



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PESCA**

CAIO LÍVIO BEZERRA HOLANDA

**CULTIVO DA MICROALGA *Chaetoceros muelleri* (Lemmermann, 1898) EM
EFLUENTE DE CARCINICULTURA E SEU EFEITO NA QUALIDADE DE ÁGUA,
PRODUÇÃO DE LIPÍDEOS E EXOPOLISSACARÍDEOS**

**FORTALEZA
2017**

CAIO LÍVIO BEZERRA HOLANDA

CULTIVO DA MICROALGA *Chaetoceros muelleri* (Lemmermann, 1898) EM
EFLUENTE DE CARCINICULTURA E SEU EFEITO NA QUALIDADE DE ÁGUA,
PRODUÇÃO DE LIPÍDEOS E EXOPOLISSACARÍDEOS

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Engenharia de pesca.

Orientador: Prof. Dr. Manuel Antônio de Andrade Furtado Neto.

FORTALEZA
2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo autor

H669c Holanda, Caio Lívio Bezerra.
Cultivo da microalga *Chaetoceros muelleri* (Lemmermann, 1898) em efluente de carcinicultura e seu efeito na qualidade de água, produção de lipídeos e exopolissacarídeos. / Caio Lívio Bezerra Holanda. – 2017.
58 f. : Il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca, Fortaleza, 2017.
Orientação: Prof. Dr. Manuel Antonio de Andrade Furtado Neto

1. Aquicultura. 2. Fitorremediação. 3. Diatomácea. I. Título

CDD 639.2

CULTIVO DA MICROALGA *Chaetoceros muelleri* (Lemmermann, 1898) EM
EFLUENTE DE CARCINICULTURA E SEU EFEITO NA QUALIDADE DE ÁGUA,
PRODUÇÃO DE LIPÍDEOS E EXOPOLISSACARÍDEOS

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Engenharia de Pesca
da Universidade Federal do Ceará, como
parte dos requisitos para obtenção do
Título de Mestre em Engenharia de
Pesca.

APROVADA EM: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Manuel Antonio de Andrade Furtado Neto (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr. José Ariévilo Gurgel Rodrigues

Dr. Glacio Souza Araujo
Instituto Federal de educação, ciência e tecnologia do Ceará (IFCE)

Dedico este trabalho ao Prof. Wladimir
Ronald Lobo Farias e a Murilo Costa
Filho, *in memoriam*.

AGRADECIMENTOS

A minha família, pelo amor, incentivo, investimento na minha educação e apoio nas horas mais difíceis.

Ao saudoso professor Wladimir Lobo, pelos ensinamentos, parceria e entusiasmo ao longo do curso de mestrado.

Ao meu orientador Prof. Dr. Manuel Antonio de Andrade Furtado Neto pela confiança e apoio nos momentos que mais precisei.

Aos pesquisadores, amigos e professores do Centro de Biotecnologia Aplicada à Aquicultura, em especial ao Msc. João Henrique, Msc. Alan Coelho, Msc. Glaydson Lima, Dr. Ariévilo Gurgel e Prof^a Dra. Alessandra Cristina pela parceria na execução deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Alberto Nunes do Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos pela concessão do efluente e espectrofotômetro. Aos pesquisadores e amigos deste laboratório, Matheus Albuquerque, Felipe Nobre e Luis Paulo pelo auxílio prestado.

A Prof^a Dra. Oscarina Viana e Dra. Cristiane Teles do Laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado e Dr. Rubens Feijó do CEDECAM pelo auxílio nas análises lipídicas.

“Eu sou de uma terra que o povo padece mas não
esmorece e procura vencer!”.

Patativa do Assaré

RESUMO

O desenvolvimento da aquicultura intensiva tem gerado impactos ambientais quando seus efluentes ricos em matéria orgânica são descartados sem tratamento prévio nos ecossistemas aquáticos. A fitorremediação por microalgas é uma alternativa promissora no tratamento de efluentes da aquicultura, pois além de melhorar qualidade da água, a biomassa algal produzida pode ser utilizada para variadas finalidades. O presente estudo teve como objetivos: cultivar a espécie de microalga marinha *Chaetoceros muelleri*, totalmente e parcialmente, em um efluente de carcinicultura; e avaliar a taxa de redução de amônia, nitrito, nitrato e fosfato, bem como, o rendimento de lipídeos e de exopolissacarídeos liberados no meio de cultivo. Três tratamentos com diferentes meios de cultura, e três repetições cada um, foram avaliados: efluente de carcinicultura (100% E); meio Guillard f/2 (100% G); e mistura de efluente de carcinicultura com Guillard f/2 (50%G+50%E). O crescimento das culturas da microalga foi acompanhado diariamente através da contagem da densidade celular. A remoção de nutrientes foi avaliada através de análises de água iniciais e finais nos meios de cultura e as extrações de lipídeos e exopolissacarídeos foram realizadas ao final do experimento. Os resultados obtidos mostraram que as diferentes culturas apresentaram crescimentos celulares similares. Quanto à remoção de nutrientes nos meios de cultura, o meio (50%G+50%E) removeu significativamente mais amônia, nitrato e fosfato, apresentando conseqüentemente a maior eficácia no tratamento de água. A produção de lipídeos não foi influenciada pelos meios de cultura, entretanto, para a produção de exopolissacarídeos, os meios (50%G+50%E) e (100% G) obtiveram quantidades significativamente maiores. Como conclusão, pode-se propor que o cultivo da microalga *C. muelleri* utilizando efluente de carcinicultura é uma ótima opção de fitorremediação, substituição de meio de cultura para produção de biomassa algal e de biomoléculas.

Palavras-chave: Aquicultura. Fitorremediação. Diatomácea. Biomoléculas.

ABSTRACT

The development of intensive aquaculture has generated environmental impacts as its effluents rich in organic matter are disposed off without prior treatment in aquatic ecosystems. Phytoremediation by microalgae is a promising alternative for treatment of aquaculture effluents, since in addition to improving water quality, the algal biomass produced can be used for a variety of purposes. This study has as objectives: to cultivate a marine microalgae species *Chaetoceros muelleri*, totally and partially, in a shrimp effluent; and to evaluate the rate of reduction of ammonia, nitrite, nitrate and phosphate, as well as, the yield of lipids and polysaccharides released (exopolysaccharides) in culture medium. Three treatments with different culture media, and three replicates each one, were evaluated: shrimp effluent (100% E), Guillard f /2 medium (100% G) and shrimp effluent mixture with Guillard f / 2 (50% G + 50% E). Growth of microalgae cultures was monitored daily by counting the cell density. The nutrient removal was evaluated through initial and final water analyzes in the culture media and the extractions of lipids and exopolysaccharides were performed at the end of the experiment. As a result, the different cultures showed similar cell growth. As for the nutrient removal in the culture media, the medium (50% G + 50% E) significantly removed more ammonia, nitrate and phosphate, and consequently has the greater efficacy in water treatment. The production of lipids was not influenced by the culture media, however, the media (50% G + 50% E) and (100% G) obtained significantly higher amounts. As conclusion, the cultivation of the *C. muelleri* using shrimp effluent is an excellent choice of phytoremediation, replacement of culture medium for the production of algal biomass and biomolecules.

Keywords: Aquaculture. Phytoremediation. Diatom. Biomolecules.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
3	MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1	Local do experimento	20
3.2	Obtenção da Cepa de <i>Chaetoceros muelleri</i> e meios de cultura	20
3.3	Esterilização e adaptação das cepas	22
3.5	Qualidade de água	24
3.5.1	Determinação de Amônia	24
3.5.2	Determinação de Nitrito	24
3.5.3	Determinação de Nitrato	25
3.5.4	Determinação de Fosfato	25
3.6	Acompanhamento do crescimento das culturas	25
3.7	Extração e rendimento lipídico da biomassa seca	27
3.8	Obtenção de exopolissacarídeos do meio de cultura	27
3.9	Análise estatística	28
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
4.1	Curvas e parâmetros de crescimento de <i>C. muelleri</i>	29
4.2	Parâmetros de qualidade de água	33
4.2.1	Remoção de Amônia	34
4.2.2	Remoção de Nitrito	36
4.2.3	Remoção de Nitrato	37
4.2.4	Remoção de Fosfato	38
4.3	Rendimento lipídico	40
4.4	Rendimento de exopolissacarídeos	43
5	CONCLUSÕES	47
	REFERÊNCIAS	48

1 INTRODUÇÃO

A produção de pescado mundial tem crescido constantemente nas últimas cinco décadas de acordo com as informações mais recentes sobre a produção global de pescado do documento “Estado Mundial da Pesca e Aquicultura”, publicado pela Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO). Isso se deve ao constante crescimento da atividade aquícola, haja vista que a captura de organismos aquáticos pela pesca extrativista alcançou os limites sustentáveis e segue praticamente estável desde o final da década de 1980. Além disso, a demanda mundial pelo pescado cresce em ritmo acelerado em função do crescimento da população e da busca por alimentos saudáveis (FAO, 2016).

A aquicultura, ou cultivo de organismos aquáticos, vive atualmente um momento que evidencia seu constante crescimento, pois pela primeira vez na história a produção aquícola de pescado para consumo humano, que foi de 73,8 milhões de toneladas em 2014, ultrapassou a produção de pescado capturado pela pesca extrativista na natureza, que foi de 72,5 milhões de toneladas em 2014, de acordo com o documento da FAO (2016). A mesma publicação mostrou que a produção mundial da aquicultura teve um crescimento de 18,1 milhões de toneladas de 2009 a 2014, o equivalente a um crescimento de 24,52%.

O crescimento da aquicultura também está relacionado diretamente à crescente demanda por alimentos aquáticos, a qual foi impulsionada pelo aumento da população mundial aliada ao aumento de consumo de pescado “per capita”, que passou de 9,9 kg/ano na década de 1960, para 18,9 kg/ano em 2010 (FAO, 2014). Desta forma, é provável que a aquicultura seja no futuro a única forma de produzir pescado de alta qualidade para suprir as necessidades nutricionais da população cada vez mais crescente. Também segundo a mesma publicação, a aquicultura é o setor de produção animal, voltado à alimentação, com a maior taxa de crescimento, representando quase a metade da oferta total de pescado consumido no mundo.

Contudo, o desenvolvimento contínuo da aquicultura com sistemas de produção cada vez mais intensivos, tem provocado alguns problemas ambientais, inclusive a produção de efluentes aquícolas ricos em matéria orgânica (MOOK *et al.*, 2012). O descarte inapropriado destes efluentes pode resultar em impactos negativos sobre o meio ambiente, haja vista que as águas residuais da aquicultura

possuem compostos nitrogenados, fosfatados e carbono orgânico dissolvido que podem deteriorar a qualidade da água, quando estão em altas concentrações (NORA'AINI *et al.*, 2005).

Para evitar os impactos ambientais negativos da aquicultura é fundamental realizar tratamento prévio das águas residuais antes do seu descarte em um corpo hídrico receptor. Caso contrário, esses efluentes podem causar eutrofização e desequilíbrio ecológico (FERNANDEZ *et al.*, 2008).

De modo a reduzir tais impactos ambientais causados pela liberação dos efluentes aquícolas, pesquisadores buscam novas tecnologias de produção com menor gasto de água e alternativas de tratamento e reutilização de água (AVNIMELECH, 2009). Diversos métodos (físicos, químicos e biológicos) têm sido empregados no tratamento dos efluentes provenientes da aquicultura (LIN *et al.*, 2002). A fitorremediação, ou seja, o tratamento da qualidade de água através de vegetais capazes de assimilar os compostos poluentes do meio ambiente é um dos métodos biológicos que se destacam por serem ambientalmente seguros. Além de remover os compostos tóxicos, estes organismos podem ser utilizados para fins de interesse econômico (ZHANG *et al.*, 2007).

A fitorremediação por microalgas tem se mostrado uma alternativa promissora no tratamento de águas residuais da aquicultura, pois além de realizar o tratamento da qualidade da água, também gera biomassa algal, a qual pode ser utilizada para variadas finalidades (NASIR *et al.*, 2015), como o aproveitamento do óleo produzido, tendo em vista que as microalgas conseguem produzir uma grande quantidade de óleo por área, superior as principais plantas terrestres oleaginosas (CHISTI, 2007). Além disso, a biomassa de algas apresentam diversas moléculas que possuem atividade biológica, como por exemplo, os polissacarídeos, compostos orgânicos que podem ser utilizadas em diferentes aplicações farmacológicas possuindo propriedades antivirais, antioxidantes e anti-inflamatórias (RAPOSO; MORAIS; MORAIS, 2013).

Portanto, este estudo teve como objetivos: cultivar a espécie de microalga marinha *Chaetoceros muelleri*, totalmente e parcialmente em efluente da carcinicultura; e avaliar a remoção de amônia, nitrito, nitrato e fosfato, bem como, o rendimento de lipídeos e polissacarídeos liberados (exopolissacarídeos) no meio de cultura.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A aquicultura pode ser definida como o cultivo de organismos vivos que possuem pelo menos uma parte do seu ciclo de vida na água. Esta atividade é equiparada à atividade agropecuária, de acordo com o artigo 20 da Lei Nº 11.959 de 2009. A aquicultura é uma atividade milenar, havendo registros da criação de carpas e de outros peixes pelos chineses há 4.000 anos (CAMARGO; POUHEY, 2005).

A carcinicultura é o ramo específico da aquicultura voltado para a criação de crustáceos, tendo os camarões como destaque. O camarão *Penaeus vannamei* é a principal espécie cultivada, haja vista que no ano de 2014 representou 80% da produção mundial de camarões cultivados de 3.668.681 toneladas (ABCC, 2017).

Como qualquer cultivo intensivo de animais pode gerar impactos positivos e negativos na localidade inserida, a carcinicultura também pode ocasionar problemas do ponto de vista ambiental. Esses impactos não estão restritos à fase de implantação, tendo em vista que na fase da despesca (colheita dos camarões), muitas vezes são lançados no ambiente os efluentes com todos os insumos utilizados no cultivo. Desta forma, a despesca tem sido apontada como a fase que mais gera danos ao ambiente (BRUMMETT, 2003; PÁEZ-OSUNA *et al.*, 2003).

