados de teor lipídico com deficiência de P, atingiu um percentual de aumento de 44,7%.

Os lipídios de microalgas apresentam ainda potencialidade na indústria petroquímica, pois há possibilidade de utilização dos ácidos graxos para produção de biodiesel. A produção comercial de biodiesel se dá através de uma transesterificação alcalina de triacilglicerídeos (TAGs) encontrados em culturas de sementes oleaginosas ou, no caso das microalgas, a fração lipídica extraída das células (BRENNAN & OWENDE, 2010).

Por possuírem maior eficiência fotossintética (entre 4 a 7%), a produtividade em biomassa e em óleo das microalgas é maior quando se compara às oleaginosas. Por exemplo, a produtividade em óleo de microalgas pode ser cerca de trinta vezes maior que a de palma (maior produtividade dentre as oleaginosas) e cerca de dezenove vezes superior que a de soja (principal matéria-prima utilizada para a produção de biodiesel no Brasil) (COUTINHO & BOMTEMPO, 2011; FRANCO *et al.*, 2012).

A produtividade em biomassa microalgal e o acúmulo de lipídios podem ser manipulados por variações nas condições de crescimento. Dentre os fatores nutricionais e ambientais que podem alterar as condições de crescimento destacam-se: os nutrientes; pH; intensidade de luz; temperatura; e aeração. Logo, estudos que apresentam como estratégias de cultivo alterações

no metabolismo de microalgas apresentam um potencial para aumentar a produtividade em biomassa e em lipídios, além de alterar o perfil dos óleos produzidos (Tabela 6) (CONVERTI et al., 2009).

Tabela 6: Condições e Perfil Lipídico

Condições de Cultivo	Efeito no conteúdo e perfil lipídico
Baixa concentração de nitrogênio	Aumenta conteúdo lipídico
Baixa concentração de fósforo	Aumenta conteúdo lipídico
Alta intensidade luminosa	Aumenta quantidade de ácidos graxos
Baixa temperatura	Aumenta quantidade de ácidos graxos insaturados
Alta concentração de CO ₂	Aumenta quantidade de ácidos graxos insaturados

Fonte: Modificado BEHRENS & KYLE, 1996.

2.5.3 Biofertilizantes

A agricultura mundial mantém-se em constante expansão, sendo um dos maiores desafios o desenvolvimento de novos sistemas sustentável e ambientalmente correto (POVERO et al., 2016). A sociedade enfrenta um desafio não apenas para aumentar a produção agrícola em meio às mudanças climáticas globais, que ameaçam diminuir as colheitas em muitas áreas do mundo, mas também para desenvolver tecnologias inovadoras que aumentem a produção agrícola, minimizem os insumos e impeçam mais poluição ambiental (TILMAN *et al.*, 2002; FOLEY *et al.*, 2011). O uso excessivo de agroquímicos sintéticos resultou em degradação ecológica maciça em todo o mundo, levando a às zonas mortas oceânicas, eutrofização, infertilidade do solo e perda da biodiversidade (CHAGNON *et al.*, 2014; HALLMANN *et al.*, 2014). Os biofertilizantes são considerados uma alternativa ambientalmente correta, econômica e sustentável aos fertilizantes sintéticos, pois eles não apenas melhoram a produção agrícola, mas também também diminuem a poluição ambiental (KAWALEKAR, 2013).

Quando comparada ao fertilizante químico, a biomassa microalgal pode proporcionar uma concentração de cálcio 3 vezes maior e de ferro 2 vezes maior para as culturas, além de conceder zinco e manganês que são micronutrientes essenciais para o melhor desenvolvimento das plantas (Wuang et al., 2016). Os biofertilizantes são produtos que contêm microrganismos vivos ou compostos naturais derivados de organismos como

bactérias, fungos e algas que melhoram as propriedades químicas e biológicas do solo, estimulam o crescimento das plantas e restauram a fertilidade do solo (ABDEL-RAOUF *et al.*, 2012).

A biomassa de *Scenedesmus dimorphus* foi utilizada por Garcia-Gonzalez e Sommerfeld (2015) e seu uso demonstrou influências positivas no crescimento e desenvolvimento de cultivo de mudas de tomate. Os autores obtiveram resultados significativos na quantidade de ramos, flores e números de frutos em comparação aos demais tratamentos, o que levou ao final da avaliação em um aumento da massa total das plantas. Os mesmos autores acreditam que há um mercado inexplorado para aplicação de microalgas e seus subprodutos como agroquímicos.

2.5.4 Bioestimulantes

Nos últimos anos tem sido constatado um aumento do interesse em substâncias bioestimulantes naturais na agricultura, em razão do grande desafio de equilibrar o desenvolvimento tecnológico com a conservação ambiental, além da necessidade de aprimorar a produtividade e qualidade das culturas e produtos derivados (MÓGOR *et al.*, 2017, NAVARRO-LÓPEZ *et al.*, 2020; CRAIGIE, 2011).

Não há uma definição científica única sobre o conceito de bioestimulante vegetal, apesar de a maioria dos autores o descreverem como uma substância ou um conjunto de substâncias, que não pesticidas e nutrientes, que melhoram o desenvolvimento da planta, a absorção de nutrientes e o meio de crescimento onde ela se encontra, resultando em uma série de benefícios para seu crescimento (DU JARDIN, 2012; BIOSTIMULANTS COALITION, 2014).

Na Europa, o Conselho Europeu da Indústria de Bioestimulante estabelece os bioestimulantes vegetais como produtos que possuem substâncias e/ou micro-organismos que ao aplicadas às plantas ou à rizosfera, podem estimular processos naturais para melhorar a absorção de nutrientes, a capacidade nutricional, a tolerância a estresses abióticos, e a qualidade do cultivo (EUROPEAN BIOSTIMULANTS INDUSTRY COUNCIL (EBIC), 2015).

Nos Estados Unidos, os bioestimulantes vegetais são definidos como substâncias e/ou micro-organismos, que ao serem aplicados em quantidades moderada podem melhorar o

crescimento e desenvolvimento da planta, a eficiência de absorção de nutrientes ou a redução das perdas de nutrientes para o meio, bem como aumentar a resposta da planta melhorando a estrutura do solo, função ou desempenho (BIOSTIMULANTS COALITION, 2017).

Lançado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), em maio de 2020, o Programa Nacional de Bioinsumos (PNB) traz o conceito de bioestimulante como:

“produto que contém substância natural com diferentes composições, concentrações e proporções, que pode ser aplicado diretamente nas plantas, nas sementes e no solo, com a finalidade de incrementar a produção, melhorar a qualidade de sementes, estimular o desenvolvimento radicular, favorecer o equilíbrio hormonal da planta e a germinação mais rápida e uniforme, interferir no desenvolvimento vegetal, estimular a divisão, a diferenciação e o alongamento celular, incluídos os processos e as tecnologias derivados do bioestimulante;”

Os bioestimulantes são aplicados diretamente nas plantas (folhas ou frutos) ou em sementes, e possuem capacidade de proporcionar ou modificar os processos morfológicos e fisiológicos com intuito de aumentar a produtividade dos cultivos em diferentes estágios (CASTRO, 2006; DU JARDIN, 2015; MORAES, 2015b). O uso de bioestimulantes produz uma maior tolerância aos estresses bióticos e abióticos nas plantas, amplia a biodisponibilidade de nutrientes e minerais, resistência a patógenos, maior crescimento das raízes e brotos, melhorando o crescimento, qualidade e produtividade da planta (CALVO; NELSON; KLOPPER, 2014; SCAGLIA; POGNANI; ADANI, 2017). Esses resultados estão relacionados à capacidade desses compostos em influenciar a atividade hormonal nas plantas (CATO, 2006)

Alguns estudos que avaliaram o potencial do uso de microalgas, cultivada em águas residuárias, como substâncias com ação biofertilizante e bioestimulante alcançaram resultados positivos na taxa de crescimento de plantas além da troca bem-sucedida de fertilizantes sintéticos (DAS *et al.*, 2019; RENUKA *et al.*, 2016; SILVA *et al.*, 2019; SULEIMAN *et al.*, 2020). Algumas substâncias produzidas pelas microalgas são capazes de produzir crescimento e desenvolvimento vegetal, como citocininas e poliaminas. Efeitos fisiológicos das poliaminas são citados por Leite *et al.*(2012) que descrevem sua atuação no crescimento das plantas, floração, desenvolvimento e amadurecimento dos frutos, envelhecimento das folhas e resposta ao stress.

2.5.5 Pigmentos presentes nas microalgas

A importância dos corantes naturais vem crescendo cada vez mais, especialmente em alimentos e cosméticos, o que acarreta uma grande demanda de fontes naturais de corantes. As cianobactérias e outras algas possuem um amplo espectro de componentes pigmentados, o que incluem os carotenóides, ficobiliproteínas e as clorofilas. (BECKER, 2007; SARADA *et al.*, 1999).

De acordo com Taiz e Reiger (2013) todos os organismos que realizam fotossíntese possuem pigmentos, como as clorofilas (pigmento verde) e carotenoides (pigmentos amarelos ou vermelhos). Todas as clorofilas possuem uma complexa estrutura em anel, como uma longa cauda de hidrocarbonetos ligada a esta estrutura em anel e com uma molécula de magnésio (Mg^{2+}) no centro. Já os carotenóides são moléculas lineares com múltiplas cadeias duplas conjugadas, encontrados em todos os organismos fotossintéticos. São constituintes das membranas dos tilacóides.

- Carotenóides

Podem ser divididos em dois grupos principais: os carotenos, que são pigmentos livres de oxigênio em suas cadeias hidrocarbônicas, e as xantofilas, que são seus derivados oxigenados. Mesmo sendo descritos mais de 400 carotenóides, apenas alguns poucos são utilizados comercialmente: β -caroteno (pigmento amarelo), astaxantina e, menos frequente, a luteína, zeaxantina e licopeno. São aplicados geralmente como corante de alimentos, cosméticos ou alimentação animal. Suas propriedades nutricionais e relevância terapêutica relacionam-se com a ação pró-vitamina A e outras propriedades particulares, como a ação antioxidante (BECKER, 1994; SPOLAORE *et al.*, 2006; GRAHAM e WILCOX, 2000; DUFOSSÉ *et al.*, 2005).

Segundo os mesmos autores, a microalga *Dunaliella salina* é o micro-organismo mais usado para a produção de β -caroteno, já que essa molécula pode representar mais de 14% do seu peso seco, por ser altamente protéica e também apresentar boa quantidade de ácidos graxos essenciais, podendo ser utilizada com segurança graças ao seu padrão alimentício (GRAS). Já a astaxantina, produzida por *Hematococcus pluvialis* é consumida em grande parte pela indústria produtora de ração para salmão.

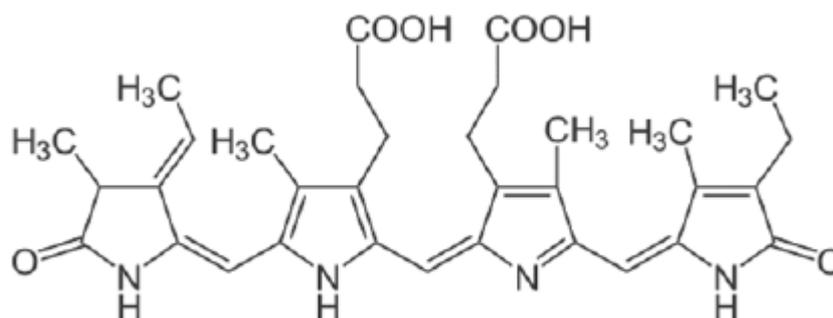
- Ficobiliproteínas

Ficobiliproteínas são as proteínas mais abundantes em muitas cianobactérias e algas. No entanto, foi postulado que não são essenciais para a função celular pois são degradadas quando há privação de nitrogênio. Portanto, são considerados como fonte de armazenamento de nitrogênio (SLOTH, WIEBE, & ERIKSEN, 2006).

Sendo um composto de armazenamento de nitrogênio, a síntese de ficobilinas é dependente da fase do perfil de crescimento celular. Verificou-se que o conteúdo de ficobiliproteínas das células nas cianobactérias aumenta ao longo do período de crescimento das células. Kenekar e Deodhar (2013) observaram a fase estacionária inicial (15 dias) como o momento certo para a colheita da biomassa de *Geitlerinema sulphureum* para o rendimento máximo de ficobiliproteínas. Além disso, diferentes variáveis ambientais, como a disponibilidade de nutrientes, a intensidade da luz, o comprimento de onda da luz e a temperatura, podem influenciar o conteúdo e a composição das células de cianobactérias (HEMALATA E FATMA, 2009). Esses sinais de estresse têm papel significativo em influenciar síntese de ficobiliproteínas fisiologicamente importantes (SINGH *et al.*, 2012).

As ficobiliproteínas são solúveis em água; eles têm cores brilhantes e são altamente fluorescente. Elas também possuem características qualitativas e quantitativas singulares, o que inclui um amplo espectro de absorção de luz visível e alto coeficiente de absorção (CHATTOPADHYAY *et al.*, 2012).

Figura 3: Fórmula estrutural do pigmento ficocianina



Fonte: Modificado SPOLAORE (2006)

As microalgas mais utilizadas na produção comercial das ficobiliproteínas como a ficocianina (PC) e a ficoeritrina são, respectivamente, a cianobactéria *Spirulina* e a rodófito *Porphyridium*. Além do potencial como corantes naturais, estudos vêm demonstrando que

essas moléculas possuem propriedades benéficas à saúde e uma vasta aplicação farmacêutica. (BECKER, 1994; GRAHAM e WILCOX, 2000; ERIKSEN, 2008-a).

A ficocianina (PC) é um importante produto de valor agregado que tem sido amplamente utilizado para o benefício da humanidade. É solúvel em água, fortemente fluorescente e tem propriedades antioxidantes. São utilizadas em diversas aplicações em alimentos e cosméticos, biotecnologia (sondas fluorescentes), diagnósticos e medicamentos, por causa de sua ação antioxidante, antiinflamatória, antiviral, anticâncer, redutora do colesterol e neuroprotetora e propriedades hepatoprotetoras (RODRÍGUEZ-SÁNCHEZ *et al.*, 2012; SPOLAORE *et al.*, 2006). Os potenciais benefícios para a saúde da ficocianina podem ser devido à sua semelhança com as propriedades químicas do antioxidante natural, a bilirrubina (GANTARA *et al.*, 2012).

A ficocianina pode ser extraída das cianobactérias e microalgas por diferentes procedimentos, que combinam o rompimento das paredes celulares com a extração das ficobiliproteínas num meio aquoso. Para biomassa úmida, a ficocianina pode ser extraída através de ciclos de congelamento (entre -25°C e -15°C) e descongelamento (entre 4 e 30°C). Outros processos, como rompimento mecânico das células, sonicação, tratamento enzimático, uso de solventes, também são relatados por diferentes autores, porém, a melhor eficiência foi obtida através dos ciclos de congelamento/descongelamento (ERIKSEN, 2008-b; SILVA, 2008; SILVEIRA, 2007; MANIRAFASHA *et AL.*, 2016).

O grau de pureza da ficocianina é obtido pela razão entre a absorbância de uma amostra do pigmento a 615 nm (A615) e a 280 nm (A280). As amostras de ficocianina com uma razão A615/A280 maior que 0,7 são consideradas de grau alimentício. As amostras com a razão A615/A280 de 3,9 são consideradas de grau reativo, enquanto valores superiores a 4,0 são consideradas de grau analítico (ERIKSEN, 2008-b; SILVA, 2008; e SILVEIRA, 2007; MANIRAFASHA *et AL.*, 2018).

2.6 Atividade Bioestimulante Vegetal

Entre as várias aplicações associadas às microalgas, a utilização para a produção de biofertilizantes também deve ser considerada, pois não somente os lipídeos, mas algumas outras biomoléculas também podem ser produzidas pelo seu metabolismo, sendo estas as proteínas, os aminoácidos, os carboidratos e até mesmo os fitohormônios, tais como auxinas,

citocininas e poliaminas (BECKER, 2007; TARAKHOVSKAYA et al., 2007; JOHN et al., 2011; RAZEGHIFARD, 2013).

Alguns estudos com extratos derivados de espécies de microalgas mostraram um efeito positivo no desenvolvimento de plantas (Tabela 7). Os efeitos bioestimulantes foram associados a provável ação de fitormônios presentes nesses extratos de microalgas (STIRK et al., 2002; JÄGER et al., 2010; HUSSAIN; HASNAIN, 2011).

Fitormônios são moléculas orgânicas, não nutrientes, encontrados de forma natural em todos os estágios de desenvolvimento das plantas, são produzidos e transportados em diferentes locais nas plantas, estão presentes em concentrações muito baixas, aproximadamente picogramas por grama de biomassa seca (TARKOWAKÁ et al., 2014), e são responsáveis pelos processos fisiológicos e morfológicos em plantas (VOB et al., 2014). As principais classes de fitormônios são constituídos por: auxinas (AIA), citocininas (CKs), giberelinas (GAs), ácido abscísico (ABA) e etileno (ET), e mais recentemente, ácido jasmônico (AJ), brassinosteróides (BRs), ácido salicílico (AS) e estrigolactona (SL) (TARKOWAKÁ et al., 2014; WANI et al., 2016).

As citocininas estão ligadas a praticamente todos os processos de crescimento e desenvolvimento das plantas, sendo o agente causador da divisão e diferenciação celular, formação de raízes e brotos, e senescência de folhas, sendo a zeatina a citocinina em maior quantidade (SAKAKIBARA, 2006; WERNER; SCHMÜLLING, 2009). As auxinas estão compreendidas nos processos de crescimento e desenvolvimento das plantas. O ácido indol acético (AIA) é a forma mais dominante de auxina e é responsável pela expansão, divisão, alongamento e diferenciação celular, e tem papel considerável no desenvolvimento de plantas sob condições de estresse (TEALE *et al.*, 2006; NAPIER, 2017). O ácido abscísico (ABA) tem relação com as respostas de estresse biótico e abiótico das plantas, atua no desenvolvimento do embrião, maturação, dormência e germinação das sementes e fechamento dos estômatos (TARKOWAKÁ et al., 2014). As giberelinas são responsáveis pela expansão foliar, alongamento do caule, floração e desenvolvimento do fruto (YAMAGUCHI, 2008).

Vários estudos já relataram a presença e ação das classes de fitormônios endógenos em microalgas. Mesmo que os processos de biossíntese deles em plantas já estejam bastante descritos na literatura (SANTNER; VILLALOBOS; ESTELLE, 2009), em microalgas, seu papel fisiológico e efeitos endógenos ainda não são bem estabelecidos, e suas vias metabólicas não são conhecidas (TARAKHOVSKAYA; MASLOV; SHISHOVA, 2007; BAJGUZ, 2009a; STIRK et al., 2011; LU et al., 2014; LU; XU, 2015).

Alguns estudos mostram que extratos de microalgas levaram ao melhoramento de algumas culturas, algumas com ações similares de fitohormônios produzidos pelas plantas (STIRK *et al.*, 2002). Oliveira *et al.* (2013) utilizaram a *Spirulina sp.* na cultura de beterraba e observaram que a massa seca e fresca do hipocótilo e o diâmetro de expansão apresentaram diferenças significativas em experimentos com determinada concentração (1,5 g/L) de microalgas quando comparadas ao controle. Garcia-Gonzalez e Sommerfield (2014) utilizaram a microalga *Scenedesmus dimorphus* e verificaram que ao aplicarem o substrato na cultura de tomate pôde se observar que ganhos no crescimento e desenvolvimento do cultivo de mudas.

Estes resultados mostram que as microalgas possuem um potencial de produção de moléculas bioativas, como proteínas e carboidratos (DERNER *et al.*, 2006), contribuindo para o crescimento e desenvolvimento vegetal (PIJAL, 2009).

Tabela 7: Aplicação das Microalgas com Atividades Bioestimulantes

PLANTA	MICROALGA	EFEITO	REFERÊNCIA
Pepino	<i>Chlorella sp.</i> ; <i>Scenedesmus quadricauda</i> ; <i>Chlamydomonas sp.</i>	Aumento do número de raízes e peso dos cotilédones de pepino	STIRK <i>et al.</i> , 2002
Milho Pepino	<i>klebsormidium sp.</i> <i>Neochloris sp.</i>	Aumento nas anteras de milho; Aumento número de raízes e peso dos cotilédones de pepino	JAGER <i>et al.</i> , 2010
Trigo	<i>Scenedesmus sp.</i>	Aumento do peso seco e maior absorção de macronutrientes nas plantas	SHAABAN <i>et al.</i> , 2010
Trigo	<i>Chroococciopsis sp.</i>	Maior altura da parte aérea da planta, aumento no comprimento das espigas, aumento do peso seco e número de grãos de trigo	HUSSAIN & HASNAIN, 2011
Tomate	<i>Desmodesmus subspicatus</i>	Aumento do comprimento e volume dos hipocótilos	MAZEPA, 2013
Trigo Milho	<i>Spirulina máxima</i>	Maior aceleração da germinação das sementes e produtividade em plantas adultas	MORAES, 2015a
Tomate Pimenta	<i>Spirulina platensis</i>	Aumento no tamanho das plantas, maior densidade nas raízes	ELARROUSSI <i>et al.</i> , 2016
Tomate	<i>Acutodesmus dimorphus</i>	Germinação mais rápida, maior crescimento das plantas, aumento no número de frutos	GONZALEZ & SOMMERFELD, 2015

2.7 Cultivo em água de reúso: vantagens e desvantagens

A utilização da água de reúso no Brasil tem aumentado gradualmente nos últimos anos, impulsionada pela necessidade de conservação dos recursos hídricos e pela busca por soluções sustentáveis para suprir a demanda crescente por água. No entanto ainda existem desafios e limitações em relação a sua implementação em larga escala.

O Brasil possui uma legislação específica para uso de água de reúso, que é regulamentada principalmente pela Resolução nº54/2005 do Conselho Nacional de Recursos Hídricos. Essa resolução estabelece diretrizes para a qualidade da água de reúso e define padrões a serem seguidos para diferentes usos, como irrigação de cultura, recarga de aquíferos e usos industriais.

A agricultura é o setor que mais utiliza água de reúso no Brasil, principalmente para a irrigação de culturas. Grandes empreendimentos industriais também têm adotado o reúso de água em seus processos produtivos, buscando reduzir o consumo de água potável. Apesar do crescimento na utilização dessas águas, ainda existem desafios a serem enfrentados. Alguns dos principais obstáculos incluem a falta de infraestrutura adequada para o tratamento e distribuição de água de reúso, a necessidade de investimentos em tecnologias de tratamento mais avançadas e a conscientização e aceitação pública em relação ao uso dessas águas.

Diversas iniciativas têm sido desenvolvidas no país para promover o uso dessas águas. Algumas cidades, como São Paulo e Campinas, implementaram programa de reúso de água em maior escala, visando reduzir a demanda por água potável, uma parceria entre a SANASA e a AEGEA visa explorar o mercado de água de reúso para fins industriais. Além disso, empresas de diferentes setores têm adotado práticas de reúso em suas operações, visando sustentabilidade e redução de custo. O Brasil possui um imenso potencial para utilização de água de reúso devido a disponibilidade de água residual gerada por atividades domésticas, industriais e agrícolas. Com investimento em infraestrutura, tecnologia de tratamento e conscientização, é possível aumentar consideravelmente o uso da água de reúso no Brasil, contribuindo para a conservação dos recursos hídricos e sustentabilidade.

O cultivo em água de reúso para o cultivo de microalgas pode trazer diversos benefícios:

- Conservação de recursos hídricos: O uso da água de reúso reduz a demanda por água potável, preservando os recursos naturais. Isso é especialmente importante em regiões

com escassez de água, onde a reutilização pode ajudar a aliviar a pressão sobre os suprimentos de água doce;

- **Redução de desperdício:** Ao reutilizar a água para o cultivo de microalgas, evita-se o desperdício de água que de outra forma seria descartada. Isso contribui para a conservação dos recursos naturais e promove o uso sustentável da água;
- **Benefícios econômicos:** A utilização de água de reúso pode reduzir os custos associados ao fornecimento de água potável. Isso é particularmente relevante para setores que demandam grandes volumes de água, como agricultura ou alimentos a base de microalgas. A redução nos custos de produção pode resultar em preços mais acessíveis para os consumidores finais.
- **Geração de empregos:** A implantação de sistemas de reúso de água requer investimentos em infraestrutura, tecnologia e manutenção, o que pode criar empregos direto e indiretos. Isso impulsiona a economia local e promove o desenvolvimento socioeconômico;
- **Sustentabilidade ambiental:** Ao utilizar água de reúso reduz-se a descarga de efluentes e poluentes nos corpos de água naturais. Isso auxilia a preservar a qualidade da água e a proteger os ecossistemas aquáticos, contribuindo para a sustentabilidade ambiental a longo prazo;
- **Pesquisa e inovação:** A adoção de práticas de reúso de água para o cultivo de microalgas impulsiona a pesquisa e a inovação nessa área. Isso pode levar ao desenvolvimento de tecnologias mais eficientes e sustentáveis, beneficiando não apenas o setor de microalgas, mas também outros setores que podem se inspirar nesse modelo.

O uso de águas de reúso também apresentam algumas desvantagens potenciais, embora elas possam variar dependendo do sistema específico e das condições de operação. Dependendo de sua origem, pode conter resíduos químicos provenientes de atividades industriais, agrícolas ou domésticas. Esses resíduos podem conter compostos tóxicos, metais pesados, pesticidas, produtos farmacêuticos e outros contaminantes. Essas substâncias podem afetar negativamente o crescimento e a saúde das microalgas, bem como a qualidade dos produtos derivados dela.

Além disso, pode conter também micro-organismos patogênicos, como bactérias, vírus e parasitas, que podem prejudicar as microalgas. A presença desses patógenos pode levar a

infecções e doenças nas culturas das microalgas, reduzindo o rendimento e a viabilidade do processo.

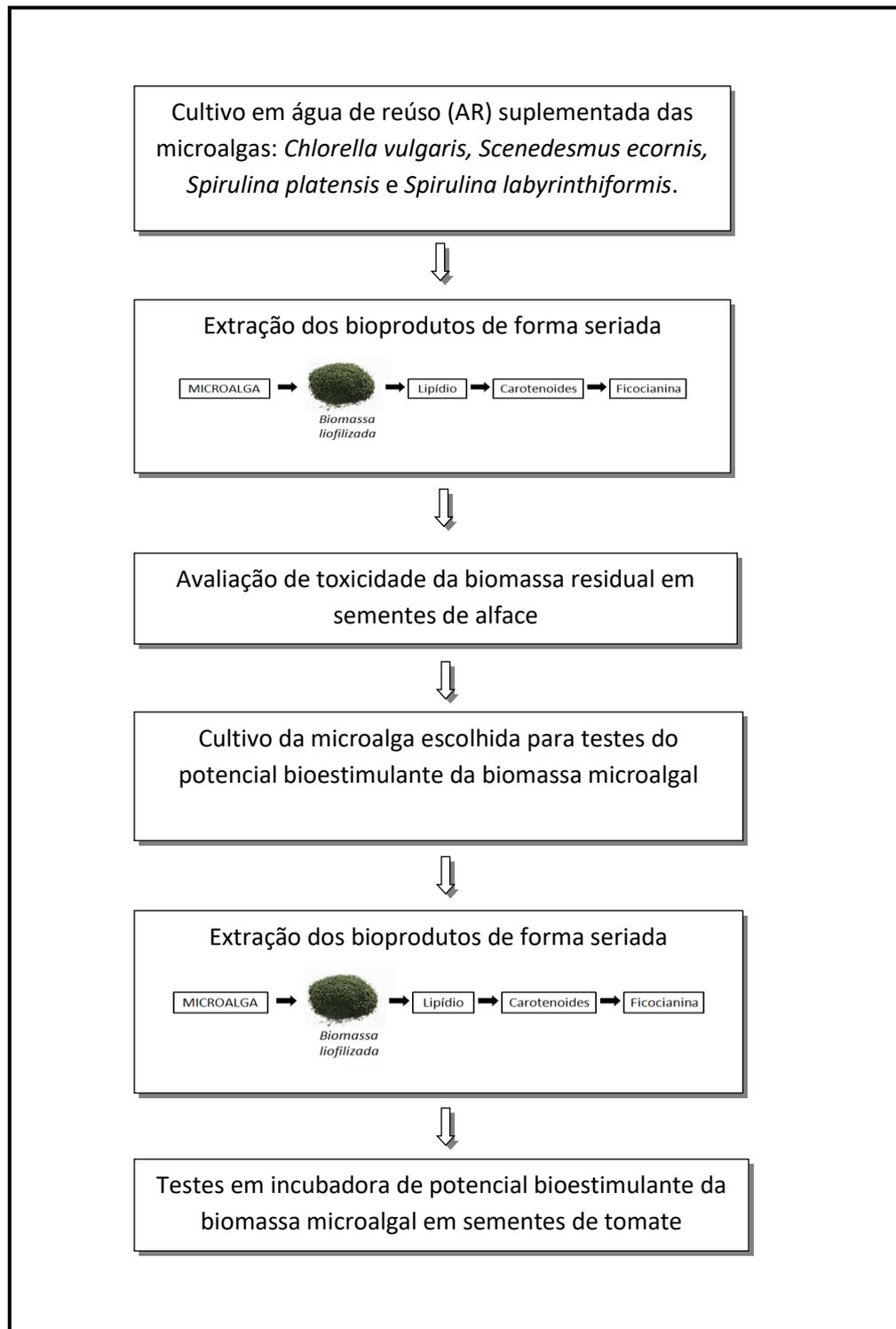
A composição química e biológica da água de reúso pode variar ao longo do tempo, dependendo da origem da água e das atividades prévias. Essas variações podem afetar a consistência e a previsibilidade dos resultados de cultivo das microalgas, dificultando o controle do processo e a obtenção de altos rendimentos. Em muitos casos, a água de reúso requer um tratamento adicional para remover ou reduzir a presença de contaminantes. Os custos associados a esse tratamento podem ser significativos e afetar a viabilidade econômica da produção de microalgas.

