



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE  
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS

**DINÂMICA DE NITROGÊNIO EM CULTIVO HETEROTRÓFICO A PARTIR DE  
CIANOBACTÉRIA SOB O ESCOPO DE BIORREFINARIAS AGROINDUSTRIAIS**

**NIVIA MARIA STREIT**

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. MARIA ISABEL QUEIROZ

Orientadora

Rio Grande, RS  
2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE  
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS

**DINÂMICA DE NITROGÊNIO EM CULTIVO HETEROTRÓFICO A PARTIR DE  
CIANOBACTÉRIA SOB O ESCOPO DE BIORREFINARIAS AGROINDUSTRIAIS**

**NIVIA MARIA STREIT**

Tese apresentada como parte dos  
requisitos para obtenção do título de  
Doutor em Engenharia e Ciência de  
Alimentos

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. MARIA ISABEL QUEIROZ

Orientadora

Rio Grande, RS  
2014



## AGRADECIMENTOS

Agradeço, em primeiro lugar, a Deus, que sempre iluminou meus caminhos;

À professora Maria Isabel Queiroz, minha eterna gratidão por acreditar em mim e participar de todas as etapas do meu doutoramento. Obrigada por passar uma parte dos seus mais de 40 anos de conhecimento na área, minha verdadeira mestre, um exemplo de dedicação. Muito obrigada;

À minha mãe, que sempre acreditou em mim e em meus sonhos. Obrigada por me estimular a procurar sempre o melhor. O seu otimismo me inspira;

Ao meu esposo Claudio, sempre presente em todos os momentos de minha vida acadêmica. Obrigada por entender meus dias de poucos amigos, e, mesmo assim, tentar me ajudar de uma forma ou de outra. A tua alegria me contagia todos os dias e me ajuda a tornar mais leve todos os obstáculos pelos quais a vida me impõe. Meu eterno companheiro;

À minha sogra, que esteve por perto em muitas conquistas minhas. Muito obrigada pelo apoio;

Às minhas novas amigas e ex-colegas, Adriana Manetti, pela tua amizade e por tudo o que me ensinaste. Nádia, pelo companheirismo. Juliana Latorres, sempre pronta a ajudar. Gurias, sinto muitas saudades dos nossos cafés e das trocas de idéias. Vocês tornavam os dias mais leves. Às colegas Marina e Faby que agora se encontram em lugares distantes;

À amiga Juliana Guerra, a última colega do laboratório, parceira de experimentos, obrigada pela tua constante dedicação e empenho e pela tua amizade. Grande defensora dos animais; causa esta que me faz te admirar muito;

Aos meus amigos Adriana Riso, Vanessa, Márcia, Beto, Matias; pessoas especiais que eu tive a oportunidade de conhecer;

Ao Laboratório LlipidômicaBio-UFPel, pelo apoio na liofilização das amostras;

Aos professores Leila Zepka e Eduardo Jacob-Lopes, pela contribuição no desenvolvimento da tese, assim como à mestranda Andriéli, sempre muito dedicada;

À professora Eliana Furlong, sempre atenciosa e disposta a ajudar. À Larine, pela contribuição nas análises cromatográficas;

Ao professor Luiz Antônio de Almeida Pinto, pela atenção, carinho e todo o seu empenho em sanar as dúvidas durante a sua gestão como coordenador do curso de pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos;

A CAPES, pela concessão da bolsa;

Ao CNPQ, pelo apoio financeiro;

À Cooperativa Sul-Riograndense de Laticínios Ltda-COSULATI, por estarem sempre dispostos a nos ajudar nas coletas de efluente;

A secretária da pós-graduação Islanda, pela disponibilidade e empenho em esclarecer todas as dúvidas, ao longo destes 4 anos;

A todas as pessoas que, de uma forma ou de outra, colaboraram para o andamento do projeto;

*“Quando o homem aprender a respeitar até o menor Ser da Criação, seja animal ou vegetal, ninguém precisará ensiná-lo a amar o seu semelhante.”*

*Albert Schweitzer, filósofo.*

## RESUMO

O trabalho teve por objetivo avaliar a dinâmica de nitrogênio, em cultivo heterotrófico, a partir da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli, sob o escopo de uma biorrefinaria. Neste sentido, foi avaliada a contribuição dos compostos nitrogenados não proteicos, na dinâmica de distribuição do nitrogênio, na biomassa gerada pelo micro-organismo em estudo, quando cultivado em sistema autotrófico e heterotrófico. Para o cultivo em condições autotróficas, foi utilizado o meio padrão BG-11, enquanto que, para o cultivo em condições heterotróficas, foi empregado o efluente da indústria de laticínios. Inicialmente, foi avaliada a contribuição dos pigmentos na fração nitrogenada não proteica tendo como base dois experimentos. No primeiro experimento foi selecionada a melhor condição para a produção de pigmentos, expressos pela clorofila-*a* em sistema heterotrófico, tendo como base os parâmetros C/N (20, 40 e 60), N/P (5, 10 e 15) e concentração de inóculo (100, 200 e 300 mg.L<sup>-1</sup>), mediante um planejamento fatorial 2<sup>3</sup>. Os experimentos foram conduzidos em biorreator heterotrófico a 20°C, pH 7,6 e aeração contínua de 1VVM. A melhor condição de produção de pigmento foi indicada como sendo a 200 mg.L<sup>-1</sup> de concentração celular, razões C/N 20 e N/P 10. Com base nestes resultados, um segundo experimento foi delineado, visando avaliar a contribuição de pigmentos na fração de nitrogênio não proteico, bem como avaliar a produção de clorofila-*a* e ficobiliproteínas (ficocianina, aloficocianina e ficoeritrina), sob influência da luz e do meio de cultivo. Foi possível destacar teores superiores de ficobiliproteínas na biomassa gerada no cultivo heterotrófico. No entanto, com notada diferença ( $p \leq 0,05$ ) nos teores de clorofila-*a*, quando são comparadas as concentrações na biomassa de meios autotróficos (10,7 mg.g<sup>-1</sup>) e heterotróficos (1,0 mg.g<sup>-1</sup>). Fato este compensado pelo menor tempo de cultivo registrado para atingir o final do experimento, quando o micro-organismo é cultivado em condições heterotróficas. Fica demonstrado assim, ainda, a importante contribuição dos pigmentos na fração de nitrogênio não proteico. Na sequência, um terceiro e quarto experimentos foram delineados, visando avaliar a influência do nitrogênio inorgânico intracelular na fração não proteica e na produção de proteína, assim como a caracterização da fração proteica quanto ao seu perfil aminoacídico. O estudo da dinâmica do nitrogênio intracelular demonstrou que o N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> foi a forma nitrogenada predominante, perfazendo importante fração de N-NP, sendo, portanto, os teores de N-NP significativamente dependente dos teores de pigmentos e nitrogênio intracelular. Os aminogramas das biomassas geradas pelos cultivos autotróficos e heterotróficos indicaram como aminoácidos majoritários o ácido glutâmico e aspártico, seguidos por valina, leucina e isoleucina, e como minoritários, lisina, glicina e metionina. O perfil aminoacídico caracterizou-se por apresentar aminoácidos essenciais como isoleucina, metionina + cisteína, fenilalanina + tirosina, valina e treonina em concentrações superiores ao preconizado pela FAO/WHO. A caracterização da fração proteica quanto ao perfil aminoacídico qualificou esta biomassa como fonte potencial de proteína. Os resultados obtidos neste trabalho demonstram a influência e dinâmica de distribuição dos compostos nitrogenados em *Aphanothece microscopica* Nägeli. Fica demonstrado, ainda, que a implementação do conceito de biorrefino, no tipo de agroindústria estudado, poderá representar importantes possibilidades de aproveitamento sustentável do efluente gerado.

Palavras-chave: *Aphanothece*; biorrefinaria; efluente de laticínios; nitrogênio; pigmentos naturais; proteínas.

## ABSTRACT

The study aimed to evaluate the dynamics of nitrogen in the heterotrophic cultivation from cyanobacteria *Aphanthece microscopica* Nägeli under the scope of a biorefinery. In this sense, we evaluated the contribution of non-protein nitrogenous compounds in the dynamic distribution of nitrogen in the biomass generated by the microorganism under study, when grown on autotrophic and heterotrophic system. In autotrophic conditions was used as the culture medium, the standard BG-11 medium and heterotrophic effluents of the dairy industry. In first moment, the contribution of the pigments in non-protein nitrogen fraction was evaluated based on two experiments. In the first experiment was selected the best condition for the production of chlorophyll-*a* in heterotrophic system, based on the C/N (20, 40 and 60), N/P (5, 10 and 15) parameters and concentration of inoculum (100, 200 and 300 mg.L<sup>-1</sup>), through a 2<sup>3</sup> factorial design. Experiments were conducted in heterotrophic bioreactor at 20° C, pH 7.6 and continuous aeration 1VVM. The optimum conditions for the production of pigment was indicated as being 200 mg.L<sup>-1</sup> of cell concentration and ratio C/N 20 and N/P 10. Based on these results, a second experiment was conducted in order to evaluate the contribution of pigments in the fraction of non-protein nitrogen, and estimate the production of chlorophyll-*a* and phycobiliproteins (phycocyanin, allophycocyanin and phycoerythrin), under the influence of light and medium. It was possible to highlight higher levels of phycobiliproteins in biomass generated in heterotrophic cultivation. However, with noticeable difference ( $p \leq 0.05$ ) in the levels of chlorophyll-*a*, when comparing the concentrations in the biomass of autotrophic media (10.7 mg g<sup>-1</sup>) and heterotrophic (1.0 mg g<sup>-1</sup>). This fact is compensated by lower cultivation time recorded to reach the end of the experiment, when the organism is grown in heterotrophic conditions. Being demonstrated thus also the important contribution of the pigments in the fraction of non-protein nitrogen. Following a third and fourth experiment were designed in order to evaluate the influence of intracellular inorganic nitrogen in the non-protein fraction and protein production, as well as the characterization of protein fraction as to its amino acid profile. The study of the dynamics of intracellular nitrogen showed that the N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> was the predominant nitrogen form, making significant fraction of N-NP, therefore, while the levels of N-NP significantly dependent on the levels of pigments and intracellular nitrogen. The aminograms of biomass generated by the autotrophic and heterotrophic cultures showed major amino acids such as glutamic acid and aspartic acid, followed by valine, isoleucine and leucine, and as a minority, lysine, glycine and methionine. The amino acid profile was characterized by presenting essential amino acids like isoleucine, methionine+cysteine, phenylalanine+tyrosine, valine and threonine at higher than recommended by the FAO/WHO concentrations. The characterization of the protein fraction as the amino acid profile that described biomass as a potential source of protein. The results of this study demonstrate the influence and dynamic distribution of nitrogenous compounds in *Aphanthece microscopica* Nägeli. It is shown also that the implementation of the concept of biorefinery in the type of agribusiness studied may represent important opportunities for the sustainable use of the effluent.

Keywords: *Aphanthece*; biorefinery; dairy effluent; nitrogen; natural pigments; proteins.

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Caracterização do efluente da indústria de laticínios.....	49
<b>Tabela 2</b> - Produção e produtividade de clorofila- <i>a</i> em função da concentração inicial do inóculo, razão C/N e N/P.....	56
<b>Tabela 3</b> - Análise dos efeitos dos fatores concentração de inóculo, razão C/N e razão N/P na produção e produtividade de clorofila- <i>a</i> .....	58
<b>Tabela 4</b> - Variáveis cinéticas para a <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli desenvolvida em condições autotróficas e heterotróficas.....	60
<b>Tabela 5</b> - Concentração de clorofila- <i>a</i> e ficobiliproteínas (mg.g <sup>-1</sup> ) na biomassa da cianobactéria <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli durante as fases inicial, logarítmica e estacionária nos cultivos heterotrófico e fotossintético.....	62
<b>Tabela 6</b> - Percentagem em ficocianina e aloficocianina, em função da concentração em proteína unicelular, de <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli, desenvolvida em condições autotróficas e heterotróficas, nas fases logarítmicas de crescimento.....	65
<b>Tabela 7</b> - Relação entre concentrações de pigmentos na biomassa de <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli, cultivada em meio autotrófico e heterotrófico, na fase logarítmica de crescimento.....	65
<b>Tabela 8</b> - Estimativa de produção de pigmentos por <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli na fase logarítmica de crescimento, cultivada em sistema heterotrófico, utilizando como meio de cultivo o efluente de laticínios.....	67
<b>Tabela 9</b> - Parâmetros cinéticos de remoção de poluentes do efluente.....	68
<b>Tabela 10</b> - Coeficientes de conversão de matéria orgânica, nitrogênio e fósforo por <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli, cultivada no efluente da indústria processadora de laticínios, na ausência de luz.....	69
<b>Tabela 11</b> - Concentração em nitrogênio total Kjeldahl (N-TK) e nitrogênio não proteico (N-NP) na <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli, desenvolvida em condições autotróficas e heterotróficas.....	71
<b>Tabela 12</b> - Valores médios de biomassa obtidos para <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli, nas curvas de crescimento, dos cultivos autotrófico e heterotrófico.....	73