Os efluentes da carcinicultura, principalmente de sistemas de produção semi-intensivos e intensivos são, de uma maneira geral, ricos em nutrientes (amônia, nitrito, nitrato, fosfato) que podem gerar eutrofização se forem descartados diretamente em corpos d'água receptores (JONES *et al.*, 2001; GÁL *et al.*, 2003; FIGUEIRÊDO *et al.*, 2006; ANH *et al.*, 2010; SOUZA, 2013).

No Brasil, o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), órgão consultivo do Ministério do Meio Ambiente (MMA), através das resoluções Nºs 357/2005 e 430/2012, determinaram valores limites recomendados para concentrações de Nitrogênio e Fósforo nos efluentes da carcinicultura (Tabela 1).

Segundo Guimarães (2008), os nutrientes presentes nos efluentes aquícolas são fornecidos na alimentação, pois 60% do nitrogênio e 11% do fósforo das rações são perdidos na água através das excretas dos camarões e pela decomposição da ração não consumida. Desta forma, o tratamento destes pode ser realizado por organismos biorremediadores, tais como animais filtradores e organismos fotossintetizantes que reduzem alguns compostos tóxicos da água.

Tabela 1 - Níveis máximos de nutrientes recomendados pelo CONAMA para efluentes da carcinicultura.

Parâmetros	Concentração em mg/L
Fósforo Total	0,062
Nitrogênio amoniacal	20,00
Nitrito	0,070
Nitrato	0,40

Fonte – CONAMA, MMA.

As microalgas são organismos unicelulares, filamentosos ou coloniais, que podem apresentar estrutura celular procariótica ou eucariótica (BASHAN; BASHAN, 2010). Microalgas possuem clorofila e outros pigmentos fotossintéticos (RAVEN *et al.*, 2001) e constituem a base da cadeia alimentar (GAFFNEY; O'ROURKE; MURPHY, 2014), sendo responsáveis pela produtividade primária dos oceanos e dos ecossistemas aquáticos continentais. Além disso, elas são os principais responsáveis pela fixação do CO₂ (CHISTI, 2007) e pela produção de oxigênio global (TAHMASEBI *et al.*, 2013).

Na indústria aquícola, as microalgas possuem um papel vital, pois são cultivadas para serem destinadas a alimentação de peixes, crustáceos e moluscos, principalmente durante a fase de larvicultura destes animais (GUEDES; MALCATA, 2012). Elas são bastante utilizadas devido ao seu alto valor nutricional, tamanho adequado, alta taxa de crescimento e por produzirem biomoléculas com diversas propriedades importantes (ROY; PAL, 2015).

Mais de 100.000 espécies de microalgas já foram identificadas, de acordo com Ohseet *al.* (2007). As principais classes são as Cyanophyta (cianobactérias), Prochlorophyta, Bacillariophyceae (diatomáceas), Dinophyceae (dinoflagelados), Prymnesiophyceae (cocolitoforídeos), Cryptophyceae (criptomônadas), Prasinophyceae e Chlorophyceae (algas verdes) (BICUDO; MENEZES, 2006).

As microalgas da classe Bacillariophyceae, também conhecidas como diatomáceas, são organismos unicelulares, eucarióticos e fotossintéticos que possuem tamanho celular variando entre 5 µm à 0,5 mm. Estas microalgas se caracterizam por possuírem frústulas compostas por sílica, podendo ser encontradas em formas solitárias ou agregadas formando colônias (KALE; KARTHICK, 2015).

Diatomáceas estão classificadas em dois grupos principais, de acordo com a morfologia das frústulas: diatomáceas cêntricas com simetria radial e diatomáceas penadas, com simetria bilateral. Estas microalgas possuem como produtos de reserva, a crisolaminarina (polissacarídeo), e gotículas de óleo. Os principais pigmentos fotossintéticos das diatomáceas são: clorofilas *a* e *c*, β -caroteno, fucoxantina, diadinoxantina e diatoxantina (LOURENÇO, 2006).

As diatomáceas possuem grande importância ecológica, pois são responsáveis por cerca de 20 a 25% da produção global de oxigênio e constituem cerca de 40% da biomassa fitoplanctônica global, o que corresponde a 25% da produtividade primária líquida (SMOL; STOERMER, 2010). Elas são microalgas fundamentais no ciclo biogeoquímico de vários componentes, especialmente da sílica e carbono, sendo o grupo de fitoplâncton eucariótico mais importante na fixação de CO₂, responsável por mais de 25% do sequestro de carbono global (FIELD *et al.*, 1998). A produção das diatomáceas é destinada principalmente para alimentação de espécies aquícolas em fases iniciais de desenvolvimento. Entretanto, recentemente, a biomassa de diatomáceas vem ganhando força no mercado de “nutracêuticos” destinados a alimentação humana através de suplementos alimentares (GÜGI *et al.*, 2015).

Além disso, as diatomáceas têm sido utilizadas como bioindicadores de qualidade de água e no tratamento de águas residuais ricas em compostos nitrogenados, fosfatados e metais pesados, purificando as mesmas e melhorando a sua qualidade (VENKATESAN *et al.*, 2006; PISTOCCHI *et al.*, 2010).

Devido às microalgas possuírem diversas propriedades biotecnológicas, cada vez mais vem crescendo o interesse em cultivá-las. Elas podem ser utilizadas na alimentação humana (principalmente como nutracêuticos) e animal, produção de biocombustíveis, produção de biomoléculas de interesse farmacológico e cosmético, e no tratamento de águas residuais de várias atividades (LOURENÇO, 2006).

Dentre as diatomáceas, a espécie *Chaetoceros muelleri* (Figura 1) é uma das mais importantes em aquicultura, pois é amplamente utilizada na larvicultura de crustáceos, peixes e moluscos. Estas microalgas possuem algumas características importantes, tais como: a) alta qualidade nutricional, principalmente por possuir elevado teor de lipídeos, em particular ácidos graxos poli-insaturados; b) rápido crescimento em ambientes fechados ou ao ar livre; e c) resistência a condições adversas (LOPEZ-ELIAS *et al.*, 2008; MARTINEZ-CÓRDOVA *et al.*, 2012).

Segundo o site Algaebase, o posicionamento taxonômico da espécie cultivada é:

Divisão Bacillariophyta

Classe Mediophyceae

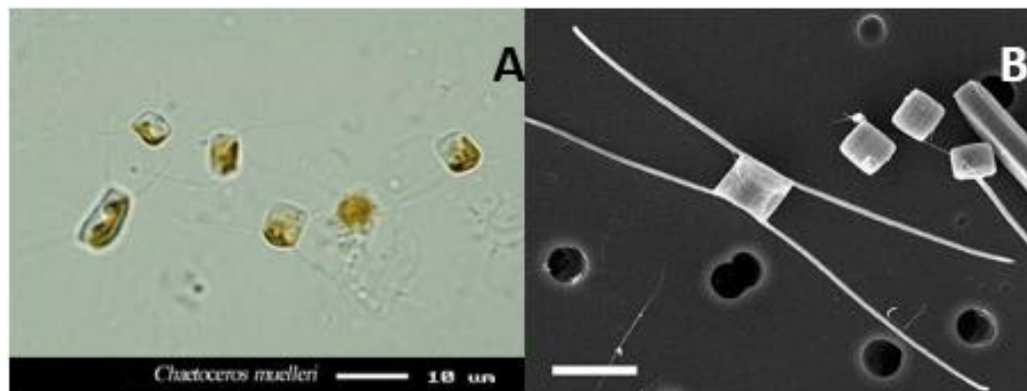
Ordem Chaetocerotales

Família Chaetocerotaceae

Chaetoceros muelleri Lemmermann

Além disso, a microalga *C.muelleri* é considerada como uma das diatomáceas de grande potencial para produção de biodiesel devido a esta espécie armazenar grandes quantidades de conteúdo lipídico como substância de reserva (WANG *et al.*, 2014).

Figura 1 - Imagens da microalga *Chaetoceros muelleri* em microscópio ótico (A) e em microscópio eletrônico de varredura (B).



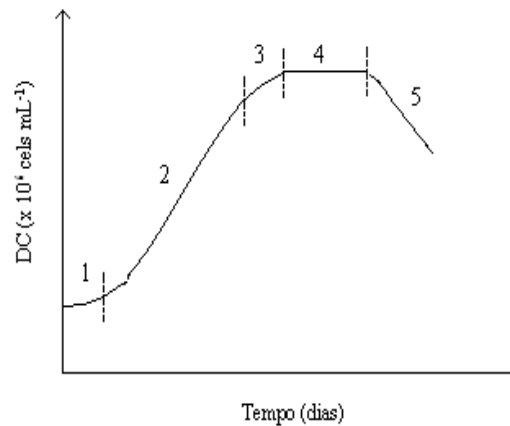
Fonte: (A) <http://algae.ihb.ac.cn/english/algaeDetail.aspx?id=467;>

(B) <https://nas.er.usgs.gov/queries/GreatLakes/FactSheet.aspx?SpeciesID=1674.>

O tratamento de efluentes aquícolas por microalgas se baseia principalmente na remoção de compostos nitrogenados e fosfatados da água (RUIZ-MARTINEZ *et al.*, 2012). Isto porque nos efluentes geralmente ocorre a predominância de nitrogênio amoniacal, forma de nitrogênio que é preferencialmente assimilada pelas microalgas (LOURENÇO, 2006), o que viabiliza o uso destes efluentes como meio de cultura para as microalgas. Além disso, as microalgas também são capazes de remover metais pesados, incorporando-os em sua parede celular (RICHARDS; MULLINS, 2013), bem como outros compostos orgânicos tóxicos como fenóis e clorofenóis (CHIAIESE *et al.*, 2011).

Em cultivos de microalgas, após sua inoculação em meio de cultura, ocorre o crescimento populacional ao longo do tempo, conforme a curva apresentada na Figura 2.

Figura 2 - Curva de crescimento de uma microalga expressa em densidade celular por dia de cultivo. Os números representam as cinco diferentes fases de um cultivo de uma microalga típica.



Fonte: Coutteau, 1996.

Na fase inicial de um cultivo de microalgas, geralmente não há crescimento populacional, pois esse primeiro momento é de adaptação das células ao novo ambiente de cultivo. Na segunda fase, com as células já adaptadas, ocorre um incremento exponencial da população algal. A terceira fase consiste em uma desaceleração de crescimento, por conta da redução de nutrientes e efeitos de sombreamento, assim diminuindo a taxa de crescimento específica. A quarta fase é conhecida como fase estacionária do cultivo, onde também por conta da redução dos nutrientes e aumento de metabólitos no meio, a taxa de crescimento se iguala à taxa de mortalidade, mantendo a população constante por um determinado período. E por fim, com o completo esgotamento dos nutrientes, grande quantidade de metabólitos e autólise celular, o cultivo entra na quinta fase, ou fase de morte, onde ocorre uma significativa redução da população algal (HERNANDEZ *et al.* 2009).

A biomassa microalgal gerada em um cultivo é fonte de matéria-prima para distintos fins (DE LA NOUE; PROULX, 1988). Contudo segundo Yang *et al.* (2011), a composição bioquímica dessa biomassa, sofre influência dos nutrientes contidos no meio de cultura utilizado e das condições abióticas empregadas nos cultivos, o que torna possível controlar as condições de cultivo para se produzir

determinadas moléculas de interesse (DERNER, 2006). Os principais fatores abióticos que afetam o crescimento das microalgas são: temperatura, intensidade de luz, disponibilidade de nutrientes e salinidade (RICHMOND, 2004). Dentre as várias biomoléculas produzidas pelas microalgas, temos os lipídeos e os polissacarídeos.

As microalgas são consideradas também grandes produtoras de lipídeos, pois possuem geralmente de 20 a 50 % de teor lipídico em sua composição. A maior parte dos lipídios presentes nas microalgas são triglicerídios, exatamente aqueles adequados para produção de biodiesel (URI; TATYANA; MEIRA, 2010). A alta produtividade de óleo das microalgas supera a de qualquer planta oleaginosa, sendo que diversas espécies apresentam elevadas concentrações de lipídeos, características favoráveis a produção de biodiesel (CHISTI, 2007). Desta forma, microalgas constituem uma ótima fonte de matéria-prima para a produção de biocombustíveis, sendo uma excelente alternativa aos tradicionais combustíveis fósseis. Algumas microalgas marinhas como as diatomáceas, são ainda mais propícias, devido produzir altas quantidades de lipídeos como substância de reserva, especialmente em condições desfavoráveis (BROWN *et al.*, 1997).

Os polissacarídeos são açúcares constituídos por monossacarídeos conectados através de ligações glicosídicas e são geralmente reconhecidos como metabólitos não tóxicos (DOGRA *et al.*, 2017). Polissacarídeos são compostos por cadeias de 40 a 50 monossacarídeos diferentes (hexoses e pentoses), incluindo muitos açúcares complexos, estando presentes em muitos organismos (DELATTRE *et al.*, 2016). Estas moléculas de açúcares podem ser utilizadas em diferentes aplicações farmacológicas possuindo várias propriedades, dentre elas, antivirais, antioxidantes e antiinflamatórias (RAPOSO; MORAIS; MORAIS, 2013). Estudos recentes têm demonstrado que os polissacarídeos extraídos de algas promovem a saúde e atuam na prevenção de doenças, ainda com ampla aplicação nas indústrias de cosméticos e farmacêutica (MARAN; MEKALA; MANIKADAN, 2013).

Além disso, microalgas frequentemente excretam substâncias poliméricas, em um processo fisiológico natural, sendo que a maior parte desse conteúdo é de exopolissacarídeos (XIAO; ZHENG, 2016). Os exopolissacarídeos (EPS) são biopolímeros de alto peso molecular que podem ser encontrados ligados à parede celular ou excretados para o meio ambiente durante o crescimento (TRABELSI *et al.*, 2016), estando envolvidos nas interações célula a célula, adesão e formação de biofilmes (DERTLI; MAYER; NARBAD, 2015).