É muito importante destacar que, embora essas desvantagens possam existir, muitos dos desafios associados ao uso da água de reúso para a produção de microalgas podem ser mitigados por meio de práticas adequadas de tratamento de água, monitoramento de qualidade e controle de processos. Além disso, a água de reúso é amplamente utilizada em várias aplicações agrícolas e industriais com sucesso, demonstrando seu potencial quando gerenciada corretamente.

3 METODOLOGIA

As principais etapas deste trabalho estão representadas no quadro 1.

Quadro 1: Etapas realizadas no presente trabalho



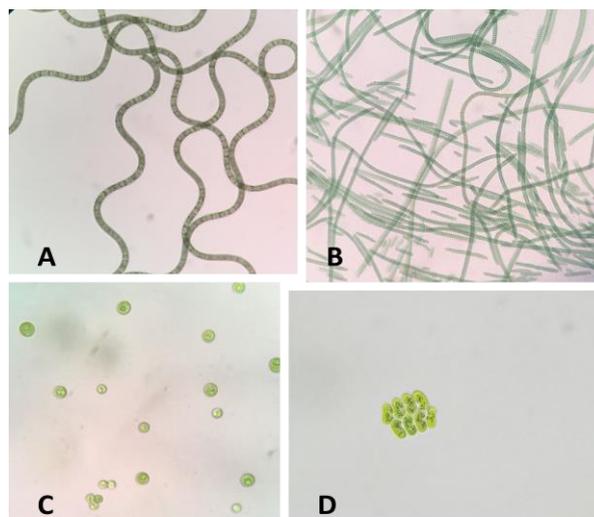
3.1 Coleta da água de reúso

A água utilizada para o cultivo de microalgas realizado neste trabalho foi recolhida na saída da estação de Tratamento de esgoto localizada na cidade do Rio de Janeiro. Após a coleta a água foi acondicionada em bombona de 50 L, filtrada em papel filtro de 150mm para retirada de sólidos em suspensão e após a filtração, foi armazenada em câmaras a 4°C para preservação de suas características por no máximo 1 mês.

3.2 Micro-organismos

Foram utilizadas as microalgas dulcícolas *Chlorella vulgaris* e a *Scenedesmus ecornis* cedidas pela Universidade Federal de São Carlos e as microalgas *Spirulina labyrinthiformis*, cedida pela Universidade Federal da Paraíba e a *Spirulina platensis*, cedida pela Universidade Federal Fluminense. As cepas foram mantidas no Laboratório de Biotecnologia de Microalgas (LABIM) do Instituto Nacional de Tecnologia (INT). Na Figura 4, são mostradas as microscopias ópticas dos micro-organismos utilizados no presente estudo.

Figura 4: Microalgas vistas no microscópio



Legenda: Microscopias ópticas em aumento de 100x. A: *Spirulina platensis*; B: *Spirulina labyrinthiformis*; C: *Chlorella vulgaris*; D: *Scenedesmus ecornis*

Fonte: Autora, 2022

3.3 Meio de cultivo e condições experimentais

3.3.1 Produtos químicos usados

Os principais reagentes utilizados na presente tese, nas etapas experimentais realizadas no Laboratório de Microalgas, no Instituto Nacional de Tecnologia e no LABTAM da UERJ, bem como suas origens, estão listados abaixo:

- Hipoclorito de sódio (4-6%) P.A. - Isofar
- Hexano P.A. – Isofar
- Acetona P.A. - CRQ

3.3.2 Equipamentos

Na elaboração da presente tese, foram utilizados os equipamentos, pertencentes a laboratórios do INT e da UERJ, listados a seguir, bem como outros equipamentos e vidrarias tradicionais usados em laboratório.

- Centrifuga Hettich Rotixa 50RS
- Liofilizador Enterprise II Terroni
- Ultrassom UNIQUE UltraSonic Clearier
- Ultrafreezer U56VC – PA – Panasonic
- Espectrofotometro GENESYS 10S
- Estufa incubadora NT 708 - Novatecnica
- Rotaevaporador Fisatom Mod: 558
- Balança AY220 – SHIMADZU
- Vortéx AP59 Phoenix

3.3.3 Condições experimentais da 1ª etapa

Para os cultivos dos micro-organismos foi preparado meio de cultura baseado em água de reúso (AR) de uma estação de tratamento de esgotos (ETE) da Cidade do Rio de Janeiro, RJ. A água de reúso é resultante de tratamento secundário, após o tratamento biológico.

Tabela 8: Dados dos cultivos iniciais

Microalga	Meio de cultivo	Conc. NPK 4-14-8 (g/L)	Tempo de cultivo (dias)	Densidade de fluxo fotônico (DDF) ($\mu\text{Ein.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)
<i>Chlorella vulgaris</i> (CV)	WC (CV-C)	0,350	20	390-450
	Água de reúso com NPK (CV-AR)			
<i>Scenedesmus ecornis</i> (SE)	WC (SE-C)			
	Água de reúso com NPK (SE-AR)			
<i>Spirulina platensis</i> (SP)	Zarrouk modificado (SP-C)	1,025	15	630 -730
	Água de reúso com NPK (SP-AR)			
<i>Spirulina labyrinthiformis</i> (SL)	Zarrouk modificado (SL-C)			
	Água de reúso com NPK (SL-AR)			

A AR foi suplementada com fertilizante comercial - NPK (04-14-08) - marca Dimy, nas concentrações de nitrogênio equivalentes as concentrações utilizadas no meio controle de cada microalga (Tabela 8). No entanto, o meio de cultivo Zarrouk modificado por George (1976) possui uma concentração muito alta de nitrogênio e não foi possível colocar essa mesma concentração em NPK, pois saturava o meio, sendo assim, foi adicionado dez vezes menos NPK, ou seja, dez vezes menos nitrogênio no meio alternativo em relação ao meio

padrão (Zarrouk). Nos meios de cultivo das cianofíceas foram adicionados carbonato e bicarbonato de sódio para controle de pH, em mesma concentração do Zarrouk. Como controles foram utilizados os meios WC (GUILLARD e LORENZEN, 1972) para as microalgas *Chlorella vulgaris* e *Scenedesmus ecornis* e meio Zarrouk, para as microalgas *Spirulina platensis* e *Spirulina labyrinthiformis*.

3.3.4 Condições experimentais da 3ª etapa

Essa etapa dos experimentos se deu após o ano de 2020, então, devido à pandemia mundial de COVID-19, foi encontrada muita dificuldade em buscar novos efluentes para essa etapa do trabalho, pois era preciso um grande volume de água para preparação do meio de cultivo e o acesso a determinados lugares se encontravam com restrições.

Para superar essa dificuldade foi estabelecido que fosse usada água de torneira ao invés da água de reúso da estação de tratamento de esgoto (Tabela 9). A água de torneira foi utilizada da mesma maneira que a água de reúso, sem nenhum tratamento prévio. Foi realizado um teste para detectar presença de cloro na água, o que poderia ser um impeditivo para o cultivo da microalga. O teste usado foi o clorotest da Labcon, um indicador de presença de cloro livre na água. Não foi detectado cloro na água.

Nessa etapa a *Spirulina platensis* foi cultivada em garrafões com 4L de cultura cada, não foi feito nenhum tipo de aclimatação da célula com o meio alternativo. Foi retirada uma pequena parcela da cultura dos tubos do cepário e passada para um erlenmeyer com 50 ml de meio Zarrouk, depois uma pequena parcela dessa cultura foi colocada em um erlenmeyer com 300 ml de meio Zarrouk para crescimento e posteriormente esse erlenmeyer foi adicionado a um garrafão com 3,700 L de meio Zarrouk para produção de inóculo, como mostra o esquema da figura 6. Após 15 dias de cultivo desse inóculo em garrafão, foram retiradas alíquotas para inocular os outros garrafões com o meio alternativo para o experimento. O meio alternativo foi preparado da mesma maneira que foi preparado para o primeiro cultivo com as quatro microalgas, sem nenhum tratamento prévio, com adição de NPK, filtração dos sólidos suspensos com papel filtro e adição das células.

As condições de cultivo também foram as mesmas utilizadas no cultivo inicial das quatro microalgas e estão apresentadas na tabela 8. A água de torneira foi suplementada com fertilizante comercial - NPK (04-14-08) - marca Dimy, na concentração proporcional a dez

vezes menos da concentração de nitrogênio do meio controle com Zarrouk. Como feito nos primeiros experimentos do presente estudo, optou-se por colocar essa proporção, pois o meio de cultivo estava saturando devido a quantidade de NPK a ser colocada para alcançar a concentração de nitrogênio igual à do meio Zarrouk. Em estudos anteriores realizados no laboratório mostraram que não há prejuízo nas concentrações de biomassa em cultivos nessas mesmas concentrações. Foram cultivados em estante (figura 5) com aeração constante à temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, em ausência de fotoperíodo.

Figura 5: Cultivo da *Spirulina platensis* feito em garrafão

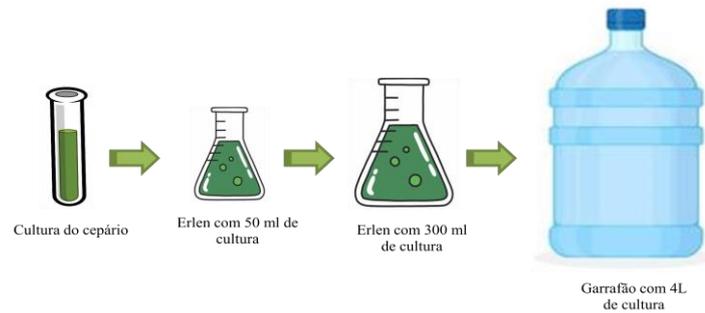


Fonte: Autora 2021

Tabela 9: Condições do experimento com a *Spirulina platensis* em água de torneira com NPK

Microalga	Meio de cultivo	Concentração de NPK (g/L)	Duração (dias)	Intensidade luminosa (uEin.m-2.s-1)
<i>Spirulina platensis</i>	Água de torneira com NPK	1,025	15	630-730

Figura 6: Esquema de produção de inóculo



3.4 Experimentos de extração sequencial dos bioprodutos produzidos em um conceito de biorrefinaria

As extrações dos compostos foram feitas de forma sequencial e para determinar a melhor sequência foram feitos testes em laboratórios de sequências diferentes conforme a tabela 9, para determinar a que apresentou melhor rendimento dos compostos. Foram feitas extrações em duas microalgas, a *Chlorella vulgaris*, a fim de representar as clorofíceas, e na *Spirulina platensis*, para representar as cianofíceas.

Tabela 10: Sequências das extrações testadas na *Spirulina platensis* e *Chlorella vulgaris*

<i>Spirulina platensis</i>			
Sequência 1	Lipídios (mg/g)	Carotenóides (mg/g)	Ficocianina (mg/g)
Sequência 2	Carotenoides (mg/g)	Lipídios (mg/g)	Ficocianina (mg/g)
Sequência 3	Ficocianina (mg/g)	Carotenóides (mg/g)	Lipídios (mg/g)
Sequência 4	Ficocianina (mg/g)	Lipídios (mg/g)	Carotenóides (mg/g)

<i>Chlorella vulgaris</i>		
Sequência 1	Lipídios (mg/g)	Carotenoides (mg/g)
Sequência 2	Carotenoides (mg/g)	Lipídios (mg/g)

3.5 Teste de germinação de semente em solo

Os testes com sementes de alface (*Lactuca sativa*.) foram realizados com o objetivo de avaliar o efeito da utilização de biomassa cultivada em água de reúso ao longo da germinação da semente.

O método empregado baseou-se nas metodologias proposta por Lopes (2011). Para avaliação do efeito da biomassa microalgal em solo foi utilizado como organismo teste sementes de alface (*Lactuca sativa* L.), conforme estabelecido pela OECD (2003). Nessa etapa, as biomassas testadas foram das quatro microalgas usadas na primeira etapa do trabalho: *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus ecornis*, *Spirulina platensis* e *Spirulina labyrinthiformis*.

Foram utilizadas sementes comerciais de alface lisa (*Lactuca sativa*) da marca ISLA. As sementes foram esterilizadas utilizando álcool 70° por 1 minuto, depois mais 2 minutos em hipoclorito de sódio e, ao final, foram lavadas 5 vezes em água destilada. Os testes foram preparados em recipientes plásticos de 50ml. Nas condições mostradas na tabela 11, cada recipiente com 25g de solo, com 0,025g de biomassa, 6,4 ml de água destilada e 10 sementes do organismo teste em análise. Os recipientes foram cobertos, para não perder a umidade, e incubados em câmara climatizada durante 5 dias, em temperatura de 25°C ±1°C, na ausência de luz. O solo utilizado foi o arenoso e sua caracterização se encontra no Anexo C.

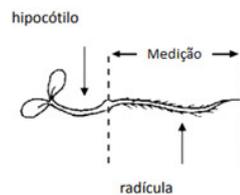
Foram testadas as seguintes condições (Tabela 11): Controle, onde não foi utilizada biomassa; biomassa cultivada em meio padrão (Zarrouk ou WC) com a célula rompida com extrato (célula que passou por todo processo de extração mas o extrato com o biocompostos não foi extraído), biomassa cultivada em meio padrão (Zarrouk ou WC) com célula rompida sem extrato (célula que passou por todo processo de extração mas o extrato com o biocompostos foi extraído) e biomassa cultivada em meio padrão (Zarrouk ou WC) com a célula íntegra (célula que não passou por processo de extração), biomassa cultivada em AR com a célula rompida com extrato, biomassa cultivada em AR com célula rompida sem extrato e biomassa cultivada em AR com a célula íntegra.

Tabela 11: Condições testadas nas análises de toxicidade

Controle	Sem biomassa
WC ou Zarrouk	Célula rompida com extrato
	Célula rompida sem extrato
	Célula íntegra
AR com NPK	Célula rompida com extrato
	Célula rompida sem extrato
	Célula íntegra

O processo germinativo foi avaliado diariamente, durante 5 dias (120 horas), sendo registrado o número de sementes germinadas em cada tratamento. As sementes que apresentarem protusão de radícula foram consideradas germinadas. Após os 5 dias, os recipientes foram retirados da câmara climatizada e foi feita a contagem das sementes germinadas e o comprimento de radícula (figura 5).

Figura 7: Medição de radícula



3.5.1 Índice de velocidade de germinação – IVG

Esse índice refere-se à velocidade de germinação, medindo a quantidade de sementes germinadas por dia. Esse índice é calculado pela soma do número de sementes germinadas a cada dia, divididos pelo número de dias corridos entre a semeadura e a germinação, de acordo com a equação (12) Maguire (1962) e Popinigis (1977):

$$IVG = (G_1/N_1) + (G_2/N_2) + (G_3/N_3) + \dots + (G_n/N_n) \quad (\text{Equação 12})$$

Onde, G_1, G_2, \dots, G_n é o número de plântulas registradas na primeira, segunda, terceira e última contagem; N_1, N_2, \dots, N_n número de dias de semeadura à primeira, segunda, terceiro e última contagem.

3.5.2 Percentual de germinação – G (%)

É o fator de germinação de sementes e alongamento da raiz relativo o ensaio no grupo controle. O resultado determinará a razão percentual de sementes que germinam no grupo teste comparados ao grupo controle. Pela contagem de sementes germinadas será calculada a porcentagem de germinação relativa ao grupo controle (G%), descrita pela equação (13) (LABOURIAU; AGUDO, 1987):

$$G(\%) = (SG_a / SG_c) \times 100 \quad \text{(Equação 13)}$$

Onde, SG_a número total de sementes germinadas na amostra analisada; SG_c número total de sementes germinadas no grupo controle.

3.5.3 Índice de germinação – IG (%)

As medidas da raiz e do hipocótilo permitem a observação da influência da exposição à substância testada no crescimento do tecido vegetal, após 5 dias. Para avaliar a toxicidade das amostras em alface (*Lactuca sativa* L.) foi utilizado o índice de germinação (IG), que combina as medidas de germinação da semente relativa ao grupo controle G(%) e alongamento da raiz relativo ao grupo controle R (%), conforme a equação (15) (LABOURIAU; AGUDO, 1987):

$$IG (\%) = [G(\%) \times R (\%)] / 100 \quad \text{(Equação 14)}$$

$$R (\%) = (MR_a / MR_c) \times 100 \quad \text{(Equação 15)}$$

Onde R(%) corresponde ao percentual de alongamento da raiz em razão do grupo controle; MR_a é média do alongamento da raiz nas sementes germinadas na amostra analisada; MR_c média do alongamento da raiz nas sementes germinadas no grupo controle.

3.6 Avaliação do potencial bioestimulante

O método empregado foi baseado na metodologia descrita por Garcia-Gonzalez & Sommerfield (2015) e por Hernández-Herrera *et al* (2014). Para avaliação da ação bioestimulante das biomassas residuais foram utilizadas sementes de tomate como organismo teste. Nessa etapa do trabalho foi utilizada a biomassa da microalga *Spirulina platensis*. Foi utilizado extrato aquoso de biomassa nos testes em placa Petri. Os extratos foram obtidos através da mistura da biomassa com água e após 45 minutos em repouso foi feita uma filtração em papel filtro e conservado a 4°C. As sementes foram previamente esterilizadas como no item 3.5. As sementes foram transferidas para placas Petri e foram submersas na solução aquosa por 24h. Após esse período foram retiradas do extrato e secaram a temperatura ambiente até o seu uso.

Os testes foram conduzidos em placa Petri com papel germitest onde foram alocadas 10 sementes por placa com 5 mL de água destilada, as placas foram fechadas com papel filme e colocadas em incubadora com temperatura de 21°C sob um ciclo de 16h de luz e 8h de ausência de luz.

O processo germinativo foi avaliado a cada 24h ao longo de 10 dias. Sementes com 2mm de radícula foram contabilizadas como germinadas. Os parâmetros analisados foram: Porcentagem de germinação (%G), energia de germinação (EG), comprimento de radícula (CR) e número de raízes laterais (RL);

3.6.1 Energia de germinação (EG)

A energia de germinação é uma medida de velocidade de germinação, foi calculado de acordo com Hernandez-Herrera *et al* (2013) conforme a equação 17.

$$GE (\%) = (N_T/N_{G3}) \times 100 \quad (\text{Equação 17})$$

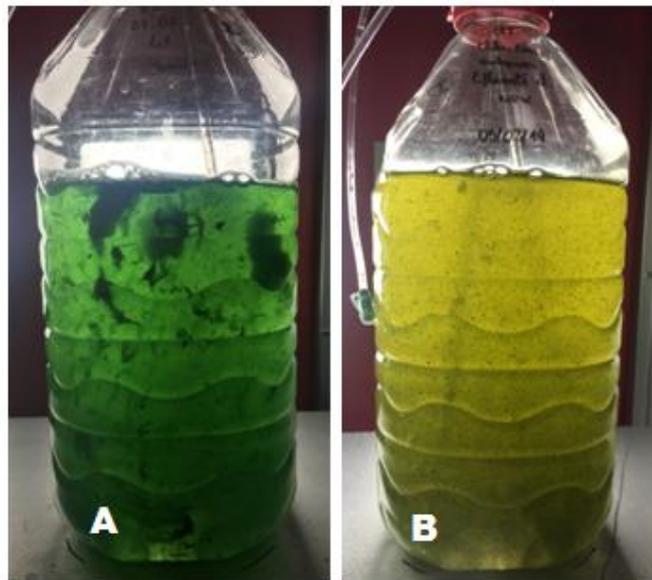
Onde, N_T corresponde ao número total de sementes germinadas; N_{G3} corresponde ao número total de sementes germinadas após 3 dias de germinação.

3.7 Determinações Analíticas

3.7.1 Determinação de Massa Seca

Devido à formação de diversos grumos (Figura 8) a análise de crescimento pela densidade óptica ficou dificultada, assim como a determinação de massa seca retirando-se alíquotas da suspensão celular, pois não havia homogeneidade. Logo, a forma de avaliação da massa seca foi feita por meio do valor da biomassa total de cada garrafão ao final do cultivo.

Figura 8: Cultivo da *Spirulina labyrinthiformis* (A) e *Chlorella vulgaris* (B) em água de reúso com formações de grumos, impossibilitando acompanhamento do crescimento por densidade óptica.



Sendo assim, as culturas de *Chlorella vulgaris* e *Scenedesmus ecornis* foram colocadas em centrífuga para separação da célula e meio de cultura, a biomassa obtida foi congelada, liofilizada e pesada. Obtendo ao final dos cultivos a concentração em g/L de cada condição. Os experimentos foram realizados com 4 repetições para minimizar os erros e avaliar as variações causadas pelos grumos.

A concentração em massa seca foi obtida através da equação (1):

$$\text{Massa seca} = M_p * 0,25 \quad (\text{Equação 1})$$

Onde, M_p é o peso da biomassa liofilizada (g) de cada garrafão.

Devido ao maior tamanho das microalgas *Spirulina platensis* e *Spirulina labyrinthiformis* a forma de separação da célula do meio de cultura é diferente. A suspensão celular foi filtrada em tela de nylon de 5 micrômetros (Tegape) para separação das células e do meio de cultura. Em seguida, a biomassa obtida foi lavada com 50 ml de água destilada, congelada, liofilizada e pesada, obtendo ao final dos cultivos a concentração em g/L de cada condição.

3.7.2 Lipídios Neutros

Segundo o procedimento descrito por Montes D'Oca (2011), foram utilizados 0,1g de biomassa seca para cada 5mL de hexano, sendo a mistura submetida ao ultrassom UNIQUE UltraSonic Clearier por 20min em temperatura ambiente de 25°C. Na sequência, a biomassa foi separada por centrifugação a 2.000 rpm durante 5min. A fase orgânica foi cuidadosamente transferida para um balão de fundo redondo, previamente pesado, e levado ao rotaevaporador com temperatura de 40°C para evaporação do solvente, até peso constante. Ao final, o percentual de lipídios (%L) foi determinado através da equação (2).

$$\%L = \frac{(M_i - M_f)}{M_b} \times 100 \quad (\text{Equação 2})$$

Onde M_f é a massa final (g) do balão após a evaporação do solvente, M_i é a massa inicial (g) do balão e $M(g)$ é a quantidade de biomassa utilizada para a extração de lipídios.

O teor de lipídios na biomassa (em mg/g) foi determinada através da equação 3.

$$L \left(\frac{mg}{g} \right) = LT * \frac{1000}{m_{Biom}} \quad (\text{Equação 3})$$

Onde, LT representa os lipídios totais (mg) e M_{Biom} é a biomassa utilizada na extração (g).

3.7.3 Pigmentos

3.7.3.1 Ficocianina

A determinação da ficocianina (FC) foi feita pelo método de congelamento/descongelamento com o intuito de promover o rompimento da parede e da membrana celular, para liberação do conteúdo intracelular, onde as ficobiliproteínas estão contidas (TAVANANDI *et al*, 2018). Assim, foram pesados 20mg de biomassa em tubo falcon de 50 ml e adicionados 20 ml de água destilada, a mistura foi agitada em vortéx e levada ao congelador por 24 horas. Foram feitos 2 ciclos de congelamento/descongelamento. As amostras foram centrifugadas (4.500 rpm /20 minutos /10°C) em centrífuga Hettich Rotixa 50RS. O sobrenadante foi lido, após o segundo ciclo de congelamento/descongelamento, em dois comprimentos de onda 615nm e 652nm utilizando-se um espectrofotômetro GENESYS 10S. A estimativa da concentração de ficocianina (FC) no sobrenadante, em mg/L, foi calculada a partir da equação 4 descrita por Bennet & Bogorad (1973), e o teor em FC na biomassa (em mg/g) através da equação 5.

$$FC \text{ (mg/mL)} = \frac{ABS_{615} - 0,474 * ABS_{652}}{5,34} * d \quad \text{(Equação 4)}$$

Onde, ABS_{615} é a absorbância no comprimento de onda de 615nm, ABS_{652} é a absorbância no comprimento de onda 652nm e d é o a diluição feita para leitura da amostra.

$$FC \left(\frac{mg}{g} \right) = \frac{FC \left(\frac{mg}{ml} \right) * vol}{m_{Biom}} \quad \text{(Equação 5)}$$

Onde, Vol é o volume (mL) de solvente utilizado e m_{biom} é a quantidade de biomassa (g).

3.7.3.2 Carotenóides totais e Clorofila

Para a quantificação de carotenoides totais (Car) presentes na biomassa, 100mg de biomassa liofilizada foi ressuspensa em 1 mL de acetona (grau de pureza P.A., Merck), agitada no vortéx AP59 Phoenix, sonicada em ultrassom da marca UNIQUE, durante 5 minutos e mantida a -20°C durante 2 horas. Após esse período, as amostras foram submetidas à centrifugação. O sobrenadante foi lido no espectrofotômetro GENESYS 10S. A biomassa residual foi extraída com acetona por mais três vezes.

Para a quantificação dos fitoprodutos gerados pelas microalgas *Spirulina platensis* e *Spirulina labyrinthiformis* nos sobrenadantes foram realizadas leituras em 470nm e 661,6nm. A determinação da concentração de clorofila *a* (*Chl_a*) e carotenoides (*Car_T*) foi realizada segundo as equações 6 a 8, descritas por Lichtenthaler (1987).

$$Chl_a(mg/L) = 10.82 * ABS_{661.6} \quad (\text{Equação 6})$$

$$Car_T(mg/L) = \frac{(1000 * ABS_{470} - 1.9 * Chl_a)}{214} \quad (\text{Equação 7})$$

Onde $ABS_{661.6}$ é a absorbância no comprimento de onda de 661,6nm e ABS_{470} é a absorbância no comprimento de onda de 470nm.

Para o cálculo do teor em carotenoides totais na biomassa foi utilizada a equação 8. Onde Car_T é o valor da concentração em carotenóides no sobrenadante (em mg/L), o Vol_{sol} é o volume de solvente (em litros) utilizado na extração e m_{Biom} é a quantidade de biomassa (em mg) utilizada na extração.

$$Car \left(\frac{mg}{g} \right) = (Car_T * Vol_{sol}) / m_{Biom} \quad (\text{Equação 8})$$

Para a quantificação de carotenóides totais na *Chlorella vulgaris* e *Scenedesmus ecornis*, utilizaram-se outros comprimentos de onda devido à presença da clorofila *b*. A leitura do sobrenadante foi realizada nos comprimentos de onda de 644,8 nm, 661,6 nm e em 470nm, de acordo com as equações 9 a 11, descritas por Lichtenthaler (1987). Para o cálculo dos carotenoides totais na biomassa, foram feitas somas da concentração de carotenóides em cada extração, já que em cada biomassa foram feitas 4 extrações seguidas, totalizando 4 extratos.

$$Clora(mg/ml) = [11,24 * ABS_{661,6} - 2,04 * ABS_{644,8}] * d \quad (\text{Equação 9})$$

$$Clorb \text{ (mg/ml)} = [20,13 * ABS_{644,8} - 4,19 * ABS_{661,6}] * d \quad (\text{Equação 10})$$

$$Car_T = \frac{1000 * ABS_{470} - 1,9 * Clora - 63,14 * Clorb}{214} \quad (\text{Equação 11})$$

Onde ABS 661,6 é a absorbância no comprimento de onda 661,6 nm, a ABS 644,8 é absorbância no comprimento de onda 644,8 nm, a ABS 470 é absorbância no comprimento de onda 470 nm, d é a diluição feita na amostra, e $Clor_a$ e $Clor_b$ são as concentrações de clorofila a e b determinadas pelas equações 9 e 10 respectivamente.

3.8 Análises estatísticas

O software GraphPrism 8.0 foi utilizado para realizar teste Tukey com análise de variância (ANOVA) e para a elaboração dos gráficos. O nível de significância adotado foi de 95% ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo serão apresentados de acordo com a ordem das etapas de seu desenvolvimento, representados na Tabela 9.

Quadro 2: Etapas dos experimentos seguidos no presente trabalho

1ª etapa	Cultivo das microalgas <i>Chlorella vulgaris</i> , <i>Scenedesmus ecornis</i> , <i>Spirulina platensis</i> e <i>Spirulina labyrinthiformis</i> em água de reúso com NPK; Extração seriada dos compostos: Ficocianina, lipídios neutros e carotenóides totais.
2ª etapa	Teste de toxicidade das biomassas em sementes de alface (<i>Lactuca sativa</i>)
3ª etapa	Cultivo da <i>Spirulina platensis</i> em água de torneira com NPK; Extração seriada dos compostos: Ficocianina, lipídios neutros e carotenóides totais
4ª etapa	Teste em incubadora de potencial bioestimulante da biomassa em sementes de tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>).

4.1 Cultivo das microalgas *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus ecornis*, *Spirulina platensis* e *Spirulina labyrinthiformis* em água de reúso com NPK e extração seriada dos compostos: Ficocianina, lipídeos e carotenoides: 1ª Etapa

4.1.1 Extração sequencial dos compostos em diferentes sequências

Com o objetivo de aproveitar todas as frações úteis da biomassa, foi feita a extração em sequências dos biocompostos na biomassa. Após a extração de todos os compostos

(lipídios neutros, carotenoides e ficocianina) a biomassa residual foi utilizada em testes para avaliar o potencial bioestimulante da mesma.

Nos resultados das extrações sequenciais preliminares podemos observar, tanto na *Chlorella vulgaris* quanto na *Spirulina platensis*, que a maioria dos compostos, quando extraídos por último, apresenta valores de concentração acima dos valores encontrados quando extraídos no início, como é o caso da ficocianina e lipídios neutros na *Spirulina platensis* e dos lipídios neutros na *Chlorella vulgaris*. Esse comportamento se deve ao fato de que a cada extração as células estão mais rompidas, deixando os compostos mais disponíveis para o solvente, levando em consideração que em todas as sequências a biomassa foi de um mesmo cultivo, então a produção dos compostos foi a mesma, pode-se dizer que a extração sequencial tem uma influência na concentração final dos compostos.