<b>Tabela 13</b> - Concentração de íon amônio, nitrato e nitrito intracelular em $\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ , na biomassa da cianobactéria <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli, cultivada em sistema autotrófico e heterotrófico.....	74
<b>Tabela 14</b> - Teores de pigmentos, e aminoácidos livres ( $\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ ), nas biomassas geradas em sistemas autotrófico e heterotrófico, na fase logarítmica de crescimento.....	76
<b>Tabela 15</b> - Contribuição de nitrogênio na fração de N-NP por pigmentos e $\text{N}\cdot\text{NH}_4^+$ intracelular ( $\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ ), nas biomassas geradas em meios autotrófico e heterotrófico, na fase logarítmica de crescimento e porcentagem de contribuição de cada fração.....	77
<b>Tabela 16</b> - Concentração de proteína ( $\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ ) na biomassa gerada em cultivo autotrófico e heterotrófico.....	80
<b>Tabela 17</b> - Composição de aminoácidos totais na cianobactéria <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli, cultivada em sistema autotrófico e heterotrófico. Resultados ( $\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ de biomassa seca) representam a recuperação de aminoácidos após a hidrólise ácida.....	82
<b>Tabela 18</b> - Avaliação comparativa da composição em aminoácidos essenciais ( $\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ de amostra) obtidos para <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli (fase logarítmica), cultivada em condições heterotróficas, com o padrão indicado pela FAO/WHO, arroz, feijão e escores químicos.....	84
<b>Tabela 19</b> - Concentrações de proteínas ( $\text{N}\cdot\text{TKc} \times 6,25$ ) corrigidas, a partir dos de nitrogênio não proteico no cultivo heterotrófico.....	88
<b>Tabela 20</b> - Balanço de nitrogênio do processo de conversão de nitrogênio em proteína.....	88

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Cultura da <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli (200x).....	24
<b>Figura 2</b> - Estrutura química da clorofila- <i>a</i> e clorofila- <i>b</i> .....	37
<b>Figura 3</b> - Ficobilinas: grupos tetrapirrólicos, cromóforos lineares, covalentemente unidos através de ligações tioésteres aos resíduos específicos de cisteína das proteínas.....	39
<b>Figura 4</b> - Cromóforos ficocianobilinas (4A) e ficoeritrina (4B).....	40
<b>Figura 5</b> - Modelo de um ficobilissoma tricilíndrico hemidiscoidal.....	41
<b>Figura 6</b> - Fluxograma operacional.....	47
<b>Figura 7</b> - Esquema do aparato experimental utilizado nos experimentos.....	48
<b>Figura 8</b> - Curvas de crescimento para a <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli, desenvolvida em meio BG-11 (8a), e no efluente da indústria de laticínios (8b).....	59
<b>Figura 9</b> - Percentuais das frações individuais de ficobiliproteínas, em relação ao total de ficobiliproteínas, nas biomassas obtidas na fase logarítmica de crescimento, em condições autotróficas e heterotróficas.....	64
<b>Figura 10</b> - Estratégia de biorrefino aplicado a indústrias do processamento de leite.....	70
<b>Figura 11</b> - Comparação entre os valores de N-TK em g.100g <sup>-1</sup> , na biomassa da cianobactéria <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli, na fase logarítmica, cultivada em diferentes fontes de efluentes.....	78
<b>Figura 12</b> - Comparação entre os valores de N-NP em g.100g <sup>-1</sup> , na biomassa da cianobactéria <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli, na fase logarítmica, cultivada em diferentes fontes de efluentes.....	78
<b>Figura 13</b> - Comparação dos teores de aminoácidos essenciais (g.100g <sup>-1</sup> ) na biomassa da cianobactéria <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli em diferentes meios de cultivo.....	86
<b>Figura 14</b> - Comparação dos teores de aminoácidos não essenciais (g.100g <sup>-1</sup> ) na biomassa da cianobactéria <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli em diferentes meios de cultivo.....	87



## NOMENCLATURA

AFC: Aloficocianina

ANOVA: Análise de variância

AOAC: Association of Official Analytical Chemists

APHA: American Public Health Association

ATP: Adenosina trifosfato

$\beta$ : Beta

BG-11: Braun-Grunow Medium

C16:0: Acido palmítico

C18:2: Acido linolêico

C18:3: Acido linolênico

C: Concentração final ( $\text{mg.L}^{-1}$ )

Co: Concentração inicial ( $\text{mg.L}^{-1}$ )

C/N: Razão entre carbono e nitrogênio (adimensional)

CV: Coeficiente de variação (%)

d: Dia

DBO: Demanda biológica de oxigênio

D.I.: Diâmetro interno

DQO: Demanda química de oxigênio ( $\text{mg.L}^{-1}$ )

dS: Variação da concentração de substrato ( $\text{mg.L}^{-1}$ )

ER: Eficiência de remoção (%)

FAO: Food and agriculture organization of the United Nations

FC: Ficocianina

FE: Ficoeritrina

kDa: Quilodalton

Klux: Unidade de medida de iluminância ( $10^3$ )

L: Comprimento

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido

$\text{NH}_4^+$ : Ion amônio ( $\text{mg.L}^{-1}$ )

N-TK: Nitrogênio total Kjeldahl ( $\text{mg.L}^{-1}$ )

N-NP: Nitrogênio não proteico ( $\text{mg.L}^{-1}$ )

N/P: Razão entre nitrogênio e fósforo (adimensional)

ND: Não detectado

OPA: Orto-ftalaldeído

p: Probabilidade

$P_x$ : Produtividade ( $\text{mg.L}^{-1}\text{h}^{-1}$ )

pH: Potencial hidrogeniônico

Pred: Valor predito

$P_X$ : Produtividade de biomassa ( $\text{mg.L}^{-1}\text{h}^{-1}$ )

P- $\text{PO}_4^{-3}$ : Fósforo como fosfato ( $\text{mg.L}^{-1}$ )

r: Coeficiente de correlação (adimensional)

$R^2$ : Coeficiente de determinação (adimensional)

tg: Tempo de geração (h)

$t_{\text{log}}$ : Tempo de duração da fase log (h)

T: Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )

$\Delta t$ : Variação entre o tempo final e inicial (h)

VVM: Volume de ar por volume de meio por minuto ( $\text{m}^3 \text{ m}^{-3} \text{ min}^{-1}$ )

X: Concentração celular final ( $\text{mg.L}^{-1}$ )

$X_{\text{máx}}$ : Concentração celular máxima ( $\text{mg.L}^{-1}$ )

$X_0$ : Concentração celular inicial ( $\text{mg.L}^{-1}$ )

$Y_{X/S}$ : Fator de conversão de substrato em célula (mg biomassa/mgSubstrato)

$\alpha$ : Nível de significância estatística

$\lambda$ : Comprimento de onda (nm)

$\Delta X$ : Variação da concentração final e inicial ( $\text{mg.L}^{-1}$ )

$\mu_{\max}$ : Máxima velocidade específica de crescimento do micro-organismo ( $\text{h}^{-1}$ )

$\gamma$ : Gama

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	17
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	19
2.1 Objetivo geral .....	19
2.2 Objetivos específicos .....	19
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	20
3.1 Efluentes agroindustriais.....	20
3.2 Cianobactérias .....	22
3.3 <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli .....	23
3.4 Metabolismo das cianobactérias.....	27
3.4.1 Aplicação do metabolismo respiratório em tratamento de efluentes e biorrefino .....	29
3.4.2 Metabolismo de nitrogênio .....	33
3.5 Pigmentos.....	36
3.5.1 Clorofila.....	36
3.5.2 Ficobiliproteínas.....	39
3.6 Proteínas .....	43
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	47
4.1 Micro-organismo.....	47
4.1.1 Manutenção do Inóculo.....	47
4.2 Experimentos.....	48
4.2.1 Seleção das condições ótimas de produção de pigmentos.....	49
4.2.2 Estimativa da produção de pigmento.....	50
4.2.2.1 Avaliação da cinética de crescimento.....	50
4.2.2.2 Avaliação da produção de pigmentos.....	52
4.2.2.2.1 Determinação de Clorofila- <i>a</i> .....	52

4.2.2.2	Determinação de Ficobiliproteínas.....	52
4.2.3	Dinâmica da distribuição de nitrogênio na biomassa e estimativa da produção de proteína.....	52
4.2.3.1	Nitrogênio não proteico (N-NP).....	53
4.2.3.2	Determinação de Nitrogênio inorgânico intracelular .....	53
4.2.3.3	Nitrogênio total kjeldahl e nitrogênio proteico.....	53
4.2.3.4	Contribuição do nitrogênio pigmentar na fração N-NP .....	54
4.2.4	Caracterização das proteínas quanto ao perfil aminoacídico.....	54
4.2.4.1	Determinação do perfil aminoacídico.....	54
4.2.4.2	Análise cromatográfica .....	54
4.3	Determinações do escore químico .....	55
4.4	Análise estatística .....	55
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	56
5.1	Seleção das condições ótimas de produção de pigmentos.....	56
5.1.1	Análise dos efeitos dos fatores concentração de inóculo, razão C/N e razão N/P na produção e produtividade de clorofila- <i>a</i> .....	57
5.2	Estimativa da produção de pigmentos .....	58
5.2.1	Avaliação da curva de crescimento da <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli em meio autotrófico e heterotrófico .....	58
5.2.2	Avaliação da produção de pigmentos em biomassa de <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli cultivada em meio autotrófico e heterotrófico .....	61
5.2.3	Análise de sensibilidade da produção de pigmentos por <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli, desenvolvida no efluente da indústria de laticínios .....	66
5.3	Dinâmica de nitrogênio na biomassa.....	71
5.3.1	Avaliação de N-TK e N-NP.....	71
5.4	Estimativa da produção de proteína e perfil aminoacídico.....	79
5.4.1	Avaliação da concentração de proteína na biomassa de <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli, desenvolvida em condições autotróficas e heterotróficas.....	79

5.4.2	Perfil aminoacídico da biomassa de <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli, desenvolvida em condições autotróficas e heterotróficas .....	81
5.4.3	Escore químico da <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli .....	84
5.4.4	Influência do meio de cultivo, no perfil aminoacídico, da cianobactéria <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli .....	85
5.4.5	Análise de sensibilidade da produção de proteína por <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli desenvolvida no efluente de laticínio .....	87
6	CONCLUSÃO .....	89
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	91

## 1 INTRODUÇÃO

O processo de biorrefinaria pode ser obtido através da recuperação seletiva e sequencial de produtos de diferentes compartimentos celulares de microalgas procarióticas e eucarióticas (BALASUNDARAM; SKILL; LLEWELLYN, 2012; VANTHOOR-KOOPMANS et al., 2013).

Existem, pelo menos, 30.000 espécies conhecidas de microalgas. Apenas uma pequena parcela tem importância comercial, as quais são, geralmente, cultivadas para a extração de compostos de alto valor (PRIYADARSHANI; RATH, 2012).

Dentre as microalgas, as cianobactérias vêm se destacando na produção de uma série de compostos de interesse comercial. Estes micro-organismos são procariontes fotossintéticos, capazes de sintetizar todos os componentes celulares à partir de água, luz e poucos sais minerais às expensas da luz solar (RODRÍGUEZ et al., 1989; MISHRA et al., 2012; BEEVI; SUKUMARAN, 2014). A sua utilização no tratamento de águas residuárias, podem oferecer uma alternativa barata, tanto no que se refere ao tratamento de água, como na produção de proteína unicelular. Biorreatores algais heterotróficos, operando na ausência de luz, são uma tecnologia em potencial para tratamento de efluentes agroindustriais, onde moléculas orgânicas exógenas simples e nutrientes inorgânicos são convertidas em biomassa com potencial produção de proteína unicelular, que poderá ser utilizada como matéria prima para a produção de alimentos, compostos biologicamente ativos e bioenergia (QUEIROZ et al., 2007b; ZEPKA et al., 2008; RAWAT; KUMAR; BUX, 2011; QUEIROZ et al., 2013).

Dentre os nutrientes inorgânicos que podem limitar o crescimento, o nitrogênio pode ser limitante para o crescimento de microalgas e, conseqüente, para a produção de compostos bioativos. Os íons nitrato, nitrito, amônio e compostos nitrogenados orgânicos são as principais fontes de nitrogênio e são utilizadas, principalmente, na síntese de aminoácidos e proteínas (TOUCHETTE; BURKHOLDER, 2000; MURO-PASTOR; FLORÊNCIO, 2003). Em meios ricos em nutrientes, as microalgas apresentam a propriedade de acumular, intracelularmente, expressivas concentrações de nitrogênio inorgânico, na forma de amônia, nitrato e nitrito, antes da sua assimilação, utilizando este nutriente em período de privação, o que se reflete em sua composição química (DORTCH et al., 1984; LAVÍN; LOURENÇO et al., 2005; HORNES et al., 2010).

Assim, a utilização de processos para a produção de blocos construtores por sistemas baseados em recursos renováveis é uma alternativa para a viabilização da produção

de compostos bioativos, em escala de manufatura industrial. Quando insumos e/ou produtos finais são obtidos de fontes renováveis e de maneira integrada, estabelece o conceito de biorrefinarias (RODSRUD et al., 2012). O biorrefino é um conceito de produção baseado no desenvolvimento sustentável. Neste sentido, as biorrefinarias são sistemas que combinam as tecnologias necessárias entre a concepção, exploração das matérias primas biológicas (biomassa) e a produção de insumos industriais intermediários e finais. Isto é conseguido usando uma combinação sinérgica entre conversões biológicas e químicas (KAMM; KAMM, 2004).