Os exopolissacarídeos possuem estruturas de até 12 diferentes monossacarídeos (DELATTRE *et al.*, 2016), sendo que nem sempre é fácil a detecção de exopolissacarídeos. Isto porque estes metabólitos muitas vezes são sintetizados pelas microalgas apenas em condições específicas, ou durante determinadas fases do crescimento das mesmas. Contudo, uma vez liberado para o meio de cultura, os exopolissacarídeos podem ser facilmente recuperados e purificados (BAFANAA, 2013).

Segundo Markou e Nerantzis (2013), se estima que as microalgas produzam de 0,5 a 20 g.L⁻¹ de exopolissacarídeos. A maior parte da excreção desses biopolímeros ocorre durante a fase estacionária, indo até a fase de senescência (REVIERS, 2006). As diatomáceas liberam assim uma grande quantidade de carbono orgânico sob a forma de exopolissacarídeos no meio ambiente durante o seu crescimento (XIAO; ZHENG, 2016).

Apesar das vantagens de se cultivar microalgas, a produção das mesmas requer altos investimentos para instalação e operação, tais como, mão de obra, energia, nutrientes e separação da biomassa algal (RICHMOND, 2004).

Os meios de cultura constituem o principal custo de produção de microalgas, podendo inviabilizar economicamente os cultivos em grande escala (VENKATESAN *et al.*, 2006). Além do mais, esses meios de cultura podem ser difíceis de serem encontrados nos mercados locais, por serem muitas vezes constituídos de nutrientes altamente especializados (MARTINEZ-CÓRDOVA *et al.*, 2012). Desta maneira, é importante o desenvolvimento de novas pesquisas visando a utilização de águas residuais para a produção em massa de microalgas, a fim de diminuir os custos de produção e viabilizar o processo produtivo em grande escala (GÓMEZ-SERRANO *et al.*, 2015).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Local do experimento

O experimento foi realizado no Laboratório de Planctologia do Centro de Biotecnologia Aplicada a Aquicultura (CEBIAQUA) do Departamento de Engenharia de Pesca (DEP) da Universidade Federal do Ceará (UFC).

3.2 Obtenção da Cepa de *Chaetoceros muelleri* e meios de cultura

A cepa da microalga *Chaetoceros muelleri* foi obtida no cepário do Laboratório de Planctologia do CEBIAQUA/DEP/UFC. A cepa foi mantida inicialmente em meio Guillard f/2 (GUILLARD, 1975) modificado, cuja composição é mostrada na Tabela 2. A composição da solução de metais traço do meio Guillard f/2 está descrita na Tabela 3.

Tabela 2 - Composição do meio Guillard f/2 modificado utilizado para cultivo da microalga *C.muelleri*.

Solução	Componentes	Solução estoque (g L ⁻¹)	Quantidade no meio de cultura (mL L ⁻¹)
1	Nitrato de sódio	75	1,0
2	Fosfato de sódio	5	1,0
3	Silicato de sódio	30	1,0
4	Solução de vitaminas	*	0,5
5	Metais traço	-	1,0

Fonte: Guillard, 1975. * 50 mL de água destilada mais duas ampolas de Citoneurin® (Vitaminas: B1 e B6 100 mg; B12 5000 mcg).

Tabela 3 - Composição da solução de metais traço do meio Guillard f/2.

Componentes	Solução estoque (g L ⁻¹)	Quantidade na solução de metais traço
Cloreto de ferro	-----	3,15 g L ⁻¹
Na ₂ EDTA	-----	4,36 g L ⁻¹
Sulfato de cobre	9,8	1,0 mL L ⁻¹
Molibdato de sódio	6,3	1,0 mL L ⁻¹
Sulfato de zinco	22	1,0 mL L ⁻¹
Cloreto de cobalto	10	1,0 mL L ⁻¹
Cloreto de manganês	180	1,0 mL L ⁻¹

Fonte: Guillard, 1975.

No cultivo da microalga *C. muelleri* foram utilizados três meios de cultura: a) o meio de cultura Guillard f/2; b) o Efluente de um cultivo de camarão; e c) um meio de cultura que consistiu na mistura de: 50% de meio Guillard e 50% Efluente.

A composição química do efluente de carcinicultura está mostrada na Tabela 4.

Tabela 4 - Composição química do efluente de carcinicultura utilizado para cultivo de *C.muelleri*.

Parâmetros	Quantidade no meio de cultura (mg L ⁻¹)
pH	7,5
Salinidade	30
Amônia	5,22
Nitrito	0,512
Nitrato	6,1
Fosfato	6,06

Fonte: Dados do experimento.

O efluente foi coletado de um sistema de cultivo semi-intensivo do camarão marinho *Penaeus vannamei* com diferentes densidades de estocagem, tamanhos e dias de cultivo, tendo sido o cultivo de camarão realizado no Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos (LANOA) do Centro de Estudos de Aquicultura Costeira (CEAC) do Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR) da UFC, localizado no município de Eusébio, Ceará (Figura 3).

Figura 3 - Tanques do cultivo semi-intensivo de camarão marinho *Penaeus vannamei* no Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos (LANOA), de onde foi coletado o efluente usado nesse estudo.



Fonte: Arquivo pessoal.

O efluente foi transportado em dois recipientes de 50 L do CEAC para o CEBIAQUA. Posteriormente, o efluente foi transferido para uma caixa de 150 L para sedimentação dos sólidos em suspensão por dois dias. Em seguida, o sobrenadante do efluente foi filtrado em uma malha de 30 μm para retirar resquícios de material em suspensão e plâncton. Foi adicionado ao Efluente de carcinicultura solução de silicato de sódio na concentração de 1 mg L^{-1} .

3.3 Esterilização e adaptação das cepas

As cepas de *C. muelleri* foram cultivadas em meio Guillard f/2 até o volume de 50 mL. Em seguida, o volume foi gradativamente aumentado durante cinco dias com os meios de cultura, para obtenção de novos inóculos adaptados. Para isso, foram utilizados erlenmeyers de 3 L úteis sob as mesmas condições do cultivo experimental. Todo material utilizado, bem como os meios de cultura foram esterilizados em autoclave vertical a uma temperatura de 120 °C e pressão de 1 kgf cm^{-2} durante 15 minutos.

3.4 Descrição do Experimento

O experimento foi conduzido utilizando um delineamento inteiramente casual, contendo um tratamento controle e dois tratamentos experimentais, todos em triplicatas.

Os tratamentos consistiram na utilização de três meios de cultura diferentes, foram eles:

- a) Guillard f/2 (Controle) (100% G).
- b) Efluente de carcinicultura (100% E).
- c) Guillard f/2 + Efluente de carcinicultura (1:1) (50% G + 50% E).

Os cultivos foram realizados pelo método Estacionário ou “batch” (COUTTEAU *et al.*, 1996). No início do experimento as microalgas foram inoculadas a uma densidade óptica ($\text{DO}_{700\text{nm}}$) de 0,100 determinada através de

espectrofotômetro (modelo HACH DR/2000). Para isso, foi utilizada a Equação (01) (SIPAÚBA-TAVARES; ROCHA, 2003):

$$V = v - (D_f/D_i) \cdot V \quad \text{Equação (01)}$$

Onde:

V – volume de meio de cultura por repetição.

v – volume da cultura de inóculo.

D_f – Densidade óptica desejada.

D_i – Densidade óptica do inóculo.

As microalgas foram cultivadas em garrafões do tipo PET de 10 litros (9 litros úteis) em triplicatas (Figura 4).

Figura 4 - Culturas de *C. muelleri* em garrafões do tipo PET de 10 litros.



Fonte: Arquivo pessoal.

A iluminação foi realizada utilizando-se quatro lâmpadas fluorescentes de 40 W cada, com luminosidade média de $2.378 \pm 6,3$ Lux. A aeração foi fornecida por um soprador com fluxo de ar de 3 L min^{-1} , acoplada a um filtro artesanal constituído de lã de vidro, algodão e carvão ativado. A temperatura média da sala foi de $28 \pm 1,2$ °C e o experimento teve duração de dez dias.

3.5 Qualidade de água

As concentrações de amônia, nitrito, nitrato e fosfato nos meios de cultura foram determinadas através de espectrofotometria, no início e no final do experimento (fase estacionária tardia) para verificar a máxima remoção dos nutrientes (LOURENÇO, 2006). As análises de água foram realizadas no Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos da UFC. Os valores das concentrações foram expressos em mg L⁻¹. Para isso, foram retiradas amostras de 100 mL de cada unidade experimental e centrifugadas por 5 minutos (10.000 RPM), em seguida, foram levadas para leitura em espectrofotômetro (HACH DR/2800). As taxas de remoção de nutrientes foram calculadas por comparação entre os valores obtidos ao final do cultivo e valores iniciais dos nutrientes nos meios de cultura.

3.5.1 Determinação de Amônia

A determinação de Amônia nos meios de cultura das microalgas foi realizada pelo método de NESSLER. Para isso, foram coletadas amostras de 25 mL previamente centrifugadas. Em seguida, foram adicionadas três gotas de álcool polivinil, uma gota de estabilizante mineral por parte de sal e as amostras foram agitadas para a completa homogeneização. Finalmente, foi adicionado 1 mL do reagente de Nessler em cada amostra e, após um minuto de reação, a mistura foi levada ao espectrofotômetro para a leitura da absorbância a 425 nm (comprimento de onda).

3.5.2 Determinação de Nitrito

A determinação de Nitrito foi realizada pelo método da diazotização utilizando o reagente NitriVer® Nitrite. Foram coletadas amostras de 10 mL previamente centrifugadas onde o reagente foi adicionado e homogeneizado. Após 15 minutos as amostras foram levadas ao espectrofotômetro para leitura a 507 nm (comprimento de onda).

3.5.3 Determinação de Nitrato

A determinação de Nitrato foi realizada pelo método da redução de cádmio utilizando o reagente NitraVer®5 Nitrate. Foram coletadas amostras 10 mL previamente centrifugadas onde o reagente foi adicionado e homogeneizado. Após 5 minutos as amostras foram levadas ao espectrofotômetro para leitura a 500 nm (comprimento de onda).

3.5.4 Determinação de Fosfato

A determinação de Fosfato foi realizada pelo método do ácido ascórbico utilizando o reagente PhosVer® 3 Phosphate. Para isso, foram coletadas amostras 10 mL previamente centrifugadas onde o reagente foi adicionado e homogeneizado. Após 2 minutos as amostras foram levadas ao espectrofotômetro para leitura a 890 nm (comprimento de onda).

3.6 Acompanhamento do crescimento das culturas

O acompanhamento do crescimento populacional da microalga *C. muelleri* foi realizado diariamente através da contagem da densidade celular (DC) e determinação da densidade óptica (DO_{700nm}) através de espectrofotometria (apenas para acompanhamento). Para a contagem da densidade celular (DC) foram retiradas amostras de 5 mL de cada unidade experimental e fixadas com duas gotas de lugol. Em seguida, as amostras eram transferidas para uma câmara de Neubauer (hemocitômetro) utilizando uma pipeta Pasteur, sendo a contagem feita com auxílio de microscópio óptico (Olympus cx 40). Os resultados foram expressos em cél/mL. As leituras de absorbância foram realizadas em espectrofotômetro (HACH DR/2000) utilizando alíquotas de 25 mL. Para *C. mulleri*, foi utilizado comprimento de onda de 700 nm.

Para o cálculo da densidade celular (DC) de cada repetição, foi utilizada a fórmula descrita por Sipaúba-tavares e rocha (2003):

$$DC \text{ (cél/mL)} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de células contadas}}{10 \times 4 \times 10^{-6}} \quad \text{Equação (02)}$$

Foram construídas as curvas de crescimento de cada tratamento e também determinadas suas taxas de crescimento diário (K) (divisões dia⁻¹) e densidade celular máxima (DCM) utilizando a (DC) de acordo com a equação descrita por Lourenço (2006):

$$K = \log_2 (N_f / N_0) / Dt$$

Equação (03)

Onde:

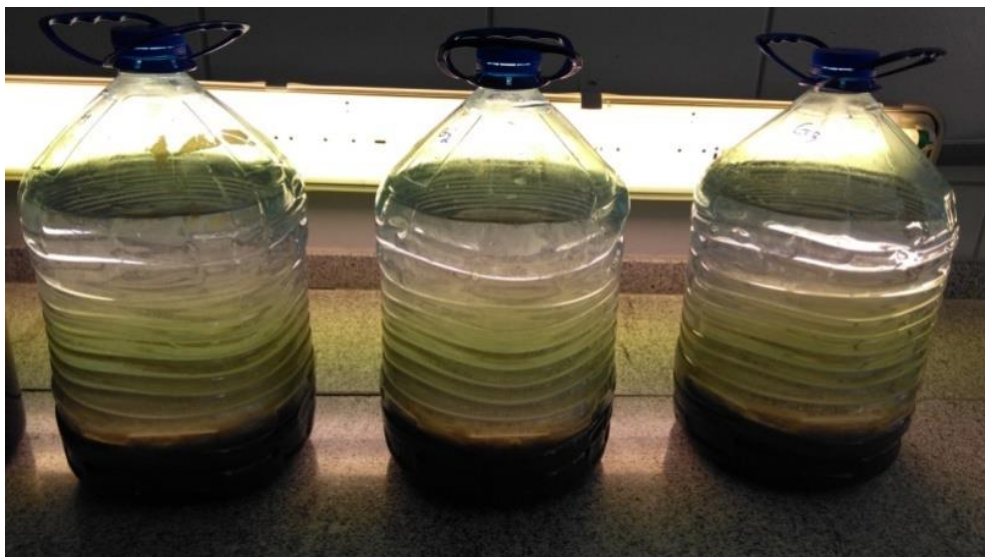
K – taxa de crescimento (divisões dia⁻¹)

N₀ e N_f – DC no início e DC no dia em que o cultivo obteve a máxima concentração celular, respectivamente.