Tabela 12: Sequências testadas na *Chlorella vulgaris*

Rendimento do biocomposto (mg.g⁻¹)		
Sequência 1	Lipídios Neutros	Carotenóides
	37,69 ± 1,39	1,13 ± 0,06
Sequência 2	Carotenóides	Lipídios Neutros
	3,25 ± 0,21	50,02 ± 0,39

Tabela 13: Sequências de extração na biomassa da *Spirulina platensis*

Rendimento do biocomposto (mg g⁻¹)			
Sequência 1	Lipídios Neutros	Carotenoides	Ficocianina
	23,5 ± 1,41	1,19 ± 0,03	149,7 ± 0,7
Sequência 2	Carotenoides	Lipídios Neutros	Ficocianina
	3,45 ± 0,05	18,67 ± 2,02	152,23 ± 1,6
Sequência 3	Ficocianina	Carotenoides	Lipídios
	55,94 ± 3,3	5,56 ± 0,01	27,00 ± 9,89
Sequência 4	Ficocianina	Lipídios	Carotenoides
	62,38 ± 0,43	15,00 ± 2,83	2,59 ± 0,01

Quando se observa os resultados da *Chlorella vulgaris* na tabela 12, pode-se observar esse comportamento na concentração dos lipídios neutros, porém não na concentração de carotenoides. Isso pode ocorrer devido ao fato de que ao ser realizada a extração de lipídios neutros com n hexano, por ser um solvente apolar, pode ter extraído também os betacarotenos presentes na biomassa diminuindo a concentração de carotenoides. Isso explicaria o porquê a

concentração de carotenoides está maior na sequência 2 das extrações do que na sequência 1, quando geralmente a concentração do composto é maior.

Na tabela 13, pode-se observar os resultados da extração sequencial da *Spirulina platensis*, a concentração da ficocianina quando extraída por último foi quase que três vezes maior do que quando extraída nas sequências 3 e 4, quando foi a primeira extração a ser feita. Mais uma vez, podemos observar o efeito da extração sequencial. Quando se tem extrações prévias o composto fica mais disponível e aumenta a concentração final do composto extraído da célula. Tavanandi *et al* (2018), em seu estudo, realizou extrações seriadas na mesma biomassa para atingir o valor máximo de produção de ficocianina da *Spirulina platensis*.

O valor da concentração de carotenoides totais quando extraído inicialmente (Sequência 2) foi de 3,45 mg/g. Nas sequências 1 e 3, os carotenoides totais foram os segundos compostos a serem extraídos e mesmo assim apresentaram valores distintos, na sequência 1 foi de 1,19 mg/g e na sequência 3 foi de 5,56 mg/g. Isso pode ter ocorrido pelo fato de que a extração com o valor mais alto (sequência 3) foi precedida pela extração de ficocianina realizada utilizando água, portanto, não houve absorção de nenhuma fração do composto pelo solvente da extração prévia. O que não ocorreu na sequência 1, em que a extração foi precedida por uma extração de lipídios neutros e, como comentado anteriormente pode ter carregado, com o solvente, os betacarotenos presentes nos carotenoides.

Em relação aos lipídios neutros a maior concentração do composto se encontra na sequência 3 onde o valor alcançado foi de 27,00 mg/g, sendo o último composto a ser extraído e por isso, com o maior valor de concentração. Tal dado corrobora a hipótese sobre a influência da extração sequencial nos valores de concentração dos biocompostos. Nas sequências 2 e 4, os valores são menores, sendo 18,67 mg/g e 15,00 mg/g, respectivamente. E na sequência 1, obteve-se um valor de 23,5 mg/g, maior do que o citado anteriormente (sequência 2 e 4), mas pode ser devido aos betacarotenos da biomassa presentes na biomassa.

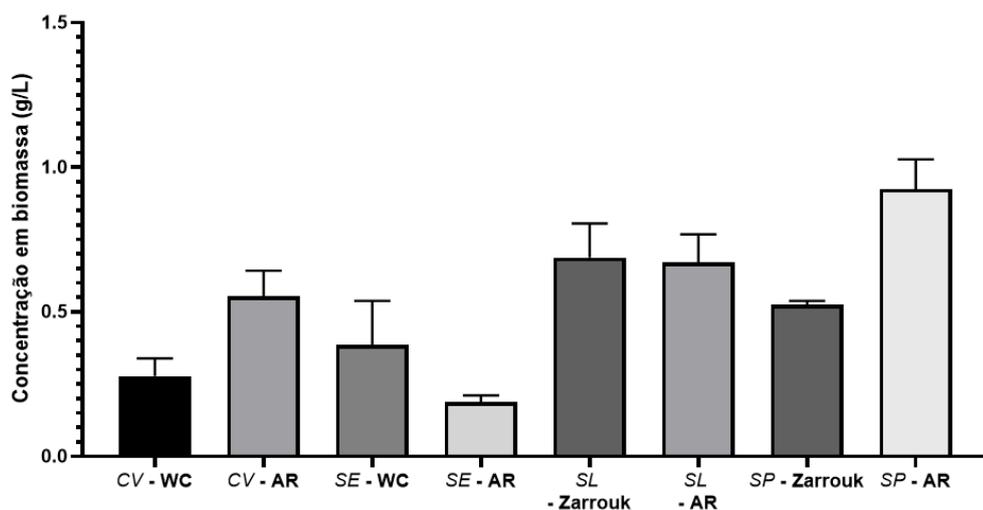
A escolha da sequência de extração dos biocompostos a ser utilizada nos experimentos subsequentes, baseou-se no alto valor agregado da ficocianina, tomando os valores das concentrações dos compostos de *Spirulina platensis* como fator determinante. Tendo em vista que entre a sequência 1 e 2 (as quais tem os maiores valores de concentração em ficocianina) o que difere é o valor dos lipídios neutros, foi escolhida a sequência 1 para ser executada em todas as biomassas do presente trabalho

4.1.2 Produção de biomassa das microalgas em AR

O cultivo de microalgas em água de reúso pode afetar diretamente a produção de biomassa microalgal e de compostos de alto valor agregado. Pois há a possibilidade do mesmo apresentar componentes tóxicos para o crescimento das microalgas utilizadas. Nesse estudo, foram cultivadas microalgas em águas de reúso (AR) suplementada com NPK e feita comparação com o cultivo em meio padrão (WC e Zarrouk). Baseado na figura 9, pode-se observar que no cultivo em água de reúso da *Chlorella vulgaris* e *Spirulina platensis* houve um aumento significativo de concentração em biomassa, de 0,28 g/L para 0,55 g/L e 0,52 g/L para 0,92 g/L, respectivamente, em relação ao cultivo em meio padrão (Figura 9). A microalga *Scenedesmus ecornis* apresentou concentração em biomassa em água de reúso inferior à concentração em WC (0,19 g/L e 0,39 g/L, respectivamente). A concentração em biomassa da *Spirulina labyrinthiformis* se manteve praticamente a mesma nos dois cultivos, em Zarrouk (0,69 g/L) e em água de reúso (0,67 g/L), não apresentando diferenças significativas nas duas condições avaliadas.

Devido à impossibilidade de acompanhar o crescimento das células diariamente pela formação de grumos, não se pode afirmar o comportamento delas ao longo do tempo, somente sua concentração final.

Figura 9: Concentração em biomassa nos cultivos (g/L)



Legenda: CV-WC: *Chlorella vulgaris* no WC; CV-AR: *Chlorella vulgaris* na água de reúso; SE-WC: *Scenedesmus ecornis* no WC; SE-AR: *Scenedesmus ecornis* na água de reúso; SP-Zarrouk: *Spirulina platensis* em Zarrouk; SP-AR: *Spirulina platensis* em água de reúso; SL-Zarrouk: *Spirulina labyrinthiformis* em Zarrouk; SL-AR: *Spirulina labyrinthiformis* em água de reúso.

De acordo com análises em cromatógrafo de íons Dionex ICS3000 feitas previamente na AR utilizada nos experimentos, não foram detectadas quantidades significativas de nitrato, nitrito e fosfato, e, por isso, foi realizada a suplementação com NPK, a fim de garantir nutrientes essenciais (N e P) para o desenvolvimento celular. A escolha do NPK para suplementação se deu pelo fato de ser um suplemento constituído de nitrogênio e fósforo, essenciais para o crescimento das microalgas e possuir um baixo custo.

Nos cultivos de *Chlorella vulgaris* a concentração de nitrogênio da AR foi igualada ao meio controle, porém a AR foi suplementada com NPK de fórmula fixa (04-14-08) e ao igualar a concentração de nitrogênio, aumentou-se conseqüentemente a concentração de fósforo (P) e potássio (K). Venonesiv *et al* (2017) relataram que a diferença na concentração de fósforo influenciou o crescimento das células no cultivo da *Chlorella vulgaris*, o meio com maior concentração foi o de maior crescimento celular. Mesmo alguns estudos relatando que uma maior disponibilidade de P não influencia a produção de biomassa (CHIA *et al*, 2015, Schmidt *et al*, 2016, Wu *et al*, 2012), os experimentos realizados neste trabalho levam a crer que a grande disponibilidade de P pode ter contribuído positivamente para um maior crescimento microalgal da *Chlorella vulgaris*. Outra possível explicação seria que através da degradação da matéria orgânica presente na água de reúso em pequenas moléculas, a *Chlorella vulgaris*, tenha as utilizado como nutrientes para seu crescimento, como relatado por Mustafa *et al* (2021). O que explicaria a maior concentração de biomassa no cultivo em meio alternativo (Tabela 14).

As águas residuais têm se mostrado como uma boa alternativa, principalmente por ser sustentável, para o cultivo de microalgas (Daneshvar *et al*, 2019), pois são micro-organismos com elevada eficiência fotossintética, se adaptam e crescem rapidamente em diferentes tipos de águas residuais (Cheng *et al*, 2018). A microalga *Scenedesmus ecornis* não apresentou um aumento de produção ao ser colocada em AR suplementada. Normalmente, as águas residuais municipais são adequadas para uso em cultivos mesmo tendo um baixo nível de nutrientes quando comparado ao meio padrão (Zarrouk, BG-11, W.C. por exemplo), possuem também um baixo nível de substâncias tóxicas e venenosas, outra razão pela qual as águas residuais municipais são bastante utilizadas e investigadas ao longo dos anos. (Li *et al*, 2019). Porém não foi o ocorrido no presente estudo no cultivo da *Scenedesmus ecornis*, levantando a possibilidade de haver componentes tóxicos para a microalga em questão, pois de todas as espécies estudadas no presente estudo, foi a microalga em que se observou uma diminuição da concentração de biomassa comparada ao controle quando cultivada em AR. Ansari *et al* (2019) obtiveram uma concentração em biomassa de 0,880 g/L de *Scenedesmus*

obliquus em meio de cultivo alternativo de águas residuais municipais. Essa maior concentração encontrada, quando comparada ao cultivo do presente estudo, pode ser devido ao fato de suas cepas terem sido isoladas de campos abertos de plantas de tratamento de águas residuais, estando, possivelmente, mais adaptadas às tais condições de cultivo e tendo assim um melhor crescimento. As microalgas do presente estudo não foram isoladas de plantas de tratamento e não tiveram aclimatação, tendo um maior impacto ao ter contato com o meio alternativo. Porém, em meio sintético também houve uma diferença de concentração em biomassa do presente estudo comparada a concentração de biomassa alcançada por Ansari *et al* (2019) que pode ser devido a diferenças nas condições de cultivo como intensidade luminosa, presença de fotoperíodo e concentração de nutrientes (nitrogênio e fósforo), principalmente a concentração de nitrogênio, que em meio BG-11 é muito maior que no meio WC, chegando a aproximadamente 17 vezes o valor da concentração de nitrato do WC (WC: 0,085g/L e BG-11: 1,5 g/L).

Tabela 14: Resultados das concentrações dos produtos obtidos das microalgas *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus ecornis*, *Spirulina platensis* e *Spirulina labyrinthiformis*.

Microalga	Meio de cultivo	Concentração final em biomassa (g/L)	Lipídios Neutros (mg/g)	Carotenoides (mg/g)	Ficocianina (mg/g)
<i>Chlorella vulgaris</i>	WC	0.28 ± 0.06	21.38 ± 1.9	1.2 ± 0.02	-
	Água de reuso	0.55 ± 0.08	13.39 ± 2.2	1.5 ± 0.3	-
<i>Scenedesmus ecornis</i>	WC	0.38 ± 0.15	37.77 ± 0.7	0,79 ± 0.09	-
	Água de reuso	0.19 ± 0.02	26.43 ± 2.9	1.75 ± 0.11	-
<i>Spirulina platensis</i>	Zarrouk	0.52 ± 0.01	40.75 ± 2,75	1.05 ± 0.10	115,50 ± 2,70
	Água de reuso	0.92 ± 0.10	42.75 ± 1,06	1.21 ± 0.2	98,47 ± 2.73
<i>Spirulina labyrinthiformis</i>	Zarrouk	0.69 ± 0.10	34.25 ± 2.5	1.02 ± 0.21	123,81 ± 1,43
	Água de reuso	0.67 ± 0.09	33.83 ± 2.7	0.77 ± 0.1	101,58 ± 2,34

Gouveia *et al* (2016) também cultivaram *Scenedesmus obliquuos* e *Chlorella vulgaris* em efluentes urbanos no fotobiorreator como tratamento para remoção de nitrogênio e fósforo dessas águas, e como resultado, perceberam que a *Scenedesmus obliquuos* teve um crescimento satisfatório com a otimização de alguns fatores (pH, aeração e fluxo de recirculação) quando comparada as outras microalgas do experimento, porém foram isoladas do próprio efluente, o que é um ponto positivo em relação à adaptação da espécie ao meio utilizado. Algumas microalgas são mais sensíveis a determinados componente, mesmo as

outras espécies tendo uma boa produção em biomassa no meio com AR e NPK, a *Scenedesmus ecornis* utilizada no presente estudo pode apresentar uma resistência às condições em que foi exposta.

Spirulina platensis alcançou uma concentração de biomassa final de 0,92 g/L quando cultivada em água de reúso. Zhou *et al* (2017) cultivaram *Spirulina platensis* em uma mistura de descarga de água do mar e água doce e obtiveram uma biomassa final de 0,760g/L, sendo consistente com o presente estudo em que obteve um bom resultado em concentração de biomassa, ainda que com diferenças na composição da água de reúso em relação ao controle, o que demonstra que ela possui potencial para bom crescimento em meios alternativos. *Spirulina platensis* apresentou uma taxa de crescimento satisfatório em meios a partir de águas residuais sendo capaz de sobreviver em ambiente com esse tipo de água mantendo uma razoável concentração de biomassa. Uma das possíveis explicações é o fato de tender a absorver o fósforo excessivo como estoque de energia para crescimento e biosíntese (Zhu *et al*, 2015) e, como citado anteriormente, há uma grande disponibilidade de fósforo no meio alternativo, o que pode ter contribuído positivamente para uma maior concentração final dessa biomassa. Uma explicação alternativa para essa diferença de concentração de biomassa pode ser que a água de reúso tenha algum componente orgânico ou inorgânico que tenha estimulado esse crescimento das células, como relatou Ansari *et al*, (2019). Alguns estudos sobre o cultivo da *Spirulina platensis* em águas residuais, de diferentes fontes, foram realizados (Araújo *et al*, 2020, Li *et al*, 2019, Zhou *et al*, 2017) e ela é considerada uma alternativa promissora para cultivos em meios alternativos, pois tem um crescimento satisfatório, é de fácil separação do meio por filtração, tem condições de ser associada a técnicas de tratamento de águas residuais e sua biomassa tem um grande potencial de uso biotecnológico.

Em relação à *Spirulina labyrinthiformis*, na literatura não há resultados de produção de biomassa para comparação de resultados. Essa microalga foi pouco estudada e explorada. Pelos experimentos realizados neste estudo, ela tem capacidade de adaptação a meios alternativos já que a produção de biomassa na AR foi praticamente a mesma que em meio padrão. Ela possui também crescimento rápido e, assim como a *Spirulina platensis*, é de fácil separação das células do meio de cultivo devido ao seu formato, tamanho e formação de grumos. Sendo o suficiente uma filtração em tela de nylon para sua separação. O valor alcançado por esta microalga, nesse estudo, em meio Zarrouk foi de 0,69 g/L e em meio alternativo (AR) foi de 0,67 g/L. São valores semelhantes ao que outros autores alcançaram para a *Spirulina platensis* em meios alternativos (Zhou *et al*, 2017, Araujo *et al*, 2020).

A microalga *Chlorella vulgaris* obteve um bom aumento em sua concentração de biomassa, comparando os dois meios (Meio padrão e AR). Porém do ponto de vista de potencial de produção biotecnológica, as outras microalgas, *Spirulina platensis* e *Spirulina labyrinthiformis*, são mais interessantes, pois mesmo com um ganho relativamente menor que a *Chlorella vulgaris*, elas em valor final alcançaram um valor maior em concentração de biomassa seca. Além disso, pelo formato de suas células, a *Spirulina* tem um menor gasto energético quando se fala em coleta e separação das células. O que é um aspecto importante a ser considerado, pois um grande desafio na produção de microalgas está relacionado com os métodos de recuperação da biomassa no meio de cultivo (ZHUANG et al., 2016). Como as células *Chlorella vulgaris* e *Scenedesmus ecornis* apresentam um tamanho bastante reduzido, a sua recuperação torna-se difícil e custosa. Por isso, as técnicas de recuperação são consideradas como um fato relevante para a determinação dos custos envolvidos no processo de produção.

Pode-se concluir que o meio alternativo suplementado pode fornecer nutrientes e condições necessárias para um bom crescimento celular sem qualquer efeito negativo, dependendo da espécie a ser cultivada, indicando que o uso do meio alternativo com água de reúso é viável para a produção de biomassa com um custo de produção relativamente menor.

4.1.3 Produção de lipídios neutros

Notou-se maior produção de lipídios no meio controle em relação ao meio com água de reúso nos cultivos de *Chlorella vulgaris* e *Scenedesmus ecornis*. Nos cultivos de *Spirulina platensis* e *Spirulina labyrinthiformis* a diferença entre o meio controle e o meio alternativo não foi significativa (Figura 10).

A escolha do solvente é uma etapa importante para a extração eficiente de pigmentos, pois determina o grau de afinidade com a substância a ser extraída (Sarkar et al, 2020). Pohndorf et al (2016) testaram diversos métodos de extração de lipídios da *Spirulina sp.*, e de acordo com os autores a extração usando hexano como solvente foi mais seletiva para extrair lipídios neutros. A grande questão envolvendo o uso de solvente, no presente estudo, foi a tentativa de não causar danos às demais frações da biomassa, para usos posteriores. Essa biomassa, pós-extração dos compostos, ainda pode ser empregada, por exemplo, como biofertilizante, como bioestimulante etc. Diante disso, a escolha de solvente deve ser pensada

de modo que não implique em uma toxicidade na biomassa residual em uma futura aplicação, sendo essa a motivação de escolha do n hexano para extração de lipídios neutros no presente estudo. Os solventes orgânicos também são frequentemente usados devido à especificidade para lipídios neutros. Além de que, a alta volatilidade desses solventes possibilita o isolamento do produto por meio de um processo de destilação de baixa energia após o processo de extração (RANJITH KUMAR *et al*, 2015).

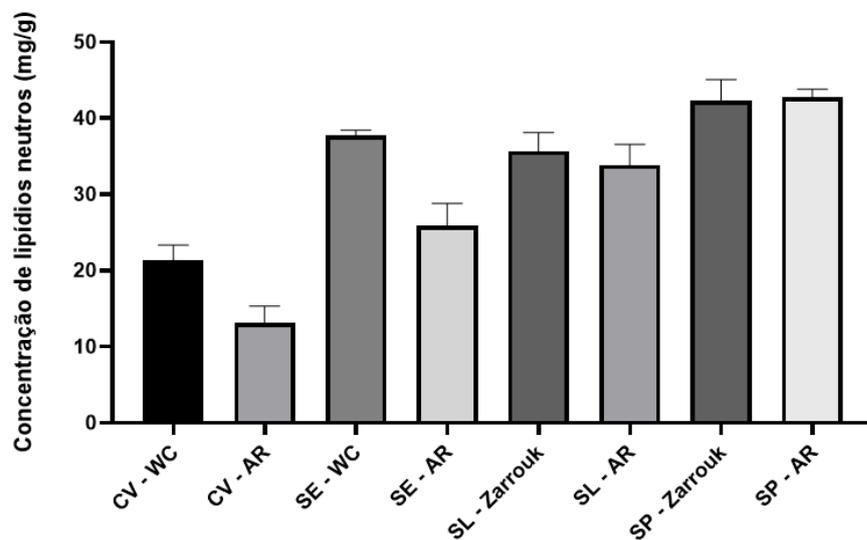
Jawaharraaj *et al*. (2016) também encontraram baixa concentração de lipídios em cultivo de *Oscillatoria sp.* em água residual da agroindústria (9,6%). No entanto, Gao *et al*. (2018) relataram alta quantidade de lipídio em cultivo de *Chlorella sp* em água residual sem tratamento (29%). Essa variação dos teores de lipídios encontradas nos estudos pode ser explicada pela presença de produtos químicos nas águas residuais que podem causar interferências nas concentrações dos lipídios (KUMAR *et al.*, 2017), uma vez que podem alterar o metabolismo celular.

Já é amplamente conhecido que expor as microalgas a condições de estresse, como meios em limitação de nutrientes, resulta em um aumento de lipídios na célula (CHU *et al* (2014), ZHANG *et al* (2013), YEH & CHANG (2011)). Kamalanathan *et al* (2015) observaram em estudo feito com *Chlamydomonas reinhardtii* que o grupo com limitação de nutrientes (N e P) resultou em maior teor de lipídios neutros, mas menor biomassa, enquanto a células em meios repletos de nutrientes resultaram em menor concentração de lipídios neutros e uma maior concentração em biomassa. Ratnapuram *et al* (2017) cultivaram *Chlorella pyrenoidosa* e o teor de lipídios neutros alcançado pelos autores foi de 6,14% a 16,43%, porém as células estavam em condições de estresse para aumentar a produção deste biocomposto.

Neste estudo, as microalgas *Spirulina platensis* e *Spirulina labyrinthiformis* quando cultivadas em águas de reúso, estavam com uma concentração de nitrogênio menor que a utilizada na condição controle, porém já foi visto anteriormente que isso não afetou negativamente a produção de biomassa, e a menor concentração de nitrogênio no meio AR pode não ter sido suficiente para causar estresse na célula e estimular uma maior produção de lipídios neutros. Não houve uma diferença significativa entre os cultivos em AR e Zarrouk das *Spirulina platensis* e *Spirulina labyrinthiformis*. Levou-se também em consideração que as condições de cultivo não eram favoráveis para uma alta produção de lipídios, pois as células não foram submetidas a condições de depleção de nutrientes para tal.

Dentre as muitas explicações que pode ter a diferença de concentração de lipídios neutros nas microalgas, principalmente entre as cianofíceas e clorofíceas, pode-se relatar a influência da temperatura na produção de lipídios nas microalgas. A temperatura é um importante fator físico e condição ambiental que afeta o conteúdo lipídico da microalga (BRINDHADEVI *et al*, 2021). A temperatura em todo o experimento foi de 25°C, tanto para as cianofíceas quanto para as clorofíceas, que pode também ter influenciado o metabolismo dos lipídios.

Figura 10: Concentração de lipídios neutros nas microalgas cultivadas em água de reúso e no meio controle (WC e Zarrouk)



Legenda: CV-WC: *Chlorella vulgaris* no WC; CV-AR: *Chlorella vulgaris* na água de reúso; SE-WC: *Scenedesmus ecornis* no WC; SE-AR: *Scenedesmus ecornis* na água de reúso; SP-Zarrouk: *Spirulina platensis* em Zarrouk; SP-AR: *Spirulina platensis* em água de reúso; SL-Zarrouk: *Spirulina labyrinthiformis* em Zarrouk; SL-AR: *Spirulina labyrinthiformis* em água de reúso.

4.1.4 Produção de carotenoides totais

As extrações realizadas na biomassa de todas as microalgas testadas foram realizadas de forma sequencial, ou seja, de uma mesma biomassa se extraiu lipídios neutros em seguida os carotenoides e, por último, a ficocianina (esta última, no caso da *Spirulina platensis*). Deste modo, as extrações que foram precedidas por outra extração podem ter sofrido alguma interferência em seu resultado, de forma positiva ou negativa, como foi discutido no item 4.2.

A extração de carotenoides foi precedida pela extração de lipídios neutros utilizando o n hexano que é um solvente apolar e que pode ter carregado juntamente com os lipídios os betacarotenos presentes na célula. Resultando em uma distorção na concentração final de carotenóides quando comparada a literatura.

Com relação aos carotenoides totais (Figura 11), em *Spirulina platensis* foi alcançado um valor de 1,21 mg/g na condição controle com Zarrouk e 1,05 mg/g no cultivo em água de reúso, estatisticamente não há diferença entre as concentrações ($p > 0,05$). O conteúdo de carotenoides relatado na *Spirulina platensis* varia de 0,1 a 0,4 mg/g (AMBATI *et al*, 2018; KUMAR *et al*, 2013). Park *et al* (2018) compararam o teor de carotenóides totais de várias *Spirulinas* comerciais compradas em diferentes lugares (diferentes países) e a concentração de carotenoides alcançada foi de $1,70 \pm 0,15$ mg/g na biomassa vendida nos EUA e $0,75$ mg/g $\pm 0,20$ na biomassa oriunda da Índia. Valores relativamente próximos ao encontrado nesse estudo nas condições controle (Zarrouk) e AR, respectivamente. Porém muitas podem ser as diferenças de cultivo (luz, nutrientes, temperaturas), pois como são biomassas comerciais, não há esse tipo de informação. Na literatura, os valores da concentração de carotenoides para a *Spirulina* são menores do que os valores encontrados para as clorofíceas, a *Chlorella vulgaris*, por exemplo. No presente estudo, os valores dessas duas microalgas estão bem próximos. Existem várias razões pelas quais isso pode acontecer, entre eles as condições de cultivo, pois desempenham um papel crucial na produção dos biocompostos. Uma vez que cada microalga reage de uma forma diferente ao mesmo estímulo, o que pode estimular uma maior produção na *Spirulina platensis*, pode não causar o mesmo efeito na *Chlorella vulgaris*. O estímulo por estresse também pode determinar uma maior produção desse composto, a cianofíceas pode reagir mais a composição do meio alternativo do que a clorofíceas

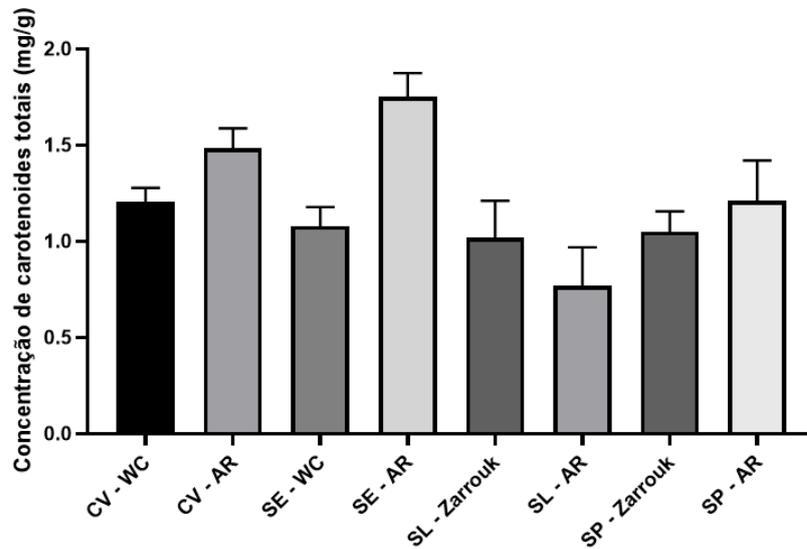
Não há resultados registrados na literatura da concentração de carotenoides da *Spirulina labyrinthiformis*. Porém, não houve diferença significativa entre as concentrações na condição controle (1,02 mg/g) e na condição de água de reúso (0,77 mg/g), assim como ocorreu na *Spirulina platensis*, as duas médias não apresentaram diferenças estatisticamente significativas. Além disto, a concentração deste biocomposto alcançada na condição controle está próxima àquela observada na *Spirulina platensis*.

Nos cultivos da *Chlorella vulgaris* em WC e água de reúso não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre as concentrações alcançadas, sendo 1,20 mg/g no meio padrão WC e 1,5 mg/g no meio alternativo com água de reúso. Mesmo com o aumento na concentração de biomassa no meio alternativo não foi observado o mesmo aumento em relação à concentração de carotenoides. A presença dos carotenoides nas microalgas está

relacionada com a eficiência da absorção de luz da atividade fotossintética (clorofila a), e é importante para avaliar sua adaptação em condições de estresse ambiental (Vaz *et al*, 2016). Um dos fatores mais críticos que afetam a produção de lipídios, carotenoides e biomassa como um todo é a composição do meio em que as microalgas são cultivadas e o estágio em que são recolhidas (MINHAS *et al*, 2020). Uma das possíveis explicações para a baixa concentração de carotenoides é que o efeito combinado de estresses ambientais pode ter levado a redução da absorção fotossintética devido ao deslocamento metabólico para a síntese de outras biomoléculas (CARDOSO *et al*, 2020). Como a clorofila é um composto rico em nitrogênio e é facilmente acessível, ela é utilizada como um reservatório de nitrogênio intracelular para apoiar o crescimento celular e a produção de biomassa à medida que o nitrogênio no meio se esgota (BENAVENTES-VALDES *et al*, 2016). Damergi *et al* (2017) alcançaram um valor de concentração de carotenoides de $0,417 \pm 1,6$ mg/g, porém antes deles usarem técnicas combinadas de extração para remoção do composto residual na biomassa. A *Chlorella vulgaris* possui maior resistência aos métodos de lise celular quando comparada com outras microalgas como a *Dunaliella sp.* e *Haematococcus pluvialis* conhecidas pelo seu conteúdo em carotenoides e por possuírem uma membrana celular menos rígida, podendo melhorar a penetração de solvente e um melhor rendimento da extração dos compostos.