Os pigmentos naturais são biomoléculas abundantemente presentes na biomassa microalgal. Além dos carotenoides e das ficobilinas, as clorofilas são moléculas de ocorrência abrangente nestes micro-organismos. Os pigmentos são empregados como corantes naturais em indústrias farmacêuticas e de alimentos, além de estarem vinculadas a propriedades nutracêuticas em atividades funcionais de promoção a saúde, como ação anti-inflamatória, auxiliar de cicatrização, controle de cristais de oxalato de cálcio e desodorização interna (FERRUZI; BLAKESLEE, 2007).

A cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli tem sido considerada uma fonte de compostos biologicamente ativos, que vem sendo estudada no laboratório de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande, visando à utilização como insumos intermediários e produtos finais (JACOB-LOPES et al., 2007; ZEPKA et al., 2010; QUEIROZ et al., 2011; QUEIROZ et al., 2013). Em face disto, o objetivo do trabalho foi avaliar a dinâmica de nitrogênio, cultivada no efluente da indústria de laticínios, a partir da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli sob o escopo de uma biorrefinaria.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar a dinâmica do nitrogênio em cultivo heterotrófico a partir da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli sob o escopo de uma biorrefinaria agroindustrial.

### 2.2 Objetivos específicos

1. Caracterizar a água residuária da indústria de laticínios;
2. Avaliar a cinética de crescimento da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli;
3. Selecionar a melhor condição para produção de pigmentos pela cianobactéria em condições heterotróficas;
4. Avaliar a influência da luz e do meio de cultivo na produção de compostos bioativos, expressos como pigmentos e proteínas;
5. Avaliar a dinâmica do nitrogênio nos cultivos autotrófico e heterotrófico;
6. Avaliar a influência do nitrogênio não proteico na estimativa de produção de proteína;
7. Avaliar o perfil aminoacídico na biomassa gerada nos cultivos autotrófico e heterotrófico.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Efluentes agroindustriais

A composição de efluentes agroindustriais caracteriza-se por apresentar alto conteúdo em matéria orgânica, constituída por compostos facilmente degradáveis, como carboidratos, proteínas e lipídios (QUEIROZ; KOETZ, 1997; GUERRERO et al., 1999; DE-BASHAN et al., 2002; MULKERRINS; DOBSON; COLLEMAN, 2004; WANG et al., 2005; SARKAR et al., 2006; JANCZUKOWICZ et al., 2007; VOURCH et al., 2008; KUMAR; MIAO; WYATT, 2010; PITTMAN; DEAN; OSUNDEKO, 2011; QUEIROZ et al., 2013).

De-Bashan et al. (2002) reportam que os íons fosfato e amônio são os principais constituintes do efluente agroindustrial, com altos níveis de sólidos dissolvidos ou suspensos, como lactose, gorduras e proteínas. Esta constatação é corroborada por outros trabalhos (QUEIROZ; KOETZ, 1997; SARKAR et al., 2006; VOURCH et al., 2008; MARKOU; GEORGAKAKIS, 2011; VIEIRA, 2012a).

Queiroz e Koetz (1997) caracterizaram o efluente da parboilização do arroz em relação à concentração de N-TK, DQO,  $N-NH_4^+$  e  $P-PO_4^{-3}$ , obtendo valores entre 28 e 140  $mg.L^{-1}$  para o N-TK, 1742-4423  $mg.L^{-1}$  de DQO, 11-35  $mg.L^{-1}$  de  $N-NH_4^+$  e 12-94 para  $P-PO_4^{-3}$ , o que indica alta variabilidade destes componentes. A concentração destes parâmetros, nestes intervalos, tem sido registrada para este tipo de efluente em uma série de outros trabalhos (BASTOS et al., 2002; BASTOS et al., 2004; BASTOS et al., 2010; QUEIROZ et al., 2007b; ZEPKA et al., 2008). No entanto, a composição dos efluentes industriais varia enormemente em função da matéria-prima e processamentos empregados (LYBERATOS et al., 1997; SARAIVA, 2000; AGUILAR et al., 2002; WANG et al., 2005; QUEIROZ et al., 2007b; QUEIROZ et al., 2013).

No processamento de laticínios, a composição do efluente gerado é constituída por expressivas concentrações em matéria orgânica, constituída por óleos, gorduras, proteína, nitrogênio, fósforo, açúcar, nutrientes dissolvidos e sólidos suspensos (SARKAR et al., 2006; VOURCH et al., 2008).

Concentrações em matéria orgânica e sólidos suspensos podem apresentar uma variação diária significativa no efluente gerado pelos processos industriais. No processamento de vegetais no período correspondente a lavagem, a concentração destes parâmetros excedem as de outras horas de trabalho (LYBERATOS et al., 1997).

Os efluentes agroindustriais se caracterizam, de uma forma geral, por apresentarem a concentração em sólidos voláteis, compreendendo, aproximadamente metade dos sólidos totais, oferecendo uma aproximação grosseira da quantidade de matéria orgânica presente (AGUILAR et al., 2002). Isto tem sido evidenciado por outros autores, como Sarkar et al. (2006), que estudaram a relação dos níveis de sólidos suspensos do efluente da indústria de laticínios com o conteúdo de matéria orgânica.

A indústria de laticínios constitui um setor importante da indústria alimentícia, contribuindo de maneira significativa para a produção de efluentes agroindustriais. Caracterizam-se pelo elevado consumo de água, gerando, em torno de 0,2 a 10L de efluente, o que resulta em um alto volume de água residuária, rica em poluentes orgânicos e inorgânicos (VOURCH et al. 2008; MARKOU; GEORGAKAKIS, 2011).

A elevada carga de matéria orgânica provoca sérios problemas ambientais, caso estes nutrientes sejam acumulados em rios e lagos, devido às suas altas taxas de DBO e DQO (BEEVI; SUKUMARAN, 2014). Em função disto, inúmeros estudos têm sido realizados, visando o tratamento destas águas residuárias, utilizando microalgas (GASPERI et al., 2008; SAMORI et al., 2013; ZHU et al., 2013), enfatizando, principalmente, a remoção de nitrogênio e fósforo (QUEIROZ et al., 2007a; BASTOS et al., 2010; PITTMAN; DEAN; OSUNDEKO, 2011; VIEIRA et al., 2012a).

Segundo Beevi e Sukumaran (2014), o cultivo de microalgas, no efluente da indústria de laticínios, resulta em uma série de vantagens, tais como a produção de biomassa a partir de carbono orgânico, nitrogênio e sais minerais, sem a necessidade adicional de nutrientes; redução da carga orgânica do efluente; oxigenação do efluente tratado e a possibilidade de extrair produtos de alto valor, tais como lipídios, proteínas e carboidratos. Estes autores descrevem o efluente da indústria de laticínios, como de cor branca, portador de forte odor e alto pH alcalino, fazendo-se necessária a aferição de pH, quando o objetivo é o cultivo de microalgas. Vieira et al., 2012a, caracterizaram o efluente de uma indústria de processamento de laticínio por um período de 12 meses, demonstrando a alta variedade de seus constituintes, mediante os valores dos coeficientes de variação obtidos, que oscilaram de 10,5% para os valores de pH a 138,6% para óleos e graxas. Os valores de pH registrados, oscilaram de 7,1 a 9,6, resultando valores médios de 9.1.

Assim, microalgas e cianobactérias apresentam o potencial de reciclar nutrientes de águas residuárias e produzir biomassa, que, aliada a biorremediação, será aplicada na produção de compostos bioativos e insumos a serem utilizados, principalmente, na indústria

de alimentos (QUEIROZ et al., 2011; MARKOU; GEORGAKAKIS, 2011; QUEIROZ et al., 2013; BEEVI; SUKUMARAN, 2014; MARONEZE et al., 2014).

### 3.2 Cianobactérias

As cianobactérias são um dos mais interessantes e importantes micro-organismos autotróficos, sob o ponto de vista evolutivo, filogenético e ecológico (KNOLL, 2008; KOMÁREK, 2014). São procariotos Gram-negativos, considerados os primeiros produtores primários de matéria orgânica a realizar a fotossíntese, de forma similar às plantas superiores (ADAMS, 2000; OLGUÍN et al., 2001; DAVID et al., 2007). Datam da era paleozóica, tendo evoluído na arqueozóica, originando-se há 3 bilhões de anos atrás (TANAKA et al., 1975; THAJUDDIN; SUBRAMANIAN, 2005; DAVID et al., 2007; MISHRA et al., 2012). Na escala evolutiva, as cianobactérias representam um elo entre as bactérias e as plantas verdes. Sua estrutura celular é caracterizada pela ausência de organelas envoltas por membranas, tais como núcleo definido, cloroplastos ou mitocôndrias, assim como todo o aparelho fotossintético e sistema respiratório, assemelhando-se a bactérias Gram-negativas (XU et al., 2001).

Estes micro-organismos constituem um dos maiores subgrupos de procariontes Gram-negativos, apresentando cerca de 150 gêneros (RIPPKA et al., 1979) e mais de 4.000 espécies (BURJA et al., 2001) depositadas em coleções no mundo inteiro (COHEN; GUREVITZ, 2006). Tem seu nome originado a partir de um dos seus principais pigmentos, a ficocianina, que é um pigmento de cor azul. Além da ficocianina, encontram-se pigmentos como a ficoeritrina, clorofila-*a*, xantofilas e  $\beta$ -carotenos (CAMPBELL, 1998; TING et al., 2002). As cianobactérias caracterizam-se por apresentar somente clorofila-*a*, estando sempre presente a ficocianina, podendo estar ausente a ficoeritrina (SANTOS et al., 2004).

A clorofila-*a* é o principal pigmento fotoquimicamente ativo, que funciona como um receptor de luz para a condução da fotossíntese (VONSHAK, 1997; SANTIAGO-SANTOS et al., 2004; BARSANTI; GUALTIERI, 2006; MAGER; THOMAS, 2011). Este pigmento absorve energia luminosa a qual é transferida para os centros de reação localizados na membrana fotossintética, dando início ao processo de fotossíntese (HOEK; MANN; JAHNS, 1995; VISKARI; COLYER, 2003). Outras classes de pigmentos acessórios estão também envolvidos na captação de energia luminosa, os carotenoides e as ficobiliproteínas. Os carotenoides são pigmentos lipossolúveis, de cor vermelha, alaranjada ou amarela, encontrados em associação com a clorofila-*a*. A terceira classe de pigmentos acessórios são as

ficobilinas, a ficocianina, de cor azul e a ficoeritrina, de cor vermelha. Em torno de 50% da luz requerida é capturada pelas ficobiliproteínas (MISHRA et al., 2012)

Associada a capacidade de realizar fotossíntese, está a facilidade de fixar nitrogênio atmosférico. Estas propriedades conferem a estes micro-organismos as necessidades nutricionais mais simples de todos os seres conhecidos (ROMANO et al., 2000; JEFFERSON et al., 2001). Apresentam vantagens notáveis, que os colocam como importante fonte alternativa de bioprodutos. Apresentam, ainda, a capacidade de utilizar fontes de carbono orgânico e inorgânico, curto tempo de geração e ser facilmente cultivável em pequenas áreas (CHISTI, 2007; MATA et al., 2010).

A versatilidade para sustentar seu crescimento, torna este grupo relevante fonte de recursos a serem explorados pela humanidade (ANUPAMA; RAVINDRA, 2000; BURJA et al., 2001; MORIST et al., 2001; MOLINA-GRIMA et al., 2002; OLGUÍM, 2003; BASTOS et al., 2004; QUEIROZ et al., 2007b; DE-BASHAN; BASHAN, 2010; ABDEL-RAOUF et al., 2012).

Nos últimos anos, a Universidade Federal do Rio Grande vem estudando a cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli, com o duplo propósito de tratamento de efluentes e produção de compostos bioativos (BASTOS et al., 2004; QUEIROZ et al., 2006; ZEPKA et al., 2007; JACOB-LOPES et al., 2008; SILVA et al., 2009; QUEIROZ et al., 2010; QUEIROZ et al., 2011; VIEIRA et al., 2012a; MARKOU et al., 2011; VIEIRA et al., 2012b; MARONEZE et al., 2014).