Dt – tempo de cultivo em dias.

Durante a fase de crescimento estacionária, evidenciada por espectrofotometria e contagem da densidade celular, as culturas foram floculadas utilizando hidróxido de sódio 2 N (NaOH) (Figura 5). Após a sedimentação dos flocos, o meio de cultura foi separado da biomassa por sifonagem e a mesma lavada com água clorada sucessivas vezes para retirada de impurezas. Em seguida, a biomassa foi seca em estufa com circulação de ar a 60°C por 48 horas, pesada em balança analítica e armazenada em frasco fechado para uso posterior.

Figura 5 - Floculação química de *C. mulleri* realizada utilizando hidróxido de sódio 2 N (NaOH).



Fonte: Arquivo pessoal.

3.7 Extração e rendimento lipídico da biomassa seca

A extração lipídica foi realizada no Laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado da UFC. As análises foram feitas pelo método de Bligh e Dyer (1959), em triplicatas, partindo-se de 5 g de biomassa seca de *C. mulleri*. Para isso, utilizou-se um erlenmeyer de 250 mL no qual a biomassa ficou em contato com uma solução composta de 25 mL de metanol, 12,5 mL de clorofórmio e 5 mL de água destilada. Cada erlenmeyer foi selado e imerso em um banho ultrasônico com frequência de 40 kHz e potência de 80 W durante 30 minutos. Logo após esse período, foram adicionados a cada erlenmeyer mais 12,5 mL de água destilada e 12,5 mL de clorofórmio e levados novamente para banho ultrasônico por 15 minutos. Após a formação de duas fases distintas, a porção sólida foi filtrada à vácuo e levada a estufa para secar durante 24 h a 70° C. A biomassa final foi determinada usando-se uma balança analítica.

O percentual de lipídeos totais (PL) foi calculado através da equação:

$$PL (\%) = \frac{(\text{peso antes da extração} - \text{peso após a extração})}{5g} \times 100 \quad \text{Equação (04)}$$

3.8 Obtenção de exopolissacarídeos do meio de cultura

A obtenção de exopolissacarídeos presentes no meio de cultura de *C. muelleri* foi realizada ao final do experimento, de acordo com a metodologia adaptada de Guzman-Murilo e Ascencio (2000) em triplicatas. Inicialmente, alíquotas de 200 mL do meio de cultura foram filtradas em papel filtro de celulose para remoção de resíduos de biomassa microalgal. Em seguida, foi adicionado para cada alíquota de meio de cultura obtido, etanol de grau comercial numa proporção de (2:1) para precipitação por 24 horas a -20°C.. Após esse período, o material foi centrifugado por 5 minutos (10.000 r.p.m.) e o sobrenadante foi descartado. Posteriormente, o precipitado obtido foi lavado com álcool de grau comercial e

centrifugado por mais 15 minutos. Finalmente, os exopolissacarídeos foram secos em estufa a 60°C por 24 horas e a quantidade obtida expressa em g L⁻¹.

3.9 Análise estatística

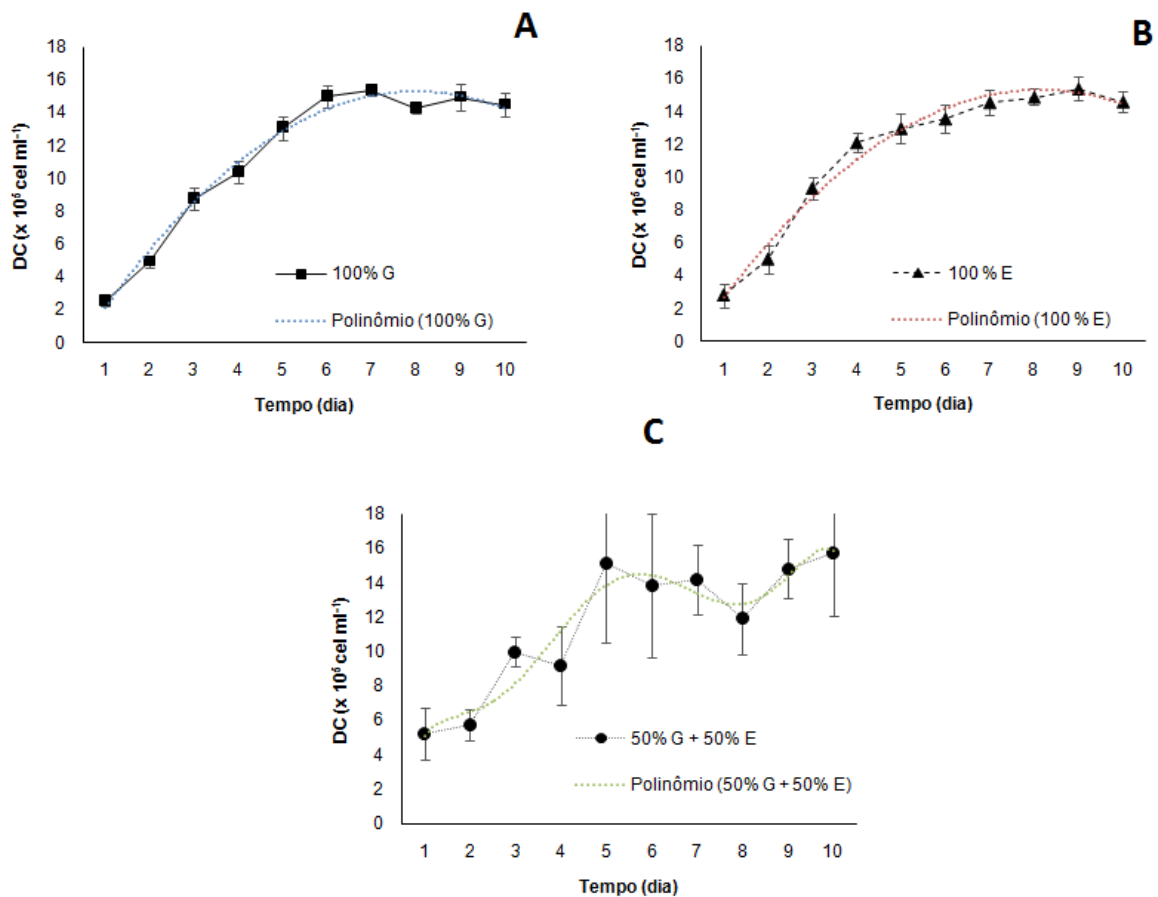
Os resultados de qualidade de água foram submetidos à análise multivariada de variância (MANOVA) ($p < 0,05$). Os resultados de crescimento foram analisados através da comparação de curvas de crescimento e análise de variância (ANOVA) simples ($p < 0,05$). Já os resultados de rendimentos lipídicos e de exopolissacarídeos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) simples ($p < 0,05$). No caso de diferenças significativas entre os dados, as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Curvas e parâmetros de crescimento de *C. muelleri*

As culturas de *C. muelleri* apresentaram curvas de crescimento com fases de crescimento distintas (Figura 6).

Figura 6 - Crescimento da microalga *C. muelleri* em diferentes culturas: (A) Cultura usando meio Guillard f/2 (100% G); (B) Cultura no meio efluente de carcinicultura (100% E); e (C) Cultura utilizando meio Guillard f/2 + efluente (50% G + 50% E) na imagem C.



Fonte: Dados do experimento.

A cultura do meio Guillard f/2 + efluente (50% G + 50% E) apresentou curva de crescimento com quatro fases (*lag*, *log*, redução de crescimento e estacionária), enquanto as culturas usando meio Guillard f/2 (100% G) e Efluente

(100% E) apresentaram três fases de crescimento (*log*, redução de crescimento e estacionária).

A fase de adaptação ou *lag* foi constatada apenas no cultivo utilizando o meio de cultura (50% G + 50% E) e teve duração de um dia, sendo essa fase finalizada com densidade celular (DC) média de $5,75 \pm 0,9 \times 10^5$ cel.ml⁻¹. Enquanto nos meios de cultura (100% E) e (100% G) não houve fase de adaptação, pois as microalgas entraram diretamente na fase de crescimento exponencial ou *log*, alcançando DC média de $5,0 \pm 0,8 \times 10^5$ cel.ml⁻¹ e $4,9 \pm 0,3 \times 10^5$ cel.ml⁻¹, respectivamente.

Do segundo ao terceiro dia, o meio (50% G + 50% E) entrou na fase *log* de crescimento alcançando DC média de $10 \pm 0,9 \times 10^5$ cel.ml⁻¹, acompanhando os outros cultivos que também permaneceram na fase *log* com meio (100% G) e (100% E) alcançando DC média de $8,75 \pm 0,9$ e $9,33 \pm 0,6 \times 10^5$ cel.ml⁻¹, respectivamente.

Já do terceiro ao quarto dia, o meio (50% G + 50% E) entrou na fase de redução de crescimento com DC média de $9,17 \pm 2,2 \times 10^5$ cel.ml⁻¹. Os outros dois meios (100% G) e (100% E) permaneceram na fase *log* de crescimento alcançando DC média de $10,42 \pm 0,6$ e $12,13 \pm 0,5 \times 10^5$ cel.ml⁻¹, respectivamente.

Do quarto ao quinto dia, o meio (100% G) permaneceu na fase *log* com DC de $13,08 \pm 0,7 \times 10^5$ cel.ml⁻¹ e o meio (100% E) entrou na fase de redução de crescimento com DC média de $13 \pm 0,8 \times 10^5$ cel.ml⁻¹. Já o meio (50% G + 50% E) continuou seu crescimento exponencial alcançando DC média de $15,13 \pm 4,5 \times 10^5$ cel.ml⁻¹.

Do quinto ao sexto dia, o meio (100% G) entrou na fase de redução de crescimento onde alcançou DC de $15,38 \pm 0,3 \times 10^5$ cel.ml⁻¹, entrando na fase estacionária a partir do sexto dia em diante. Já as outras culturas entraram em fase de crescimento estacionária no quinto dia, perdurando até o último dia do experimento. As densidades celulares médias no último dia foram de $15,75 \pm 3,6$, $14,63 \pm 0,6$ e $14,50 \pm 0,7 \times 10^5$ cel.ml⁻¹ para os meios de cultura (50% G + 50% E), (100% E) e (100% G), respectivamente.

As médias das taxas de crescimento (K) entre os meios de cultura foram similares e não apresentaram diferenças significativas ($P < 0,05$), sendo para o meio

(50% G + 50% E) de $0,58 \pm 0,31$, para (100% E) de $0,57 \pm 0,26$ e $0,56 \pm 0,25$ para (100% G), respectivamente.

As densidades celulares máximas (DCM) das culturas foram alcançadas na fase estacionária, contudo, em dias diferentes, com maior valor para o meio (50% G + 50% E), seguido pelo meio (100% E) e meio (100% G), respectivamente. No meio (100% G) a densidade celular máxima foi alcançada em um menor período, no sétimo dia de cultivo, com $15,38 \times 10^5$ cel.ml⁻¹. Já nas outras culturas a DCM foi alcançada na fase estacionária tardia. O meio (100% E) teve DCM obtida no nono dia de cultivo, com $15,42 \times 10^5$ cel.ml⁻¹ e no meio (50% G + 50% E) a DCM foi obtida no décimo dia de cultivo, com $15,75 \times 10^5$ cel.ml⁻¹ (Tabela 5).

Tabela 5 - Densidade celular máxima e taxas de crescimento dos tratamentos testados no cultivo da microalga *C. muelleri*.

Tratamento	Densidade celular máxima (cel.ml⁻¹)	Taxa de crescimento (divisões dia⁻¹)
100% Guillard	$15,38 \times 10^5$	$0,56 \pm 0,25$
100% Efluente	$15,42 \times 10^5$	$0,57 \pm 0,26$
50% G + 50% E	$15,75 \times 10^5$	$0,58 \pm 0,31$

Fonte: Dados do experimento.

Apesar da diferença na quantidade de nutrientes em cada meio de cultura, as curvas de crescimento do meio (100% G) e (100% E) apresentaram uma dinâmica de crescimento semelhante, com crescimento exponencial mais tênue quando comparado ao meio (50% G + 50% E), que apresentou crescimento exponencial mais acentuado.

Com relação às curvas de crescimento do meio (100% G) e (100% E), o meio (100% E) apresentou densidade celular média um pouco maior que o meio (100% G), atingindo a fase estacionária de crescimento no quinto dia de cultivo. A partir do quinto até o sétimo dia, o meio (100% G) obteve densidades celulares um pouco maiores, voltando a ter concentração celular menor do que o meio (100% E) do sétimo dia em diante.

A curva de crescimento do meio (50% G + 50% E) apresentou um padrão diferente dos demais tratamentos: com fase de adaptação inicial e fases com dois picos de crescimento exponencial, no terceiro e quinto dia. Apesar da maior variação na concentração de DC ao longo do cultivo, esse tratamento alcançou os maiores

valores para densidade celular máxima, densidade celular média e taxa de crescimento (K) das culturas de *C. muelleri*, sendo este meio o mais viável para a produção da microalga.

Segundo Lourenço (2006), a fase de indução em microalgas pode ser influenciada por diferenças das características dos cultivos preexistentes (usados como inóculo) e do novo. O uso de cepas velhas como inóculo podem aumentar o tempo de adaptação das microalgas, e em contrapartida, o uso de cepas novas com células bem adaptadas ao meio de cultura, podem ausentar a fase de adaptação em cultivos. Além disso, a qualidade do inóculo pode exercer grande influência sobre o crescimento das culturas, independente do meio de cultura utilizado (PELIZER *et al.*, 2003). A ausência da fase de adaptação nos meios (100% G) e (100% E) pode estar relacionada com a melhor adaptação das células a estes dois meios de cultura e com a qualidade dos inóculo utilizados.