Nos cultivos de *Scenedesmus ecornis* em WC e água de reúso houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre as concentrações alcançadas, sendo 0,79 mg/g no meio padrão WC e 1,75 mg/g no meio alternativo com água de reúso. Visto que os carotenoides são biomarcadores sensíveis a poluente em meio aquoso, quanto maior seu valor, maior é a poluição presente no meio de cultura (CARDOSO *et al.*, 2020), isso poderia ser uma explicação para a maior concentração de carotenoides no meio alternativo, já que o meio padrão é estéril e o meio alternativo não. Também explicaria a baixa concentração em biomassa alcançada por essa microalga. Pribyl *et al* (2016) relatam diferentes respostas em relação a estímulo para aumento da produção de carotenoides e relatam que diferentes espécies expressam diferentes mecanismos reguladores de biossíntese de carotenoides. A *Scenedesmus ecornis* não teve um crescimento satisfatório em meio AR, e o fator que promoveu este baixo crescimento pode ter afetado o metabolismo dos carotenoides. Este tipo de relação algumas vezes é observada – menor crescimento celular e maior produção de carotenoides totais (AMBATI *et al*, 2018).

Figura 11: Concentração de carotenoides totais nas microalgas cultivadas em água de reúso e no meio controle.



Legenda: CV-WC: *Chlorella vulgaris* no WC; CV-AR: *Chlorella vulgaris* na água de reúso; SE-WC: *Scenedesmus ecornis* no WC; SE-AR: *Scenedesmus ecornis* na água de reúso; SP-Zarrouk: *Spirulina platensis* em Zarrouk; SP-AR: *Spirulina platensis* em água de reúso; SL-Zarrouk: *Spirulina labyrinthiformis* em Zarrouk; SL-AR: *Spirulina labyrinthiformis* em água de reúso.

4.1.5 Produção de ficocianina

Em relação à ficocianina nas *Spirulina labyrinthiformis* e *Spirulina platensis* os valores das concentrações em diferentes meios são bem próximos, no Zarrouk e Água de reúso com NPK. Não houve diferença significativa entre os cultivos das *Spirulinas platensis* e *Spirulina labyrinthiformis*, sendo alcançados os valores de 98,47 mg/g e 101,58 mg/g pela *Spirulina labyrinthiformis*, respectivamente no meio alternativo (Figura 12). No meio Zarrouk, as concentrações atingidas foram de 115,50 mg/g pela *Spirulina platensis* e 123,81 mg/g pela *Spirulina labyrinthiformis*.

O meio de cultivo Zarrouk possui uma concentração muito alta de nitrogênio e não foi possível colocar essa mesma concentração em NPK, pois saturava o meio, sendo a solução encontrada adicionar dez vezes menos NPK, ou seja, dez vezes menos nitrogênio no meio alternativo do que no meio padrão (Zarrouk). De acordo com Dos Santos *et al* (2019) cultivos em que a concentração de nitrato foi dez vezes menor que o meio padrão, não houve prejuízo em relação a concentração final de ficocianina, o que foi observado também nesse estudo.

Chen *et al* (2013) relatam que a ficocianina produzida pela microalga pode ser utilizada como fonte de energia em cultivos em que há limitação de nitrogênio, o autor relata no experimento desenvolvido que quando todo o nitrogênio do meio foi consumido houve uma queda na concentração de ficocianina. Eriksen *et al* (2008) também relatam que as ficobiliproteínas obtiveram um papel secundário como composto de armazenamento de nitrogênio na célula e que são deslocados para outros fins em caso de ausência de nitrogênio. A partir disso podemos também pensar que como o cultivo em AR já começou com uma menor concentração de nitrogênio em relação ao meio Zarrouk, então a microalga após consumir todo nutriente presente no meio, a ficocianina foi consumida como fonte de energia alternativa. Uma das possíveis razões para, mesmo com o aumento da concentração de biomassa no meio alternativo em relação ao Zarrouk, a concentração de ficocianina não ter alteração significativa quando cultivada em AR.

O objetivo principal do cultivo em AR, nesse estudo, foi atingir a maior produção de concentração em biomassa e não foi o foco a maior produção de ficocianina. Todos os parâmetros utilizados nos experimentos (luz, concentração de nutrientes, tempo de cultivo etc) foram utilizados para atingir uma maior concentração em biomassa, não houve uma otimização dos parâmetros para esse objetivo.

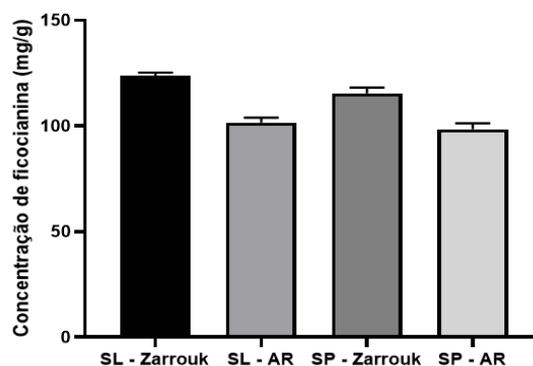
Julanti *et al* (2019) testaram métodos de otimização de extração da ficocianina em biomassa de *Spirulina platensis*, no método de congelamento/descongelamento e quando utilizada água como solvente eles obtiveram uma concentração de 26,4 mg/g de ficocianina. Nesse estudo eles concluíram que o método mais eficiente foi o de congelamento/descongelamento, porém utilizando o tampão fosfato 0,1M e ainda assim alcançaram uma concentração de 37,3 mg/g, um valor abaixo do encontrado no presente estudo que foi até três vezes maior, atingindo uma concentração máxima de 112,34 mg/g. Tavanandi *et al* (2018) relataram que a concentração de ficocianina obtida pelo método de extração de congelamento/descongelamento, o mesmo método utilizado nesse estudo, após 4 ciclos foi de 54mg/g de biomassa da microalga *Spirulina platensis*. A diferença de valores dos resultados encontrados na literatura pode ter muitas explicações, como condições de cultivos, espécies, tempo de cultivo, porém as extrações do presente foram realizadas nas biomassas de forma sequencial, ou seja, em uma mesma biomassa foram extraídos lipídios, carotenoides e, por último, a ficocianina. Por ser da mesma biomassa e por todos os processos de extração passarem por uma etapa de rompimento celular, podemos pensar que essa célula após duas extrações prévias (lipídios e carotenoides) está com o composto mais disponível do que a célula que não teve uma extração prévia. O que justificaria a diferença de valor na

concentração quando comparado ao valor encontrado na literatura. Logo, podemos concluir que extração seriada tem uma influência sobre a concentração de ficocianina, justamente pela explicação dada anteriormente da maior disponibilidade do composto. Marzorati, *et al* (2020) também chegaram a conclusões parecidas quando extraíram ficocianina de uma biomassa que tinha passado previamente por uma extração de carotenoides e clorofilas.

Os resultados encontrados na literatura são apenas em relação à *Spirulina platensis*, não há estudos que mostrem resultados referentes à produção de ficocianina pela *Spirulina labyrinthiformis*, porém ela mostrou que possui um grande potencial de produção, obtendo uma concentração desse composto semelhante à *Spirulina platensis*, atingindo 123,81 mg/g em meio Zarrouk.

Mesmo não tendo um aumento na concentração de ficocianina no meio alternativo, não foi observado uma diminuição na concentração, o que indica que o cultivo em meio com AR é uma boa alternativa de produção de ficocianina com menores custos.

Figura 12: Concentração de ficocianina nas microalgas cultivadas em água de reúso e no meio controle



Legenda: CV-WC: *Chlorella vulgaris* no WC; CV-AR: *Chlorella vulgaris* na água de reúso; SE-WC: *Scenedesmus ecornis* no WC; SE-AR: *Scenedesmus ecornis* na água de reúso; SP-Zarrouk: *Spirulina platensis* em Zarrouk; SP-AR: *Spirulina platensis* em água de reúso; SL-Zarrouk: *Spirulina labyrinthiformis* em Zarrouk; SL-AR: *Spirulina labyrinthiformis* em água de reúso

4.2 Testes de toxicidade em semente de alface (*Lactuca sativa*): 2ª Etapa

Como um dos objetivos desta tese é o de avaliação microalgal como fertilizante ou bioestimulante na agricultura, foram realizados testes de fitotoxicidade com as biomassas cultivadas em água de reúso na germinação de sementes de alface em solo. As biomassas

testadas foram das microalgas *Chlorella vulgaris* cultivada em AR e WC, *Scenedesmus ecornis* cultivada em AR e WC, *Spirulina platensis* cultivada em AR e Zarrouk e *Spirulina labyrinthiformis* cultivada em AR e Zarrouk. Este teste avalia a ação tóxica ou adversa que uma substância presente no meio provoca nas plantas, a qual pode ser determinada pela germinação das sementes, alongamento da raiz e crescimento da muda (GRYCZAK *et al.*, 2018).

Os testes preliminares de toxicidade foram realizados nas duas microalgas cultivadas na primeira fase do estudo, a *Chlorella vulgaris* e a *Spirulina platensis*, representando as espécies clorofíceas e cianofíceas, respectivamente. As microalgas utilizadas nesse experimento preliminar de germinação não tiveram compostos extraídos.

Foram testadas as seguintes concentrações: 1g de biomassa/kg de solo, 2g de biomassa/kg de solo e 4g de biomassa/kg de solo (tabela 14). Foi adicionada água em 60% da capacidade de campo do solo, que foi de 6,4 mL. Os experimentos foram realizados em triplicata e o resultado apresentado na tabela 15 é a média com o seu respectivo desvio padrão.

Tabela 15: Testes preliminares de germinação com três concentrações de biomassa.

Microalga	Biomassa (g)	Solo (g)	Volume de água (mL)
<i>Chlorella vulgaris</i>	0,0025	25	6,4
	0,05		
	0,1		
<i>Spirulina platensis</i>	0,0025	25	6,4
	0,05		
	0,1		

Pelos resultados dos testes preliminares (Tabela 16), não houve diferença significativa entre as médias de índice de velocidade de germinação (IVG) e percentual de germinação (G), com a biomassa da *Spirulina platensis*. Entretanto, no índice de germinação (IG), apresentou uma diferença estatística, sendo o maior IG apresentado na menor concentração de 1g de biomassa/ kg de solo. Por outro lado, o experimento com a biomassa da *Chlorella vulgaris* não apresentou diferença significativa entre os três parâmetros: IVG, G e IG. Desta forma, escolheu-se a concentração de 1g de biomassa/ Kg de solo para os experimentos de toxicidade realizados com todas as microalgas do estudo.

Tabela 16: Resultados dos testes preliminares de toxicidade com *Spirulina platensis* e *Chlorella vulgaris*

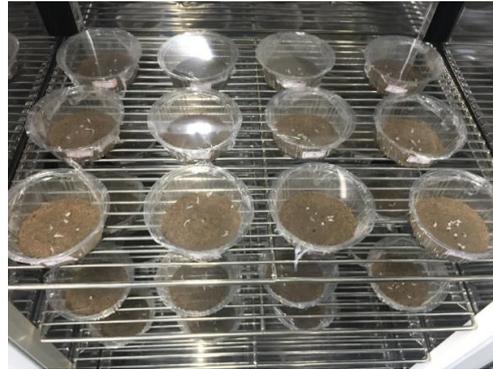
<i>Spirulina platensis</i>			
Condições	IVG	G (%)	IG (%)
Controle	12,10 ± 0,9	-	
1g biomassa / kg solo	12,08 ± 1,0	106,25	89,2
2 g biomassa/ kg solo	11,68 ± 2,1	106,25	45,38
4 g biomassa / kg solo	10,23 ± 2,5	68,75	24,45

<i>Chlorella vulgaris</i>			
Condições	IVG	G (%)	IG (%)
Controle	10,8 ± 0,82	-	-
1g biomassa / kg solo	9,8 ± 0,21	94,40	84,19
2 g biomassa/ kg solo	10,6 ± 0,15	105,50	69,96
4 g biomassa / kg solo	8,4 ± 1,89	88,88	73,91

O índice de germinação (IG) diminuiu à medida que se aumenta a concentração da biomassa, tanto na *Chlorella vulgaris* quanto na *Spirulina platensis*, nas concentrações de 2g de biomassa / kg de solo (45,38% para *Spirulina platensis* e 69,96% para a *Chlorella vulgaris*) e 4g de biomassa / kg de solo (24,45% para *Spirulina platensis* e 73,91% para *Chlorella vulgaris*). Como a variação do IG foi abaixo de 80%, segundo Young *et al* (2012) o meio deve apresentar alguma toxicidade para a germinação da semente. Esse resultado pode ser devido a algum componente presente na biomassa, tanto oriundo do cultivo em água de reúso, que ao ser adicionado na terra com concentrações maiores, causou algum tipo de inibição de germinação.

O próximo experimento (Figura 13) foi realizado com as quatro microalgas em diferentes condições apresentadas na tabela 14, tanto no meio padrão (Zarrouk para as cianofíceas ou WC para as clorofíceas) quanto no meio alternativo (AR). Para esse próximo experimento foi adotada a concentração de 1g de biomassa/kg de solo, pois foi a que apresentou melhores resultados em todos os parâmetros, muito próximo a condição controle.

Figura 13: Recipientes com terra e biomassa em incubadora



Legenda: Teste de toxicidade com sementes de alface em andamento
 Fonte: Autora, 2019

Para esse teste foram utilizados 25g de solo arenoso, com 0,025g de biomassa e adicionada água destilada no volume de 6,4 ml (60% da capacidade de campo do solo). Foram colocadas 10 sementes, previamente esterilizadas, em cada pote com 5 repetições de cada condição. As condições estão presentes na tabela 17. A condição controle foi adicionada somente água destilada. O experimento ocorreu durante cinco dias, em incubadora, com temperatura controlada (25°C) e ausência de luz.

Tabela 17: Condições testadas para cada microalga

Nomenclatura	Condição testada
A	Água de reúso com NPK (célula rompida e retirado o extrato)
B	WC ou Zarrouk (célula rompida e retirado o extrato)
C	Água de reúso com NPK (célula rompida SEM retirar o extrato)
D	WC ou Zarrouk (célula rompida SEM retirar o extrato)
E	Água de reúso com NPK (célula íntegra)
F	WC ou Zarrouk (célula íntegra)

O índice de velocidade de germinação (MAGUIRE, 1962), procura reunir em uma única medida tanto a germinabilidade das sementes como a velocidade com que isto ocorre. Os valores encontrados nas microalgas testadas não tiveram diferença significativa entre as condições testadas e o controle. Na condição em que se utiliza a *Chlorella vulgaris* não apresentou nenhum valor acima do controle, assim como *Scenedesmus*. Na *Spirulina labyrinthiformis*, todos os valores estão abaixo do controle.

	-	84,1 ± 6,2	90,9 ± 8,0	100,0 ± 5,0	95,4 ± 10,2	95,4 ± 10,2	106,8 ± 10,2
Alongamento da raiz (cm)							
	Controle	A	B	C	D	E	F
	1,1 ± 0,3	0,8 ± 0,1	0,4 ± 0,1	1,3 ± 0,05	1,21 ± 0,3	0,6 ± 0,1	1,2 ± 0,2
Índice de velocidade de germinação							
	Controle	A	B	C	D	E	F
	9,6 ± 1,5	9,2 ± 1,2	8,3 ± 2,1	6,9 ± 1,6	6,7 ± 1,4	8,9 ± 1,0	8,3 ± 1,6
Percentual de germinação (G%)							
	Controle	A	B	C	D	E	F
<i>Spirulina labyrinthiformis</i>	-	90,2 ± 10,9	91,5 ± 12,2	89,4 ± 14,1	77,2 ± 7,0	87,8 ± 10,2	85,4 ± 12,2
Índice de germinação (IG%)							
	Controle	A	B	C	D	E	F
	-	49,9 ± 10,1	27,2 ± 9,5	18,8 ± 3,5	25,0 ± 6,8	41,1 ± 13,7	29,0 ± 5,3
Alongamento da raiz (cm)							
	Controle	A	B	C	D	E	F
	1,2 ± 0,2	0,56 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,05	0,4 ± 0,1	0,7 ± 0,3	0,38 ± 0,03

A título de comparação entre os resultados, os valores encontrados nas condições controle da *Chlorella vulgaris* e *Scenedesmus ecornis* são globalmente maiores do que os encontrados na *Spirulina platensis*, porém quando comparamos as condições das espécies ao seu próprio controle, podemos fazer uma melhor análise do comportamento dessas biomassas na germinação da semente de alface.

A *Scenedesmus ecornis* apresentou resultados compatíveis com a condição controle, pode-se observar que algumas condições (A, B, C, D e E) apresentaram alongamento de raiz com valores próximos a condição controle. O mesmo pode ser observado no IVG em todas as condições (A, B, C, D, E e F), onde os valores encontrados não diferem estatisticamente da condição controle. O IG e o G também apresentaram valores próximos a 100% em relação a condição controle. A biomassa da microalga *Scenedesmus ecornis* cultivada em AR e WC se mostrou atóxica quando utilizada em solo com sementes de alface (figura 14).

Figura 14: Semente germinada com raiz desenvolvida da com biomassa da *Scenedesmus ecornis* em água de reúso retirando os extratos



Fonte: Autora, 2019

A *Chlorella vulgaris* também tem a mesma tendência com bom alongamento de raiz e boa velocidade de germinação com valores muito próximos ao controle, o IG e G também seguindo a mesma tendência da microalga comentada anteriormente. As conclusões dos resultados dessa microalga não são muito diferentes das conclusões da *Scenedesmus ecornis*, talvez por serem ambas clorofíceas, possuam características semelhantes que agregam ao desenvolvimento da plântula, não causando efeito tóxico no desenvolvimento da semente.

Nos cultivos em que foram utilizados a *Spirulina labyrinthiformis* as condições tiveram um valor abaixo do controle em todos os parâmetros. O alongamento da raiz e o índice de germinação de todas as condições são menores do que o controle, indicando que há certo impacto mesmo sendo utilizada a concentração mais baixa, de todas as concentrações propostas anteriormente. Não há muitos estudos sobre a *Spirulina labyrinthiformis* para que possa trazer hipóteses sobre o possível impacto negativo da biomassa nas sementes. Dentro dos resultados obtidos essa microalga ficou com os valores de IG abaixo de 80%, que apresentou valores de até 18,8% na condição C (água de reúso com NPK – célula rompida sem retirar o extrato) sendo o maior valor na condição A (água de reúso com NPK – célula rompida e retirado o extrato), de 49,9 %. De acordo com RAS (Regra de análise de semente), umas das análises a serem feitas para germinação de sementes é o crescimento das estruturas essenciais como raízes primárias. No uso da biomassa *Spirulina labyrinthiformis* não houve desenvolvimento das raízes (Figura 15). Pode-se considerar que essa microalga nesse meio de cultivo apresenta efeitos tóxicos para a germinação de semente.

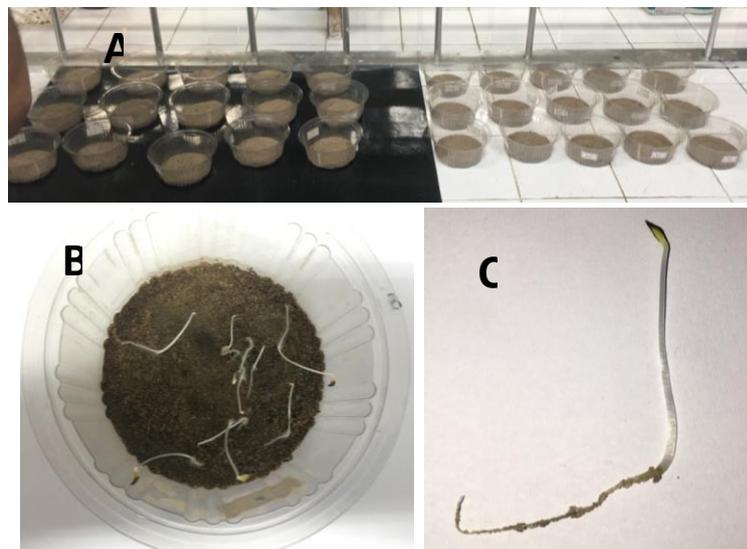
Figura 15: Semente de alface germinada com raiz não desenvolvida quando utilizada a biomassa da *Spirulina labyrinthiformis*



Fonte: Autora, 2019

Nos testes com a *Spirulina platensis* o índice de velocidade de germinação, não houve diferença significativa entre as condições. O percentual de germinação (%G) apresentou um bom resultado nas condições A (101,7%), C (72,1%) e E (108,6%), todas as condições com água de reúso com NPK, sendo as condições A e E com valores acima de 100%, alcançando, respectivamente, 101,7 % e 108,6 %. Possivelmente pelo Zarrouk ser um meio com bastante sais a germinação das sementes nas condições B, D e F pode ter sido afetada, já que pode conter algum resquício de sal na biomassa. O início do processo germinativo tem como característica a absorção de água por embebição. Contudo, a semente precisa alcançar um nível de hidratação que permita que seus processos metabólicos sejam reativados. Com isso, quando há sal presente ele diminui o potencial hídrico do meio de crescimento e como consequência, o aumento do gradiente osmótico entre a semente e o meio, o que dificulta a embebição de água pela semente levando a diminuição do processo germinativo (DUTRA *et al*, 2017). No parâmetro de índice de germinação, todas as condições apresentaram resultados acima de 80%, o que não indica toxicidade da biomassa, porém os melhores resultados foram nas condições C e F com valores, respectivamente, de 100,0% e 106,8%. O parâmetro de IVG leva em consideração tanto a porcentagem de germinação quanto a velocidade em que elas germinam e todas as condições utilizando a biomassa da *Spirulina platensis* obtiveram resultados próximos ao controle. A *Spirulina platensis* é uma microalga já conhecida como segura, ela possui um longo histórico de uso em diversas aplicações (BORTOLINI *et al*, 2022).

Figura 16: Teste de toxicidade feito em laboratório.



Legenda: (A) Preparação dos recipientes com terra; (B) Sementes germinadas no recipiente após 7 dias; (C) Semente de alface germinada.

Fonte: Autora, 2019

Em relação aos resultados obtidos pelas quatro microalgas testadas, as clorofíceas tiveram um bom resultado nos parâmetros analisados, apresentando valores satisfatórios de %G, IG e IVG. Já os testes em cianofíceas, a biomassa da *Spirulina labyrinthiformis* não teve um resultado adequado nos testes, apresentando valores muito abaixo da condição controle, indicando um grau de toxicidade quando utilizada em solo para a germinação da semente de alface. O cultivo em AR pode influenciar em algumas características da composição celular das células que causam esse comportamento tóxico à semente. Porém, como analisado anteriormente, a *Spirulina platensis* apresentou um bom resultado dos parâmetros nas condições em que a microalga foi cultivada em água de reúso, indicando que essa microalga cultivada em água de reúso não apresenta inibição de germinação, ou seja, não apresenta toxicidade.

4.3 Cultivo em garrafão da *Spirulina platensis* e extração seriada dos compostos (3ª Etapa)

Após o cultivo das quatro microalgas em água de reúso e os testes de toxicidade dessa mesma biomassa em sementes de alface, foi determinado que os experimentos posteriores

fossem realizados somente por uma microalga. A escolha da microalga se deu por algumas razões, que são:

- Boa adaptação e boa produção de biomassa da espécie da microalga ao meio alternativo (água de reúso com NPK);
- Concentração dos compostos em meio alternativo;
- Facilidade de separação das células do meio de cultivo;
- Ausência de toxicidade no teste de germinação.

A microalga *Scenedesmus ecornis* não apresentou boa produção de biomassa quando cultivada em água de reúso. Apesar da *Chlorella vulgaris* ter apresentado uma boa produção de biomassa, os compostos extraídos (lipídios e os carotenoides) não apresentaram uma boa concentração. Porém a *Spirulina platensis* e *Spirulina labyrinthiformis* além dos compostos em comum com a *Chlorella vulgaris*, também possuem a ficocianina, um composto de alto valor agregado, o qual apresentou uma boa concentração nas condições de cultivo em que foi submetida. Essa seria uma vantagem em relação às microalgas *Chlorella vulgaris* e *Scenedesmus ecornis*.

Além disso, a *Spirulina platensis* tem uma grande vantagem quando se fala em separação de células do meio, devido a sua morfologia espiralada e sua maior dimensão celular. A *Spirulina labyrinthiformis* também apresenta essa vantagem, pois possui as mesmas características da *Spirulina platensis*. Porém quando falamos sobre toxicidade a *Spirulina labyrinthiformis* não apresentou as mesmas vantagens, pois apresentou efeitos inibitórios na germinação da semente de alface, sendo considerada tóxica. Então seu uso não seria possível na etapa seguinte.

Diante do que foi exposto, foi determinado que a microalga a ser utilizada nos experimentos posteriores seria a *Spirulina platensis*. Pois apresentou uma boa produção de biomassa, dos compostos de interesse e não apresentou toxicidade quando cultivada em meio alternativo (AR com NPK).

A *Spirulina platensis* possui características como alto teor de proteínas (~70%), lipídios (3~9%), carboidratos (15~30%), betacarotenos e vitaminas (incluindo B1, B2 e B12) que permitem uma ampla aplicação, incluindo alimentação humana e animal, que movimenta aproximadamente de 30 a 60 bilhões de dólares anualmente (CARDOSO *et al*, 2020).

Após 15 dias de cultivo o experimento foi encerrado, a microalga foi separada do meio de cultivo através de filtração em tela de nylon, sendo lavada repetidas vezes com água destilada para retirada do sal presente no meio (no caso da microalga da condição controle,

meio Zarrouk), a biomassa recuperada foi colocada em potes de plástico, levadas ao congelador e após 24 horas foram liofilizadas (liofilizador modelo Enterprise II, marca Terroni). A determinação de massa seca foi feita de acordo com o item 3.4 devido à formação de grumos que impediam a análise de crescimento pela densidade óptica e também pela determinação da massa seca por alíquota, pois não há homogeneidade na suspensão celular. Na tabela 19 são apresentados os resultados dos cultivos e da extração dos compostos.

Tabela 19: Cultivo feito em garrafão da *Spirulina platensis* na condição Zarrouk e Água de torneira com NPK.

	Zarrouk	Água com NPK
Biomassa (g/L)	1,29 ± 0,10	1,16 ± 0,16
Lipídios (mg/g)	4,2 ± 0,26	7,8 ± 0,09
Carotenoides (mg/g)	0,2 ± 0,07	0,1 ± 0,07
Ficocianina (mg/g)	121,2 ± 18,4	77,3 ± 6,16

4.3.1 Concentração em biomassa

Em relação à concentração em biomassa seca do cultivo realizado em Zarrouk e Água de torneira com NPK, não houve uma diferença significativa pelos testes estatísticos aplicados. Sendo a concentração em Zarrouk 1,29 g/L e no meio alternativo 1,16 g/L. Já se sabe que a *Spirulina platensis* tem boa performance em meios alternativos (LI *et al*, 2019) e é realmente uma necessidade a otimização da composição de nutrientes nesses meios (GOUVEIA *et al*, 2016), devido ao alto custo de cultivos em grande escala envolvendo o meio Zarrouk, por exemplo (RAGAZA *et al*, 2022).

Nesse estudo foi utilizado somente água de torneira com um fertilizante com um custo muito baixo e a produção de biomassa se manteve praticamente a mesma do cultivo feito em Zarrouk, sem diferença significativa. Os compostos gerados a partir dessa biomassa não serão nas mesmas concentrações do que os gerados no cultivo em meio Zarrouk, pois envolve um estresse para a célula devido à falta de outros nutrientes necessários para sua produção, porém pode ser considerado uma boa alternativa para a otimização de custo de produção. As condições e nutrição das culturas celulares são fatores reconhecidamente significantes para a determinação da composição bioquímica da célula. As várias condições de cultivo e cepas de

microalgas afetam a composição de pigmentos, lipídios, proteínas e carboidratos (AJJAH *et al*, 2020). O objetivo no presente trabalho foi alcançar um meio alternativo de baixo custo que alcançasse a concentração em biomassa igual ou superior ao meio de cultivo Zarrouk e avaliar a produção dos compostos nesse meio.

Devido ao fato de que foi utilizado como suplementação no cultivo um NPK de fórmula fixa (04-14-08), assim que foi colocado uma determinada concentração de nitrogênio no meio de cultivo, aumenta-se conseqüentemente a concentração do fósforo e potássio presente no meio alternativo, que pode influenciar no desenvolvimento das células. Zhu *et al* (2015) observaram que a *Spirulina platensis* apresenta uma taxa de crescimento satisfatória em meios a partir de águas residuais sendo capaz de sobreviver nesse ambiente e manter uma razoável concentração de biomassa, pois ela tende a absorver o fósforo excessivo presente no meio utilizado como estoque de energia para crescimento e biosíntese. Dessa forma, pode-se dizer que o fósforo em grande quantidade presente no meio de cultivo pode ter contribuído para uma boa produção de biomassa.