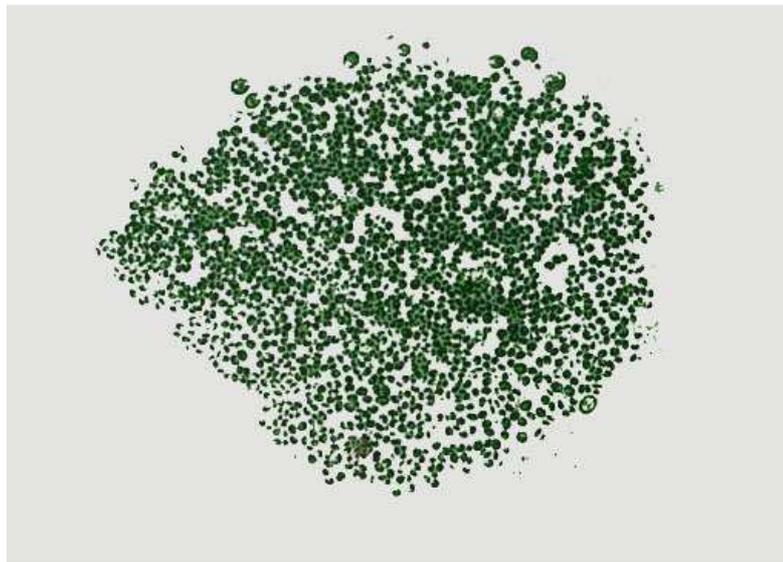
### 3.3 *Aphanothece microscopica* Nägeli

A *Aphanothece microscopica* Nägeli é uma cianobactéria de ocorrência na Laguna dos Patos, RS, com florações constantes durante todo ano (QUEIROZ; TREPTOW; KOETZ, 1998; QUEIROZ et al., 2001). É taxonomicamente classificada na divisão Cyanofita, Classe Cyanoficeae, ordem Chroococcales, família Synechococcaceae e subfamília Aphanotecoidease, gênero *Aphanothece* (ANAGNOSTIDIS; KOMARE, 1998; BARSANTI; GUALTIERI, 2006). São citadas duas espécies do Gênero *Aphanothece* no estuário da laguna dos Patos, *Aphanothece microscopica* Nägeli e *Aphanothece stagnina* Sprengel. Estas duas espécies são morfologicamente muito próximas, quase não havendo diferenças nas medidas celulares e na proporção comprimento-largura, diferindo, apenas quanto a morfologia da bainha gelatinosa. A *Aphanothece microscopica* Nägeli apresenta a bainha firme, amorfa e

macroscópica, diferindo da bainha gelatinosa da *Aphanothece stagnina* Sprengel (COUTINHO, 1982; DE LORENZO, 1995).

A coloração da *Aphanothece microscopica* Nägeli é verde azulada escura, células adultas elípticas acilíndricas, conteúdo celular finamente granuloso, medindo 9,0 - 9,5  $\mu\text{m}$  x 4,2  $\mu\text{m}$ , cerca de 2,1 vezes mais comprida que larga (Figura 1).

**Figura 1** - Cultura da *Aphanothece microscopica* Nägeli (200x)



Fonte: Laboratório de Biotecnologia – Universidade Federal do Rio Grande. Fotografia: Fabiana Barros

A espécie *Aphanothece stagnina* se caracteriza por formar agregados macroscópicos de 2 a 2,5 cm de diâmetro, com numerosas células embebidas em mucilagem firme, homogênea e incolor. Tais agregados, inicialmente mais ou menos globulosos, se alargam, a posteriori, formando lâminas ou massas regulares verde-azulada, ou, às vezes ligeiramente pardacenta (HALPERIN; ZULPA; ZACCARO, 1974).

Uma série de trabalhos focados no crescimento da espécie *Aphanothece microscopica* Nägeli em efluentes agroindústrias vêm sendo desenvolvidos, visando, principalmente, a aplicação da biomassa gerada na dieta alimentar, buscando com isto, caracterizar este micro-organismo quanto ao seu valor nutricional e viabilidade de utilização como alimento (QUEIROZ et al., 1998; QUEIROZ; KOETZ; TREPTOW, 2001; TEIXEIRA, 1996; QUEIROZ et al., 2001; QUEIROZ et al., 2004a; JACOB-LOPES et al., 2006; QUEIROZ et al., 2007b; ZEPKA et al., 2007; ZEPKA et al., 2008; HORNES et al., 2010; ZEPKA et al., 2010; QUEIROZ et al., 2011; QUEIROZ et al., 2013).

Neste sentido, Queiroz, Koetz e Treptow (1998) caracterizaram o odor da *Aphanothece microscopica* Nägeli desidratada, constatando odor característico a ervas, o que viabiliza o uso desta cianobactéria na alimentação humana. Afirmativa esta, que foi avaliada, mediante elaboração de macarrão contendo este micro-organismo. O produto foi submetido à aceitação pelo consumidor demonstrando sua palatabilidade (TEIXEIRA, 1996). A viabilidade de aplicação deste micro-organismo na dieta foi avaliada por Queiroz et al. (2001), mediante avaliação do efeito histológico e fisiológico em ratas alimentadas com dietas contendo *Aphanothece sp*, bem como sua primeira geração. A análise histológica não indicou qualquer alteração nas ratas e em tecidos embrionários em formação, ficando demonstrado, ainda, o efeito hipocolesterolêmico da dieta ministrada. Baixos níveis de colesterol e glicemia foram também obtidos em ratas alimentadas com *Aphanothece microscopica* Nägeli, desenvolvida no efluente da parboilização do arroz, quando comparados a ratas alimentadas com caseína (Zepka et al., 2010). Os baixos níveis de colesterol podem ser atribuídos à composição em ácidos graxos destes micro-organismos. Jacob-Lopes et al. (2007) demonstrou a predominância em ácidos graxos poli-insaturados da biomassa gerada no efluente da parboilização do arroz, destacando-se a presença do ácido  $\gamma$ -linolênico (C18:3). Equivalência em concentração foi obtida para o ácido palmítico (C16:0), seguido pelo ácido linolêico (C18:2).

O perfil aminoacídico deste micro-organismo foi avaliado, apresentando-se como fonte em potencial de proteína unicelular, salientando-se concentrações dos aminoácidos essenciais leucina, fenilalanina+tirosina, valina, isoleucina e treonina, em concentrações superiores ao padrão exigido pela FAO/WHO (QUEIROZ et al., 1998). Estes autores reportam a deficiência em lisina, limitação esta, similar em relação ao padrão aminoacídico de outras cianobactérias. Este fato pode estar associado à operação de secagem. Segundo Yang et al. (1980), quando estes micro-organismos são secos a elevadas temperaturas, a lisina pode se complexar com açúcares livres ou com a parede celular, resultando em baixos teores deste aminoácido.

A aplicação de proteínas unicelulares como ingredientes de alimentos está condicionada a desidratação da biomassa e a funcionalidade dos constituintes da biomassa seca (JACOB-LOPES et al., 2006). Desta forma, este micro-organismo desidratado foi caracterizado quanto à composição bioquímica de interesse industrial, tais como proteínas, carboidratos, ácidos graxos, perfil aminoacídico, perfil eletroforético e características

funcionais da proteína (JACOB-LOPES et al., 2006; ZEPKA et al., 2007; ZEPKA et al., 2008).

Jacob-Lopes et al. (2006), reportam que o perfil eletroforético da *Aphanothece microscopica* Nägeli é constituído de bandas, com massa molar de 15 kDa a 62,5 kDa. Neste mesmo trabalho, os autores obtiveram a caracterização funcional da fração proteica deste micro-organismo, em termos de solubilidade e capacidade emulsificante, demonstrando a influência da secagem na funcionalidade proteica da biomassa. Foram obtidos maiores valores para a capacidade emulsificante, quando a biomassa foi desidratada a 60°C, correspondendo ao menor tempo de exposição da biomassa ao ar aquecido. No entanto, as maiores solubilidades foram registradas nas amostras secas a 40°C.

Zepka et al. (2008), avaliaram a influência da temperatura de secagem (40, 50 e 60°C) nos teores de proteína, carboidratos e lipídios da biomassa de *Aphanothece microscopica* Nägeli, desenvolvida no efluente da parboilização do arroz. Foram registradas diferenças na composição da biomassa, em função das temperaturas utilizadas. Foram registrados mínimos e máximos na ordem de 41,3 e 49,3%, 13,4 e 17,7% e 7,2 e 7,9% de proteína, carboidratos e lipídios, respectivamente. Foi constatado que as maiores concentrações foram registradas a 60°C.

A qualidade da proteína da biomassa, seca a 60°C, foi avaliada mediante ensaios biológicos, quanto aos parâmetros nutricionais, tais como valor biológico, digestibilidade, utilização líquida de proteína e quociente de eficiência líquida. Os resultados demonstraram a viabilidade de utilização deste micro-organismo como fonte em potencial de proteínas (ZEPKA et al., 2010).

Associado ao tratamento do efluente e a utilização da biomassa, a possibilidade de reúso da água residuária vem sendo estudada. Silva-Manetti et al. (2011), avaliaram o potencial de reúso da água residuária da indústria processadora de pescado, a partir do cultivo da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli, bem como o processo de separação da biomassa. Estes autores verificaram que a associação do tratamento biológico e químico é uma importante estratégia quando se pensa em reúso de águas, considerando o uso de coagulantes, como cloreto de ferro e a propriedade de eficiência de remoção de matéria orgânica e nutrientes por este micro-organismo (QUEIROZ et al., 2004b; BASTOS et al., 2004; ZEPKA et al., 2007; ZEPKA et al., 2008; BASTOS et al., 2010). A associação do tratamento biológico com o processo de coagulação e sedimentação complementa o processo de depuração da água residuária, mediante a remoção de outros contaminantes requeridos pela legislação quando se visa o reúso de água, com eficiente separação da biomassa (SILVA-

MANETTI et al., 2009; SILVA-MANETTI et al. 2011). Neste sentido, uma série de trabalhos têm sido desenvolvidos, envolvendo a remoção de matéria orgânica, nitrogênio e fósforo, com ênfase no estudo da cinética de crescimento em efluentes agroindustriais deste micro-organismo (QUEIROZ et al., 2002; QUEIROZ et al., 2004b; BASTOS et al., 2004; QUEIROZ et al., 2007a; BASTOS et al., 2010; QUEIROZ et al., 2011; VIEIRA et al., 2012a; VIEIRA et al., 2012b; QUEIROZ et al., 2013). Nestes trabalhos, a influência de condições de crescimento, como meio de cultivo, luz, temperatura, concentração celular e razões C/N e N/P, tem sido profundamente estudados e otimizados visando associar o tratamento de efluente, com a produção de compostos bioativos, mediante a conversão dos nutrientes das águas residuárias sob o escopo de uma biorrefinaria, com a possibilidade de reúso de água. Estes trabalhos centralizam-se na capacidade do micro-organismo em questão crescer na ausência de luz às expensas de matéria orgânica.

O desenvolvimento do cultivo, em completo escuro, elimina diversas desvantagens dos biorreatores fotossintéticos, principalmente ao que se refere ao aporte de energia luminosa, possibilitando o uso de reatores convencionais como os reatores agitados mecanicamente e coluna de bolhas (QUEIROZ et al., 2011).

Nestas condições, fontes orgânicas exógenas de carbono, podem ser obtidas, através de águas residuárias industriais, podendo ser direcionada a conversão de poluentes como matéria orgânica, nitrogênio e fósforo, em biomoléculas de valor agregado. Por outro lado, se considerarmos apenas as características de tratamentos de resíduos industriais, a principal vantagem do uso de reatores heterotróficos com microalgas, está relacionado com a conversão simultânea de matéria orgânica, nitrogênio e fósforo, em uma única etapa, reduzindo custos capitais e operacionais, associados às formas convencionais de tratamento (QUEIROZ et al., 2007a).

### **3.4 Metabolismo das cianobactérias**

O principal modelo do metabolismo energético das cianobactérias, invariavelmente, é a fotossíntese, em que a luz é a fonte energética para a síntese do material orgânico celular a partir do dióxido de carbono, acompanhada pela formação de oxigênio (OLGUÍN et al., 2001; CHISTI et al., 2007; DAVID et al., 2007; MADHYASTHA; VATSALA, 2007; MISHRA et al., 2012). A eficiência fotossintética das microalgas é considerada substancialmente mais elevada que nas plantas superiores (CHISTI et al., 2007).

A fosforilação fotossintética (produção de ATP), nas células de cianobactérias, ocorre via transporte de elétrons, da mesma forma que ocorre em algas eucarióticas e plantas superiores (LEM; GLICK, 1985; ARDELEAN; ZARNIA, 1998).

A maior parte da energia luminosa, utilizada por qualquer organismo fotossintético, é absorvida por uma coleção de pigmentos acessórios, uma vez que a clorofila-*a* absorve a energia luminosa, somente em uma limitada região do espectro solar. A energia de excitação é, então, transferida para os centros de reação, localizados na membrana fotossintética, iniciando o processo fotossintético. Os pigmentos fotossintetizantes estão localizados nos tilacóides, onde ficam livres no citoplasma, e não inclusos nos cloroplastos, como nos organismos eucarióticos sintetizantes (HOEK; MANN; JHANS, 1995; VISKARI; COLYER, 2003).

O desenvolvimento de células de microalgas, em zonas afóticas, associado à manutenção de suas estruturas celulares nos períodos de escuro, durante o fotoperíodo diário, indica a possibilidade de utilizar tecnologicamente rotas metabólicas heterotróficas para o cultivo microalgal (PEREZ-GARCIA et al., 2011).

Apesar de apresentarem como modelo principal a fotossíntese, estes micro-organismos possuem uma versatilidade, no que se refere à manutenção de suas estruturas, usufruindo de diferentes metabolismos energéticos. Algumas cianobactérias, como outros organismos procariontes fotossintéticos, são capazes de utilizar a respiração como metabolismo auxiliar para obtenção de energia, na ausência de luminosidade. Estes mecanismos ocorrem, simultaneamente, na célula do micro-organismo, onde são capazes de assimilar compostos orgânicos, imediatamente, quando transferidos para o escuro. Fato que não ocorre em células eucarióticas, onde estes processos têm localizações subcelulares específicas (ARDELEAN; ZARNIA, 1998).