Segundo Lourenço (2006), a fase de crescimento estacionária é a que o cultivo atinge rendimento final máximo (maior número de cel.ml⁻¹) e quase sempre é a mais longa das fases. O autor relata ainda, que nesta fase existem variações nas medidas de crescimento que podem envolver medidas positivas (divisão de células) e negativas (morte de células). Entretanto no cultivo experimental a fase de crescimento estacionária foi a mais longa, na qual se atingiu as densidades celulares máximas (DCM) em todas as culturas. O tratamento (100% G) atingiu sua DCM em menor tempo, possivelmente por ser o meio de cultura com menor quantidade de nutrientes comparado aos meios envolvendo efluentes, dessa forma, exaurindo os nutrientes mais rapidamente e atingindo crescimento máximo em período menor. Este fato é interessante do ponto de vista do menor gasto de tempo com o cultivo, pois há menor probabilidade de haver contaminações, apesar do menor valor de DCM dentre as culturas.

Barros *et al.* (2014) cultivaram *C. muelleri* usando meio Guillard f/2 em três diferentes salinidades (15, 25 e 35), sob condições de cultivo constantes (temperatura de 28 °C e intensidade de luz de 20 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ / 24h). Esses autores encontraram densidade celular máxima de 16,3, 17,6 e 10,3 x 10⁵ cel.ml⁻¹ para as respectivas salinidades acima citadas, sendo que o valor de DCM da salinidade 15 mais próximo dos valores encontrados nesta pesquisa. Já na salinidade 25, a fase estacionária a partir do quinto dia, bem como a taxa de crescimento K (0,55) foram semelhantes à deste experimento.

Oshe *et al.* (2008) cultivaram *C. muelleri* usando meio Guillard f/2 em condições controladas (temperatura de 24 °C, salinidade 29, radiação luminosa de 150 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}/24\text{h}$). Os pesquisadores encontraram densidade celular máxima com valor de $161,5 \times 10^5 \text{ cel}\cdot\text{ml}^{-1}$ e 1,30 para a taxa de crescimento (K), ou seja, bem superior à desta pesquisa. Suas culturas entraram na fase estacionária de crescimento a partir do sétimo dia de cultivo.

Pernet *et al.* (2003) testando diferentes volumes de cultura (sob condições constantes: temperatura de 19 °C e intensidade de luz de 1500 lux/24h) de *C. muelleri* utilizando meio Guillard f/2 em água do mar, encontraram praticamente o dobro de DCM comparada a este estudo, com de $3 \times 10^6 \text{ cel}\cdot\text{ml}^{-1}$, no menor volume testado (0,5 L).

Em trabalhos no qual foram utilizados efluentes de carcinicultura como meio de cultura, Alves (2013) cultivando a microalga *Chlorella vulgaris* observou um menor valor para taxa de crescimento comparado a este trabalho com $K= 0,23$, e uma fase de crescimento estacionária a partir do sétimo dia de cultivo, sob condições de cultivo de 28 °C e luminosidade constante de $60 \mu\text{E}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

4.2 Parâmetros de qualidade de água

Ao longo do cultivo foi constatada a remoção de nutrientes nos meios de cultura testados, o que em contrapartida, aumentou a densidade celular das diferentes culturas de *C. muelleri*. Os valores médios de remoção de amônia, nitrito, nitrato e fosfato nas unidades experimentais testadas são mostrados na Tabela 6.

Tabela 6 - Valores de remoção dos parâmetros de qualidade de água testados no cultivo de *C. muelleri* em diferentes meios de cultivo.

Tratamento	Remoção de Amônia (%)	Remoção de Nitrito (%)	Remoção de Nitrato (%)	Remoção de Fosfato (%)
100% G	0%	$84,02 \pm 2,4^{\text{a}}\%$	$64,52 \pm 0^{\text{b}}\%$	$61,88 \pm 24,1^{\text{b}}\%$
100% E	$52,52 \pm 6,6^{\text{a}}\%$	$24,08 \pm 1,2^{\text{c}}\%$	$39,34 \pm 2,8^{\text{c}}\%$	$22,11 \pm 6,4^{\text{c}}\%$
50% G+ 50% E	$59,50 \pm 6,46^{\text{a}}\%$	$56,44 \pm 10,6^{\text{b}}\%$	$79,86 \pm 2,0^{\text{a}}\%$	$87,25 \pm 6,5^{\text{a}}\%$

Fonte: Dados do experimento.

De um modo geral, o meio de cultura (50% G+ 50% E) apresentou os melhores resultados de remoção de nutrientes, seguido pelo meio (100% G) e pelo

meio (100% E), respectivamente. Apesar do meio (100% E), ter removido significativamente ($P < 0,05$) menos Nitrito, Nitrato e Fosfato do que o meio (100% G), esse meio assimilou maiores quantidades (mg L^{-1}) para todos os nutrientes comparado a este último.

Foi verificada uma relação inversa entre o tratamento ideal de águas residuais e a colheita de microalgas em sua máxima biomassa, pois é necessário um maior tempo de retenção para que todos os nutrientes disponíveis no meio de cultura sejam esgotados, e um menor tempo de cultivo para acumulação máxima de biomassa (RICHMOND, 2004). Além disso, segundo Lourenço (2006), muitas espécies de microalgas podem ser sensíveis a meios de cultura com altas concentrações de nutrientes, podendo inclusive entrar em fase de senescência, sendo que microalgas oceânicas são particularmente mais afetadas se inoculadas em meios de cultura ricos em nutrientes. Estas condições podem ter interferido na menor remoção de nutrientes do meio (100% E), o qual foi o mais rico em nutrientes, e ao final do experimento ainda continha alta carga de compostos nitrogenados e fosfatados. A mistura do efluente de carcinicultura com meio guillard f/2, diluiu os nutrientes do efluente, o que pode ter possibilitado uma melhor assimilação por *C. muelleri*.

4.2.1 Remoção de Amônia

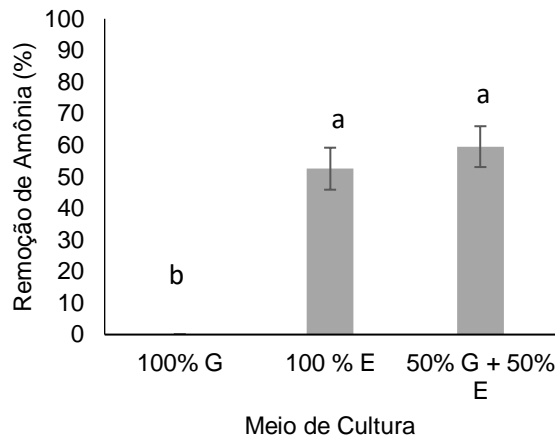
Não foram observadas diferenças significativas entre a remoção de amônia nos meios de cultura (50% G + 50% E) e (100% E), que apresentaram média de 59,50 e 52,52%, respectivamente. Enquanto no tratamento (100% G), não houve remoção de amônia (Gráfico 1).

Apesar das remoções de amônia terem sido estatisticamente similares entre os tratamentos (50% G + 50% E) e (100% E), o meio (100% E) teve percentual de remoção um pouco menor, possivelmente por ser o meio mais rico em amônia, o qual *C. muelleri* removeu a maior quantidade deste nutriente com $2,22 \text{ mg L}^{-1}$, comparado ao meio (50% G + 50% E) com $0,97 \text{ mg L}^{-1}$.

A amônia é a forma química de nitrogênio preferida pelo fitoplâncton, pois é assimilada mais facilmente que as outras formas (nitrito e nitrato), devido menor gasto energético para sua absorção (LOURENÇO, 2006; SIPAÚBA-TAVARES;

ROCHA, 2003). A absorção deste componente é muito importante do ponto de vista ambiental, tendo em vista seu efeito tóxico para vários animais (RICHMOND, 2004).

Gráfico 1 - Valores de remoção de amônia no cultivo de *C. muelleri* em diferentes meios de cultivo.



Fonte: Dados do experimento.

Venkatesan *et al.* (2006) produziram a diatomácea *Chaetoceros coarctatus* sob condições constantes (temperatura de 24 °C, fotoperíodo de 16/8hs e irradiância entre 4000 e 5000 Lux) em efluente de carcinicultura semi-intensiva e observaram remoção de 47,2% de nitrogênio amoniacal. Este valor é um pouco inferior aos de remoção de amônia das duas culturas envolvendo efluentes deste experimento. Já Alves (2013), observou maiores remoções de amônia comparadas a presente pesquisa, tanto em efluente de carcinicultura (71,96%), como de piscicultura (86,78%) através de fitorremediação utilizando a microalga *Chlorella vulgaris* sob condições contínuas (temperatura de 28 °C, salinidade 30 e luminosidade em torno de 60 $\mu\text{E}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}/24\text{h}$).

O tratamento (100% G) foi a única exceção do experimento que apresentou elevação da concentração de um nutriente (amônia) ao final do cultivo. Este fato já foi reportado por outros autores e pode estar relacionado com a exsudação da matéria orgânica realizada por bactérias, onde são liberados aminoácidos e compostos nitrogenados que podem aumentar amônia no meio (PUDDU *et al.*, 2003). Além disso, a quantidade de compostos nitrogenados remanescentes no inoculo utilizado para o meio Guillard f/2 também pode ter influenciado no aumento de amônia neste meio. No entanto, estas hipóteses para

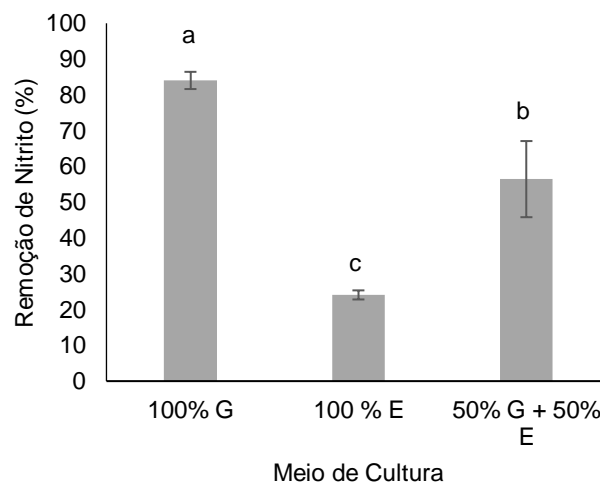
aumento de amônia no meio (100% G) só poderiam ser confirmadas através de exame bacteriológico e análise de água prévia no inoculo utilizado.

Da mesma forma que na presente pesquisa, Magnotti *et al.* (2016) cultivaram a microalga *Tetraselmis chuii* em meio Guillard f/2 e observaram o aumento de amônia ao alcançar o oitavo dia de cultivo atingindo $6,5 \text{ mg L}^{-1}$. As condições de cultivo empregadas foram constantes (salinidade 35, temperatura de $22 \text{ }^\circ\text{C}$ e irradiância $150 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$).

4.2.2 Remoção de Nitrito

As remoções de nitrito nos meios de cultura apresentaram diferenças significativas entre todos os tratamentos. O meio (100% G) apresentou as maiores remoções com média de 84,02%, seguido pelo meio (50% G + 50% E) com 56,44% e meio (100% E) que removeu 24,08% de nitrito (Gráfico 2).

Gráfico 2 - Valores de remoção de nitrito no cultivo de *C. muelleri* em diferentes meios de cultivo.



Fonte: Dados do experimento.

O nitrito é a forma tóxica de nitrogênio na água e pode ser absorvido pelas microalgas quando se encontra em baixas concentrações (LOURENÇO, 2006). Dentre os meios de cultura, o meio (100% G) foi o que possuiu a menor concentração deste nutriente ($0,048 \text{ mg L}^{-1}$), logo sua remoção foi mais efetiva que nos outros tratamentos. Fato que também foi observado nos meios (100% E) e (50%

G + 50% E) com maiores concentrações de nitrito (0,512 e 0,274 mg L⁻¹) e menores absorções, respectivamente.

Kumar *et al.* (2015) testando diferentes densidades de *Chlorella* sp., no tratamento de efluente de carcinicultura, encontrou como melhores resultados de remoção de nitrito (67%) em densidade populacional inicial de 0,5 g L⁻¹. Os autores mantiveram condições de cultivo com 23-25 °C de temperatura, intensidade luminosa de 5000 Lux e fotoperíodo de 12:12h.

Alves (2013) verificou maiores remoções de nitrito no cultivo de *Chlorella vulgaris* tanto em efluente de carcinicultura (94,44%) como em meio Guillard f/2 (83,33%) em comparação a esta pesquisa. O experimento foi mantido em condições controladas (temperatura de 28 °C, salinidade 30, e luminosidade em torno de 60 $\mu\text{E}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}/24\text{h}$).

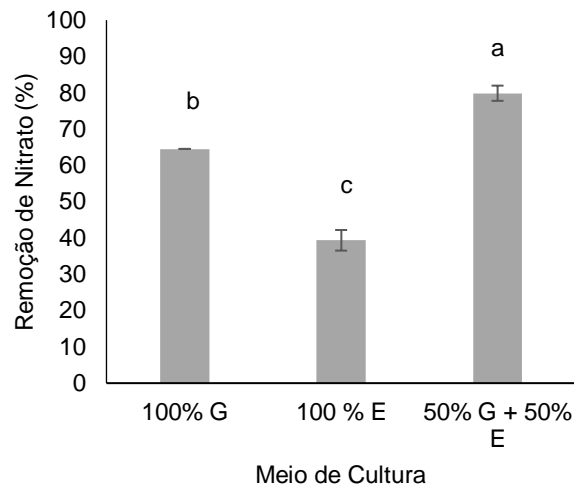
4.2.3 Remoção de Nitrato

Assim como aconteceu com a remoção do nitrito, as remoções de nitrato nos meios de cultura também apresentaram diferenças significativas entre todos os tratamentos. O meio (50% G + 50% E) alcançou as maiores remoções com média de 79,86%, seguido pelo meio (100% G) com 64,51% e meio (100% E) removendo 39,34% de nitrato (Gráfico 3).