Pereira *et al* (2019), cultivaram *Spirulina platensis* em soro de queijo e alcançaram, em cultivo autotrófico, uma concentração em biomassa de 2,16 g/L. Mesmo sendo um valor acima do encontrado no recente estudo pode ter sido pelo fato de que foi conduzido em meio estéril e em meio com mais nutrientes em sua composição. O cultivo feito em Zarrouk nesse mesmo trabalho alcançou um valor máximo de 1,75 g/L, sendo coerente com o valor encontrado no presente estudo, na condição controle com Zarrouk. Os cultivos realizados em meios alternativos variam muito de resultado, pois como a maioria não possui uma composição fixa, como é o caso na água de torneira (pode variar a composição de micronutrientes dependendo do dia e horário da coleta), há uma dificuldade em estabelecer um padrão de valores de resultados para esse tipo de experimento. Pode-se inferir algumas suposições e fazer paralelos, mas nenhuma comparação direta pode ser feita devido a grande diferença entre o meio utilizado nesse estudo e os encontrados na literatura.

O fato de a concentração em biomassa nos dois meios de cultivos serem próximas traz um novo caminho para estudo com meios de cultivos mais simples com menores custos com chances de resultados promissores. A questão envolvendo a água de reúso e a água de torneira está relacionada a não utilização de água potável para cultivo desses micro-organismos, uma vez que há um bom crescimento nessas águas. O uso de águas residuais para culturas de microalgas é benéfico para minimizar o uso de água doce e produzindo biomassa de microalgas como recursos biológicos para biocombustíveis ou subprodutos de valor agregado.

É considerado um recurso de alto valor pois podem conter nutrientes necessários para a proliferação e multiplicação em massa de algas.

O cultivo com a *Spirulina platensis* feito na primeira etapa do presente trabalho alcançou uma produção de biomassa em AR de 0,92 g/L enquanto a produção em água de torneira (AT) alcançou uma concentração de 1,16 g/L, conforme mostra a tabela 16. Mesmo os valores sendo próximos quando comparado um ao outro, pode-se observar um comportamento diferente em cada uma delas. Enquanto a concentração de biomassa aumentou 76,9% quando comparado ao controle na 1ª etapa dos experimentos (Tabela 20). Nessa 3ª etapa não houve diferença significativa entre a concentração de biomassa no controle (Zarrouk) e a AT. Atentando para o fato de que os experimentos não foram feitos em paralelo, as células não saíram do mesmo erlenmeyer de cultura para os dois experimentos ao mesmo tempo. Podem ter ocorridos algumas mudanças nas células no intervalo de tempo entre os experimentos.

Tabela 20: Tabela comparativa dos valores da concentração em biomassa nos cultivos da 1ª etapa do trabalho e da 3ª etapa nos cultivos com AR e AT, respectivamente

		Biomassa (g/L)	
1ª Etapa	Zarrouk	0.52 ± 0.01	Aumento de 76,9 %
	AR com NPK	0.92 ± 0.10	
3ª Etapa	Zarrouk	1,29 ± 0,10	NS
	AT com NPK	1,16 ± 0,16	

A AR se mostrou mais eficiente quando se trata em produção de biomassa, pois essas águas, oriundas de estação de tratamento de esgoto, contém substâncias orgânicas e inorgânicas que podem contribuir para um melhor crescimento das células. Por outro lado a AT, mesmo não apresentando um aumento expressivo na concentração de biomassa quando comparada ao Zarrouk da mesma etapa, o cultivo nesse meio alcançou um resultado muito próximo ao controle. A composição dessa água utilizada pode variar de acordo com a região e do sistema de abastecimento de água da região, mas basicamente ela é composta por: água, minerais, cloro, fluoreto e substância orgânica e inorgânica, de acordo com a Secretária de Vigilância em Saúde (2006). Porém, mesmo com esse resultado menor que o resultado apresentado na 1ª etapa, ainda pode ser considerada uma boa alternativa para cultivo de baixo custo desses micro-organismos, pois ao ser atingido um valor na mesma concentração que o

cultivo em meio Zarrouk, há uma economia nos custos de produção, devido ao baixo valor da suplementação utilizada (NPK).

4.3.2 Lipídios neutros

A concentração de lipídios neutros foi maior na condição com AT do que na condição controle, atingindo os valores de 7,8 mg/g e 4,2 mg/g, respectivamente. O cultivo realizado em Zarrouk possui todos os nutrientes necessários para o pleno crescimento e desenvolvimento das microalgas, sem levar em consideração os fatores externos (luz, temperatura, aeração etc) que influenciam também no crescimento desses micro-organismos. Guldhe *et al* (2017) afirma que metabólitos como proteína na biomassa de microalgas são altamente dependentes da composição do meio e das condições de cultivo. A limitação de nitrogênio ou esgotamento dessa fonte em águas residuais levam a célula da microalga a desviar a síntese de proteínas para produzir carboidratos ou lipídios.

Dito isso, o maior valor na concentração de lipídios ocorreu, de fato, no meio em que há algum tipo de estresse para a célula, o meio em que se utiliza somente a AT com NPK. Em primeiro lugar, ele não tem a mesma concentração de nitrogênio que o meio Zarrouk, no meio alternativo foi colocada uma concentração dez vezes menor de nitrogênio que o meio Zarrouk.

Kamalanathan *et al* (2015) realizaram testes em microalgas com limitação de nitrogênio e constataram que ao cultivar esses micro-organismos em um ambiente com depleção desse nutriente há um aumento dos lipídios neutros, porém há uma diminuição no crescimento celular. Rahim *et al* (2021) realizaram um estudo a *Spirulina platensis* onde ela foi cultivada em águas de poço contendo cinzas de madeira, e concluíram que o uso de meios de cultivos baratos e prontamente disponíveis podem alcançar uma boa produção de biomassa e compostos de alto valor agregado. Andrade *et al* (2019) relataram que o estresse causado pela limitação de oxigênio, redirecionou a o metabolismo celular para síntese de compostos reserva (carboidratos ou lipídios). Braga *et al* (2018) relacionaram os resultados do esgotamento de nitrogênio do meio de cultivo com a redução do crescimento das microalgas e redirecionamento das vias metabólicas.

Nos cultivos realizados na etapa 1 foi obtido um valor de lipídios neutros acima do encontrado nos cultivos da etapa 3. Entretanto, os valores da concentração em biomassa estão

diferentes também, sendo a maior concentração de biomassa nos cultivos realizados nessa última etapa. Seria necessário mais teste para determinar a causa de uma diferença tão grande de concentração. Esses experimentos não foram feitos em concomitadamente, sendo realizados em diferentes momentos, com dois anos de intervalo entre eles, devido a pandemia da COVID-19.

Porém, há coerência nos resultados obtidos nas duas etapas. Na 1ª etapa, foi relatado sobre a possível composição da AR não ter sido suficiente estressante para causar um desvio do metabolismo da célula para acúmulo de lipídios. Nessa mesma linha de raciocínio, o meio utilizado nessa etapa, composto por AT, com menos substâncias favoráveis ao crescimento da célula, pode ter causado um estresse suficiente para aumentar a concentração de lipídios em até 85% a mais do que na condição controle (Tabela 21).

Tabela 21: Tabela comparativa dos valores da concentração de lipídios neutros nos cultivos da 1ª etapa do trabalho e da 3ª etapa nos cultivos com AR e AT, respectivamente

		Lipídios neutros (mg/g)
1ª Etapa	Zarrouk	40.75 ± 2,75
	AR com NPK	42.75 ± 1,06
3ª Etapa	Zarrouk	4,2 ± 0,26
	AT com NPK	7,8 ± 0,09

4.3.3 Carotenoides totais

Com relação aos carotenoides totais, em *Spirulina platensis* foi alcançado um valor de 0,2 mg/g na condição controle com Zarrouk e 0,1 mg/g no cultivo em AT, estatisticamente não há diferença entre as concentrações ($p < 0,05$). Essa baixa concentração no meio controle pode ser devido a influência da extração prévia de lipídios neutros, como visto anteriormente no item 4.2 existe uma captura dos betacarotenos quando precedida de uma extração com solvente apolar, o que também causaria uma baixa concentração na condição com AT. A tabela 21 reúne os valores das concentrações encontradas nos experimentos das duas etapas.

O conteúdo de carotenoides relatado na *Spirulina platensis* varia de 0,1 a 0,4 mg/g (AMBATI *et al*, 2018; KUMAR *et al*, 2013). O que condiz com o que foi encontrado nesse

experimento, essa faixa de concentração. Um dos fatores mais críticos que afetam a produção de lipídios, carotenoides e biomassa como um todo é a composição do meio em que as microalgas são cultivadas e o estágio em que são recolhidas (MINHAS *et al*, 2020). Como nesses experimentos não foi possível fazer um acompanhamento do crescimento por dia das células, devido a formação de grumos no cultivo, não foi possível identificar o estágio em que a *Spirulina platensis* foi recolhida, porém, de modo geral, com 15 dias de cultivo ela já está entrando na fase estacionária. Uma outra questão também é a composição do meio de cultivo, todos os parâmetros analisados nos experimentos realizados nessa 3ª etapa estão com resultados diferentes dos parâmetros dos experimentos da 1ª etapa, levando a conclusão de que a composição do meio alternativo, apesar da suplementação ser igual (concentração de npk), exerceu influência sobre o metabolismo da microalga e, conseqüentemente, gerou resultados diferentes dos apresentados na 1ª etapa (Tabela 22).

Cardoso *et al* (2020) relatam que os carotenoides são biomarcadores sensíveis a poluente em meio aquoso, quanto maior seu valor, maior é a poluição presente no meio de cultura, o que pode também justificar o maior valor de concentração encontrado no cultivo em AR com NPK da 1ª etapa. A AR é uma água de reúso coletada na saída da estação de tratamento de esgoto, há mais compostos presentes do que na água de torneira, utilizada no cultivo da 3ª etapa.

Além de uma menor produção do composto, ainda podemos contar com o sequestro de betacaroteno na extração prévia de lipídios, o que reduziria ainda mais a concentração dos carotenoides na biomassa, já que é a segunda extração a ser realizada.

Tabela 22: Tabela comparativa dos valores da concentração de carotenoides totais nos cultivos da 1ª etapa do trabalho e da 3ª etapa nos cultivos com AR e AT, respectivamente

		Carotenoides (mg/g)
1ª Etapa	Zarrouk	1.05 ± 0.10
	AR com NPK	1.21 ± 0.2
3ª Etapa	Zarrouk	0,2 ± 0,07
	AT com NPK	0,1 ± 0,07

4.3.4 Produção de ficocianina

Em relação aos valores encontrados para ficocianina nos meios Zarrouk e AT foram 121,2 mg/g e 77,3 mg/g, respectivamente, há uma diferença estatística nesses valores (Tabela 23). O meio de cultivo composto pela AT possui uma concentração muito menor (dez vezes menos) de nitrogênio do que o meio de cultivo Zarrouk, o que levaria a uma redução da produção desse composto, uma vez que sua produção está diretamente relacionada a presença de nitrogênio no meio.

O cultivo em AT reduziu a concentração de ficocianina na célula em 36%, uma vez que ao ser extraída após duas extrações, o composto está muito disponível para o solvente. Não sendo uma questão de método de extração e, sim, de produção do composto pela célula. Tavanandi *et al* (2018) para atingir o valor máximo de ficocianina produzida pela microalga em seu estudo, realizou extrações seriadas na mesma biomassa para atingir o valor máximo de produção de ficocianina na biomassa. O cultivo em AR na 1ª etapa acarretou na redução de aproximadamente 14% na concentração de ficocianina.

Essa diferença na redução na porcentagem da concentração de ficocianina no meio alternativo, entre AR e AT, se deve ao fato de que, muito provavelmente, há uma diferença na composição dessas águas, como observado nos itens anteriores, e gera uma influência na produção desse composto pela célula.

Tabela 23: Tabela comparativa dos valores da concentração de carotenoides nos cultivos da 1ª etapa do trabalho e da 3ª etapa nos cultivos com AR e AT, respectivamente

		Ficocianina (mg/g)
1ª Etapa	Zarrouk	115,50 ± 2,70
	AR com NPK	98,47 ± 2,73
3ª Etapa	Zarrouk	121,2 ± 18,4
	AT com NPK	77,3 ± 6,16

Entre todos os parâmetros analisados nesse experimento, esse resultado é o mais parecido com o encontrado na 1ª etapa do trabalho e é um valor de concentração acima do

encontrado na literatura. Diversos autores (JULANTI *et al*, 2019; TAVANANDI *et al*, 2018; CHEN *et al*, 2013, MARZORATI *et al*, 2020) relatam que em extrações parecidas com a reproduzida nesse estudo, as concentrações alcançadas foram abaixo dos valores encontrados no presente estudo. O método de congelamento/descongelamento é amplamente utilizado e muito seguro, pois o solvente utilizado é água destilada.

4.4 Teste em incubadora de potencial bioestimulante da biomassa em sementes de tomate (*Solanum lycopersicum*):4ª Etapa

O uso de bioestimulante em cultivos agrícolas tem sido alvo de estudos em diversas culturas, pois podem promover o crescimento e desenvolvimento de plantas, estimular a divisão celular e promover a diferenciação e alongamento celular. Ao serem utilizados em plantas, devido a sua característica protetora de estresse abiótico, esses bioestimulante reduzem a necessidade de fertilizantes e podem aumentar a produtividade. Porém os efeitos dependem da concentração, natureza e proporção das substâncias contidas no produto (MURTIC *et al*, 2019).

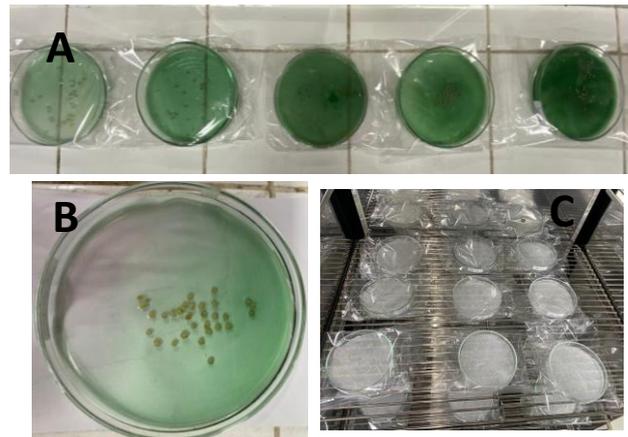
Com o objetivo de aumentar a produtividade, melhorar a qualidade e facilitar a colheita, os bioestimulantes podem ser aplicados em diferentes órgãos e em diferentes fases da planta (folhas, sementes e frutos) (ISSA *et al*, 2021). Dito isso, nesse tópico foram avaliados os efeitos da biomassa da *Spirulina platensis* residual, ou seja, após processo de extração sequencial, realizado no tópico 4.3, como bioestimulante na germinação de sementes de tomate (*Solanum lycopersicon L*).

4.4.1 Teste preliminar para determinar concentração de biomassa

Inicialmente foi feito um teste preliminar (Figura 17) com a biomassa da *Spirulina platensis* em seis concentrações diferentes de biomassa (s1: 1g/L, s2: 2g/L, s3: 4g/L, s4: 6g/L e s5: 8g/L) para determinar a concentração com melhor desempenho no processo germinativo das sementes e, posteriormente, executar os testes com todas as condições com a biomassa

residual pós extração dos compostos. As concentrações foram utilizadas para produção de um extrato para ser adicionado as sementes. O controle foi feito somente com água destilada.

Figura 17: Experimento preliminar realizado em laboratório: (A) Sementes embebidas nas soluções em diferentes concentrações; (B) Sementes embebidas por 24 na solução 1; (C) Início de experimento, sementes em placa Petri na incubadora.



Legenda: (A) Placas Petri com extratos de microalgas nas concentrações S1, S2, S3, S4 e S5 (da esquerda para direita); (B) Sementes imersas no extrato de microalga *Spirulina platensis*; (C) Placas Petris em incubadora no início do experimento.

Fonte: Autora, 2022

Na tabela 24 estão apresentados os resultados dessa fase preliminar. Estatisticamente o %G e o comprimento da raiz (CR) não possuem diferenças significativas. Mas a energia de germinação (EG) e o número de raízes laterais (RL) apresentaram diferenças, sendo o controle, em ambos os parâmetros, menor que as condições de tratamento com biomassa.

Tabela 24: Resultados dos testes preliminares com diferentes concentrações de biomassa

	G (%)	EG (%)	CR (cm)	RL (cm)
Controle	93,3 ± 5,7	41,8 ± 8,8	6,4 ± 0,4	2,0 ± 0,3
S1	96,7 ± 5,7	93,3 ± 11,5	7,5 ± 0,8	3,7 ± 0,8
S2	100 ± 0,0	86,7 ± 15,2	7,3 ± 0,5	3,4 ± 0,2
S3	96,7 ± 5,7	85,9 ± 7,0	6,4 ± 1,2	3,4 ± 0,4
S4	96,7 ± 5,7	82,6 ± 6,5	6,5 ± 1,0	3,0 ± 0,9
S5	100 ± 0,0	89,6 ± 0,6	8,4 ± 0,6	5,9 ± 0,4

Legenda: S1: extrato com concentração de 1g/L; S2: extrato com concentração de 2g/L; S3 extrato com concentração de 4g/L; S4 extrato com concentração de 6g/L; S5: extrato com concentração de 8g/L.

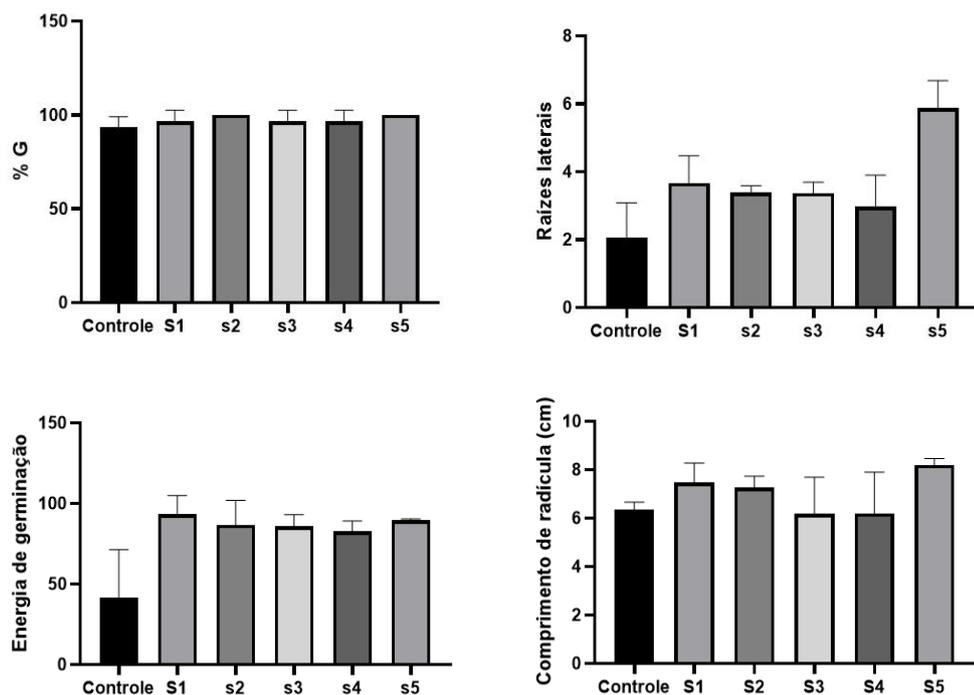
Fonte: Autora, 2023

O percentual de germinação (%G) foi acima de 90% na condição controle e para todas as concentrações que foram testadas, ou seja, praticamente todas as sementes germinaram.

Lembrando que é contada como semente germinada as que apresentaram formação de radícula maior ou igual a 2mm. Podemos observar um valor um pouco acima do controle nas soluções S2 e S5, com 100% de germinação em ambas as concentrações.

No parâmetro de energia de germinação (EG) foi alcançado um valor de 41,85 % na condição controle, valor acima do encontrado nas condições de tratamento, que variou entre 82,6% e 93,3%. Esse parâmetro nos informa sobre a velocidade em que a semente germina. Na condição controle, após três dias do início da germinação apenas 1 semente havia sido germinada, enquanto na condição S5, por exemplo, 9 sementes já haviam sido germinadas no mesmo período, ou seja, um número maior de sementes germinadas em um mesmo espaço de tempo.

Figura 18: Resultados do experimento preliminar para determinação de concentração de biomassa. Percentual de germinação (%G), número de raízes laterais, energia de germinação (EG) e comprimento de radícula (CR).



Legenda: S1: extrato com concentração de 1g/L; S2: extrato com concentração de 2g/L; S3 extrato com concentração de 4g/L; S4 extrato com concentração de 6g/L; S5: extrato com concentração de 8g/L
Fonte: Autora, 2023

Um outro parâmetro analisado foi a quantidade de raízes laterais desenvolvidas nas radículas. Foi constatado uma diferença significativa entre as médias, sendo S5 (8g/L) a condição com maior número de raízes laterais encontrada. Devido aos resultados de %G e CR

não apresentarem uma diferença significativa de resultados entre as condições avaliadas, o fator determinante para a escolha da concentração a ser utilizada em experimentos posteriores foi a energia de germinação e a quantidade de raízes laterais encontradas nas radículas.

O padrão observado no desenvolvimento de RL nas sementes de tomate pela condição S5, na concentração de 8g/L, sugere uma ação similar a observada pelos hormônios do crescimento, especialmente as auxinas que promovem, dentre outras coisas, o aumento do número de raízes laterais (SILVA *et al*, 2011). Dessa forma, essa foi a concentração escolhida para os testes em diferentes condições com biomassa residual da *Spirulina platensis*, pois a aplicação dessa concentração em biomassa mostrou benefícios em relação a condição controle.

4.4.2 Testes do potencial bioestimulante com a biomassa de *Spirulina platensis* em todas as condições pré-determinadas

Existem poucos estudos sobre o uso da biomassa de microalgas cultiváveis como matéria-prima no setor agrícola e há limitações em relação às evidências dos efeitos dos extratos em culturas (MÓGOR *et al*, 2018).

A partir da concentração definida no item anterior, os experimentos foram conduzidos de maneira similar ao já realizado anteriormente, na concentração de 8g/L de biomassa da *Spirulina platensis* nas condições apresentadas na tabela 25.

Tabela 25: Condições testadas no experimento de bioestimulante

Nomenclatura	Condição testada
Controle	Água destilada
A	Zarrouk (célula rompida SEM retirar o extrato)
B	Zarrouk (célula rompida e retirado o extrato)
C	AT com NPK (célula rompida SEM retirar o extrato)
D	AT com NPK (célula rompida e retirado o extrato)
E	Zarrouk (célula íntegra)
F	AT com NPK (célula íntegra)

Legenda: Condições testadas em biomassa de *Spirulina platensis* cultivada em água de torneira (AT) e Zarrouk.

Nos testes estatísticos realizados não foram encontradas diferenças significativas entre as médias no percentual de germinação (%G). Em todas as condições, inclusive na condição controle, foram obtidos valores próximos de 100% de germinação nas sementes de tomate (Tabela 26).

Tabela 26: Resultados dos experimentos com biomassa residual de *Spirulina platensis*

	%G	EG (%)	CR (cm)	RL (Un)
Controle	98,00 ± 4,5	15,0 ± 5,7	4,9 ± 1,1	2,1 ± 1,3
A	98,00 ± 4,5	73,3 ± 5,7	6,8 ± 1,0	3,0 ± 0,5
B	90,00 ± 7,1	63,6 ± 12,1	6,6 ± 0,3	2,4 ± 0,5
C	98,00 ± 4,5	41,6 ± 2,8	6,5 ± 1,3	1,6 ± 1,3
D	90,00 ± 7,1	66,6 ± 8,2	7,4 ± 0,9	2,0 ± 0,9
E	92,00 ± 4,5	40,9 ± 7,2	5,9 ± 0,8	2,1 ± 0,2
F	98,00 ± 4,5	43,6 ± 4,7	6,1 ± 0,6	1,9 ± 0,4

Legenda: %G: Percentual de germinação; EG: energia de germinação; CR: comprimento de radícula; RL: raízes laterais.

No quesito da energia de germinação (EG) foi observada uma diferença significativa entre a condição controle e as demais condições testadas. A EG no controle foi de 15% e o maior valor encontrado nas demais condições foi na condição A (biomassa residual do cultivo em Zarrouk com a célula rompida sem retirar os extratos) com 73,3%.

A energia de germinação é feita através de uma fórmula que se usa o número de sementes germinadas no terceiro dia de germinação. Quanto maior for esse número maior a energia. Quando se tem uma energia de germinação acima do controle significa que nessa condição germinaram mais sementes do que o controle, em um mesmo período. Mesmo que no total de sementes germinadas (%G) a quantidade não tenha variação. Com isso, pode-se dizer que o aumento da energia de germinação em determinadas condições pode ser devido a uma bioestimulação causada por um componente da biomassa e/ou do meio cultivo utilizado para cultivo dela.

A condição A foi a que se utilizou biomassa de cultivo em meio Zarrouk, com os compostos disponíveis. Ou seja, a célula foi rompida mas os compostos não foram retirados. O extrato utilizado nessa condição A tem disponível para estimular um aumento na energia de germinação são os lipídios neutros, carotenoides totais e a ficocianina. Compostos com características possivelmente favoráveis a bioestimulação da germinação.

Apesar dessa condição (A) ter sido a de maior valor entre todas as outras, as demais condições também apresentaram valores acima do controle. Em diferentes graus, as biomassas

foram favoráveis a uma germinação antes do controle. As sementes embebidas com os extratos das biomassas, apresentaram uma maior energia de germinação.

Garcia-Gonzalez & Sommerfield (2015) obtiveram resultados em sementes de tomate em resposta a extratos de microalgas na germinação de sementes, com um aumento da velocidade de germinação em até 63%. Os autores sugeriram que de acordo com os métodos de aplicação dos extratos, o efeito bioestimulante tende a ser melhor. De acordo com os autores, a biomassa tem um efeito estimulante na germinação.

A disponibilidade de nutrientes no meio influencia o crescimento, a composição bioquímica e o metabolismo primário das microalgas (LOURENÇO, 2006). Esses resultados indicam que as microalgas possuem potencial na produção de moléculas bioativas, como proteínas e carboidratos, que são capazes de estimular o crescimento vegetal (MOGOR *et al*, 2017) e conferir maior tolerância a estresse biótico e abiótico (DERNER *et al*, 2006)

No comprimento de radícula (CR) a biomassa apresentou um papel de alongador de raiz, ao observar o valor obtido na condição controle de 4,9 cm e nas demais condições, atingindo seu valor máximo na condição D com 7,4 cm de radícula.

Figura 19: Comprimento das radículas (CR) das sementes germinadas

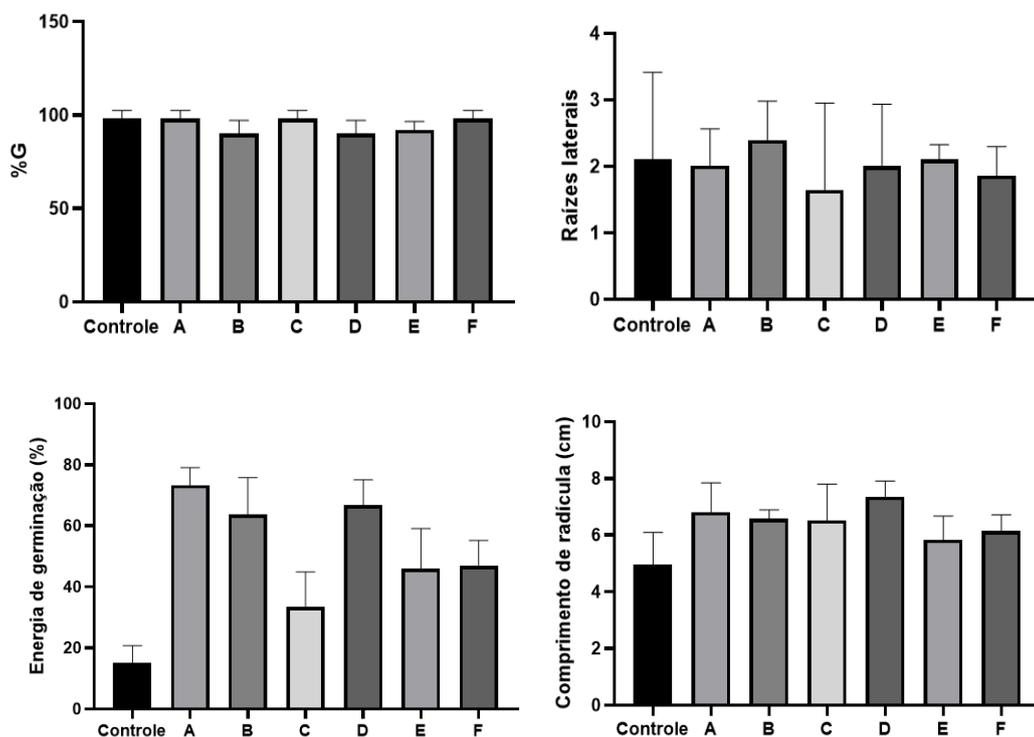


Fonte: Autora, 2022

O sistema radicular é de extrema importância para as plantas, desempenhando várias funções essenciais para seu crescimento e desenvolvimento. Ele consiste em raízes primárias (principal) e as secundárias (raízes laterais). Entre suas funções estão a absorção de água e

nutrientes, fixação da planta no solo, armazenamento de nutrientes e água, estabilidade do solo, trocas gasosas etc (FIGUEROA-BUSTOS *et al*, 2008). Com isso, utilizar substâncias que promovam o desenvolvimento radicular é de grande vantagem para a cultura da planta. A biomassa da *Spirulina platensis* na condição D, cultivada em AT com NPK, apresentou um bom resultado quando analisado o comprimento de radícula, um valor acima da condição controle, um aumento de 51% no comprimento da raiz. Mesmo sendo estruturas primárias nessa etapa do desenvolvimento da planta, a tendência é que o bioestimulante continue atuando em outras fases do amadurecimento vegetal, através de uma nova aplicação. Uma vez que a germinação é só o estágio inicial da planta, a biomassa pode trazer muito mais vantagens além do estímulo a germinação e aumento de radícula.