De uma forma geral, todos os organismos usam as mesmas rotas para a respiração. O metabolismo respiratório das microalgas se assemelha ao das plantas superiores. A respiração aeróbia é a mais completa, contando com três etapas básicas, que são a formação de piruvato a partir de açúcares, ácidos graxos ou proteínas, ciclo do ácido tricarboxílico e cadeia de transporte de elétrons (PAHL et al., 2010).

A respiração nas cianobactérias é um processo de transporte de elétrons, via membrana, o qual leva a formação de ATP. Nestes micro-organismos, estruturalmente, apresentam-se três membranas, uma típica de bactérias Gram-negativas, a qual não é ativada bioenergeticamente, a membrana plasmática ou celular e a membrana intracitoplasmática ou tilacóides (SCHMETTERER, 1994).

A respiração nas cianobactérias é única em diversos aspectos. A fotossíntese e a respiração aeróbica não ocorrem em organelas como nas plantas, mas são ativas nos mesmos compartimentos. No entanto, apenas algumas cianobactérias apresentam cadeias respiratórias completas. Em contraste com a fotossíntese, o transporte de elétrons está, geralmente, presente nas membranas intracelulares. Componentes não envolvidos na respiração de outros organismos formam a cadeia respiratória destes micro-organismos, tais como NADPH e complexo citocromo (SCHMETTERER, 1994; ARDELEAN; ZARNIA, 1998).

À medida que as cianobactérias tem se tornado extremamente úteis na elucidação de estudos fotossintéticos, há um acréscimo de atenção ao fato que estas células são as únicas capazes de realizar a respiração aeróbia e a fotossíntese no mesmo compartimento. Assim, supõem-se não existir uma cadeia de transporte de elétrons exclusiva para a respiração, sendo vários componentes utilizados, nas vias fotossintética e respiratória (SMITH, 1982; SCHMETTERER, 1994).

Durante a respiração, ao contrário da fotossíntese, o oxigênio é consumido, com paralela produção de dióxido de carbono, estando a taxa respiratória dos substratos orgânicos, intimamente orientada para o crescimento e divisões celulares. O metabolismo respiratório em microalgas desempenha duas funções principais: servir como fonte exclusiva de energia, para manutenção e biossíntese e, fornecer os blocos construtores de carbono para a biossíntese (GEIDER; OSBORNE, 1989; JACOB-LOPES et al., 2010).

### **3.4.1 Aplicação do metabolismo respiratório em tratamento de efluentes e biorrefino**

A aplicação deste modelo metabólico, passível de proporcionar o crescimento microalgal, tendo como fonte de carbono a matéria orgânica, e ausência de luz, vem sendo explorada, no sentido de associar o tratamento de efluente ao biorrefino (KAMM; KAM, 2004; WILLIAMS; LAURENS, 2010; RODSRUD et al., 2012; QUEIROZ et al., 2013).

O metabolismo heterotrófico de microalgas utiliza uma rota específica para o crescimento no escuro, captando carbono exógeno da rota tradicional, que utiliza dióxido de carbono e energia luminosa, em condições fotossintéticas (PEREZ-GARCIA et al., 2011).

O propósito de tratar efluente antecede ao biorrefino, que cresce paralelamente ao desenvolvimento biotecnológico. Nas últimas décadas, diversos trabalhos têm sido realizados, tomando como base o metabolismo destes micro-organismos, explorando seus mecanismos auxiliares, como a respiração, as quais podem ser aplicadas, satisfatoriamente, no tratamento de despejos agroindustriais que constituem significativas fontes poluidoras (VILLANUEVA,

1994; DE LA NOUE et al., 1997; TAM; WONG, 2000; NÚÑEZ et al., 2001; QUEIROZ et al., 2002; QUEIROZ et al., 2004b; QUEIROZ et al., 2007a; ZEPKA et al., 2008; DE-BASHAN; BASHAN et al., 2010; BASTOS et al., 2010; PEREZ-GARCIA et al., 2011; ABDEL-RAOUF et al., 2012; QUEIROZ et al., 2013).

O tratamento de efluentes, utilizando cianobactérias, tem sido proposto, devido à eficiência na remoção de matéria orgânica e nutrientes inorgânicos. Nos processos convencionais de tratamento biológico de efluente, as substâncias carbonáceas são removidas por organismos heterotróficos enquanto os compostos nitrogenados são eliminados por nitrificação e desnitrificação, em dois reatores distintos, nas condições aeróbicas e anaeróbicas. Assim, a remoção simultânea destes compostos trás consigo as vantagens de redução de custo e a possibilidade de aproveitamento do nitrogênio por incorporação em biomassa (ORTIZ et al., 1997; TAM; WRONG, 2000; XING et al., 2000; QUEIROZ et al., 2004b; ZEPKA et al., 2007). Estudos restritos têm sido direcionados para elucidar o potencial do metabolismo heterotrófico das microalgas para a aplicação no tratamento de efluentes e biorrefino (DEVI et al., 2012; VIEIRA et al., 2012a; VIEIRA et al., 2012b; QUEIROZ et al., 2013; BEEVI et al., 2014; MARONEZE et al., 2014).

O crescimento de microalgas, heterotroficamente, consome nitrogênio e fósforo, como elementos essenciais requeridos na constituição celular de compostos nitrogenados e fosforados, como os fosfolipídios, nucleotídeos e ácidos nucleicos (ABELSON, 1999). Tipicamente, as células destes organismos contem aproximadamente 1% de fósforo em base seca (KAPLAN et al., 1986). Embora, em certas condições, as microalgas sejam induzidas a acumular mais do que o fósforo necessário para sua sobrevivência. Há evidências de que estes organismos sejam capazes de retirar do meio, quantidades excedentes de fósforo, para posterior utilização. Este fósforo extra é estocado, na forma de fosfato, para uso como recurso interno, quando as condições externas de fósforo são limitantes (POWELL et al., 2009).

As águas residuárias apresentam, em sua composição, importantes concentrações em fósforo, elemento este, considerado como uma das principais causas da eutrofização, quando atingem os corpos de água sem qualquer tratamento (ESTELA; CERDÁ, 2005). Vieira et al., 2012a, reportam teores médios de  $P-PO_4^{-3}$  para o efluente de laticínio, na ordem de  $21,9 \text{ mg.L}^{-1}$ , demonstrando a eficiência do uso de biorreatores heterotróficos, com a cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli para a remoção deste nutriente. Entre as inúmeras variáveis que controlam este processo, a temperatura parece ser o maior limitante, por ser uma variável geográfica que afeta a taxa metabólica de todos os processos biológicos (SAKAMOTO et al., 1997). Vieira et al. (2012a) reportam que o uso de biorreatores

heterotróficos, com a cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli, foi eficiente na remoção de fosfato total do efluente do processamento de laticínios, reportando, ainda, que a remoção deste constituinte é sensível a temperatura.

A utilização de sistemas heterotróficos, para o cultivo de microalgas, quando comparado aos autotróficos, traz consigo a vantagem da redução de custo de produção de biomassa, por ser independente da luminosidade, e ser passível de utilização de água residuária. Além disso, é possível obter, em condições heterotróficas, elevadas concentrações de biomassa, visando a produção em grande escala de compostos bioativos (CHEM, 1996; BEEVI; SUKUMARAN, 2014). A peculiaridade do crescimento heterotrófico, de resultar em alta densidade celular, tornam as cianobactérias, desenvolvidas em meio heterotróficos, organismos altamente aplicáveis sob o escopo de uma biorrefinaria e, por consequência, altamente atrativas, como fonte de substâncias químicas de alto valor, como ácidos graxos, moléculas bioativas, ficobiliproteínas, clorofila, carboidratos e proteína (MISHRA et al., 2010; ZEPKA et al., 2010; LEVINE et al., 2010; PEREZ-GARCIA et al., 2011; QUEIROZ et al., 2011; QUEIROZ et al., 2013; BEEVI; SUKUMARAN, 2014). Assim, na atualidade, uma série de trabalhos tem enfatizado a aplicação do metabolismo heterotrófico na geração de compostos, quer para a indústria de alimentos, farmacológica ou para geração de energia.

A demanda por combustíveis vem aumentando, proporcionalmente, com as mudanças climáticas, poluição do ar, destruição de ecossistemas, assim como os problemas relacionados com a produção e combustão de petróleo. Na busca de soluções para estes problemas, vem a necessidade por alternativas de combustíveis a serem consumidos (WU et al., 2009; JANAUN; JANAUN; ELLIS, 2010; LEVINE et al., 2010).

O biodiesel é uma alternativa promissora de suprimento energético, o qual é produzido a partir de uma mistura de ácidos graxos, sendo sintetizado através de um processo de transesterificação do triglicerídeo, gerando metil ésteres e glicerol (CHISTI, 2009; WU et al., 2009; JANAUN; ELLIS, 2010; RAWART et al., 2011; CHISTI et al., 2013).

As microalgas são consideradas uma das maiores fontes em potencial para a produção de biodiesel, limitada, principalmente, pelo rendimento dos cultivos fotoautotróficos (CHISTI, 2007). Recentes avanços em sistemas biológicos, engenharia genética e biorrefinaria apresentam oportunidades para expandir a produção de lipídios, extraídos da biomassa algal, em processos industriais, utilizando como fonte de nutrientes águas residuárias agroindustriais (WIJFFELS; BARBOSA, 2010; MARKOU; GEORGAKAKIS, 2011; QUEIROZ et al., 2013; BEEVI; SUKUMARAN, 2014). O interesse por microalgas,

como fonte de lipídios, tem aumentado, em grande parte, em função da possibilidade de altos rendimentos em lipídios, bem como pela capacidade de cultivo de algas em terras improdutivas, utilizando águas salobras, salgadas ou residuárias (CHISTI, 2007; DISMUKES et al., 2008; HU et al., 2008; LI et al., 2008; MATA et al., 2010; PITTMAN et al., 2011; MARKOU; GEORGAKAKIS, 2011; ROSGAARD et al., 2012; PIGNOLET et al., 2013; PANCHA et al., 2014).

Chisti (2007) discute o resultado, de uma análise comparativa, de fontes de produção de biodiesel, tais como o gerado a partir de canola, soja e palma, destacando as microalgas como as mais promissoras para a produção deste combustível. De acordo com Mohammadi e Aliabadi (2013), as microalgas apresentam um potencial de produção de biodiesel de 5.000 a 15.000 galões de biodiesel por acre/ano de cultivo.

Beevi e Sukumaran (2014), avaliaram a produção de lipídios da microalga *Chlorococcum* sp. RAP 13, quando desenvolvida em condições mixotrófica e heterotrófica, utilizando como meio de cultivo o efluente da indústria de laticínios, verificando que o micro-organismo em estudo acumula mais lipídios quando em heterotrofia.

Queiroz et al. (2013), desenvolveram um sistema de conversão heterotrófica, de nutrientes do efluente da indústria processadora de pescado, para a produção de lipídios e proteínas, com paralelo reúso de água, sob o escopo de uma biorrefinaria. Os autores reportam importantes resultados quanto aos teores de lipídios, bem como para o perfil de ácidos graxos da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli. O conteúdo de lipídios da biomassa obtida foi de 13,8% e a fração lipídica, caracterizada por apresentar  $\alpha$ -linolênico (41%) como ácido graxo predominante. Este teor lipídico é reportado a outras microalgas oleaginosas estudadas, em condições heterotróficas, visando a produção de biodiesel (LEVINE et al., 2010; BEEVI; SUKUMARAN, 2014). Esta biomassa gerada demonstrou seu potencial biorrefino ainda representado por 52,5% de proteína, 21,7% de carboidrato e 6,5% de minerais. O perfil lipídico da biomassa deste micro-organismo indicou proporções de ácidos graxos saturados, insaturados e poli- insaturados compatíveis com os parâmetros estabelecidos pelos órgãos de regulamentação de biocombustíveis.

Contudo, a composição bioquímica das microalgas pode variar de acordo com as condições de cultivo, tipo e estado fisiológico do micro-organismo. Concentrações obtidas a partir da variação de parâmetros, como temperatura, meio de cultura e fase de crescimento, permitem a identificação das culturas de microalgas e cianobactérias, embora muitos efeitos sejam específicos das espécies em questão (LOURENÇO et al., 1997).

Assim, as condições de cultivo podem ser otimizadas de maneira a maximizar a síntese de compostos bioativos (RENAUD et al., 2002; RODOLFI et al., 2008; QUEIROZ et al. 2011).

Queiroz et al. (2011) estudaram a produção de lipídios por *Aphanothece microscopica* Nägeli, objetivando sua aplicação na produção de biodiesel, quando cultivada no efluente do processamento de pescado a diferentes níveis de temperatura. Os resultados demonstraram, nitidamente, a influência da temperatura, sendo registrados valores de 15,3; 13,8 e 7,1% de lipídios para biomassas cultivadas a 10, 20 e 30°C, respectivamente.