O nitrato é a forma química de nitrogênio com maior estabilidade na água e possivelmente a mais usada pelo fitoplâncton (LOURENÇO, 2006). De forma geral, o nitrato foi dentre os nutrientes o que teve as maiores quantidades incorporadas entre os tratamentos com 3,9; 2,4 e 2 mg L⁻¹ absorvidas nos meios (50% G + 50% E), (100% E) e (100% G), respectivamente.

Magnotti *et al.* (2016) cultivaram a microalga *C. muelleri* em meio Guillard f/2 sob condições de cultivo constantes (salinidade 35, temperatura de 22 °C e irradiância 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Estes autores observaram remoção de 61% de nitrato, valor próximo do encontrado nesta pesquisa para o meio (100% G). Já no cultivo de *Tetraselmis chuii* utilizando efluente de carcinicultura de um sistema de bioflocos como meio de cultura, estes autores observaram remoção de 87% de nitrato.

Gráfico 3 - Valores de remoção de nitrato no cultivo de *C. muelleri* em diferentes meios de cultivo.



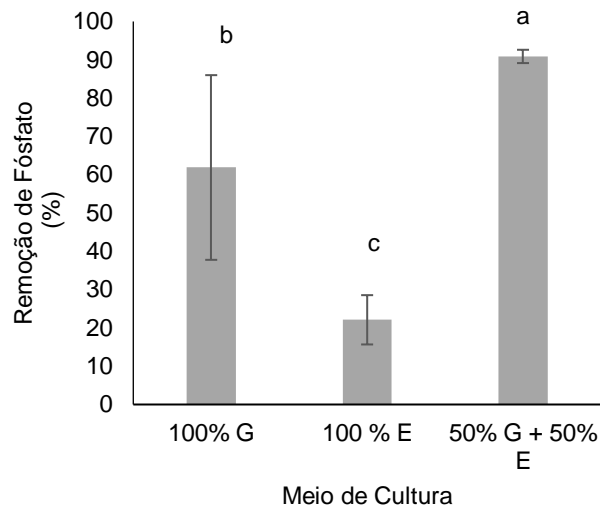
Fonte: Dados do experimento.

Karthikeyan *et al.* (2013) cultivaram as diatomáceas *Chaetoceros curvicutus* e *Chaetoceros simplex* em meio Guillard f/2 variando as fontes de nitrogênio deste meio. Os autores observaram valores de remoção de nitrogênio total bastante elevados, comparadas as remoções de compostos nitrogenados desta pesquisa, com 91,62% para a primeira espécie e 97,86% para a segunda espécie usando nitrato no meio de cultura.

4.2.4 Remoção de Fosfato

A remoção de fosfato nos meios de cultura apresentou diferenças significativas entre todos os tratamentos, tendo sido obtidos valores de 87,24% para o meio de cultivo (50% G + 50% E), 48,12% para o (100% G) e 22,11% para (100% E) (Gráfico 4).

O fósforo é um dos nutrientes essenciais que frequentemente pode limitar o crescimento de microalgas na natureza. Todas as microalgas utilizam fosfatos inorgânicos para o seu crescimento e sua função está associada à realização de todos os processos que envolvem trocas energéticas nas células (LOURENÇO, 2006; SIPAÚBA-TAVARES; ROCHA, 2003).

Gráfico 4 - Valores de remoção de fosfato no cultivo de *C. muelleri* em diferentes meios de cultivo.

Fonte: Dados do experimento.

Magnotti *et al.* (2016) cultivaram *C. muelleri* utilizando efluente de carcinicultura de um sistema de bioflocos como meio de cultura sob condições de cultivo constantes (salinidade 35, temperatura de 22 °C e irradiância 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Estes autores observaram remoção 100% de fosfato em apenas dois dias de cultivo para os tratamentos utilizando efluente cru, efluente diluído (50% água do mar) e meio Guillard f/2.

Venkatesan *et al.* (2006) produziram as diatomáceas *Skeletonema costatum* e *Chaetoceros coarctatus* em efluente de carcinicultura semi-intensiva e obtiveram remoções de 20,8% e 17,7% de fosfato, respectivamente sob condições constantes (temperatura de 24 °C, fotoperíodo de 16/8h e irradiância entre 4000 e 5000 Lux). Estes valores foram inferiores aos encontrados na presente pesquisa utilizando meios de cultura com efluente de carcinicultura.

Alves (2013) cultivou a microalga *Chlorella vulgaris* em condições controladas (temperatura de 28 °C, salinidade 30 e luminosidade em torno de 60 $\mu\text{E}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}/24\text{h.}$) usando efluente de carcinicultura e observou remoção de 59,89% de fosfato, valor superior ao encontrado neste estudo (22,11%). Porém quando o efluente foi diluído em Guillard f/2 no tratamento (50% G + 50% E) a remoção de fosfato foi bem superior (87,24%) a encontrada por Alves.

Marella *et al.* (2017) encontraram valor de remoção de fosfato similar ao do tratamento (50% G + 50% E) desta pesquisa. Estes pesquisadores utilizaram um

consórcio de várias espécies de diatomáceas para o tratamento de efluente industrial + doméstico, e observaram remoção de 88,9% de fosfato em cultivo estacionário com condições mantidas constantes (temperatura de 26° C, fotoperíodo de 12:12h e intensidade de luz de 100 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

4.3 Rendimento lipídico

Os valores médios de lipídeos (%) totais estão apresentados na Tabela 7. Não foi constatada diferença significativa ($P < 0,05$) entre os valores médios de rendimentos lipídicos totais dos diferentes meios de cultura. O que pode ser observado também no Gráfico 5.

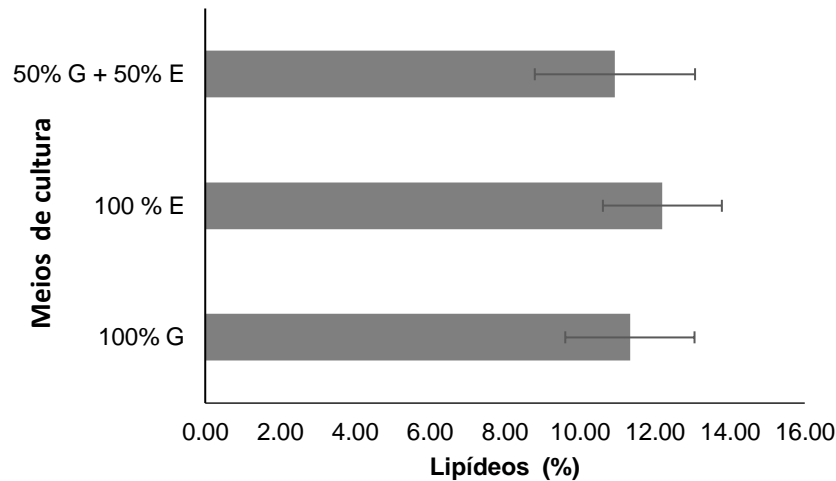
Tabela 7 - Valores de rendimento lipídico no cultivo de *C. muelleri* em diferentes meios de cultivo.

Tratamento	Rendimento lipídico (%)
100% Guillard	11,33 \pm 1,72
100% Efluente	12,20 \pm 1,59
50% G+ 50% E	10,93 \pm 2,14

Fonte: Dados do experimento.

A produção de óleo a partir de microalgas cultivadas em águas residuais pode ser considerada uma ótima alternativa de redução do custo de produção, além de ser importante do ponto de vista ambiental, haja vista que através da fitorremediação as microalgas podem usar contaminantes como nutrientes para o seu crescimento (MATA; MARTINS; CAETANO, 2010; WANG *et al.*, 2008). Existe um grande potencial para a exploração de diferentes fontes de águas residuais (domésticas, industriais e agrícolas). Do ponto de vista econômico, utilizar meios de cultura artificiais para produção de biodiesel em larga escala, a partir de microalgas, torna-se inviável (BHATT; TAMTA, 2013).

A produção de lipídeos em microalgas depende da espécie e é influenciada pelas condições ambientais em que a microalga se encontra. O acúmulo de lipídeos em diatomáceas parece estar ligado à condição de “stress” causada pela depleção de nutrientes do meio de cultura ao longo do cultivo (PERNET *et al.*, 2003).

Gráfico 5 - Valores de rendimento lipídico de *C. muelleri* em diferentes meios de cultura.

Fonte: Dados do experimento.

López-elias *et al.* (2014) cultivaram *C. muelleri* em temperatura de 20 a 25°C, iluminação com lâmpadas de 40W utilizando meios de cultura em que foi reduzido 75% de nitrogênio e um outro onde foi reduzido 75% de silicato comparado ao meio Guillard f/2 e observaram que a produção lipídica aumentou de 15% (Guillard f/2) para 28,86% e 34,28%, respectivamente.

Apesar da redução de biomassa nos meios com redução de nutrientes, os autores sugerem que meios de cultura com redução de nitrogênio e silicato são mais indicados para aumentar o teor de lipídeos de *C. muelleri*, tanto por aumentar o percentual lipídico, como pela redução de custos com meio de cultura.

Barros *et al.* (2014) cultivaram *C. muelleri* em três salinidades diferentes (15, 25 e 35) sob condições de cultivo controladas (Meio Guillard f/2, Temperatura 28°C e intensidade de luz de 20 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ / 24h). Esses autores obtiveram valores de 10,41%, 10,87% e 12,33%, respectivamente, para as diferentes salinidades, valores que podem ser considerados similares aos encontrados nesta pesquisa, não tendo sido constatadas diferenças significativas, na produção de lipídeos entre as salinidades testadas.

Araújo (2011) cultivou várias espécies de microalgas, dentre elas, *C. muelleri* em meio Guillard f/2, testando duas salinidades diferentes (25 e 35) e sua influência na produção de lipídeos. A salinidade mais baixa (25) apresentou maior

concentração de lipídeos com 25,25% comparada a salinidade mais alta (35) com 11,67%. As condições de cultivo foram constantes com temperatura de 28°C e irradiância de $60 \mu\text{E}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

Alves (2013), cultivando a microalga *Chlorella vulgaris* em efluente de carcinicultura, obteve uma concentração lipídica bem menor que a encontrada neste experimento, tendo uma produção apenas de 3,45%. Já para os cultivos em meio Guillard f/2 e efluente de piscicultura o autor encontrou valores similares a deste experimento, com 13,22 e 12,69%, respectivamente. As condições de cultivo foram mantidas com temperatura de 28 °C, salinidade 30 e luminosidade em torno de $60 \mu\text{E}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}/24\text{h}$.

Os métodos utilizados para extração de lipídeos podem influenciar diretamente na quantidade de lipídeo extraído, tendo em vista a polaridade dos lipídeos e dos reagentes utilizados para extração (RAMLUCKAN *et al.*, 2014), o que torna a escolha do método de extração lipídica essencial para extrair a máxima quantidade de lipídeos possível (LEWIS;NICHOLS; MCMEEKIN, 2000). Além disso, Ramluckan *et al.* (2014) relataram também que o tipo de solvente utilizado para extração de lipídeos, a quantidade e o tempo de exposição podem influenciar nas quantidades obtidas.

Wang *et al.* (2014) obtiveram valores de lipídeos superiores aos encontrados neste trabalho. Os autores cultivaram *C. muelleri* em meio Guillard f/2 obtendo um percentual de 27,74% de conteúdo lipídico. Já no tratamento aplicando aeração enriquecida com 10% de CO₂, o percentual lipídico aumentou para 43,43%. As condições de cultivo foram: temperatura de 20°C e intensidade de luz de $150 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Os autores sugeriram que a adição 10% de CO₂ pode induzir o acúmulo de lipídeos, não só pela injeção de fonte de carbono, mas também por aumentar a fotossíntese total e produção de biomassa, além de ser uma ótima alternativa para mitigação dos efeitos nocivos causados pela emissão de CO₂.

Recentemente, Lin e Wu (2017) cultivaram *C. muelleri* em águas marinhas superficiais e profundas e obtiveram rendimento lipídico de 22,84% e 28,23%, respectivamente, sob as condições de cultivo de 25°C e intensidade de luz de 12.000 Lux. Esses autores relataram que a água de profundidade pode ter influenciado em uma maior concentração lipídica, por ser mais rica em nutrientes.

As baixas concentrações de lipídeos encontradas neste trabalho podem estar relacionadas com um fator ou uma combinação de fatores, tais como:

nutrientes; parâmetros abióticos; fase de crescimento das culturas; estado fisiológico e características biológicas da microalga; etc. Apesar das diferentes quantidades de nutrientes determinados ao final do cultivo nos meios de cultura, a condição de “stress” causada pela depleção de nutrientes não influenciou a diferenciação de produção de lipídeos dos diferentes tratamentos.

4.4 Rendimento de exopolissacarídeos

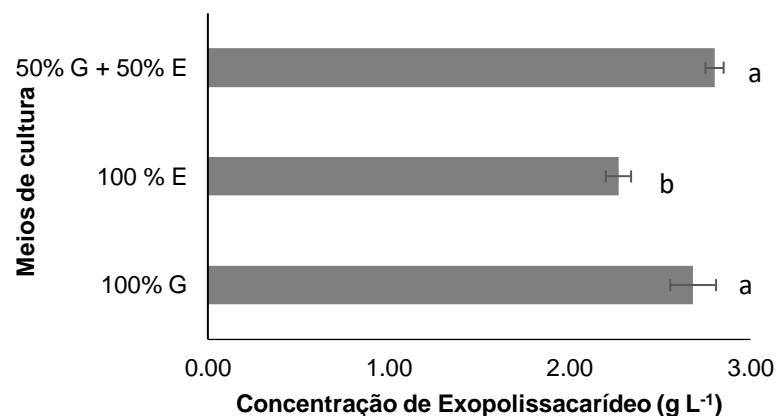
Os valores médios de exopolissacarídeos encontrados nos diferentes meios de cultura estão apresentados na tabela 8 e no Gráfico 6.

Tabela 8 - Valores de rendimento de exopolissacarídeos de *C. muelleri* em diferentes meios de cultura.