Figura 20: Resultados do experimento com a biomassa residual da *Spirulina platensis*: Percentual de germinação (%G), número de raízes laterais, energia de germinação (EG) e comprimento de radícula (CR)



Segundo Dos Santos *et al* (2021), quanto menor o tempo de germinação, maior será o índice de velocidade de germinação. Estes parâmetros estão associados e permitem inferir sobre a qualidade das sementes. Também dependem da espécie em estudo e das condições do experimento/ambientais as quais as sementes estão submetidas. Dessa maneira, neste estudo

pode-se afirmar que o parâmetro de energia de germinação está relacionado com o menor tempo e a maior velocidade de germinação. Considerando que, a germinação rápida é característica de espécies cuja estratégia é se estabelecer o mais rápido possível, aproveitando condições ambientais para o desenvolvimento do novo indivíduo (Ferreira & Borghetti 2004).

Estudos anteriores mostram reações da aplicação de extratos de microalgas em vegetais em diferentes fases de desenvolvimento, provocam aumento no número de raízes. Comportamento similar ao provocado à aplicação de ácido indolbutírico (auxina). Ela é exigida em concentrações muito baixas para o crescimento das raízes, pois em concentrações elevadas podem inibir o crescimento (DOS SANTOS *et al*, 2021). Em estudos realizados com a *Spirulina platensis*, o crescimento das raízes foi atribuído a bioatividade de aminoácidos, com crescimento do comprimento total das raízes em até 27,9% (MORGOR *et al*, 2018). Esses resultados podem variar de acordo com o método, frequência de aplicação e dosagem.

4.5 Custos do cultivo da *Spirulina platensis* em água de reuso

Os custos de produção do meio alternativo são baixíssimos quando comparados ao meio padrão utilizado nos cultivos de microalgas, chegando a uma redução de até 90% no valor por litro do meio de cultivo. Na tabela 27, pode-se observar os valores em reais dos custos de todos os meios utilizados para cultivar as microalgas do presente trabalho. Os custos são em relação as concentrações presente no meio de cada nutrientes.

Tabela 27: Cálculo dos custo de produção do meio alternativo

Zarrouk			
Composto	Concentração utilizada (g/L)	R\$/kg	R\$/L
NaHCO ₃	13,61	29,00	0,395
Na ₂ CO ₃	4,03	73,90	0,298
K ₂ HPO ₄	0,50	37,60	0,019
NaNO ₃	2,50	12,50	0,031
K ₂ SO ₄	1,00	31,40	0,031
NaCl	1,00	15,70	0,016
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,20	19,20	0,004
EDTA	0,08	32,77	0,003
FeSO ₄ 7H ₂ O	0,01	160,00	0,002
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,04	505,00	0,020
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,01	677,00	0,007
ZnSO ₄ .7H ₂ O	1,00	852,00	0,852
Co(NO) ₃ .6H ₂ O	1,00	570,00	0,570
MnSO ₄ 7H ₂ O	1,00	940,00	0,940
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	1,00	4142,00	4,142
Total			7,329

R\$/L

Água de reúso com NPK			
Composto	Concentração utilizada (g/L)	R\$/kg	R\$/L
NPK	1,025	17,9	0,018
NaHCO ₃	13,61	29,00	0,395
Na ₂ CO ₃	4,03	73,90	0,298
Total			0,711

R\$/L

CONCLUSÃO

- No cultivo realizado inicialmente utilizando água de reúso como meio de cultivo em quatro microalgas (*Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus ecornis*, *Spirulina platensis* e *Spirulina labyrinthiformis*) obteve-se um bom resultado em concentração de biomassa (g/L), principalmente na *Chlorella vulgaris* e *Spirulina platensis*.
- Foi obtido também uma boa concentração de determinados compostos em extração feita posteriormente como a ficocianina, produzida pela *Spirulina platensis* e *Spirulina labyrinthiformis*, alcançando valores de quase três vezes os valores relatados na literatura.
- No teste de toxicidade realizado para avaliar possíveis efeitos tóxicos dessas biomassas cultivadas em águas de reúso, pode-se observar efeito tóxico somente na microalga *Spirulina labyrinthiformis*. Foram obtidos bons resultados para *Chlorella vulgaris* e *Scenedesmus ecornis*. A *Spirulina platensis* apresentou toxicidade nas condições em que foram utilizado o meio Zarrouk, devido a sua salinidade, porém nas condições em que foi utilizada a água de reúso, os valores dos parâmetros ficaram acima do controle.
- Foi escolhida a microalga *Spirulina platensis* para prosseguimento dos experimentos devido aos seguintes fatores: (1) Fácil separação de célula/meio; (2) Produção de um composto de alto valor agregado, a ficocianina, com uma alta concentração (mg/g); (3) Fácil adaptação a meios alternativos; (4) Não apresentou toxicidade na germinação de sementes de alface quando cultivada em meio alternativo;
- Nos testes de bioestimulante, a condição que teve o melhor desempenho foi a D, que é a biomassa do cultivo feito em AT com NPK com a retirada de todos os extratos. Essa condição obteve um maior alongamento de raiz e uma maior energia de germinação, quando comparada ao controle.

REFERÊNCIAS

ABDEL-RAOUF, N.; AL-HOMAIDAN, A. A.; IBRAHEEM, I. B. M. Microalgae and wastewater treatment. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 19, n. 3, p. 257–275, 2012.

ABURAI, N.; SUMIDA, D.; ABE, K. Effect of light level and salinity on the composition and accumulation of free and ester-type carotenoids in the aerial microalga *Scenedesmus* sp. (Chlorophyceae). **Algal Research**, v. 8, p. 30–36, 1 mar. 2015a.

AGEITEC – **Agência Embrapa de Informação Tecnológica**. Semente. 2010. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/feijao/arvore/CON_TAG01_9_131120_0215101.html>. Acessado em: Ago, 2018.

AJIJAH, N. et al. **Utilization of tofu wastewater as a cultivation medium for *Chlorella vulgaris* and *Arthrospira platensis***. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. **Anais...Institute of Physics Publishing**, 12 jun. 2020.

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

ALISHAH ARATBONI, H. et al. Biomass and lipid induction strategies in microalgae for biofuel production and other applications. Microbial Cell Factories BioMed Central Ltd., , 21 out. 2019.

ALVES, M. da C. S.; MEDEIROS-FILHO, S.; ANDRADE-NETO, M.; TEÓFILO, E. M. Superação da dormência em sementes de *Bauhinia monandra* Brit. ou *Bauhinia angulata* L. - Caesalpinoideae. **Revista Brasileira de Sementes**, v.22, n.2, p.139-144, 2000.

AMBAT, I. et al. A synergic approach for nutrient recovery and biodiesel production by the cultivation of microalga species in the fertilizer plant wastewater. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, 1 dez. 2019.

AMBATI, R. R. et al. Industrial potential of carotenoid pigments from microalgae: Current trends and future prospects. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition** Taylor and Francis Inc., , 4 jul. 2019.

AMMAR, S. H.; KHADIM, H. J.; MOHAMED, A. I. Cultivation of *Nannochloropsis oculata* and *Isochrysis galbana* microalgae in produced water for bioremediation and biomass production. **Environmental Technology and Innovation**, v. 10, p. 132–142, 1 maio 2018.

ANDRÉA, M. M. Contaminação do solo por pesticidas. **O Biológico**, v.60, n.2, p.63-65, 1998.

ANSARI, F. A. et al. Techno-economic estimation of wastewater phycoremediation and environmental benefits using *Scenedesmus obliquus* microalgae. **Journal of Environmental Management**, v. 240, p. 293–302, 15 jun. 2019.

ANSARI, F.A., SINGH, P., GULDHE, A., BUX, F. Microalgal cultivation using aquaculture wastewater: integrated biomass generation and nutrient remediation. **Algal Res.** 21, 169e177. 2017

ARAÚJO, B.M., SANTOS, A.S.P., SOUZA, F.P., Comparativo econômico entre o custo estimado do reúso do efluente de ETE para fins industriais não potáveis e o valor da água potável para a região sudeste do Brasil. **Persp. Online: exatas & eng.**, Campos dos Goytacazes, 17 (07) 51–61. 2017

ARAUJO, G. S. et al. Nutrient removal by *Arthrospira platensis* cyanobacteria in cassava processing wastewater. **Journal of Water Process Engineering**, v. 40, 1 abr. 2021.

ARBIB, Z., RUIZ, J., ÁLVAREZ-DÍAZ, P., GARRIDO-PÉREZ, C., & PERALES, J. A. Capability of different microalgae species for phytoremediation processes: Wastewater tertiary treatment, CO₂ bio-fixation and low cost biofuels production. **Water Research**, 49, 465–474. doi:10.1016/j.watres.2013.10.036. 2014

ASLAN, S., & KAPDAN, I. K. (2006). Batch kinetics of nitrogen and phosphorus removal from synthetic wastewater by algae. **Ecological Engineering**, 28(1), 64–70. doi:10.1016/j.ecoleng.2006.04.003. 2006.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 13969: Tanques sépticos - Unidades de tratamento complementar e disposição final dos efluentes líquidos - Projeto, construção e operação. Rio de Janeiro, 1997

BALECH, E. Introducción al Fitoplancton Marino. Buenos Aires: **Editorial Universitaria de Buenos Aires**, 212 p. 1977.

BARROS, A. I., GONÇALVES, A. L., SIMÕES, M., & PIRES, J. C. M. Harvesting techniques applied to microalgae: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 41, 1489–1500. doi:10.1016/j.rser.2014.09.037. 2015

BARSANTI, L., e GUALTIERI, P. Algae: anatomy, biochemistry, and biotechnology: CRC press. 2014.

BASKIN, C.C. & BASKIN, J. M. Seeds: ecology, biogeography and evolution of dormancy and germination. San Diego: Acad. Press, 1998.

BATISTA, A. P., AMBROSANO, L., GRAÇA, S., SOUSA, C., MARQUES, P. A. S. S., RIBEIRO, B., GOUVEIA, L. Combining urban wastewater treatment with biohydrogen production – An integrated microalgae-based approach. **Bioresource Technology**, 184, 230–235. doi:10.1016/j.biortech.2014.10.064. 2015

BECKER, E. Microalgae: Biotechnology and Microbiology, **Cambridge University Press**, 1994.

BECKER, E. W. Microalgae as a source of protein. **Biotechnol. Adv.** 25: 207–210, 2007.

BECKER, E. W. Microalgae in human and animal nutrition. Em RICHMOND, A. (ed.) **Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology**. London: Blackwell Science. 312 – 351, 2004.

BECKER, E. W., Microalgae: biotechnology in microbiology. **Cambridge University Press**, p. 293, 1994.

BEHIN, J. Deinking in bubble column and airlift reactors: Influence of wastewater of Merox unit as pulping liquor. **Chemical Engineering Research and Design**, 90(8), 1045-1051, 2012.

BEHRENS, P. W. & KYLE, D. J. Microalgae as a source of fatty acids. **Journal of Food Lipids**, 3, 259, 1996.

BENEMANN J.R. Opportunities and challenges in algae biofuels production - A Position Paper. - **Algae World**. 2008.

BERG, J. M.; Tymoczko, J. L.; Stryer, L. Biochemistry. **5th Ed. New York: W H Freeman**, 2002.

BEWLEY, J.D. e BLACK, M. Seeds: Physiology of development and germination. 2ed. New York: Plenum Press. 445p, 1994.

BEWLEY, J.D. Seed germination and dormancy. **The plant cell**. V.9, n.7, p. 1055-1066, 1997.

BICUDO, Carlos E. M. ; MENEZES, Mariângela. Gêneros de algas de águas continentais do Brasil: chave para identificação e descrições. 2. ed. **São Carlos: RiMa**, 502p, 2006.

BLAIR, M.F., KOKABIAN, B., GUDE, V.G., Light and growth medium effect on *Chlorella vulgaris* biomass production - **Journal of Environmental Chemical Engineering**, 2013.

BLERSCH, D.M.; KANGAS, P.C.; MULBRY, W.W. Turbulance and nutrient interactions that control benthic algal production in an engineered cultivation raceway. **Algal Research**, v. 2, p. 107-112. 2013

BOCK, C.; KRIENITZI, L.; PRÖSCHOLD, T.; Taxonomic reassessment of the genus *Chlorella* (*Trebouxiophyceae*) using molecular signatures (barcodes), including description of seven new species. **Fottea**: v 11(2), p 293–312, 2011.

BORKENSTEIN, C.G.; KNOBLECHNER, J.; FRÜHWIRTH, H.; SCHAGERL, M. Cultivation of *Chlorella emersonii* with flue gas derived from a cement plant. **Journal Applied Phycology**. v.23, p.131-135. 2011.

BREJC, K.; FICKNER, R.; HUBER, R.; STEINBACHER, S.; Isolation, Crystallization, Crystal Structure Analysis and Refinement of Allophycocyanin from the Cyanobacterium *Spirulina platensis* at 2.3 Å Resolution. **Journal Molecular Biology** 249: 424 – 440, 1995.

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, p.557-577, 2010.

BRINDHADEVI, K. et al. Impact of cultivation conditions on the biomass and lipid in microalgae with an emphasis on biodiesel. **Fuel**, v. 284, 15 jan. 2021a.

BROWN, N., & SHILTON, A. Luxury uptake of phosphorus by microalgae in waste stabilisation ponds: current understanding and future direction. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, 13(3), 321–328. doi:10.1007/s11157-014-9337-3. 2014

BRUNO, J.J. Edible Microalgae: a review of the health research. **Pacifica: Center for Nutritional Psychology**, V.3, 56p, 2001.

CAI, T., PARK, S. Y., e LI, Y. Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: status and prospects. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 19, 360-369, 2013.

CÂMARA VIEIRA, LETICIA et al. Vigor de sementes de cenoura recobertas com bioestimulante de Solieria filiformis. **COLLOQUIUM AGRARIAE**, v. 17, n. 1, p. 93–103, 8 mar. 2021.

CAMPBELL, N. A.; REECE, J. B. Biology. 6th ed., **Benjamin Cummings**, 2001.

CARDOSO, L. G. et al. Spirulina sp. LEB 18 cultivation in outdoor pilot scale using aquaculture wastewater: High biomass, carotenoid, lipid and carbohydrate production. **Aquaculture**, v. 525, 30 ago. 2020.

CARVALHO, A. P., MEIRELES, L. A., e MALCATA, F. X. Microalgal reactors: a review of enclosed system designs and performances. **Biotechnology progress**, 22(6), 1490-1506, 2006.

CARVALHO, M. E. A.; CASTRO, P. R. C. Extratos de algas e suas aplicações na agricultura. **Série Produtor Rural** – v.56. Piracicaba, São Paulo, 2014.

CARVALHO, N.M.; NAKAGAWA, J. Sementes: ciência, tecnologia e produção. **4ed. Jaboticabal**: FUNEP, 588p. 2000.

CASTRO, J. DE S. et al. Algal biomass from wastewater: soil phosphorus bioavailability and plants productivity. **Science of the Total Environment**, v. 711, 1 abr. 2020a.

CASTRO, J. DE S. et al. Microalgae based biofertilizer: A life cycle approach. **Science of the Total Environment**, v. 724, 1 jul. 2020b.

ÇELEKLI, A., TOPYÜREK, A., MARKOU, G., & BOZKURT, H. . A Multivariate Approach to Evaluate Biomass Production, Biochemical Composition and Stress Compounds of *Spirulina platensis* Cultivated in Wastewater. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 180(4), 728–739. doi:10.1007/s12010-016-2128-2. 2016

CHAGNON, M., KREUTZWEISER, D., MITCHELL, E.A.D., MORRISSEY, C.A., NOOME, D.A., VAN DER SLUIJS, J.P. Risks of large-scale use of systemic insecticides to ecosystem functioning and services. **Environ Sci Pollut Res**. doi:10.1007/s11356-014-3277. 2014

CHANG, J.-S. Analysis of Economic and Environmental Aspects of Microalgae Biorefinery for Biofuels Production: A Review. **Biotechnology Journal**, 1700618. doi:10.1002/biot.201700618. 2018

CHAPMAN, P. M. Emerging substances — Emerging problems. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.25, n.6, p.1445-1447. 2006.

CHASIN, A.A.M. (Eds.). As bases toxicológicas da ecotoxicologia. **São Carlos/São Paulo: RiMa/InterTox**, 340p. 2004.

CHAVAN, R.; MUTNURI, S. Tertiary treatment of domestic wastewater by *Spirulina platensis* integrated with microalgal biorefinery. **Biofuels**, v. 10, n. 1, p. 33–44, 2 jan. 2019.

CHEAH, W. Y., SHOW, P. L., JUAN, J. C., CHANG, J.-S., & LING, T. C. Enhancing biomass and lipid productions of microalgae in palm oil mill effluent using carbon and nutrient supplementation. **Energy Conversion and Management**, 164, 188–197. doi:10.1016/j.enconman.2018.02.094. 2018

CHEN, C. Y. et al. Cultivating *Chlorella sorokiniana* AK-1 with swine wastewater for simultaneous wastewater treatment and algal biomass production. **Bioresource Technology**, v. 302, 1 abr. 2020a.

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

CHEN, C. Y. et al. Engineering strategies for simultaneous enhancement of C-phycoerythrin production and CO₂ fixation with *Spirulina platensis*. **Bioresource Technology**, v. 145, p. 307–312, 2013.

CHEN, C.-Y., YEH, K.-L., AISYAH, R., LEE, D.-J., e CHANG, J.-S. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: a critical review. **Bioresource technology**, 102(1), 71-81. 2011.

CHEN, W. et al. Automated accelerated solvent extraction method for total lipid analysis of microalgae. **Algal Research**, v. 51, 1 out. 2020b.

CHENG, D. et al. Microalgae biomass from swine wastewater and its conversion to bioenergy. **Bioresource Technology**, v. 275, 2019.

CHENG, J. et al. Removing ethinylestradiol from wastewater by microalgae mutant *Chlorella* PY-ZU1 with CO₂ fixation. **Bioresource Technology**, v. 249, p. 284–289, 1 fev. 2018.

CHIA, M. A. et al. Combined nitrogen limitation and cadmium stress stimulate total carbohydrates, lipids, protein and amino acid accumulation in *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae). **Aquatic Toxicology**, v. 160, p. 87–95, 1 mar. 2015.

CHIA, S. R., CHEW, K. W., SHOW, P. L., YAP, Y. J., ONG, H. C., LING, T. C., & CHIAIESE, P. et al. Renewable sources of plant biostimulation: Microalgae as a sustainable means to improve crop performance. *Frontiers in Plant Science* Frontiers Media S.A., , 2018.

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

CHIU, S.-Y., KAO, C.-Y., CHEN, T.-Y., CHANG, Y.-B., KUO, C.-M., & LIN, C.-S. Cultivation of microalgal *Chlorella* for biomass and lipid production using wastewater as nutrient resource. **Bioresource Technology**, 184, 179–189. doi:10.1016/j.biortech.2014.11.080. 2015.

CHO, D.-H., RAMANAN, R., HEO, J., KANG, Z., KIM, B.-H., AHN, C.-Y., KIM, H.-S. Organic carbon, influent microbial diversity and temperature strongly influence algal diversity and biomass in raceway ponds treating raw municipal wastewater. **Bioresource Technology**, 191, 481–487. doi:10.1016/j.biortech.2015.02.013. 2015

CHO, H. U. et al. Enhanced microalgal biomass and lipid production from a consortium of indigenous microalgae and bacteria present in municipal wastewater under gradually mixotrophic culture conditions. **Bioresource Technology**, v. 228, p. 290–297, 2017.

CHO, H. U., KIM, Y. M., & PARK, J. M. Enhanced microalgal biomass and lipid production from a consortium of indigenous microalgae and bacteria present in municipal wastewater under gradually mixotrophic culture conditions. **Bioresource Technology**, 228, 290–297. doi:10.1016/j.biortech.2016.12.094. 2017

CHO, S. *et al.* Reuse of effluent water from a municipal wastewater treatment plant in microalgae cultivation for biofuel production. **Bioresource Technology**, Korea, v. 102, p. 8639-8645. 2011.

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

CHURCH, J. et al. Effect of salt type and concentration on the growth and lipid content of *Chlorella vulgaris* in synthetic saline wastewater for biofuel production. **Bioresource Technology**, v. 243, p. 147–153, 2017.

CIFERRI, O.; TIBONI, O. The biochemistry and industrial potential of *Spirulina*. **Annual Reviews of Microbiology**, v.39, p.503-526, 1985.

COLLA, G. et al. **Protein hydrolysate-based biostimulants: Origin, biological activity and application methods**. Acta Horticulturae. **Anais...International Society for Horticultural Science**, 18 nov. 2016.

CONSELHO NACIONAL DE RECURSOS HÍDRICOS – CNRH - Resolução nº 54, de 28 de novembro de 2005. Estabelece modalidades, diretrizes e critérios gerais para a prática de reúso direto não potável de água, e dá outras providências. Diário Oficial [da] União, Brasília, DF, 09 de mar. 2006.

CONVERTI, A.; CASAZZA, A. A.; ORTIZ, E. Y.; PEREGO, P.; DEL BORGHI, M. Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. **Chemical Engineering and Processing**, 48, 1146-1151, 2009.

COPELAND, L.O. e McDONALD, M.B. Principles of seed science and technology. 2 ed. New York: Macmillan, 321p. 1985.

COSTA, C. R.; OLIVI, P.; BOTTA, C. M.; ESPINDOLA, E. L. G. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**. V.31 n. 7, p. 1820-1830, 2008.

COUTINHO, P. & BOMTEMPO, J. V. Roadmap tecnológico em matérias-primas renováveis: uma base para a construção de políticas e estratégias na Brasil. **Química Nova**, v34, n5, 910-916, 2011.

CUHEL, R.L., ORTNER, P.B. e LEAN, D. R. S.. Night synthesis of protein by algae. **Limnol. Oceanogr.**, 29: 15, 1984.

D'OCA, M. G. M. et al. Production of FAMES from several microalgal lipidic extracts and direct transesterification of the *Chlorella pyrenoidosa*. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, n. 4, p. 1533–1538, 2011.

DA SILVA FERREIRA, V., & SANT'ANNA, C. Impact of culture conditions on the chlorophyll content of microalgae for biotechnological applications. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 33(1). doi:10.1007/s11274-016-2181-6. 2016

DANESHVAR, E. et al. Investigation on the feasibility of *Chlorella vulgaris* cultivation in a mixture of pulp and aquaculture effluents: Treatment of wastewater and lipid extraction. **Bioresource Technology**, v. 255, p. 104–110, 1 maio 2018.

DANESHVAR, E. et al. Sequential cultivation of microalgae in raw and recycled dairy wastewater: Microalgal growth, wastewater treatment and biochemical composition. **Bioresource Technology**, v. 273, p. 556–564, 1 fev. 2019.

DARLEY, W. M. Algal Biology: a physical approach. In: WILKINSON, J. F. **Basic Microbiology**. v. 9, Blackwell Scientific Publications, p. 30-52, 1982.

DAS, P. et al. Microalgal nutrients recycling from the primary effluent of municipal wastewater and use of the produced biomass as bio-fertilizer. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 16, n. 7, p. 3355–3364, 1 jul. 2019.

DAS, P., QUADIR, M. A., THAHER, M. I., ALGHASAL, G. S. H. S., & ALJABRI, H. M. S. J. Microalgal nutrients recycling from the primary effluent of municipal wastewater and use of the produced biomass as bio-fertilizer. **International Journal of Environmental Science and Technology**. doi:10.1007/s13762-018-1867-8. 2018

DE MORAIS, M. G., DA FONTOURA PRATES, D., MOREIRA, J. B., DUARTE, J. H., & COSTA, J. A. V. Phycocyanin from Microalgae: Properties, Extraction and Purification, with Some Recent Applications. **Industrial Biotechnology**, 14(1), 30–37. doi:10.1089/ind.2017.0009. 2018

DEMIRBAS, A. ; FATIH DEMIRBAS, M. **Algae energy: algae as a New Source of Biodiesel**. London: Springer. 199p, 2010.

DEMIRBAS, A. Biodiesel from oilgae, biofixation of carbon dioxide by microalgae: A solution to pollution problems. **Applied Energy**. v.88, p. 3541-3547, 2011.

DEMIRBAS, A., E DEMIRBAS, M. F. **Algae energy: algae as a new source of biodiesel: Springer Science & Business Media**. 2010.

DERNER B. R., OHSE S., VILLELA M., CARVALHO S. M., FETT R. “Microalgas, produtos e aplicações – Revisão”. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.6, p.1959-1967, nov-dez, 2006.

DINESHKUMAR, R. et al. Microalgae as Bio-fertilizers for Rice Growth and Seed Yield Productivity. **Waste and Biomass Valorization**, v. 9, n. 5, p. 793–800, 1 maio 2018.

DOS SANTOS, R. R. et al. Evaluation of the co-production of total carotenoids, C-phycoyanin and polyhydroxyalkanoates by *Arthrospira platensis*. **Bioresource Technology Reports**, v. 7, 1 set. 2019.

DOUCHA, J. *et al.* Production of *Chlorella* biomass enriched by selenium and its use in animal nutrition: a review. **Applied Microbiology Biotechnology**, Czech Republic, v. 83, n. 6, p.1001-1008, july. 2009.

DU JARDIN, P. Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. **Scientia Horticulturae** Elsevier, , 30 nov. 2015.

DUFOSSÉ, L.; GALAUPA, P.; YARONB, A.; ARADB, S. M., BLANCC, P.; RAVISHANKARD, G. A. Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: a scientific oddity or an industrial reality? - **Trends Food Sci. Tech.** 16: 389–406, 2005.

EKINCI, K. et al. Anaerobic Digestion of Three Microalgae Biomasses and Assessment of Digestates as Biofertilizer for Plant Growth. **Environmental Progress and Sustainable Energy**, v. 38, n. 3, 1 maio 2019.

EL BAKY, H. H. A.; EL BAROTY, G. S.; MOSTAFA, E. M. Optimization Growth of *Spirulina* (*Arthrospira*) *Platensis* in Photobioreactor Under Varied Nitrogen Concentration for Maximized Biomass, Carotenoids and Lipid Contents. **Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture**, v. 11, n. 1, p. 40–48, 27 dez. 2018.

EMBRAPA. CENTRO NACIONAL DE PESQUISA DE SOLOS. **Manual de metodos de análise de solo**. [s.l.] Embrapa, 1997. estimulante vegetal. [s.d.].

EOM, I.C.; RAST, C.; VEBER, A.M.; VASSEUR, P. Ecotoxicity of a polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-contaminated soil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v 67, p.190-205. 2007.

ERIKSEN, N. T. Production of phycocyanin—a pigment with applications in biology, FÁBREGAS J., MASEDA A., DOMÍNGUEZ A. The cell composition of *Nannochloropsis* *sp.* Changes under different irradiances in semi continuous culture. **World Journal of Microbiology Technology**, 20: 5, 2004.

FAHEED, F. A.; ABD-EL FATTAH, Z. Effect of *Chlorella vulgaris* as Bio-fertilizer on Growth Parameters and Metabolic Aspects of Lettuce Plant. **J. Agri. Soc. Sci**, v. 4, p. 165–69, [s.d.].

FENG P, DENG Z, FAN L AND HU Z. Lipid accumulation and growth characteristics of *Chlorella zofingiensis* under different nitrate and phosphate concentrations. **J BiosciBioeng** 114: 405-410. 2012

FENT, K. Ecotoxicological problems associated with contaminated sites. **Toxicology Letters**, v. 140-141, p. 353-365, 2003.

FERNÁNDEZ-LINARES, L. C. et al. Assessment of *Chlorella vulgaris* and indigenous microalgae biomass with treated wastewater as growth culture medium. **Bioresource Technology**, v. 244, n. May, p. 400–406, 2017.

FERREIRA, L. A. et al. Bioestimulante e fertilizante associados ao tratamento de sementes de milho. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 29, n. 2, p. 80–89, 2007.

FERREIRA, L.A.; OLIVEIRA, J.A.; PINHO, É.V.R.V.; QUEIROZ, D.L. Bioestimulante e fertilizante associados ao tratamento de sementes de milho. **Revista Brasileira de Sementes**, v.29, n.2, p.80-89, 2007.

FERREIRA, V. S., PINTO, R. F., & SANT'ANNA, C. Low light intensity and nitrogen starvation modulate the chlorophyll content of *Scenedesmus dimorphus*. **Journal of Applied Microbiology**, 120(3), 661–670. doi:10.1111/jam.13007. 2016

FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANE STANLEY, G. H. a Simple. v. 55, n. 5, p. 999–1033, 1987.

FOLCH, J.; LESS, M. & SLOANE STANLEY, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. **The Journal of Biological Chemistry**, 26 (1): 497-509, 1957.

FRANCO, A. L. C; LÔBO, I. P; CRUZ, R. S.; TEIXEIRA, C. M. L. L.; NETO, J. A. A.; AMADO, J. & MENEZES, R. S. Biodiesel de microalgas: avanços e desafios. **Química Nova**, 1-12, 2012.

GANTAR, M., SIMOVIĆ, D., DJILAS, S., GONZALEZ, W. W., & MIKSOVSKA, J. Isolation, characterization and antioxidative activity of C-phycoyanin from *Limnothrix* sp. strain 37-2-1. **Journal of Biotechnology**, 159(1-2), 21–26. doi:10.1016/j.jbiotec.2012.02.004. 2012

GARCIA-GONZALEZ, J.; SOMMERFELD, M. Biofertilizer and biostimulant properties of the microalga *Acutodesmus dimorphus*. **Journal Applied Phycology**, v.28, p.1051–1061, 2015.