Independente da produção de lipídios, a biomassa algal representa uma fonte alternativa de uma variedade de compostos químicos, produtos farmacêuticos e de aplicação na indústria alimentícia, como pigmentos fotossintéticos, tais como clorofilas, carotenoides e ficobiliproteínas (MISHRA et al., 2012, CHEN; VAIDYANATHAN, 2013), de maneira que a composição bioquímica destes micro-organismos surge como uma resposta de sua imensa capacidade de se adaptar as condições ambientais, utilizando, adequadamente, sua versatilidade metabólica.

### **3.4.2 Metabolismo de nitrogênio**

O metabolismo do nitrogênio por microalgas envolve um complexo processo, incluindo o transporte de nitrogênio pela membrana plasmática, assimilação e incorporação do nitrogênio do meio de cultivo para formar compostos bioquímicos, envolvendo uma série de sistemas enzimáticos (DORTCH et al., 1984; HONG; WANG; WANG, 2011; OHMORI; OHMORI; STRONTMANN, 1997).

Diferentes estados de oxidação do nitrogênio são utilizados por microalgas e cianobactérias, quer na forma de nitrato, nitrito, amônia, nitrogênio molecular ou orgânico (OHMORI; OHMORI; STROTSMANN, 1977; DANESI et al., 2002; MURO-PASTOR; FLORENCIO, 2003; SAHA et al., 2003). No entanto, a forma preferencial a ser utilizada é a amônia, uma vez que não necessita de um sistema enzimático de redução, o que resulta em economia de energia pela célula (HERRERO et al., 2001; MURO-PASTOR; FLORÊNCIO, 2003; VON RUCKERT; GIANI, 2004; GARCÍA-FERNANDEZ; DIEZ, 2004; LAVIN; LOURENÇO, 2005; CONVERTI et al., 2006).

A amônia quer no meio ambiente ou de cultura, pode ser resultante da degradação da matéria orgânica (SAHA et al., 2003; LAVIN; LOURENÇO, 2005; CONVERTI et al., 2006). Este composto é incorporado, na cadeia carbonada, mediante rotas metabólicas, que

contam com a participação de duas enzimas, a glutamina sintetase (G-Glutamina sintetase) e a glutamato sintetase (GOGAT-Glutamato sintetase) (MURO-PASTOR; FLORENCIO, 2003; VON RUCKERT; GIANI, 2004; CHAIKLAHAN et al., 2010). A posição central do metabolismo do nitrogênio via assimilação de amônia, é dado por estas duas rotas metabólicas. O glutamato é produzido nesta via glutamato sintetase, não apenas pelos doadores de nitrogênio, mas por precursores de alguns aminoácidos, levando a porfirina, ficobilinas e clorofilas (HERRERO et al., 2001; MURO-PASTOR; FLORÊNCIO, 2003).

Desta maneira, as formas mais oxidadas de nitrogênio, para serem assimiladas, requerem redução à amônia. Assim, em um meio em que apenas o nitrato está disponível, o nitrato é primeiro reduzido a nitrito e então, a amônia (CHAIKLAHAN et al., 2010). O primeiro passo, é a redução do nitrato a nitrito pela nitrato redutase, seguido da redução do nitrito a amônia pela nitrito redutase. Ambas as enzimas utilizam ferredoxina como doador de elétrons, consumindo em todo o processo um total de oito ferredoxinas (SYRETT 1981; FLORES; HERRERO et al., 2001).

O nitrogênio orgânico é metabolizado de diferentes formas. A uréia é convertida a amônia pela urease. Outras formas de nitrogênio, como alguns aminoácidos, requerem sistemas de transporte específicos e uma metabolização adicional para produzir amônia (HERRERO et al., 2001).

O metabolismo de nitrogênio nos organismos unicelulares como cianobactérias e algas verdes é regulado por diversos fatores ambientais, especialmente luz (FLORES; HERRERO, 1994; OLIVER; GANF, 2000; CHAIKLAHAN, 2010). Algumas cianobactérias apresentam a propriedade de apresentar a fotossíntese oxigênica na mesma célula, durante iluminação contínua (MONTROYA et al, 2004; SCANLAN; POST, 2008).

Muitas cianobactérias são diazóicas, tais como *Oscillatoria* e *Anabaena*, e são capazes de fixar o nitrogênio elementar, utilizando-o como única forma de nitrogênio, através de sua redução a amônia, catalizado pela enzima nitrogenase (BENEMANN et al., 1979; STAL, 2000; SCANLAN; POST et al., 2008).

O sistema enzimático nitrogenase é irreversivelmente inativado pelo oxigênio. No entanto, aqueles organismos capazes de fixar nitrogênio atmosférico em aerobiose, apresentam mecanismos de proteção ao oxigênio atmosférico (FLORES; HERRERO, 1994).

Pelo fato das cianobactérias serem organismos fotoautotróficos, que realizam fotossíntese, liberando oxigênio, elas não apenas protegem seu mecanismo de fixação de nitrogênio do oxigênio atmosférico, como do oxigênio gerado intracelularmente. A habilidade para a fixação de nitrogênio esteve, provavelmente, presente nas cianobactérias mais

primitivas, as quais desenvolveram-se em uma atmosfera anóxica, anterior a evolução do oxigênio a níveis atuais (FLORES; HERRERO, 1994; HERRERO et al., 2001; HERRERO, 2004).

O complexo enzimático nitrogenase catalisa a redução do  $N_2$ , na dependência de ATP, para duas moléculas de amônia, sendo que esta reação requer a transferência de seis elétrons para  $N_2$ . A nitrogenase é muito similar a todos os organismos fixadores de nitrogênio, e consiste em duas diferentes proteínas dinitrogenase (Mo-Fe proteína) e dinitrogenase (Fe-proteína) (SCANLAN; POST et al., 2008).

O processo de fixação de nitrogênio é fortemente ligado ao metabolismo do carbono nas cianobactérias. Há exigência de fontes orgânicas de carbono para a assimilação da amônia resultante da fixação do nitrogênio. A atividade da nitrogenase é sustentada pelos carboidratos de reserva (LARA GUERRERO, 1997).

Para suprir suas exigências de nitrogênio, as cianobactérias utilizam, principalmente, compostos inorgânicos, embora a uréia e fontes orgânicas, tais como alguns aminoácidos possam ser assimilados por algumas linhagens (BENEMANN, 1979; FLORES; HERRERO, 1994).

De acordo com a flexibilidade metabólica, que caracterizam estes microorganismos, as microalgas e cianobactérias são altamente adaptáveis a condições ambientais, e a disponibilização de nutrientes (MORI et al., 2003). Independente dos sistemas enzimáticos específicos para as diferentes formas de nitrogênio, a maioria delas pode entrar na célula por difusão, dependendo de sua concentração (MURO-PASTOR; FLORÊNCIO, 2003). Em meios ricos em nutrientes, apresentam a propriedade de acumular intracelularmente expressivas concentrações de nitrogênio inorgânico na forma de amônia, nitrato e nitrito, antes de sua assimilação (DORTCH et al., 1984; LOURENÇO et al., 2005; GOLDBECK et al., 2006; HORNES et al., 2010). Estas reservas podem ser disponibilizadas quando não houver fonte externa de nitrogênio (DORTCH et al., 1984).

A duração e a concentração destes componentes são influenciadas pelas concentrações externas de íons, assim como pela taxa de absorção e assimilação de nitrogênio (BERGES et al., 1997).

A disponibilidade de nitrogênio, independente da rota metabólica, a ser utilizada e fatores ambientais, como a luz, são determinantes para o acúmulo, não só de formas inorgânicas nitrogenadas, como de pigmentos (MADHYASTHA; VATSALA, 2007).

### 3.5 Pigmentos

Os pigmentos são macromoléculas que apresentam a habilidade de refletir cor a determinado comprimento de onda (PIGNOLET et al.2013).

A aparência colorida das microalgas e cianobactérias é derivada de seus pigmentos, os quais absorvem a luz visível, iniciando, desta forma, as reações fotossintéticas (YEN et al., 2013).

A composição pigmentar das cianobactérias é constituída, por clorofila-*a* e pigmentos acessórios, que são os carotenoides e as ficobiliproteínas. A maior parte da energia utilizada na fotossíntese é absorvida pelos pigmentos acessórios, uma vez que a clorofila-*a* absorve a energia luminosa em uma limitada região do espectro solar. A energia de excitação é, então, transferida para os centros de reação, localizados na membrana fotossintética (SANTIAGO-SANTOS et al., 2004; YEN et al., 2013).

Estes pigmentos são usados em diferentes propósitos industriais, como na indústria de alimentos e de cosméticos, assim como para a pesquisa na área biomédica, com grande potencial como agente terapêutico em doenças induzidas pelo *stress* oxidativo, com propriedades imuno modulante e anticancerígenas (BERMEJO ROMÁN et al., 2002; MINKOVA et al., 2003; SPOLAORE et al., 2006; GUIRY; GUIRY, 2014).

#### 3.5.1 Clorofila

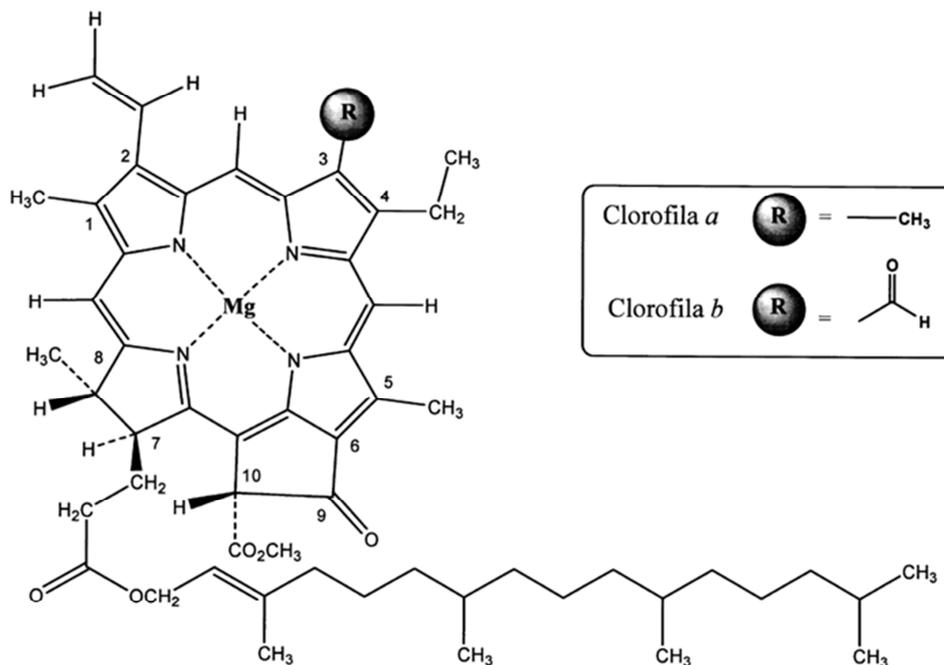
As clorofilas são os pigmentos verdes com estrutura plana policíclica esterificada por uma longa cadeia lateral de fitol. São os pigmentos mais abundantes e presentes em todas as células fotossintéticas. Ocorrem nos cloroplastos das folhas e em outros tecidos vegetais (HENRIKSON, 1989; VON ELBE, 2000; STREIT et al., 2005; LEHNINGER; NELSON; COX, 2005).

A denominação clorofila foi proposta por Pelletier e Caventou, em 1818, para designar a substância verde que se podia extrair das folhas com o auxílio do álcool. Atualmente, os pigmentos clorofilianos são de grande importância comercial, podendo ser utilizados tanto como pigmentos quanto como antioxidantes (PELLETIER; CAVENTOU, 1818; SCHOEFS, 2002; STREIT et al., 2005).

As clorofilas são moléculas formadas por complexos derivados da porfirina, tendo como átomo central o Mg (magnésio). Esse composto é uma estrutura macrocíclica assimétrica totalmente insaturada constituída por quatro anéis de pirrol. Esses anéis numeram-se de 1 a 4 ou de “a” a “d”, de acordo com o sistema de numeração de Fisher (SCHOEFS,

2002). As clorofilas *a* e *b* encontram-se na natureza numa proporção de 3:1, respectivamente, e diferem nos substituintes de carbono C-3. Na clorofila-*a*, o anel de porfirina contém um grupo metil (-CH<sub>3</sub>) no C-3 e a clorofila-*b* (considerada um pigmento acessório) contém um grupo aldeído (-CHO), que substitui o grupo metil-CH<sub>3</sub> (Figura 2).

**Figura 2** - Estrutura química da clorofila-*a* e clorofila-*b*



Fonte: VOET; VOET (2013)

A clorofila-*b* é sintetizada através da oxidação do grupo metil da clorofila-*a* para um grupo aldeído (TANAKA et al., 1998; SCHOEFS, 2002; PIGNOLET et al., 2013; YEN et al., 2013). A clorofila-*b* é convertida em clorofila-*a*, através da enzima clorofila-*a* oxigenase, que catalisa a conversão do grupo metil ao grupo aldeído (XU et al., 2001).

A estrutura dos pigmentos clorofilanos é a mesma, as diferenças aparentes na cor dos organismos são devido à presença e distribuição variável de outros pigmentos associados, como os carotenoides (AJAYAN; SELVARAJU; THIRUGNANAMOORTHY et al., 2012).