Tratamento	Rendimento exopolissacarídeos (g.L ⁻¹)
100% Guillard	2,68 ^a ±0.13
100% Efluente	2,27 ^b ±0,07
50% G+ 50% E	2,80 ^a ±0.05

Fonte: Dados do experimento.

Gráfico 6 - Valores de exopolissacarídeos de *C. muelleri* em diferentes meios de cultura.



Fonte: Dados do experimento.

Apenas o efluente de carcinicultura foi significativamente menor ($P < 0,05$) do que os outros meios de cultura.

As perspectivas são promissoras para novos produtos químicos provenientes de microalgas relatados nos últimos anos, dos quais os carotenóides e os polissacarídeos da vasta diversidade de microalgas marinhas são produtos de grande interesse e aplicabilidade para diversas áreas (RICHMOND, 2004).

A produção de exopolissacarídeos pelas microalgas pode variar consideravelmente dependendo da espécie e de seu estado fisiológico. A quantidade de polissacarídeos produzidos também é influenciada pela fase de crescimento da microalga e pelas condições de cultivo em que a microalga se encontra, existindo uma relação direta com as restrições químicas e físico-químicas impostas pelo ambiente. Fatores ambientais como disponibilidade de nutrientes, flutuações diárias de parâmetros abióticos, irradiância e toxicidade de metais geralmente influenciam as produções desses componentes (Al *et al.*, 2015; DELATTRE *et al.*, 2016; GÜGI *et al.*, 2015).

Estudos mostraram que as limitações de nitrogênio e fosfato podem afetar a taxa de produção de exopolissacarídeos em diatomáceas, bem como suas composições, aumentando a produção destes metabólitos em resposta à limitação causada pela depleção desses nutrientes ao longo do cultivo (MAGALETTI *et al.*, 2004; PENNA *et al.*, 1999).

Em culturas de microalgas, a limitação de nutrientes é a estratégia mais comum usada para acumular exopolissacarídeos. A principal desvantagem desta estratégia é que o crescimento celular diminui nessas condições, tornando-se necessário encontrar o melhor momento para realizar a extração entre alta taxa de crescimento e alta produção de exopolissacarídeos (DELATTRE *et al.*, 2016).

A polaridade do álcool utilizado para a extração de exopolissacarídeos do meio de cultura e a temperatura de precipitação (entre -20 ° C e 20 ° C) tem impacto direto sobre o rendimento destes metabólitos. O método da precipitação alcoólica utilizado neste trabalho é vantajoso, pois permite a concentração seletiva de exopolissacarídeos, além de ser ambientalmente seguro, pois é possível realizar posteriormente a reciclagem dos álcoois através da destilação (DELATTRE *et al.*, 2016).

Li *et al.* (2011) produziram *C. muelleri* por 15 dias em um sistema outdoor de biorreatores utilizando como meio de cultura água do mar filtrada. Os autores obtiveram 0,188 g L⁻¹ de rendimento de exopolissacarídeos.

Underwood *et al.* (2004) cultivaram a diatomácea *Cylindrotheca closterium* em meio guillard f/2 por 10 dias com irradiância de $30 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, temperatura de $20\text{ }^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 14:10 h e obtiveram $0,012 \text{ g L}^{-1}$ de exopolissacarídeos. Faraloni *et al.* (2003) cultivaram a diatomácea *Navicula cryptocephala* em meio guillard f/2 com irradiância de $20 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, temperatura de $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ em 35 dias de cultivo obtiveram $0,08 \text{ g L}^{-1}$ de rendimento de exopolissacarídeos. Abdullahi *et al.* (2006) cultivaram a diatomácea *Phaeodactylum tricornutum* em meio guillard f/2 com limitação de fósforo, irradiância de $100 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, temperatura de $18\text{ }^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12:12 h, durante 3 dias obtiveram $0,45 \text{ g L}^{-1}$ de exopolissacarídeos.

Outros trabalhos envolvendo diferentes grupos de microalgas obtiveram rendimentos semelhantes e também bastante elevados comparados a presente pesquisa. Guzman-Murilo e Ascencio (2000) cultivaram várias espécies de microalgas para extração de exopolissacarídeos utilizando meio guillard f/2 com 3,6% de NaCl, iluminação com lâmpadas fluorescentes e temperatura de $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. As espécies que mais produziram exopolissacarídeos foram *Porphyridium cruentum*, *Chlorella autotrophica* e *Tetraselmis* sp. com 7,27; 2,16 e $1,81 \text{ g L}^{-1}$, respectivamente.

A maior concentração de exopolissacarídeos obtidos de microalgas já relatada na literatura foram de Chi *et al.* (2007). Estes autores cultivaram a cianobactéria *Cyanothece* sp. em meio Guillard f/2 com suplementação de 7% de NaCl, irradiância de $43.000 \text{ lux}/24 \text{ h}$, temperatura de $29\text{ }^{\circ}\text{C}$ em 11 dias de cultivo e obtiveram rendimento de $22,34 \text{ g L}^{-1}$ de exopolissacarídeos.

Segundo Brown *et al.* (1997) no final da fase exponencial de crescimento e início da fase estacionária, as microalgas tendem a acumular carboidratos como resposta a limitação de fontes de nitrogênio que são utilizadas para síntese de proteínas.

Os maiores rendimentos de exopolissacarídeos evidenciadas nos meios de cultura (50% G+ 50% E) e (100% G) podem estar relacionadas com as menores concentrações de compostos nitrogenados e fosfatos determinados (meios com maiores remoções de nutrientes) ao final do cultivo, quando comparadas ao Efluente de carcinicultura (100% E), meio que apresentou as maiores concentrações desses nutrientes ao final do experimento (meio com menor remoção de nutrientes). A maior limitação de nutrientes pode ter ocasionado, maior fator de “estresse” nestes meios

de cultura ao final do cultivo, estimulando assim, maiores produções destes carboidratos.

De maneira geral, os rendimentos de exopolissacarídeos encontrados nos diferentes meios de cultura desta pesquisa podem ser considerados altos, se comparados a maioria dos trabalhos envolvendo diatomáceas na literatura.

5 CONCLUSÕES

O cultivo da microalga marinha *Chaetoceros muelleri*, totalmente e parcialmente, em efluente da carcinicultura se mostra eficaz em laboratório, apresentando taxas de crescimento celular semelhantes entre si, podendo-se substituir o meio de cultura padrão Guillard f/2.

A mistura dos dois meios de cultura (50% G+ 50% E) possibilitou uma melhor remoção de compostos nitrogenados e fosfato da água, melhorando sua qualidade.

O uso de efluente de carcinicultura como meio de cultura também se apresentou como uma opção alternativa para produção de biomoléculas de interesse biotecnológico.

REFERÊNCIAS

- ABDULLAHI, A. S.; UNDERWOOD, G. J. C.; GRETZ, M. R. Extracellular matrix assembly in diatoms (bacillariophyceae). Environmental effects on polysaccharide synthesis in the model diatom *Phaeodactylum tricornutum*. **Journal of Phycology**, v.42, p.363–378. 2006.
- AHN, P.T.; KROEZE, C.; BUSH, S.R.; MOL, A.P.J. Water pollution intensive brackish shrimp in south-east Vietnam: Causes and options for control. **Agricultural Water Management**, v. 97(6), p.872. 2010.
- AI, X. X.; JUN-RONG, L.; YA-HUI, G; SAMUEL, C. L.; FRED, W. F. L.; CHANG, P. C.; CHUN, S. L.; CHAO, D. M. T. MS analysis of the extracellular polysaccharides released by the diatom *Thalassiosira pseudonana* under various nutrient conditions. **Journal of Applied Phycology**, v. 27, p.673–684. 2015.
- ALVES, J. W. S. **Cultivo da microalga *Chlorella vulgaris* em efluentes aquícolas e sua influência na concentração lipídica**. Dissertação de mestrado em Engenharia de Pesca - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.
- AVNIMELECH, Y. Biofloc Technology- A Practical Guide Book. **The World Aquaculture Society**, Baton Rouge, Louisiana, United States. 182 p. 2009.
- BAFANAA, A. Characterization and optimization of production of exopolysaccharide from *Chlamydomonas reinhardtii*. **Carbohydrate Polymers**. V. 95, p. 746–752. 2013.
- BARROS, M. U. G.; COELHO, A. A. C.; SILVA, J. W. A.; BEZERRA, J. H. C.; MOREIRA, R. T.; FARIAS, W. R. L.; MOREIRA, L. R. Lipid content of marine microalgae *Chaetoceros muelleri* Lemmermann (Bacillariophyceae) grown at different salinities. **Biotemas**, v. 27, p.1-8. 2014.
- BASHAN, L. E.; BASHAN, Y. Immobilized microalgae for removing pollutants: Review of practical aspects. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 1611-1627. 2010.
- BHATT, N. C.; TAMTA, S. Integration of microalgae cultivation with wastewater for sustainable biofuel production. **Current science**, v. 105, p. 12-25. 2013.
- BICUDO, C. E. M.; MENEZES, M. **Gêneros de algas continentais do Brasil (chave para identificação e descrições)**, São Carlos: Rima, v. 2, p. 03-06, 2006.

BROWN, M. R.; JEFFREY, S. W.; VOLKMAN, J. K.; DUNSTAN, G. A. Nutritional properties of microalgae for mariculture. **Aquaculture**, v. 151, p. 315-331, 1997.

BRUMMETT, R. E. Aquaculture and society in the new millennium. **World Aquaculture Magazine**, v.34, p.51-59. 2003.

CAMARGO, S. G. O.; POUHEY, J. L. O. F. Aqüicultura - um mercado em expansão. **Revista brasileira de Agrociência**, v. 11, p. 393-396. 2005.

CHALLOUF, R.; TRABELSI, L.; DHIEB, R. B.; ABED, O. E.; YAHIA, A.; GHOZZI, K.; AMMAR, J. B.; OMRAN, H.; OUADA, H. B. Evaluation of Cytotoxicity and Biological Activities in Extracellular Polysaccharides Released by Cyanobacterium *Arthrospira platensis*. **Brazilian archives of biology and technology**, v.54, p. 831-838. 2011.

CHIAIESE P.; PALOMBA F.; TATINO F.; LANZILLO C.; PINTO G.; POLLIO A.; FILIPPONE E. Engineered tobacco and microalgae secreting the fungallaccase POXA1b reduce phenol content in olive oil mill wastewater. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 49, p. 540-546. 2011.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, v.25, p. 294–306. 2007.

COUTTEAU, P. Micro-algae. In: LAVENS, P.; SORGELOOS, P. (Eds.). Manual on the production and use of live food for aquaculture. Rome: **FAO**, p. 7- 48. 1996.

DELATTRE, C.; PIERRE, G.; LAROCHE, C.; MICHAUD, P. Production, extraction and characterization of microalgal and cyanobacterial exopolysaccharides. **Biotechnology Advances**, v. 34, p. 1159–1179. 2016.

DE PHILPPIS, R.; VICENZINI, M. Exocellular polysaccharides from cyanobacteria and their possible applications. **FEMS microbiology reviews**, v. 22, p.151-175, 1998.

DERNER, R. B.; OHSE, S.; VILLELA, M.; CARVALHO, S. M.; FETT, R. Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural**, v. 36, p. 1959-1967. 2006.

DINIZ, G. S.; & ANITA F. SILVA, A. F.; ARAÚJO, O. Q. F.; CHALOUB, R. M. The potential of microalgal biomass production for biotechnological purposes using wastewater resources. **Journal of Applied Phycology**, v.29, p.821–832. 2017.

DOGRA, B.; AMNA, S.; PARK, Y.; PARK, J. K. Biochemical Properties of Water Soluble Polysaccharides from Photosynthetic Marine Microalgae *Tetraselmis* Species. **Macromolecular Research**, v. 25, p. 172-179. 2017.

FAO – **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. The state of world fisheries and aquaculture: Opportunities and challenges. Rome, 2014.

FAO – **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. The state of world fisheries and aquaculture: Opportunities and challenges. Rome, 2010.

FAO - **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. The state of world fisheries and aquaculture: Opportunities and challenges Rome, 2016.

FIELD, C. B.; BEHRENFELD, M.J.; RANDERSON; FALKOWSKI, J. T. Primary production of the biosphere: integrating terrestrial and oceanic components. **Science**, v.281, p.237–240.1998.

FIGUEIRÊDO, M. C. B. DE.; ARAÚJO, L. F. P.; ROSA, M. F.; MORAIS, L. F. S. DE.; PAULINO, W. D. ;GOMES, R.B. Impactos ambientais da carcinicultura de águas interiores. **Revista Engenharia Sanitária e Ambiental**, v 11, p.231-240. 2006.

GÁL, D.; SZABÓ, P.; PEKÁR, F.; VÁRADI, L. Nutrient removal and retention of a pond recirculation system. **Hydrobiologia**, v. 506, p.767- 772. 2003.

GÓMEZ-SERRANO, C.; AMARAL, M. M. M.; ACIÉN, F. G.; ESCUDERO, R.; SEVILLA, J. M. F.; GRIMA, E. M. Utilization of secondary-treated wastewater for the production. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.99, p.6931–6944. 2015.

GUIMARÃES, I. M. **Utilização de ostra e macroalga como biofiltro para efluentes de cultivo de camarão marinho**. Dissertação de mestrado em Engenharia de Pesca - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2008.

GUEDES, C. A; MALCATA, X. F. Nutritional value and uses of microalgae. **Aquaculture**, v. 413, p. 59-79. 2012.

GÜGI, B.; COSTAQUEC, T. L.; BUREL, C. P.; LEROUGE, C. P.; HELBERT, W.; BARDOR, M. Diatom-Specific Oligosaccharide and Polysaccharide Structures Help to Unravel Biosynthetic Capabilities in Diatoms. **Marine Drugs**, v.13, p. 5993-6018. 2015.

GUZMÁN-MURILLO, M. A.; ASCENCIO, F. Anti-adhesive activity of sulphated exopolysaccharides of microalgae on attachment of the red sore disease-associated bacteria and *Helicobacter pylori* to tissue culture cells. **Letters in Applied Microbiology**, v.30, p.473–478. 2000.