GIORGETTI, L.; TALOUIZTE, H.; MERZOUKI, M.; CALTAVUTURO, L.; GERI, C.; FRASSINETTI, S. Genotoxicity evaluation of effluents from textile industries of the region Fez-Boulmane, Morocco: A case study. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, n.74, p. 2275–2283, 2011.

GODFRAY, J.H.C., BEDDINGTON, R.J., CRUTE, R.I., HADDAD, L., LAWRENCE, D., MUIR, F.J., PRETTY, J., ROBINSON, S., THOMAS, M.S., TOULMIN, C. Food security: the challenge of feeding 9 billion people. **Science** 327: 812–818. 2010

GOLDMAN, J.C. Physiological aspects in algal mass cultures. In: **Algal Biomass**. p. 343–59, Amsterdam: Elsevier/North Holland Biomedical Press. 1980.

GONÇALVES, A. Microalgal cultivation for biomass production, carbon dioxide capture and nutrients uptake. **Tese Doutorado**. 2017.

GONG, Y.; HUANG, J. Characterization of four untapped microalgae for the production of lipids and carotenoids. **Algal Research**, v. 49, 1 ago. 2020.

GONZALEZ, E. G. et al. Bioprospection of green microalgae native to Paraná, Brazil using a multi-criteria analysis: Potential for the production of lipids, proteins, and carotenoids. **Bioresource Technology Reports**, v. 10, 1 jun. 2020.

GOUVEIA, L. et al. Microalgae biomass production using wastewater: Treatment and costs. Scale-up considerations. **Algal Research**, v. 16, p. 167–176, 1 jun. 2016.

GOUVEIA, L. Microalgae as a Feedstock for Biofuels Microalgae as a Feedstock for Biofuels (pp. 1-69): **Springer**, 2011.

GRAHAM, L. E.; WILCOX, L. W. Algae. **Prentice Hall: Upper Saddle River**, N.J. 640 p., 2000.

GROBBELAAR, J. U. Mass Production of Microalgae: Photobioreactors. In: RICHMOND, A. Handbook of Microalgal Culture: **Biotechnology and Applied Phycology**. Blackwell Science, p. 97-115, 2004.

GROSSMAN, A. R.; SCHAEFER, M. R.; CHIANG, G. G.; COLLIER, J. L. The phycobilisome, a light-harvesting complex responsive to environmental conditions. **Microbiol. Review**. 57(3): 725-749,1993.

GUALTIERI, P.; BARSANTI, L. Algae: anatomy, biochemistry, and biotechnology. **CRC Press, Taylor e Francis Group**. 301 p., 2006.

GUILLARD, R. R. L. & LORENZEN, C. J. Yellow-green algae with chlorophyllide. **Journal of Phycology**, 8: 10-4, 1972.

GULDHE, A. et al. Heterotrophic cultivation of microalgae using aquaculture wastewater: A biorefinery concept for biomass production and nutrient remediation. **Ecological Engineering**, v. 99, p. 47–53, 2017.

GULDHE, A., ANSARI, F. A., SINGH, P., & BUX, F. Heterotrophic cultivation of microalgae using aquaculture wastewater: A biorefinery concept for biomass production and nutrient remediation. **Ecological Engineering**, 99, 47–53. doi:10.1016/j.ecoleng.2016.11.013. 2017

HALLMANN, C.A., FOPPEN, R.P.B., VAN TURNHOUT, C.A.M., DE KROON, H., JONGEJANS, E. Declines in insectivorous birds are associated with high neonicotinoid concentrations. **Nature** 511:341–343. 2014

HAMANA, K.; MATSUZAKI, S.; NIITSU, M.; SAMEJIMA, K.; NAGASHIMA, H.; Polyamines in UnicellularThermoacidophilicRed Alga Cyanidiumcaldarium. **Phytochemistry**, v.29, p.377-380, 1990.

HAMANA, K.; NIITSU, M.; HAYASHI, H. Occurrence of homospermidine and thermospermine as a cellular polyamine in unicellular chlorophyte and multicellular charophyte green algae. **The Journal of General and Applied Microbiology**, v.59, p.313–319, 2013.

HARRIS, G.P. Phytoplankton ecology. **Chapman & Hall**, New York. 1988

HAYES, M., SKOMEDAL, H., SKJÅNES, K., MAZUR-MARZEC, H., TORUŃSKA-SITARZ, A., CATALA, M., ... GARCÍA-VAQUERO, M. Microalgal proteins for feed, food and health. **Microalgae-Based Biofuels and Bioproducts**, 347–368. doi:10.1016/b978-0-08-101023-5.00015-7. 2017

HEMLATA, & FATMA, T. Screening of Cyanobacteria for Phycobiliproteins and Effect of Different Environmental Stress on Its Yield. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, 83(4), 509–515. doi:10.1007/s00128-009-9837-y. 2009

HO, S. H. et al. Combining light strategies with recycled medium to enhance the economic feasibility of phycocyanin production with *Spirulina platensis*. **Bioresource Technology**, v. 247, p. 669–675, 2018a.

HUANG, G. et al. Biodiesel production by microalgal biotechnology. **Applied Energy**, London, v.87, n. 1, p. 38-46, Jan. 2010.

HULTBERG, M. et al. Effect of microalgal treatments on pesticides in water. **Environmental Technology (United Kingdom)**, v. 37, n. 7, p. 893–898, 2 abr. 2016.

HUSSAIN, F. et al. Microalgae an ecofriendly and sustainable wastewater treatment option: Biomass application in biofuel and bio-fertilizer production. A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews** Elsevier Ltd, , 1 mar. 2021.

IASIMONE, F., PANICO, A., DE FELICE, V., FANTASMA, F., IORIZZI, M., & PIROZZI, F. Effect of light intensity and nutrients supply on microalgae cultivated in urban wastewater: Biomass production, lipids accumulation and settleability characteristics. **Journal of Environmental Management**, 223, 1078–1085. doi:10.1016/j.jenvman.2018.07.024. 2018

ILLMAN, A. M.; SCRAGG, A. H.; SHALES, S. W. Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium. **Enzyme microbiology technology**, v. 27, p. 631-635, 2000.

ILLMAN, A.; SCRAGG, A. e SHALES, S. Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium, *Enzyme and Microbial Technology*, 27, pp. 631- 635, 2000.

JEREZ, C. G., MALAPASCUA, J. R., SERGEJEVOVÁ, M., FIGUEROA, F. L., & MASOJÍDEK, J. Effect of Nutrient Starvation under High Irradiance on Lipid and Starch Accumulation in *Chlorella fusca* (Chlorophyta). **Marine Biotechnology**, 18(1), 24–36. doi:10.1007/s10126-015-9664-6. 2015

JOHN, R. P.; ANISHA, G. S.; NAMPOOTHIRI, K. M.; PANDEY, A. Micro and macroalgal biomass: a renewable source for bioethanol. **Bioresource Technology**, v.102 , p.186-193, 2011.

JOURDAN, J. P. Cultivez Votre Spiruline – manuel de culture artisanale. Disponível em: <www.spirulinasource.com/cultivez>. Acessado em: Ago, 2018 – 1996

JULIANTI, E. et al. Optimization of extraction method and characterization of phycocyanin pigment from *spirulina platensis*. **Journal of Mathematical and Fundamental Sciences**, v. 51, n. 2, p. 168–176, 2019a.

JÚNIOR, E. M. Iniciação ao tratamento de esgoto. Campinas: **Curso de Treinamento de esgoto**, 2001.

KALRA, R.; GAUR, S.; GOEL, M. Microalgae bioremediation: A perspective towards wastewater treatment along with industrial carotenoids production. **Journal of Water Process Engineering**, v. 40, 1 abr. 2021.

KAMALANATHAN, M. et al. Impacts of nitrogen and phosphorus starvation on the physiology of *Chlamydomonas reinhardtii*. **Journal of Applied Phycology**, v. 28, n. 3, p. 1509–1520, 1 jun. 2016.

KAPANEN, A.; ITAVAARA, M. Ecotoxicity tests for compost applications. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 49, p. 1-16, 2001.

KAPANEN, A.; ITAVAARA, M. Ecotoxicity tests for compost applications. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.49, p.1-16, 2001.

KHAN, M. I.; SHIN, J. H.; KIM, J. D. The promising future of microalgae: Current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products. *Microbial Cell Factories*. BioMed Central Ltd., , 5 mar. 2018.

KHOLSSI, R. et al. Biofertilizing Effect of *Chlorella sorokiniana* Suspensions on Wheat Growth. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 38, n. 2, p. 644–649, 15 jun. 2019.

KISIELEWSKA, M. et al. Effectiveness of *Scenedesmus* sp. Biomass grow and nutrients removal from liquid phase of digestates. **Energies**, v. 13, n. 6, 2020.

KISS, J. Terra em transe. **Globo Rural**, n.223, p.34-42, 2004.

KNIE, J.L.W. e LOPES, E.W.B. Testes ecotoxicológicos: métodos, técnicas e aplicações. **Florianópolis:FATMA/GTZ**, p.289. 2004

KOYAMA, R.; BETTONI, M. M.; RODER, C.; DE ASSIS, A. M.; SÉRGIO, R. R.; KUBE, M. et al. The impact of wastewater characteristics, algal species selection and immobilisation on simultaneous nitrogen and phosphorus removal. **Algal Research**. Elsevier B.V., , 1 abr. 2018.

KUMAR, R. R.; RAO, P. H.; ARUMUGAM, M. Lipid extraction methods from microalgae: A comprehensive review. **Frontiers in Energy Research**. Frontiers Media S.A., , 2015.

KUMAR, V. et al. Synchronized growth and neutral lipid accumulation in *Chlorella sorokiniana* FC6 IITG under continuous mode of operation. **Bioresource Technology**, v. 200, p. 770–779, 1 jan. 2016.

LAM, M. K. et al. Cultivation of *Chlorella vulgaris* using nutrients source from domestic wastewater for biodiesel production: Growth condition and kinetic studies. **Renewable Energy**, v. 103, p. 197–207, 1 abr. 2017.

LAM, M. K., YUSOFF, M. I., UEMURA, Y., LIM, J. W., KHOO, C. G., LEE, K. T., & ONG, H. C. Cultivation of *Chlorella vulgaris* using nutrients source from domestic wastewater for biodiesel production: Growth condition and kinetic studies. **Renewable Energy**, 103, 197–207. doi:10.1016/j.renene.2016.11.032. 2017

LARSDOTTER, K. Wastewater treatment with microalgae-a literature review. **Vatten**, 62(1), 31. 2006.

LEE Y.. Microalgal mass culture systems and methods: Their limitation and potential. **Journal of Applied Phycology**, 13: 9, 2001.

LEE, S. Y. et al. Techniques of lipid extraction from microalgae for biofuel production: a review. **Environmental Chemistry Letters** Springer Science and Business Media Deutschland GmbH, , 1 fev. 2021.

LEITE, G. A.; DE CARVALHO, C. A. C.; FREITAS, W. E. DE S.; DANTAS, J. I. A.; PONTES, C. A.; FERNANDES, P. L. DE O. A ação das poliaminas na maturação e senescência de frutos. **Agropecuária científica no semiárido**, v.8, n.4, p.08-21, 2012.

LI, K. et al. Microalgae-based wastewater treatment for nutrients recovery: A review. **Bioresource Technology** Elsevier Ltd, , 1 nov. 2019.

LI, Y.; YI-FENG, C.; CHEN, P.; MIN, M.; ZHOU, W.; MARTINEZ, B. Characterization of microalga *Chlorella sp.* Well adapted to highly concentrated municipal wastewater for nutrient removal and biodiesel production. **Bioresource Technology**. v.102, p.5138-5144, 2011.

LOMBARDI, J. V. **Fundamentos de toxicologia aquática**. Pp. 261 – 270 In: M. J. T.Ranzani – Paiva, R. M. Takemota & M. A. P. Lizama (Eds.), Sanidade de organismos aquáticos. Org. Livraria Varela, São Paulo, 426p. 2004.

LOPES, T.S.A. Estudo da potencialidade de biorremediação e produção de biocombustíveis a partir de microalgas. **UNESPAR**, 2017.

LÓPEZ, M. G.-M., SÁNCHEZ, E. D. R., LÓPEZ, J. C., FERNÁNDEZ, F. A., SEVILLA, J. F., RIVAS, J., GRIMA, E. M. Comparative analysis of the outdoor culture of *Haematococcus pluvialis* in tubular and bubble column photobioreactors. **Journal of biotechnology**, 123(3), 329-342, 2006.

LOURENÇO, S.O. Cultivo de microalgas marinhas: Princípios e aplicações. **São Carlos-SP: Editora RiMa**, 588p. 2006.

LU, W. et al. Cultivation of *Chlorella sp.* using raw dairy wastewater for nutrient removal and biodiesel production: Characteristics comparison of indoor bench-scale and outdoor pilot-scale cultures. **Bioresource Technology**, v. 192, p. 382–388, 2015.

LU, W., WANG, Z., WANG, X., & YUAN, Z. Cultivation of *Chlorella sp.* using raw dairy wastewater for nutrient removal and biodiesel production: Characteristics comparison of indoor bench-scale and outdoor pilot-scale cultures. **Bioresource Technology**, 192, 382–388. doi:10.1016/j.biortech.2015.05.094. 2015

LU, Z. Identification of auto-inhibitors in the reused culture media of the Chlorophyta *Scenedesmus acuminatus*. **Algal Research**, v. 44, 1 dez. 2019.

LU, Z. Water reuse for sustainable microalgae cultivation: Current knowledge and future directions. **Resources, Conservation and Recycling** Elsevier B.V., , 1 out. 2020.

LUPATINI, A. L., COLLA, L. M., CANAN, C., & COLLA, E. Potential application of microalga *Spirulina platensis* as a protein source. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 97(3), 724–732. doi:10.1002/jsfa.7987. 2016.

MADHYASTHA, H. K., & VATSALA, T. M. Pigment production in *Spirulina fusciformis* in different photophysical conditions. **Biomolecular Engineering**, 24(3), 301–305. doi:10.1016/j.bioeng.2007.04.001. 2007

MANI, D., SHARMA, B., & KUMAR, C. Phytoaccumulation, Interaction, Toxicity and Remediation of Cadmium from *Helianthus annuus L.* (sunflower). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, 79(1), 71–79. doi:10.1007/s00128-007-9153-3. 2007

MANIRAFASHA, E. et al. Enhancement of cell growth and phycocyanin production in *Arthrospira (Spirulina) platensis* by metabolic stress and nitrate fed-batch. **Bioresource Technology**, v. 255, n. November 2017, p. 293–301, 2018a.

MARCOS FILHO, J. Fisiologia de sementes de plantas cultivada. **FEALQ: Piracicaba**, 495p. 2005.

MARIÁN, F. D.; GARCÍA-JIMÉNEZ, P.; ROBAINA, R. R.; Polyamines in Marine Macroalgae: Levels of Putrescine, Spermidine and Spermine in the Thalli and Changes in Their Concentration during Glycerol-Induced Cell Growth in Vitro. **Physiologia Plantarum**. v.110, p.530–534, 2000.

MARIANI, C.F., Departamento de Ecologia, 2010 – **USP –Portal Ecologia Aquática**. Disponível em: <http://ecologia.ib.usp.br/portal/index.php?option=com_content&view=article&id=143&Itemid=419>. Acessado em: ago, 2018.

MARIN, A.R.; -ESPINOSA, L.G.M.; STEPHENSON, T. Growth and nutrient removal in free and immobilized green algae in batch and semi-continuous cultures treating real wastewater. **Bioresource Technology**. v.101, p.58–64, 2010.

MARTÍNEZ, M.E.; SÁNCHEZ, S.; JIMÉNEZ, J.M.; EL YOUSFI, F.; MUÑOZ, L. Nitrogen and phosphorus removal from urban wastewater by the microalga *Scenedesmus obliquus*. **Bioresource Technology**. v.73, p.263-272., 2000.

MARTINS, M. B. F. et al. Biofertilizante de torta de filtro e bactéria promotora do crescimento em plantas na produção de mudas de alface / filter cake biofertilizer and plant growth-promoting bacteria in lettuce seedling production. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 9, p. 67758–67768, 2020.

MARZORATI, S. et al. Carotenoids, chlorophylls and phycocyanin from Spirulina: Supercritical CO₂ and water extraction methods for added value products cascade. **Green Chemistry**, v. 22, n. 1, p. 187–196, 2020a.

MATA, T. M., MARTINS, A. A., & CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 14(1), 217–232. doi:10.1016/j.rser.2009.07.020. 2020

MATAMOROS, V. et al. Assessment of the mechanisms involved in the removal of emerging contaminants by microalgae from wastewater: A laboratory scale study. **Journal of Hazardous Materials**, v. 301, p. 197–205, 15 jan. 2016.

MATAMOROS, V., GUTIÉRREZ, R., FERRER, I., GARCÍA, J., & BAYONA, J. M.. Capability of microalgae-based wastewater treatment systems to remove emerging organic contaminants: A pilot-scale study. **Journal of Hazardous Materials**, 288, 34–42. doi:10.1016/j.jhazmat.2015.02.002. 2015.

MATOS, Â. P. et al. Biomass, lipid productivities and fatty acids composition of marine *Nannochloropsis gaditana* cultured in desalination concentrate. **Bioresource Technology**, v. 197, p. 48–55, 1 dez. 2015.

MATSUNAGA, T. et al.. Characterization of marine microalga, *Scenedesmus sp.* Strain JPCG GA0024 toward biofuel production, *Biotechnol Lett*, v. 31, p.1367 – 1372, 2009.

MIAO, X.; WU, Q. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. **Bioresource Technology**, Essex, v. 97, n. 6, p. 841-846, Apr. 2006.

MILLER, A. G.; COLMAN, G. Evidence for HCO₃⁻ transport by the blue green alga (cyanobacterium) *Coccochloris peniocyctis*. **Plant Physiology**, v. 65, p. 397-402, 1980.

MINHAS, A. K. et al. Microalga *Scenedesmus bijugus*: Biomass, lipid profile, and carotenoids production in vitro. **Biomass and Bioenergy**, v. 142, 1 nov. 2020a.

MOBIN, S.; ALAM, F. Biofuel production from algae utilizing wastewater. *In: 19th Australasian Fluid Mechanics Conference Melbourne, Australia. Australia: RMIT University*, 2014. p. 8-11, 2014.

MÓGOR, Á. F. et al. Biostimulant properties of cyanobacterial hydrolysate related to polyamines. **Journal of Applied Phycology**, v. 30, n. 1, p. 453–460, 1 fev. 2018.

MÓGOR, A. F. Extrato da alga *Ascophyllum nodosum*(L.) Le Jolis no desenvolvimento vegetativo e na produção do tomateiro. **Amazonian Journal**, v.55, p.282-287, 2012.

MÓGOR, A. F.; ONO, E. O.; RODRIGUES, J. D.; MÓGOR, G. Aplicação foliar de extrato de alga, ácido L- glutâmico e cálcio em feijoeiro. **Scientia Agrária**(UFPR).v.9, p.431-437, 2008.

- MONTES D'OCA, M. G.; VIÊGAS, C. V.; LEMÕES, J. S.; MIYASAKI, E. K.; MORÓN-VILLARREYES, J. A.; PRIMEL, E. G. & ABREU, P. C. Production of FAMES from several microalgal lipidic extracts and direct transesterification of the *Chlorella pyrenoidosa*. **Biomass and Bioenergy**, 35: 1533-1538, 2011.
- MORAIS, M. G. ; RADMANN, E. M.; ANDRADE, M. R.; TEIXEIRA, G. G.; BRUSCH, L. R. F.; COSTA, J. A. V., Pilot scale semicontinuous production of *Spirulina* biomass in southern Brazil. **Aquaculture** 294: 60–64, 2009.
- MORENO-GARCIA L, ADJALLÉ K, BARNABÉ S, RAGHAVAN G. Microalgae biomass production for a biorefinery system: recent advances and the way towards sustainability. **Renew Sustain Energy Rev**;76:493–506. 2016
- MORIST, A., MONTESINOS, J. L., CUSIDÓ, J.A., GÓDIA, F. Recovery and treatment of *Spirulina platensis* cells cultured in a continuous photobioreactor to be used as food. **Process Biochemistry** 37: 535 – 547, 2001.
- MUELLER-REES, C., PFALLER, R., WALTER, C., E COTTA, F. Tubular photobioreactor: **Google Patents**, 2013.
- MUÑOZ, R., & GUIEYSSE, B. Algal–bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: A review. **Water Research**, 40(15), 2799–2815. doi:10.1016/j.watres.2006.06.011. 2006
- MURALIKRISHNA, I. V., & MANICKAM, V. Wastewater Treatment Technologies. **Environmental Management**, 249–293. doi:10.1016/b978-0-12-811989-1.00012-9. 2017
- MURATA, N. Low-temperature effects on cyanobacterial membranes. **J.Bio-energ. Biomembr**, v. 21, p. 61–75. 1989.
- MUSTAFA, S. Microalgae biosorption, bioaccumulation and biodegradation efficiency for the remediation of wastewater and carbon dioxide mitigation: Prospects, challenges and opportunities. **Journal of Water Process Engineering**. Elsevier Ltd, , 1 jun. 2021
- NASSIF, S.M.L.; VIEIRA,I.G.; FERNANDES, G.D. – Fatores externos (ambientais) que influenciam na germinação das semente. **Informativo da sementes IPEF** – 1998. Disponível em:< <http://www.ipef.br/tecsementes/germinacao.asp>>. Acessado em: ago, 2018.
- NAVARRO-LÓPEZ, E. et al. Biostimulant Potential of *Scenedesmus obliquus* Grown in Brewery Wastewater. **Molecules**, v. 25, n. 3, 4 fev. 2020.
- NEUHAUSER, E.F.; LOEHR, R.C.; MILLIGAN, D.L.; MALECKI, M.R..Toxicity of metals to the earthworms *Eisenia foetida*, **Biology and Fertility of soils**, v.1, p. 149-152, 1985.
- NISHIDA, I. & MURATA, N. Chilling sensitivity in plants and cyanobacteria: the crucial contribution of membrane lipids. **Annu. Rev. Plant Physiol.**, Plant Mol. Biol., v. 47, p. 541–68. 1996.

NOGUEIRA, S.M.S, JUNIOR, J.S., MAIA, H.D., SABOYA, J.P.S, FARIAS, W.R.L, Use of *Spirulina platensis* in treatment of fish farming wastewater. **Revista Ciência Agronômica**. 2018.

NUVOLARI, A. Esgoto sanitário: coleta, transporte, tratamento e reúso agrícola. **Edgard Blucher**: São Paulo, 2003.

ODEGARD, R.Y.I., VAN DER VOET, E. The future of food—scenarios and the effect on natural resource use in agriculture in 2050. **Ecol Econ** 97:51–59. 2014

OLGUÍN, E. J. Dual purpose microalgae-bacteria-based system that treat wastewater and produce biodiesel and chemical products within a biorefinery. **Biotechnology Advances**, Veracruz, v. 30, p. 1031-1046, may. 2012.

OLIVEIRA, J.; MÓGOR, G.; MÓGOR, Á. F. Produtividade de beterraba em função da aplicação foliar de biofertilizante. **Resumos do VIII Congresso Brasileiro de Agroecologia** – Porto Alegre/RS –2013.

OLMSTEAD, I. L. D. et al. Low solvent, low temperature method for extracting biodiesel lipids from concentrated microalgal biomass. **Bioresource Technology**, v. 148, p. 615–619, 2013.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT – OECD. Guideline for the testing of chemicals. Proposal for updating guideline 208. **Terrestrial Plant Test: 208: Seedling Emergence and Seedling Growth Test**, 2003.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT – OECD – Terrestrial Plant Test: 208: Seedling Emergence and Seedling Growth Test. **Guideline for the Testing of Chemicals Proposal for Updating Guideline 208**, 2003.

PANCHA, I., CHOKSHI, K., GEORGE, B., GHOSH, T., PALIWAL, C., MAURYA, R., & MISHRA, S. (2014). Nitrogen stress triggered biochemical and morphological changes in the microalgae *Scenedesmus* sp. CCNM 1077. **Bioresource Technology**, 156, 146–154. doi:10.1016/j.biortech.2014.01.025

PARK, J. B. K.; CRAGGS, R. J.; SHILTON, A. N. Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production. 2010. **Bioresource Technology**. v.105, n.3, p.35-42, 2011.

PARK, W. S. et al. Two classes of pigments, carotenoids and c-phycoyanin, in spirulina powder and their antioxidant activities. **Molecules**, v. 23, n. 8, 17 ago. 2018.

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

PECCIA, J.; HAZNEDAROGLU, B.; GUTIERREZ, J.; ZIMMERMAN, J.B. Nitrogen supply is an important driver of sustainable microalgae biofuel production. **Trends in Biotechnology**. v.31, p. 134-138, 2013.

PEREIRA, M. I. B. et al. Mixotrophic cultivation of *Spirulina platensis* in dairy wastewater: Effects on the production of biomass, biochemical composition and antioxidant capacity. **PLoS ONE**, v. 14, n. 10, 1 out. 2019a.

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

PÉREZ-LEGASPI, I. A. et al. Effect of the pesticide lindane on the biomass of the microalgae *Nannochloris oculata*. **Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**, v. 51, n. 2, p. 103–106, 1 fev. 2016.

PIMENTEL, M. F.; SILVA JÚNIOR, F. C. G.; SANTAELLA, S. T. & LOTUFO, L. V. C. Ouso de *Artemia sp.* como organismo-teste para avaliação da toxicidade das águas residuárias do beneficiamento da castanha de caju antes e após tratamento em reator biológico experimental. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, v.6, n. 1, p. 15-22, 2011.

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

POHNDORF, R. S. et al. Production of lipids from microalgae *Spirulina sp.*: Influence of drying, cell disruption and extraction methods. **Biomass and Bioenergy**, v. 93, p. 25–32, 2016a.

POPINIGIS, F. Fisiologia das sementes. **Ministério da Agricultura – AGIPLAN**. Brasília, 289p. 1985.

PRABAKARAN, G. et al. Extraction and characterization of phycocyanin from *Spirulina platensis* and evaluation of its anticancer, antidiabetic and antiinflammatory effect. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 153, p. 256–263, 15 jun. 2020.

PŘIBYL, P. et al. Elevated production of carotenoids by a new isolate of *Scenedesmus sp.* **Algal Research**, v. 11, p. 22–27, 1 set. 2015.

PŘIBYL, P. et al. The role of light and nitrogen in growth and carotenoid accumulation in *Scenedesmus sp.* **Algal Research**, v. 16, p. 69–75, 1 jun. 2016.

PULZ O. e GROSS W..Valuable products from biotechnology of microalgae. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 65: 635-648, 2004.

QIU, R., GAO, S., LOPEZ, P. A., & OGDEN, K. L. Effects of pH on cell growth, lipid production and CO₂ addition of microalgae *Chlorella sorokiniana*. **Algal Research**, 28, 192–199. doi:10.1016/j.algal.2017.11.004. 2017

RAGAZA, J. A. et al. A review on *Spirulina*: alternative media for cultivation and nutritive value as an aquafeed. **Reviews in Aquaculture**Wiley-Blackwell, , 1 nov. 2020.

RAMANNA, L., GULDHE, A., RAWAT, I., & BUX, F. The optimization of biomass and lipid yields of *Chlorella sorokiniana* when using wastewater supplemented with different nitrogen sources. **Bioresource Technology**, 168, 127–135. doi:10.1016/j.biortech.2014.03.064. 2014

RAMSUNDAR, P. et al. Assessment of municipal wastewaters at various stages of treatment process as potential growth media for *Chlorella sorokiniana* under different modes of cultivation. **Bioresource Technology**, v. 227, p. 82–92, 2017.

RASTOGI, R. P. et al. Ultraviolet radiation and cyanobacteria. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 141, p. 154–169, 2014.

RATNAPURAM, H. P.; VUTUKURU, S. S.; YADAVALLI, R. Mixotrophic transition induced lipid productivity in *Chlorella pyrenoidosa* under stress conditions for biodiesel production. **Heliyon**, v. 4, p. 496, 2017.

RAVEN J.A, BALL L.A, BEARDALL J, GIORDANO M, MABERLY S.C. Algae lacking CO₂ concentrating mechanisms. **Canadian Journal of Botany** ;83:879–890, 2005.

RAWAT, I.; KUMAR, R.R.; MUTANDA, T.; BUX, F. Dual role of microalgae: Phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production. **Applied Energy**. v.88, n.10, p.3411-3424, 2011.

RAZEGHIFARD, R. Algal biofuels. **Photosynthesis Research**, v.117, p.207–219, 2013.

RENOU, S.; GIVAUDAN, J.G.; POULAIN, S.; DIRASSOUYAN, F.; MOULIN, P. RENUKA, N., PRASANNA, R., SOOD, A., BANSAL, R., BIDYARANI, N., SINGH, R., AHLUWALIA, A. S. Wastewater grown microalgal biomass as inoculants for improving micronutrient availability in wheat. **Rhizosphere**, 3, 150–159. doi:10.1016/j.rhisph.2017.04.005. 2017.

REYNOLDS C. S. Ecology of Phytoplankton - Ecology, Biodiversity and Conservation. **Cambridge**. 2006

RHEE, G.Y. Effects of environmental factors and their interactions on phyto-plankton growth. **Adv. Microb. Ecol.**, v. 6, p. 33–74. 1982.

RICHARD, J. G.; A dynamic regulatory modelo of phytoplanktion acclimation to light, RICHMOND, A. Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology. **Oxford: Blackwell Science**, 2004.

RICHMOND, AMOS. Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology. [s.l: s.n.].