A clorofila-*a* é considerada o principal elemento fotoquimicamente ativo que atua como receptor de luz para a condução da fotossíntese, convertendo a energia luminosa em

energia química (CHEN et al., 2011; AJAYAN; SELVARAJU; THIRUGNANAMOORTHY, 2012).

A clorofila-*a* tem sido apontada como o pigmento característico das cianobactérias (VONSHAK, 1997; SANTIAGO-SANTOS et al., 2004; BARSANTI; GUALTIERI, 2006; MAGER; THOMAS, 2011; MISHRA et al., 2012), estando localizada, assim como os demais pigmentos, nas membranas tilacóides, onde ficam livres no citoplasma, ao invés de estarem inclusos nos cloroplastos, como nos organismos eucarióticos fotossintetizantes, tais como nas plantas superiores. Os tilacóides não estão empilhados, permanecendo isolados e equidistantes no interior da célula (HOEK; MANN; JAHNS, 1995). Estes micro-organismos tem um potencial reconhecido para a produção de compostos de valor agregado e por sua eficiente utilização da energia da luz solar, em comparação as plantas superiores (PRIYADARSHANI; RATH, 2012). A cianobactéria é um organismo composto de uma das mais altas taxas de clorofila encontrada na natureza, correspondendo a 1,15% da sua biomassa (HENRIKSON, 1989; AJAYAN; SELVARAJU; THIRUGNANAMOORTHY, 2012).

De acordo com Rangel-Yagui et al. (2004) há uma relação inversa entre a intensidade de luz e a concentração de clorofila-*a* na biomassa. Estes autores observaram que a maior concentração de clorofila-*a* ocorreu em cultivos submetidos à luminosidade de 1400 lux e a menor utilizando 5600 lux, quando as demais condições de cultivo, para ambos os experimentos, foram as mesmas. Foi deduzido, então, que o cultivo sob condições de baixa luminosidade gera células com conteúdos de clorofila maiores, no sentido de otimizar a captura de luz aumenta o crescimento de microalgas até uma intensidade de luz de saturação. O crescimento de microalgas é inibido quando a intensidade de luz é aumentada para além da intensidade da luz de saturação. O crescimento de microalgas é, então, considerado em condições de foto inibição (ADIR et al, 2003; RAGNI et al., 2008; WAHAL; VIAMAJALA, 2010; CHEN et al., 2011).

A clorofila é um pigmento utilizado como ingrediente natural em alimentos processados na indústria de alimentos (HUMPHREY, 2004). Devido à demanda dos consumidores por alimentos naturais e a cor verde forte do pigmento, a clorofila está ganhando importância como aditivo alimentar. Por sua vez, está incentivando a indústria de alimentos para substituir os pigmentos artificiais por um corante natural à base de clorofila, trazendo benefícios a saúde.

A clorofila-*a*, produzida comercialmente é, em grande parte, obtida através de fontes vegetais. Entretanto existe um crescente interesse na produção biotecnológica de fontes de corantes não vegetais. Nesse sentido, o uso de processos biotecnológicos, empregando

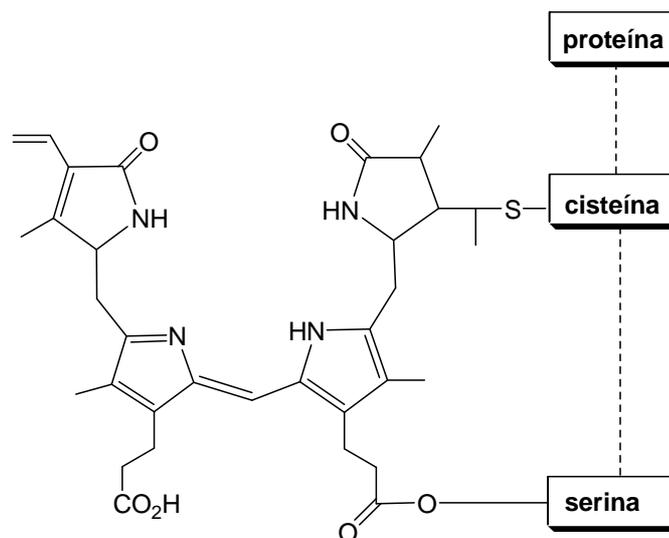
cianobactérias para a produção de corantes, possui diversas vantagens, quando comparados às fontes vegetais, incluindo a possibilidade de cultivo contínuo, a rápida multiplicação dos micro-organismos, além do alto conteúdo de pigmentos presentes na biomassa (RANGEL-YAGUI et al., 2004). Acredita-se que quase todas as algas cultivadas sob condições ótimas, apresentem aproximadamente 4% do peso total em base seca deste pigmento (HARUN et al., 2010).

### 3.5.2 Ficobiliproteínas

As ficobiliproteínas são reconhecidas como “pigmentos antenas” fotossintéticos. Quase 50% da luz requerida para o processo fotossintético é capturada por este grupo de pigmentos, que são exclusivos de algas vermelhas, criptomonas e cianobactérias (MIHOVA et al., 1996; MISHRA et al., 2012). Com base em suas características espectrais, em função da faixa de absorção de energia, as ficobiliproteínas podem ser divididas em três classes principais; as ficoeritrinas, as ficocianinas e as aloficocianinas (GLAZER, 1987; MacCOLL; GUARD-FRIAR, 1987; RODRÍGUEZ et al., 1991; VISKARI; COLYER, 2003).

As ficobiliproteínas são formadas por proteínas com grupos cromóforos tetrapirrólicos lineares, chamados de bilinas que, no seu estado funcional, estão covalentemente unidos através de ligações tioésteres aos resíduos específicos de cisteína das proteínas (Figura 3).

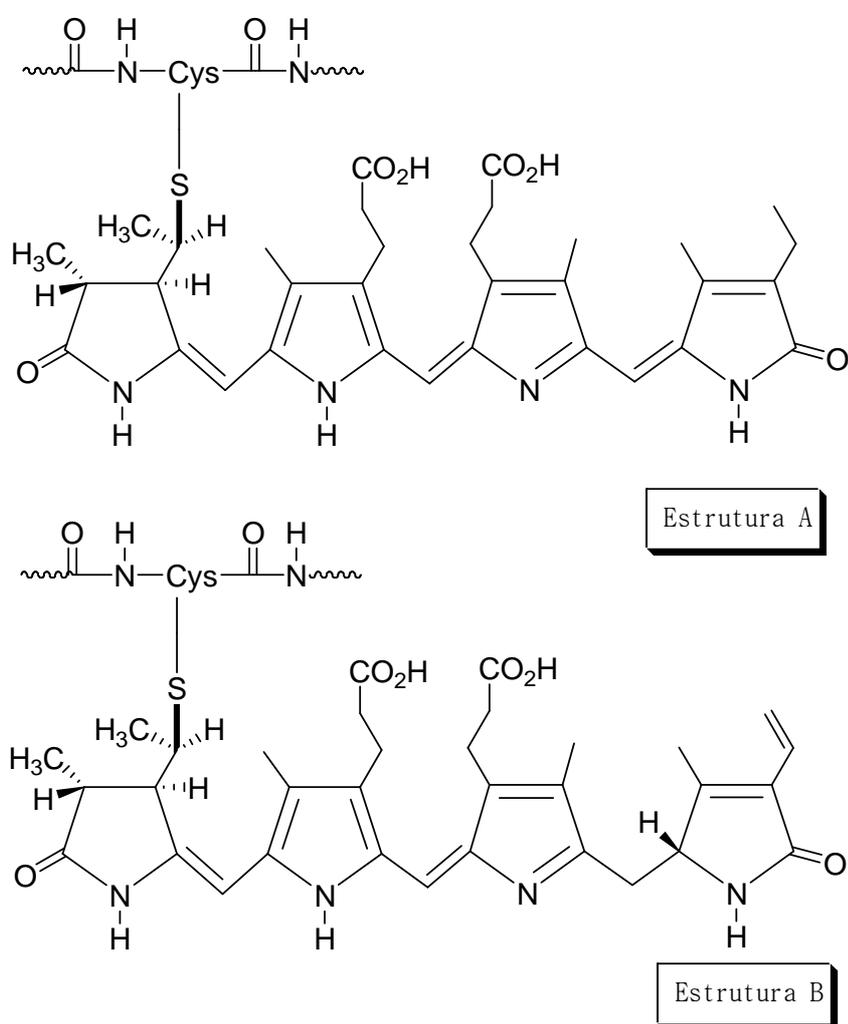
**Figura 3** - Ficobilinas: grupos tetrapirrólicos, cromóforos lineares, covalentemente unidos através de ligações tioésteres aos resíduos específicos de cisteína das proteínas



Fonte: VISKARI; COLYER (2003)

Estes grupos cromóforos, chamados de bilinas ou ficobilinas, definem as características espectrais únicas das ficobiliproteínas, tais como massa molecular, comprimento de onda, absorvidade molar e fluorescência (GLAZER; STRYER, 1984; VISKARI; COLYER, 2002; VISKARI; COLYER, 2003; SANTIAGO-SANTOS et al., 2004; MISHRA et al., 2012). A aloficocianina e ficocianina (Figura 4a) contêm os cromóforos ficocianobilinas, e a ficoeritrina (Figura 4b) contém, principalmente, ficoeritrobilina (GLAZER; STRYER, 1984).

**Figura 4** - Cromóforos ficocianobilinas (4A) e ficoeritrina (4B)



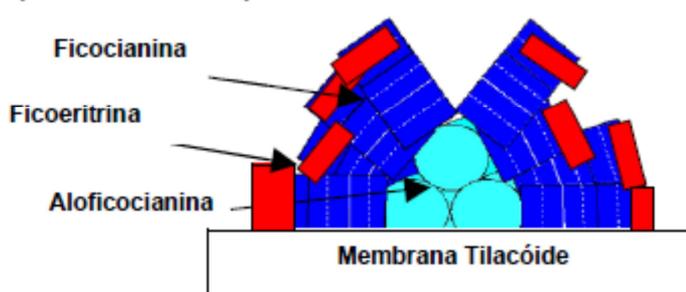
Fonte: VISKARI; COLYER (2002)

As ficobiliproteínas, derivadas das cianobactérias e das algas vermelhas, são denominadas proteínas hidrossolúveis, constituídas por várias cadeias de halo-proteínas

(SINGH; MONTGOMERY, 2013; JOHNSON; KUMAR; DAS, 2014). São altamente fluorescentes, podendo representar acima de 60% do conteúdo de proteína solúvel. De acordo com o grupo ao qual pertencem, ocorrem variações entre as proteínas em um perfil específico dos seus espectros de absorvância e a localização exata das suas absorvâncias máximas. Como estes compostos tem a capacidade de absorver energia na região de 470 nm a 670 nm, permitem aos organismos aos quais está associado estender os limites de seus espectros de absorção, ao coletar luz que não é absorvida com eficiência pela clorofila-*a*. Estes compostos participam de uma corrente de transferência de energia, extremamente eficiente, através dos quais transferem a energia de excitação por processos com menor radiação, para centros de reação nas membranas fotossintéticas, para a conversão em energia química (VISKARI; COLYER, 2003), apresentando a seguinte sequência de transferência de energia: ficoeritrina (vermelha),  $\lambda_{\text{máx}}$ : 540-570 nm para ficocianina (azul),  $\lambda_{\text{máx}}$ : 610-620 nm, na sequência aloficocianina (azul esverdeado),  $\lambda_{\text{máx}}$ : 650-655 nm e, finalmente, para a clorofila-*a* (RODRÍGUEZ et al., 1991; BERMEJO ROMÁN et al., 2002; PARMAR et al., 2011; AJAYAN et al., 2012).

As ficobiliproteínas são organizadas em estruturas especiais denominadas ficobilissomas, estruturas primárias de captação de luz, ligadas em arranjos regulares para a superfície externa da membrana tilacóide (Figura 5).

**Figura 5** - Modelo de um ficobilissoma tricilíndrico hemidiscooidal



Fonte: TELFORD et al. ( 2001)

Os ficobilissomas são formados por núcleos de aloficocianina, rodeados por ficocianina na parte externa. A ficocianina é o maior constituinte, enquanto a aloficocianina age como um pigmento de ligação entre as ficobilissomas e a lamela fotossintética (GANTT, 1981; BERMEJO et al., 2002; BÁSACA-LOYA et al., 2009; AJAYAN; SELVARAJU; THIRUGNANAMOORTHY, 2012; SINGH et al., 2012; SINGH; MONTGOMERY, 2013;

PIGNOLET et al., 2013). Estas duas ficobilinas são os pigmentos dominantes nas cianobactérias e constituem quase 20% da proteína total (AJAYAN; SELVARAJU; THIRUGNANAMOORTHY, 2012).

A literatura reporta que as ficobiliproteínas representam uma das principais fontes comerciais de pigmentos, tendo como principais produtores de ficocianina a cianobactéria *Arthrospira* e de ficoeritrina a *Rhodophyta Porphyridium* (BERMEJO et al., 2002; VISCARI; COLYER, 2003). Estes compostos têm sido amplamente utilizados na área de alimentos, cosméticos e na medicina. Tem demonstrado propriedade antioxidante, anticancerígena e hipocolesterolêmica entre outras (SPOLAORE et al., 2006; RODRÍGUEZ-SANCHES et al., 2012; JOHNSON; KUMAR; DAS, 2014).