HERNADEZ, J. P.; BASHAN, L. E.; RODRIGUEZ, D. J.; RODRIGUEZ, Y.; BASHAN, Y. Growth promotion of the freshwater microalga *Chlorella vulgaris* by the nitrogen-fixing, plant growth-promoting bacterium *Bacillus pumilus* from arid zone soils. **European Journal of Soil Biology**, v. 45, p. 88-93. 2009.

JONES, A. B.; O'DONOHUE, M. J.; UDY, J.; DENNISON, W. C. Assessing ecological impacts of shrimp and sewage effluent: Biological indicators with standard

water quality analyses. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v.52. p.91-109. 2001.

LEWIS, T.; NICHOLS, P.D. ; MCMEEKINA, T. A. Evaluation of extraction methods for recovery of fatty acids from lipid producing microheterotrophs. **Journal of Microbiological Methods**, v.43, p. 107-116. 2000.

LI, H.; LI, Z.; XIONG, S.; ZHANG, H.; LI, N.; ZHOU, S.; LIU, Y.; HUANG, Z. Pilot-scale isolation of bioactive extracellular polymeric substances from cell-free media of mass microalgal cultures using tangential-flow ultrafiltration. **Process Biochemistry**, v.46, p.1104–1109. 2011.

LIN, C. Y.; WU, S. Z. Comparison of lipid and biodiesel properties of *Chaetoceros muelleri* cultured in deep sea water and surface sea water. **Journal of renewable and sustainable energy**, v.9, 12p. 2017.

LOURENÇO, S. O. Cultivo de microalgas marinhas: princípios e aplicações, São Carlos: **Rima**, v. 1, 588 p., 2006.

LÓPEZ-ELÍAS, J. A.; CARVALLO, R. M. G.; ESTRADA, R.; ARELI, L.; MARTÍNEZ, C. L. R.; MARTÍNEZ-PORCHAS, M., MIRANDA, B. A.; RAMÍREZ, S. J. C. Evaluation of Culture Media Limited in Nitrogen and Silicates on the Production Response and Lipid Content of the Diatom *Chaetoceros muelleri*. **Current Research Journal of Biological Sciences**, v.6, p. 145-149. 2014.

KALE, A; KARTHICK, B. The diatoms. **Resonance**, v. 20. 11p. 2015.

KARTHIKEYAN, P.; MANIMARAN, K.; SAMPATHKUMAR, P.; RAMESHKUMAR, L. Growth and nutrient removal properties of the diatoms, *Chaetoceros curvisetus* and *C. simplex* under different nitrogen sources. **Applied water science**, v. 3, p. 49-55. 2013.

KUMAR, S. D.; SANTHANAM, P.; LEWIS-OSCAR, F.; THAJUDDIN, N. A Dual Role of Marine Microalga *Chlorella* sp. (PSDK01) in Aquaculture Effluent with Emphasis on Initial Population Density. **Arabian Journal for Science and Engineering**, v.40, p. 29-35. 2015.

FARALONI, C.; DE PHILIPPIS, R.; SILI, C.; VINCENZINI, M. Carbohydrate synthesis by two *Navicula* strains isolated from benthic and pelagic mucilages in the Tyrrhenian Sea (Tuscan Archipelago). **Journal of Applied Phycology**, v.15, p. 259–261. 2003.

FERNANDEZ, Y.N. ; MARANON, E.; SOONS, J.; CASTRILLON, L. Denitrification of wastewater containing high nitrate and calcium concentrations. **Bioresource Technology**, v.99, p. 7976–7981. 2008.

LIN, C. Y.; WU, S. W. Comparison of lipid and biodiesel properties of *Chaetoceros muelleri* cultured in deep sea water and surface sea water. **Journal of Renewable and Sustainable Energy**, v.9, (013104) p. 12. 2017.

LIN, Y. F.; JING, S. R.; LEE, D. Y.; WANG, T. W.; Nutrient removal from aquaculture wastewater using a constructed wetlands system. **Aquaculture**, v 209, p. 169 – 184. 2002.

MAESTRINI S. Y.; ROBERT J. M. Rendements d'utilisation des sels nutritifs et variations de l'état des cellules de trois diatomées de claires à huîtres de Vendée. **Oceanologica Acta**, v. 4, p. 13-21. 1981.

MAGALETTI, E.; URBANI, R.; SIST, P.; FERRARI, C.R.; CICERO, A.M. Abundance and chemical characterization of extracellular carbohydrates released by the marine diatom *Cylindrotheca fusiformis* under *N*- and *P*-limitation. **European Journal of Phycology**, v.39, p. 133-142. 2004.

MAGNOTTI, C.; LOPES, R.; DERNER, R.; VINATEA, L. Using residual water from a marine shrimp farming BFT system. part I: nutrient removal and marine microalgae biomass production. **Aquaculture Research**, v. 47, p. 2435–2443, 2016.

MARAN, J. P.; MEKALA, V.; MANIKANDAN, S. Modeling and optimization of ultrasound-assisted extraction of polysaccharide from *Cucurbita moschata*. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, p. 2018-2026. 2013.

MARELLA, T. K., PARINE, N. R.; TIWARI, A. Potential of diatom consortium developed by nutrient enrichment for biodiesel production and simultaneous nutrient removal from waste water. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v.24, p.1105-1444pp. 2017.

MARTINEZ-CÓRDOVA, L. R., CAMPANA-TORRES, A.; PORCHAS, M. M.; ELIAS, J. A. L.; SIFUENTES, C. O. G. Effect of alternative mediums on production and proximate composition of the microalgae *Chaetoceros muelleri* as food in culture of copepod *Acartia* sp. **Latin American Journal of Aquatic Research**, v. 40, p. 169-176. 2012.

MARKOU, G., NERANTZIS, E. Microalgae for high-value compounds and biofuels production: a new focus on cultivation under stress conditions. **Biotechnology Advances**, v. 31, p.1532–1542. 2013.

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

MOOK, W.T., CHAKRABARTI, M.H., AROUA, M.K., KHAN, G.M.A., ALI, B.S., ISLAM, M.S., HASSAN, M.A. Removal of total ammonia nitrogen (TAN), nitrate and total organic carbon (TOC) from aquaculture wastewater using electrochemical technology. **Rev. Desali**, v. 285, p. 1–13. 2012.

NASIR, T. Treatment of African catfish, *Clarias gariepinus* wastewater utilizing phytoremediation of microalgae, *Chlorella* sp. with *Aspergillus niger* bio-harvesting. **Bioresource Technology**, v. 190, p.492-498. 2015.

- NORA'AINI, A.; WAHAB, M. A.; JUSOH, A.; HASAN, M. R.; GHAZALI, N.; K. KAMARUZAMAN. Treatment of aquaculture wastewater using ultra-low pressure asymmetric polyethersulfone (PES) membrane. **Desalination**, v. 185, p. 317–326. 2005.
- OSHE, S.; DERNER, R. B.; OZÓRIO, R. A.; BRAGA, M. V. C.; CUNHA, P.; LAMARCA, C. P.; SANTOS, M. E. Crescimento de microalgas em sistema autotrófico estacionário. **Revista Biotemas**, v. 21, p. 7-18. 2008.
- OHSE, S.; DEENER, R. B.; OZÓRIO, R. A.; CUNHA, P. C. R.; LAMARCA, C. P.; DOS SANTOS, M. E.; MENDES, L.B B. Revisão: seqüestro de carbono realizado por microalgas e florestas e a capacidade de produção de lipídios pelas microalgas. **Insula Revista de Botânica**, v. 36, p. 39-74. 2007.
- PAÉZ-OSUNA, F.; FLORES-VERDUGO, F.; LYLE-FRITCH, L. P.; ALONSO-RODRÍGUEZ, R.; ROQUE, A.; RUIZ-FERNÁNDEZ, A.C. Shrimp aquaculture development and the environment in the Gulf of California ecoregion. **Marine Pollution Bulletin**. v.46, p.806-815. 2003.
- PELIZER, L. H.; DANESI, E. D. G.; RANGEL, C. O.; SASSANO, C. E. N.; CARVALHO, J. C. M.; SATO, S; MORAES, I. Influence of inoculum age and concentration in *Spirulina platensis*. **Journal of Food Engineering**, v. 56, p. 371-375. 2003.
- PENNA, A.; BERLUTI, S.; PENNA, N.; MAGNANI, M. Influence of nutrient ratios on the *in vitro* extracellular polysaccharide production by marine diatoms from the Adriatic sea. *Journal of Plankton Research*, v.21, p. 1681-1690. 1999.
- PERNET, F.; TREMBLAY, R.; M. ROUSSY, E. DEMERS, Variation of lipid class and fatty acid composition of *Chaetoceros muelleri* and *Isochrysis sp.* grown in a semicontinuous system. **Aquaculture**, v. 221, p.393–406. 2003.
- PISTOCCHI, R.; MORMILE, M.A.; GUERRINI, F.; ISANI, G.; BONI, L. Increased production of extra- and intracellular metal-ligands in phytoplankton exposed to copper and cadmium. **Journal of Applied Phycology**, v.12, p. 469–477. 2000.
- PUDDU, A.; ZOPPINI, A.; FAZI S.; ROSATI, M.; AMALFITANO, S.; MAGALETTI, E. Bacterial uptake of DOM released from P-limited phytoplankton. **FEMS Microbiology Ecology**, v.46, p. 257–268. 2003.
- RAPOSO, M. F. J.; MORAIS, M. R. C.; MORAIS, A. M. B. Bioactivity and Applications of Sulphated Polysaccharides from Marine Microalgae. **Marine Drugs**, v. 11, p. 233-252. 2013.
- RAMLUKAN, K.; KANDASAMY, G.; MOODLEY, F. B. An evaluation of the efficacy of using selected solvents for the extraction of lipids from algal biomass by the soxhlet extraction method. **Fuel**, v.116, p.103–108. 2014.
- REVIERS B. *Biologia e filogenia das algas*. **Artmed**. 280p. 2006.

- RICHARDS R. G.; MULLINS B. J. Using microalgae for combined lipid production and heavy metal removal from leachate. **Ecological Modelling**, v. 249, n. 24, p. 59-67, 2013.
- RICHMOND, A. Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology. **Blackwell Science, Oxford, UK**, 566p. 2004.
- ROY, S. S; PAL, R. Microalgae in aquaculture: A review with special references to nutritional value and fish diets. **Zoological society**, v. 68, p. 1- 8. 2015.
- ROUND, F.E.; CRAWFORD, R. M.; MANN, D. G. The Diatoms: Biology & Morphology of the Genera, **Cambridge University Press**, 1990.
- RUIZ-MARTINEZ, A., MARTIN GARCIA, N., SECO, A., AND FERRER, J. Microalgae cultivation in wastewater: Nutrient removal from anaerobic membrane bioreactor effluent. **Bioresource Technology**, v. 126, p.247-253. 2012.
- SMOL, J. P.; STOERMER, E. F. The Diatoms: Applications for Environmental and Earth Sciences, Second Edition, **Cambridge University Press**, v.46 p.667, 2010.
- SOUZA, M. C. M. B. N. **Impacto de efluentes de carciniculturas na qualidade de água e sedimento: Baía de Todos os Santos, Bahia, Brasil**. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2013.
- SIPAÚBA-TAVARES, L. H & ROCHA . Produção de plâncton (fitoplâncton e zooplâncton) para alimentação de organismos aquáticos. São Carlos: **Rima**, 106p., 2003.
- TAHMASEBI, A.; KASSIM, M. A.; YU, J.; BHATTACHARYA, S. Hermogravimetric Study of the combustion of *Tetraselmis suecica* microalgae and its blend with a Victorian brown coal in O₂/N₂ and O₂/CO₂ atmospheres. **Bioresource Technology**, v. 150, p. 15-27. 2013.
- UGHY, B.; CSABA I. NAGY, PETER B. KÓS. Biomedical potential of cyanobacteria and algae. **Acta Biologica Szegediensis**, v.59. p. 203-224. 2015.
- UNDERWOOD, G..J..C.; BOULCOT, M.; RAINES, C..A.; WALDRON, K. Environmental effects on exopolymer production by marine benthic diatoms – dynamics, changes in composition and pathways of production. **Journal of Phycology**, v.40, p.293–304. 2004.
- URI, P.; TATYANA, Z.; MEIRA, W. Accumulation of triglycerides in green microalgae: a potential source for biodiesel. **Federation of European Biochemical Societies**, v. 277, p. 5–36. 2010.
- VENKATESAN, R. K P.; KAMARAGURU, V.; BALASUBRAMANIAM, T. Culture of marine microalgae in shrimp farm discharge water: a sustainable approach to reduce

the cost of production and recovery of nutrients. **Journal of fisheries and aquatic science**, v.3, p. 262-269. 2006.

XIAO, R.; ZHENG, Y. Overview of microalgal extracellular polymeric substances (EPS) and their applications. **Biotechnology Advances** , v.34, p. 1225–1244. 2016.

WANG, B.; LI, Y. N.; WU, C.Q. L. CO₂ bio-mitigation using microalgae. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.79, p. 707-718. 2008.

WANG, X. W.; JUN-RONG LIANG, CHUN-SHAN LUO, CHANG-PING CHEN , YA-HUI GAO. Biomass, total lipid production, and fatty acid composition of the marine diatom *Chaetoceros muelleri* in response to different CO₂ levels. **Bioresource Technology**, v.161, p.124–130. 2014.

YANG, J; XU, M.; ZHANG, X.; HU, Q.; SOMMERFELD, M.; CHEN, Y. Life-cycle analysis on biodiesel production from microalgae: Water footprint and nutrients balance. **Bioresource Technology**. v. 102, p. 159-165. 2011.

ZHANG, X.; LIU, P.; YANG, Y.; CHEN, W. Phytoremediation of urban wastewater by model wetlands with ornamental hydrophytes. **Journal of Environmental Sciences**, v.19, p.902–909. 2007.