RIZWAN, M., MUJTABA, G., MEMON, S. A., LEE, K., & RASHID, N.. Exploring the potential of microalgae for new biotechnology applications and beyond: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 92, 394–404. doi:10.1016/j.rser.2018.04.034. 2018

RODRÍGUEZ-SÁNCHEZ, R., ORTIZ-BUTRÓN, R., BLAS-VALDIVIA, V., HERNÁNDEZ-GARCÍA, A., & CANO-EUROPA, E. Phycobiliproteins or C-phycoerythrin of *Arthrospira (Spirulina) maxima* protect against HgCl₂-caused oxidative stress and renal damage. **Food Chemistry**, 135(4), 2359–2365. doi:10.1016/j.foodchem.2012.07.063. 2012

RUBIO, F. C.; CAMACHO, F. G.; SEVILLA, J. M. F.; CHISTI, Y.; GRIMA, E. M.; A SACRAMENTO, A. T.; GARCÍA-JIMÉNEZ, P.; ALCÁZAR, R.; TIBURCIO, A. F.; ROBAINA, R. R. Influence of Polyamines on the Sporulation of *Grateloupia* (Halymeniaceae, Rhodophyta). **Journal of Phycology**, v.40, p.887–894, 2004.

SAFI, C. et al. Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. Elsevier Ltd, , 2014a.

SAFI, C., ZEBIB, B., MERAH, O., PONTALIER, P.-Y., & VACA-GARCIA, C. Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 35, 265–278. doi:10.1016/j.rser.2014.04.007. 2014.

SAJILATA, M. G., SINGHAL, R. S., & KAMAT, M. Y. Supercritical CO₂ extraction of γ -linolenic acid (GLA) from *Spirulina platensis* ARM 740 using response surface methodology. **Journal of Food Engineering**, 84(2), 321–326. doi:10.1016/j.jfoodeng.2007.05.028. 2008

SANTHOSH KUMAR, K.; PRASANTHKUMAR, S.; RAY, J. G. Biomass yield, oil productivity and fatty acid profile of *Chlorella lobophora* cultivated in diverse eutrophic wastewaters. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 11, p. 338–344, 1 jul. 2017.

SANTOS, F. M., & PIRES, J. C. M. Nutrient recovery from wastewaters by microalgae and its potential application as bio-char. **Bioresource Technology**, 267, 725–731. doi:10.1016/j.biortech.2018.07.119. 2018.

SANTOS, N. H. S. DOS et al. Efeito do extrato de algas no desempenho germinativo e crescimento radicular em sementes de feijão BRS Estilo em resposta a diferentes métodos de aplicação. **Hoehnea**, v. 48, 2021a.

SARADA, R.; PILLAI, M. G.; RAVISHANKAR, G. A. Phycocyanin from *Spirulina sp*: influence of processing of biomass on phycocyanin yield, analysis of efficacy of extraction methods and stability studies on phycocyanin. **Process Biochem**. 34: 795–801, 1999.

SARKAR, S. et al. Extraction of chlorophylls and carotenoids from dry and wet biomass of isolated *Chlorella Thermophila*: Optimization of process parameters and modelling by artificial neural network. **Process Biochemistry**, v. 96, p. 58–72, 1 set. 2020.

SATI, H. et al. Microalgal lipid extraction strategies for biodiesel production: A review. **Algal Research** Elsevier B.V., , 1 mar. 2019.

SAVAGE, P. E.; HESTEKIN, J. A. A Perspective on Algae , the Environment , and Energy. **Environmental Progress & Sustainable Energy**, v. 32, n. 4, p. 877–883.

SCHENK, P.M.; STEPHENS, E.; POSTEN, C. Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production. **Bioenergy Research**. v.1, p.20-43, 2008.

SCHMIDT, J. J.; GAGNON, G. A.; JAMIESON, R. C. Microalgae growth and phosphorus uptake in wastewater under simulated cold region conditions. **Ecological Engineering**, v. 95, p. 588–593, 1 out. 2016.

SCHULZ, C. T.; HENKES, J. A. Reaproveitamento d'água da estação de tratamento de efluentes: empresa Intelbras–São José (SC). **Revista Gestão & Sustentabilidade Ambiental**, v. 2, n. 2, p. 338-384, 2013.

SCHUMANN, R. et al. Chlorophyll extraction methods for the quantification of green microalgae colonizing building facades. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 55, n. 3, p. 213–222, abr. 2005.

SEO, S. H. et al. **Light intensity as major factor to maximize biomass and lipid productivity of *Ettlia* sp. in CO₂-controlled photoautotrophic chemostat**. [s.l.] Elsevier Ltd, 2017.

SEO, S.-H., HA, J.-S., YOO, C., SRIVASTAVA, A., AHN, C.-Y., CHO, D.-H., OH, H.-M. Light intensity as major factor to maximize biomass and lipid productivity of *Ettlia* sp. in CO₂ -controlled photoautotrophic chemostat. **Bioresource Technology**, 244, 621–628. doi:10.1016/j.biortech.2017.08.020. 2017

SHAABAN, M. M.; EL-SAADY, A. K. M.; EL-SAYED, A. E. K. Green Microalgae Water Extract and Micronutrients Foliar Application as Promoters to Nutrient Balance and Growth of Wheat Plants. **Journal of American Science**. v.6, p.631-636, 2010.

SHARMA, M., THUKRAL, N., SONI, N. K., E MAJI, S. Microalgae as Future Fuel: Real Opportunities and Challenges. **Journal of Thermodynamics & Catalysis**, 6(1), 2015.

SHEEHAN, J. et al. Look Back at the U.S. Department of Energy's Aquatic Species Program: Biodiesel from Algae; **Close-Out Report**. 1 jul. 1998.

SHINTATE GALINDO, F. et al. Extrato de algas como bioestimulante na nutrição e produtividade do trigo irrigado na região de Cerrado. **COLLOQUIUM AGRARIAE**, v. 15, n. 1, p. 130–140, 1 fev. 2019a.

SILVA, N., GONÇALVES, A., MOREIRA, F., SILVA, T., MARTINS, F., ALVIM-FERRAZ, M., PIRES, J. Towards sustainable microalgal biomass production by phycoremediation of a synthetic wastewater: A kinetic study. **Algal Research**, 11, 350-358. 2015

SILVEIRA, S. T.; BURKERT, J. F. M.; COSTA, J. A. V.; BURKERT, C. A. V.; KALIL, S. J.; Optimization of phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* using factorial design. **Bioresour. Technol**. 98: 1629–1634, 2007.

SINGH, G., & PATIDAR, S. K.. Microalgae harvesting techniques: A review. **Journal of Environmental Management**, 217, 499–508. doi:10.1016/j.jenvman.2018.04.010. 2018

SIPAÚBA - TAVARES, L. H. ; ROCHA, O. Produção de plâncton (fitoplâncton e zooplâncton) para alimentação de organismos aquáticos. **São Carlos: RiMA**, 106p. 2003.

SLOTH, J. K., WIEBE, M. G., & ERIKSEN, N. T. Accumulation of phycocyanin in heterotrophic and mixotrophic cultures of the acidophilic red alga *Galdieria sulphuraria*. **Enzyme and Microbial Technology**, 38(1-2), 168–175. doi:10.1016/j.enzmictec.2005.05.010. 2006

SOBRERO, M. C.; RONCO, A. Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga (*Lactuca sativa* L.). In: Morales, G. C. Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas: Estandarización, Intercalibración, resultados e aplicaciones, **IMTA**, p. 63-72., 2004.

SOLEIMANI KHORRAMDASHTI, M.; SAMIPOOR GIRI, M.; MAJIDIAN, N. Extraction lipids from *Chlorella vulgaris* by supercritical CO₂ for biodiesel production. **South African Journal of Chemical Engineering**, v. 38, p. 121–131, 1 out. 2021.

SPANOGHE, J. et al. Storage, fertilization and cost properties highlight the potential of dried microbial biomass as organic fertilizer. **Microbial Biotechnology**, v. 13, n. 5, p. 1377–1389, 1 set. 2020.

SPILLER, S., DENBEAUX, G., JONES, G., PEARSON, A. L., Fine structure of Cyanobacteria, *Spirulina platensis* and *Spirulina subsalsa*, as viewed by x-ray microscope, XM-1, beamline 6.1.2. **Department of Biology**, Mills College, USA, 2010.

SPOLAORE, P., CASSAN, C. J., DURAN, E., ISAMBERT, A. Commercial Applications of Microalgae. **J. Biosci. Bioeng.** Vol. 101, No 2: 87-96, 2006.

SUGANYA T, VARMAN M, MASJUKI H, RENGANATHAN S. Macroalgae and microalgae as a potential source for commercial applications along with biofuels production: a biorefinery approach. **Renew Sustain Energy Rev**;55:909–41. 2017

SUH, I. S.; LEE, C.G. Photobioreactor Engineering: Design and Performance. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 8, p. 313-321, 2003.

SUNDA, W.G.; PRICE, N.M.; MOREL, F.M.M. Trace metal ion buffers and their use in culture studies. In: ANDERSEN, Robert A. Algal culturing techniques. **Phycological Society of America. Elsevier Academic Press.** cap.4, p.35-63, 2005.

SUPENG, L. et al. TG-DSC-FTIR Analysis of Cyanobacteria Pyrolysis. **Physics Procedia**, v. 33, p. 657–662, 2012.

SUTHAR, S.; VERMA, R. Production of *Chlorella vulgaris* under varying nutrient and abiotic conditions: A potential microalga for bioenergy feedstock. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 113, p. 141–148, 1 jan. 2018.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. (2013). Fisiologia Vegetal. Editora Artmed, 5ª edição – cap. 11- 12; TANG, D.; HAN, W.; LI, P.; MIAO, X.; ZHONG, J. (2011). CO₂ Fixation and fatty acid composition of *Scenedesmus obliquus* and *Chorella pyrenoidosa* in response to different CO₂ levels. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 3071-3076.

TAVANANDI, H. A. et al. Simple and efficient method for extraction of C-Phycocyanin from dry biomass of *Arthrospira platensis*. **Algal Research**, v. 31, p. 239–251, 1 abr. 2018.

TERNUS, F. L. et al. Efeito do extrato de *Ascophyllum nodosum* na germinação de sementes de couve em diferentes temperaturas. **Scientific Electronic Archives**, v. 14, n. 5, p. 29–34, 30 abr. 2021.

THOMPSON, P.A.; GUO, M.; HARRISON P.J. Effects of temperature on the biochemical composition of eight species of marine phytoplankton. **J. Phycol.**, v.28, p. 481–88. 1992.

TILMAN, D., CASSMAN, G.K., MATSON, A.P., NAYLOR, R., POLASKY, S. (2002) Agricultural sustainability and intensive production practices. **Nature** 418:671–677

TZOVENIS, I.; DE PAUW, N; SORGELOOS, P. Optimisation of T-ISO biomassproduction rich in essential fatty acids. II. Effect of different light regimes on the production of fatty acids. **Aquaculture**, v. 216, p. 223-242, 2003.

ÚBEDA, B. et al. Microalgae cultivation in urban wastewater: *Coelastrum cf. pseudomicroporum* as a novel carotenoid source and a potential microalgae harvesting tool. **Bioresource Technology**, v. 228, p. 210–217, 2017.

UGWU, C. U., e AOYAGI, H. Microalgal culture systems: an insight into their designs, operation and applications. **Biotechnology**, 11(3), 127, 2012.

ULLAH K., AHMAD M., SOFIA. Assessing the potential of algal biomass opportunities for bioenergy industry: A review. **Fuel**, 143: 414-423, 2015.

ULPGC. Apostila de Maricultura Vegetal – Curso 2002-2003. Disponível em: <http://www.ulpgc.es/descargadirecta.php?codigo_archivo=4005> Acesso em: ago. 2018.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY – US EPA – **SeedGermination/ Root Elongation Toxicity Tests**. EcologicalEffects, Tests Guidelines, 1996.

VAN ATRAALEN, N.M. Assessment of soil contamination – a functional perspective. **Biodegradation**, v.13, p 41-52, 2002.

VERONESIV, D. et al. Pre-treated digestate as culture media for producing algal biomass. **Ecological Engineering**, v. 105, p. 335–340, 1 ago. 2017.

WANG, C.; FUB, C.; LIU, Y. Effects of using light-emitting diodes on the cultivation of *Spirulina platensis*. **Biochemical Engineering Journal** 37: 21–25, 2007.

WANG, J. H. et al. Microalgae-based advanced municipal wastewater treatment for reuse in water bodies. **Applied Microbiology and Biotechnology**. Springer Verlag, , 1 abr. 2017.

WHITTON, R. et al. Influence of microalgal N and P composition on wastewater nutrient remediation. **Water Research**, v. 91, p. 371–378, 15 mar. 2016.

WU, Y. H. et al. Biomass production of a *Scenedesmus* sp. under phosphorous-starvation cultivation condition. **Bioresource Technology**, v. 112, p. 193–198, maio 2012.

WUANG, S. C. et al. Use of *Spirulina* biomass produced from treatment of aquaculture wastewater as agricultural fertilizers. **Algal Research**, v. 15, p. 59–64, 2016a.

WUANG, S.C., KHIN, M.C., CHUA, P.Q.D., LUO, Y.D. Use of *Spirulina* biomass produced from treatment of aquaculture wastewater as agricultural fertilizers. **Algal Res.** 15, 59-64. , 2016

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. 5494–5500, jul. 2010.

YEH, K. L.; CHANG, J. S. Nitrogen starvation strategies and photobioreactor design for enhancing lipid content and lipid production of a newly isolated microalga *Chlorella vulgaris* ESP-31: Implications for biofuels. **Biotechnology Journal**, v. 6, n. 11, p. 1358–1366, nov. 2011.

YOUNG, B. J. et al. Toxicity of the effluent from an anaerobic bioreactor treating cereal residues on *Lactuca sativa*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 76, n. 1, p. 182–186, 1 fev. 2012a.

YUAN, X. et al. Impact of ammonia concentration on *Spirulina platensis* growth in an airlift photobioreactor. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 3, p. 3234–3239, 2011.

ZALTAUSKAITE, J.; SUJETOVIENE, G.; GUZYTE, G. Effects of salinity on earthworm (*Eisenia fetida*). **Environmental Engineering**. The 8th International Conference, Vilnius, Lithuania, May 19-20. 2008.

ZAMALLOA, C. et al. The techno-economic potential of renewable energy through the anaerobic digestion of microalgae. **Bioresource Technology**, Essex, v. 102, n. 2, p. 1149–1158, Jan. 2011.

ZHAI, J. et al. Optimization of biomass production and nutrients removal by *Spirulina platensis* from municipal wastewater. **Ecological Engineering**, v. 108, p. 83–92, 2017a.

ZHANG, L. et al. Attached cultivation for improving the biomass productivity of *Spirulina platensis*. **Bioresource Technology**, v. 181, p. 136–142, 1 abr. 2015.

ZHANG, P. et al. Effects of stepwise nitrogen depletion on carotenoid content, fluorescence parameters and the cellular stoichiometry of *Chlorella vulgaris*. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 181, p. 30–38, 15 jun. 2017.

ZHANG, Y. M. et al. Nitrogen Starvation Induced Oxidative Stress in an Oil-Producing Green Alga *Chlorella sorokiniana* C3. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, 16 jul. 2013.

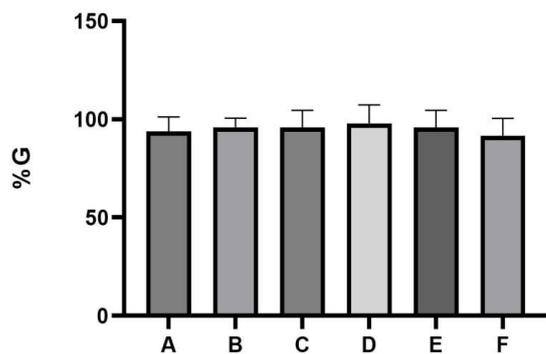
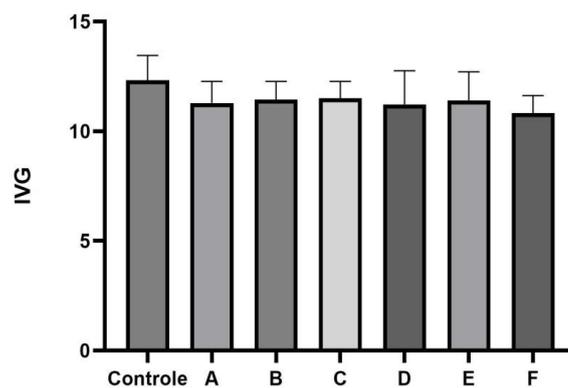
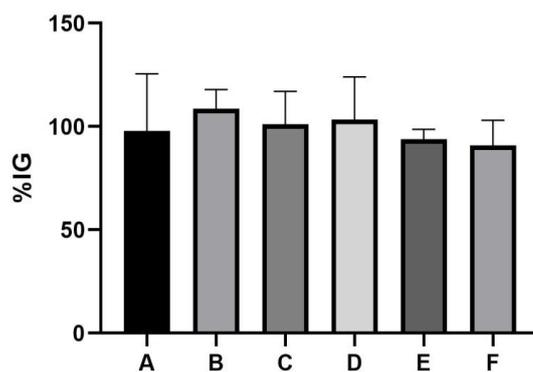
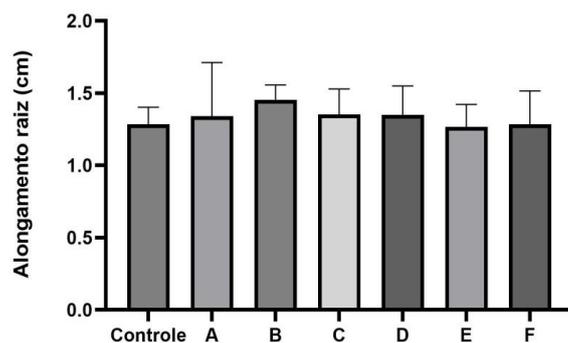
ZHOU, W. et al. Nutrients removal and recovery from saline wastewater by *Spirulina platensis*. **Bioresource Technology**, v. 245, p. 10–17, 2017.

ZHU L.. Biorefinery as a promising approach to promote microalgae industry: An innovative framework. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 41: 1376-1384, 2015.

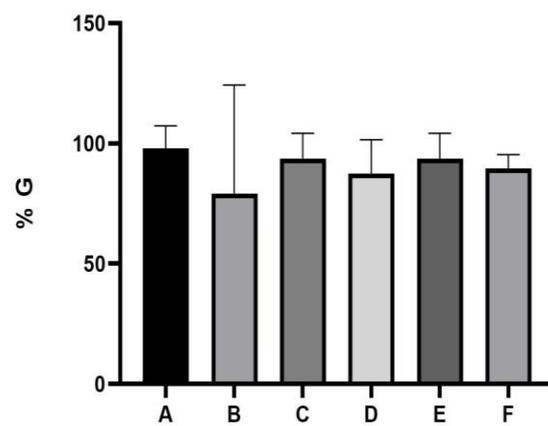
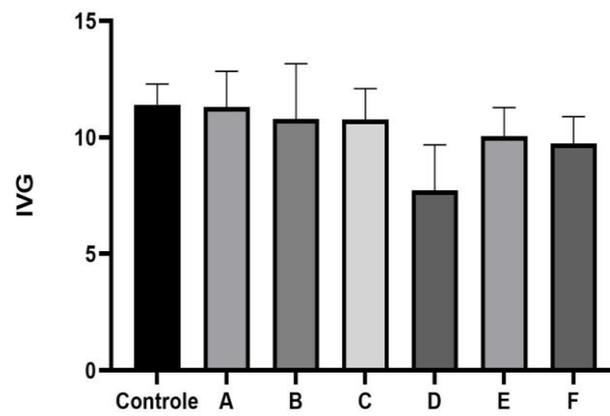
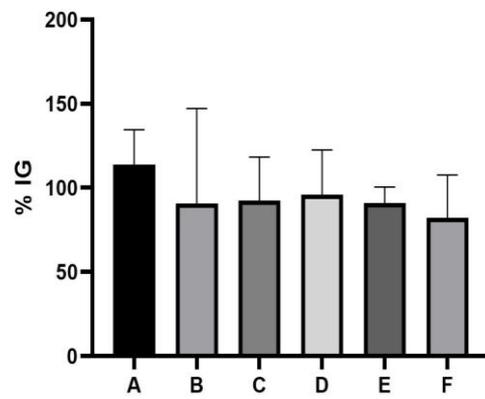
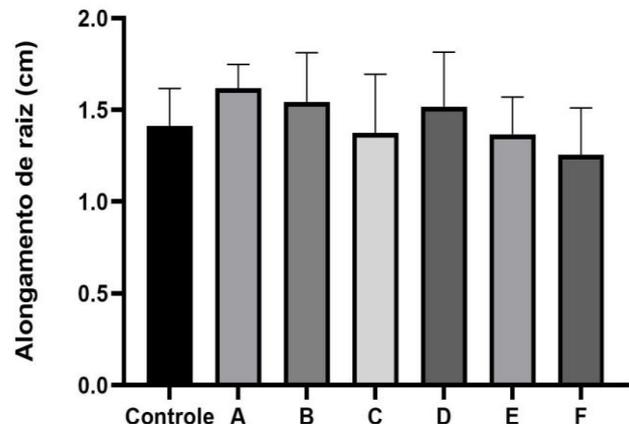
ZHUANG, L. L. et al. Enhanced attached growth of microalgae *Scenedesmus*. LX1 through ambient bacterial pre-coating of cotton fiber carriers. **Bioresource Technology**, v. 218, p. 643–649, 1 out. 2016.

APÊNDICE – Resultados dos experimentos de toxicidade feito com a biomassa das microalgas *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus ecornis*, *Spirulina platensis* e *Spirulina labyrinthiformis*.

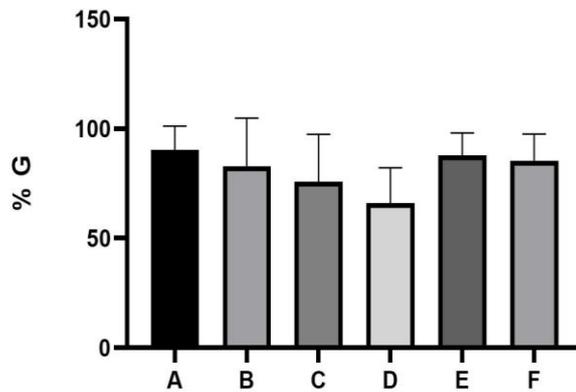
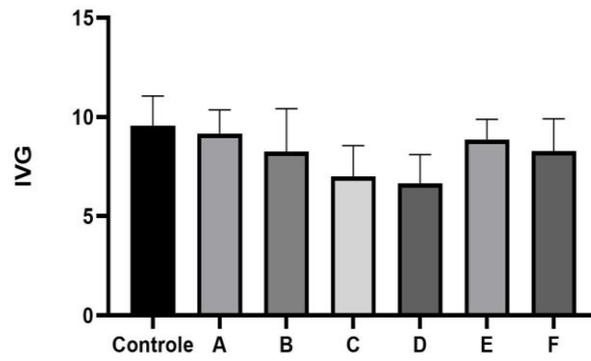
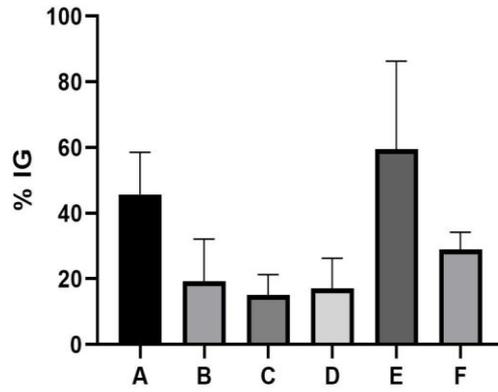
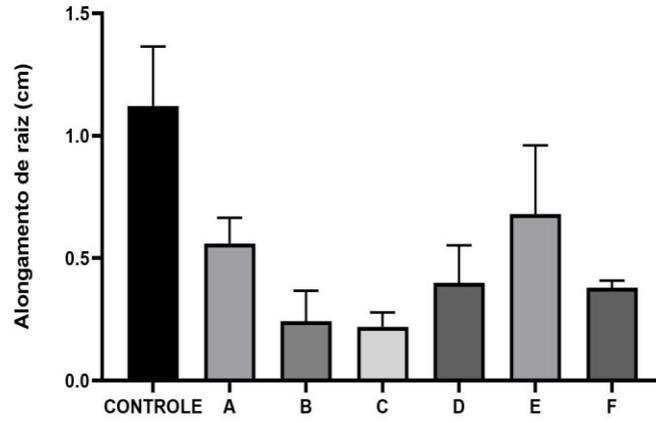
- *Chlorella vulgaris*



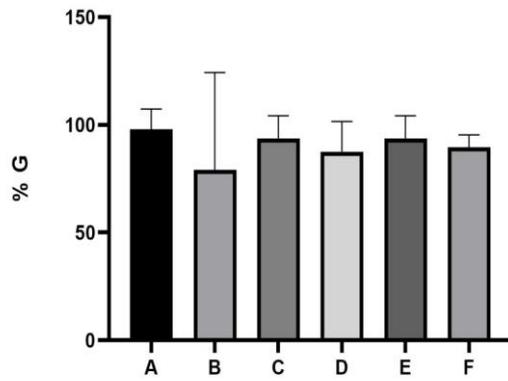
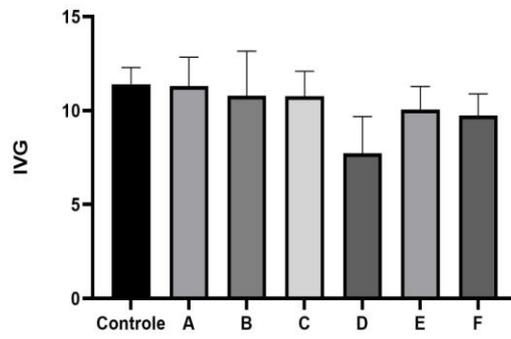
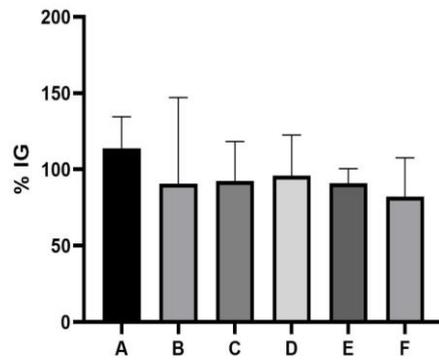
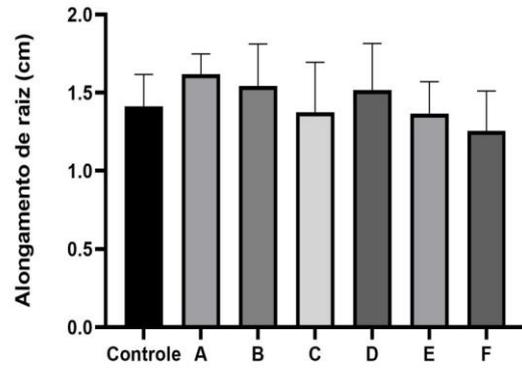
- *Scenedemus ecornis*



- *Spirulina labyrinthiformis*



- *Spirulina platensis*



ANEXO A – Composição do meio Zarrouk utilizado para cultivo da *Spirulina platensis* e *Spirulina labyrinthiformis*

Meio Zarrouk modificado por George (1976)

Composto	Concentração (g/L)	Composição da solução de microelementos	
		Composto	Concentração (g/L)
NaHCO ₃	13,61	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,001
Na ₂ CO ₃	4,03	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,000005
K ₂ HPO ₄	0,5	H ₃ BO ₃	0,01
NaNO ₃	2,5	Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	0,001
K ₂ SO ₄	1	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,001
NaCl	1	MnSO ₄ ·4H ₂ O	0,002
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2	FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,7
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	0,08	Na ₂ EDTA·2H ₂ O	0,8
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,01		
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,04		
Solução de microelementos	5 mL/L		

Fonte: George, 1976.

ANEXO B – Composição do meio WC utilizado para cultivo da *Chlorella vulgaris* e *Scenedesmus ecornis*

Componente	Solução estoque (g/L)	Volume para 1 L de WC
NaNO ₃	85,01	1 mL
NaHCO ₃	12,6	1 mL
CaCl ₂ .2H ₂ O	36,66	1 mL
MgSO ₄ .7H ₂ O	36,97	1 mL
K ₂ HPO ₄	8,71	1 mL
H ₃ BO ₃	10	0,1 mL
Solução de metais traços	-	1 mL
Solução de vitaminas	-	1 mL

Composição da solução de metais traços

Componente	Solução estoque (g/L)	Massa ou volume para 1 L de WC
Na ₂ EDTA	-	4,36 g
FeCl ₃ .6H ₂ O	-	3,15 g
CuSO ₄ .5H ₂ O	10	1 mL
ZnSO ₄ .7H ₂ O	22	1 mL
CoCl ₂ .6H ₂ O	10	1 mL
MnCl ₂ .4H ₂ O	180	1 mL
NaMoO ₄ .2H ₂ O	6	1 mL

Composição da solução de vitaminas

Componente	Solução estoque (g/L)	Massa/volume para 1 L de WC
Tiamina	0,1	-
Cianocobalamina	0,5	-
Biotina	0,5	-

Fonte: Guillard e Lorenzen, 1972.

ANEXO C – Tabela de caracterização do solo arenoso utilizado nos experimentos de germinação em solo

Caracterização do solo															
pH (1:2,5)		Complexo sortivo cmolc/kg								Valor V (sat por bases) %	100.A13+S+Al3+ %	P assimilável mg/kg	C (orgânico) g/kg	N g/kg	C/N
Água	KCL 1N	Ca2+	Mg2+	K+	Na+	Valor S (soma)	Ar 3+	H+	Valor T						
5	Insuf	0,5		0,11	0,03	0,6	0,1	0,7	1,4	43	14	36	2,6	0,2	13