De acordo com Rodríguez-Sanches et al. (2012), estes compostos estão sendo aplicados como nutracêuticos na indústria de alimentos, com mercado em ascensão, com um crescimento global girando em torno de 5% ao ano, estimado em 60 bilhões de dólares. Corantes naturais, como os obtidos a partir das ficobiliproteínas estão ganhando importância em relação aos corantes sintéticos, devido às suas propriedades atóxica e anticancerígena (HEMLATA; FATMA, 2009).

As algas marinhas vermelhas, como *Porphyrium cruentum*, e cianobactérias, como *Arthrospira platensis*, podem produzir até 8% em ficobiliproteínas, as quais podem ser utilizadas como marcadores fluorescentes (PEREZ-GARCIA et al., 2011).

A ficocianina de *Arthrospira* e a ficoeritrina de *Porphyridium* são duas das mais conhecidas ficobiliproteínas. Elas podem ser aplicadas em ensaios de imunidade, baseado em fluorescência, em microscopia e análise de DNA, como marcadores não radioativos.

Datla (2011) reporta a alta capacidade da ficocianina de agir como antioxidante, atuando no sistema imune e como um agente anti-inflamatório. Devido a sua estabilidade, a ficocianina também é usada em formulações cosméticas, como perfumes e maquiagem de olho, e já foi aprovado como corante alimentar. A utilização de pigmentos de microalgas vermelhas tem sido proposta para aplicação como corante de alimentos e cosméticos (RAPOSO et al., 2013).

A ficoeritrina é conhecida por ser a ficobiliproteína mais flexível, o que facilita a adaptação às alterações ambientais (RODRÍGUEZ et al., 1991). São os principais pigmentos no processo de captação de luz, ampliando a capacidade de absorção de luz dos ficobilissomas da região do vermelho para o verde do espectro da luz visível (PARMAR et al., 2011; AJAYAN; SELVARAJU; THIRUGNANAMOORTHY, 2012).

A exemplo de países potenciais na exploração de cianobactérias a nível comercial, a Índia é um dos países que vem investindo em pesquisas neste sentido (FATMA, 2009; HEMLATA; FATMA, 2009).

Hemlata; Fatma (2009) selecionaram uma série linhagens de cianobactérias, com potencial de síntese de ficobiliproteínas, tais como *Anabaena*, *Aulosira*, *Chroococcus*, *Calothrix*, *Cylindrospermum*, *Gloeocapsa*, *Hapalosiphon*, *Lyngbya*, *Microchaete*, *Nostoc*, *Oscillatoria*, *Plectonema*, *Phormidium*, *Scytonema*, *Spirulina*, *Tolypothrix*, *Westiellopsis*, originalmente isolados pelo Centro Nacional de coleta e utilização de cianobactérias do Instituto Indiano de Pesquisa Agrícola (IARI) em Nova Delhi. Entre as cianobactérias, o rendimento de ficobiliproteínas registrados pela *Anabaena*, *Microchaete*, *Nostoc*, *Tolypothrix*, estão entre as mais promissoras. A *Spirulina platensis* é outro micro-organismo muito estudado comercialmente em relação à produção de ficobiliproteínas (JIMÉNEZ et al., 2003; AJAYAN; SELVARAJU; THIRUGNANAMOORTHY, 2012).

### 3.6 Proteínas

O nitrogênio perfaz em torno de 10% do peso seco da biomassa na cianobactéria. É o principal composto necessário para a síntese de aminoácidos primários e secundários, proteínas, ácidos nucleicos, coenzimas, clorofila e outros pigmentos fotossintéticos, tais como ficobilinas (SHUULUKA; BOLTON; ANDERSON, 2012). Assim, um dos maiores constituintes das microalgas são as proteínas, desempenhando importante papel na biorrefinaria algal (WILLIAMS; LAURENS, 2010). Devido as altas concentrações em proteína e ao excelente perfil aminoacídico, comparável, e até mesmo superior, a alimentos convencionais, como carne e ovos, microalgas e cianobactérias, vem sendo consideradas fonte potencial de proteínas (ALOMAR; FUCHSLOCHER; STOCKBRANDS, 1999; ANUPAMA; RAVINDRA, 2000; JACOB-LOPES et al., 2006; ZEPKA et al., 2008; QUEIROZ et al., 2011).

A produção de proteína unicelular, utilizando resíduos como substrato, fornece uma fonte economicamente viável de proteína para utilização na alimentação animal ou para o processamento de produtos para consumo humano. Muitos micro-organismos têm sido utilizados para converter vários substratos e produtos residuais industriais em biomassa (KUHAD et al, 1997; QUEIROZ et al., 2004b; JACOB-LOPES et al., 2006; VOLTOLINA et al, 2005; JACOB-LOPES et al., 2007; JACOB-LOPES et al., 2010; ZEPKA et al., 2010; BASTOS et al., 2014).

Os resíduos agroindustriais apresentam características adequadas, para suportar cultivos que tem como base o metabolismo respiratório de cianobactérias. Além da elevada concentração de matéria orgânica, nitrogênio e fósforo, que resultam geralmente em razões C/N e N/P adequadas, apresentam qualitativamente compostos de fácil assimilação e, na maioria dos casos, ausência de compostos tóxicos inibidores de crescimento. Especificamente, em relação aos compostos nitrogenados, as cianobactérias são capazes de assimilar formas nitrogenadas orgânicas e inorgânicas, como aminoácidos e amônio (FLORES; HERRERO, 1994; QUEIROZ; KOETZ, 1997; JACOB-LOPES et al., 2006; QUEIROZ et al., 2007b; ZEPKA et al., 2008; JACOB-LOPES et al., 2010; BASTOS et al., 2010; QUEIROZ et al., 2013). Nesse sentido, o uso de cianobactérias em tratamento de águas residuárias, associado à produção de proteína, é uma alternativa técnico-econômica potencial em relação aos sistemas convencionais de tratamentos secundários e terciários de efluentes. Esses processos são baseados nas rotas metabólicas respiratórias que algumas cianobactérias apresentam, no qual fontes exógenas de carbono orgânico e nutrientes inorgânicos são bioconvertidos em produtos do metabolismo heterotrófico, particularmente em uma biomassa com elevado teor de proteínas, lipídios e pigmentos (ZEPKA et al., 2010). No entanto, os teores de proteínas disponíveis na literatura, são extremamente variáveis em uma mesma espécie, inerentes não apenas as diferenças fisiológicas, causadas pelas diferenças nas condições de cultivo, mas também em função da metodologia empregada para sua quantificação (BARBARINO; LOURENÇO, 2005; HORNES et al., 2010).

A disponibilidade de nutrientes do meio está intrinsecamente relacionado com a composição química das cianobactérias, sendo que, altas concentrações de nitrogênio dissolvido favorecem a síntese e acumulação de proteína (LOURENÇO et al., 1997).

As microalgas fazem parte do hábito alimentar de populações indígenas por centenas de anos, e em especial, as cianobactérias incluindo espécies dos gêneros *Nostoc*, *Arthrospira* (*Spirulina*) e *Aphanizomeno*. No entanto, o cultivo de microalgas, com o propósito comercial, é uma prática que tem início somente no século XX, quando nos anos 50, em consequência do aumento da população mundial, buscaram estudar fontes alternativas de proteínas e as algas foram cientificamente reconhecidas como boas candidatas a este propósito (BOROWITZKA, 1999; BECKER, 2004).

A fração proteica nestes micro-organismos tem recebido atenção mundial, tanto no que se refere à utilização como suplemento alimentar, como fonte alternativa de proteína consumida em várias partes do mundo, tais como o Chile, Peru, México, Espanha, Índia e

Filipinas (ANUPAMA; RAVINDRA et al., 2000; JIMÉNEZ et al., 2003; THAJUDIN; SUBRAMANIAN, 2005; SPOLAORE et al., 2006).

O elevado teor de proteínas de várias espécies de microalgas compreende uma forte razão para considerar estes micro-organismos unicelulares como fonte proteica não convencional (CORNET, 1998; MOLINA-GRIMA et al., 2002; SOLETTTO et al., 2005; PIGNOLET et al., 2013). O padrão de aminoácidos encontrados nas microalgas torna possível uma comparação com outros alimentos. Como as células são capazes de sintetizar todos os aminoácidos, eles podem fornecer os aminoácidos essenciais para os seres humanos e animais (GUIL GUERRERO et al., 2004).

As proteínas destacam-se pelas suas inúmeras funções tais como no crescimento, reparação e manutenção das células e reguladores da atividade celular (SAFI et al., 2013).

De acordo com Ávila-Leon et al. (2012), a cianobactéria *Arthropira platensis* é considerada uma fonte alternativa de proteína muito promissora, a ser utilizada como suplemento alimentar ou aditivo. Sua biomassa contém, em média, 50% em peso seco, e tem sido destacada por apresentar elevada qualidade nutricional. Este autores reportam, para este micro-organismo, valores de utilização líquida de proteína, valor biológico e coeficiente de eficiência proteica na ordem de 83,9%, 65,0% e 2,10, respectivamente (DILLON; PHAN, 1993). No entanto, estes valores podem variar, entre outros fatores, com a espécie, o meio de cultivo e a temperatura de secagem da biomassa. Zepka et al. (2010) encontraram valores superiores aos registrados para a *Arthropira platensis*, quando avaliaram a biomassa da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli, desenvolvida no efluente da parboilização do arroz, na ausência de luz e seca 60°C. São reportados valores de 95,0%, 73,3% e 2,40 para os parâmetros nutricionais utilização líquida de proteína, valor biológico e coeficiente de eficiência proteica, respectivamente.

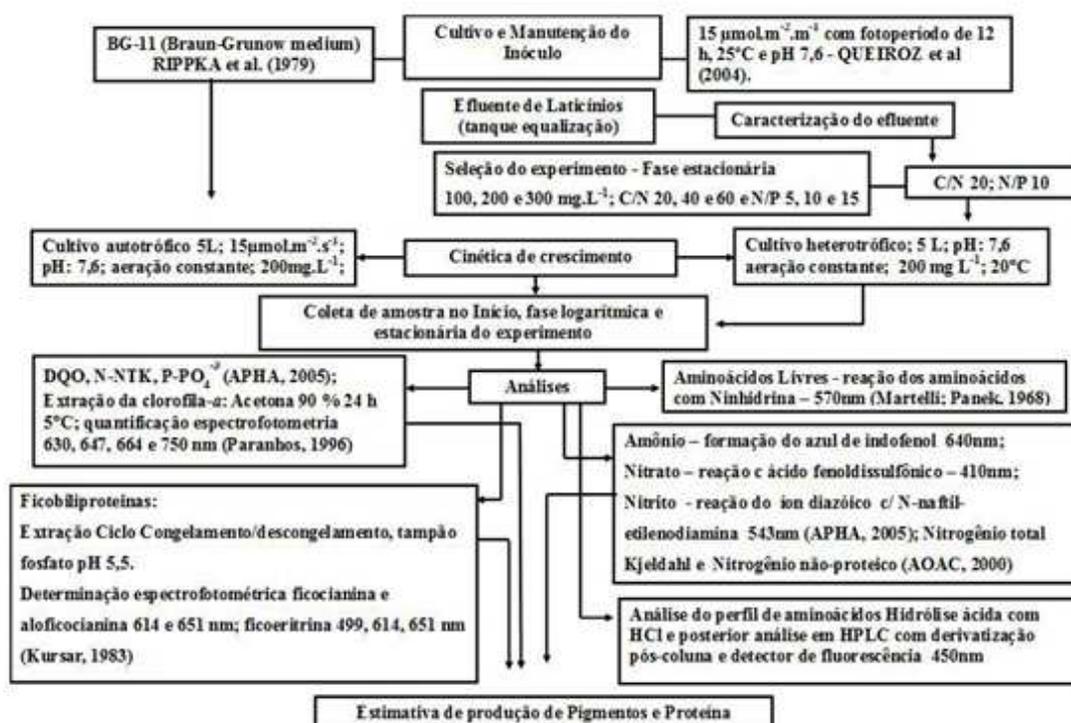
Os métodos habitualmente utilizados para determinar proteínas em microalgas tem sido referenciados, como o de Lowry (Lowry et al., 1951), Bradford (Bradford, 1976) e o que utiliza a conversão de nitrogênio total Kjeldahl pelo fator 6,25 (BARBARINO; LOURENÇO, 2005). A literatura se refere à conversão do nitrogênio total pelo fator 6,25, como a metodologia mais usada na quantificação de proteínas unicelulares (DORTCH et al., 1984; ESQUÍVEL et al., 1993; HORNES et al., 2010; QUEIROZ et al., 2013; PANCHA et al., 2014). Muito tem sido discutido quanto a esse procedimento, uma vez que o cálculo da concentração de proteínas a partir desta metodologia inclui computar junto ao nitrogênio total

Kjeldahl, importante fração de nitrogênio não proteico (DORTCH et al., 1984; LAVIN; LOURENÇO et al., 2005; GOLDBECK et al., 2006; HORNES et al., 2010).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

A Figura 6 expressa as diferentes etapas do desenvolvimento do trabalho, para obtenção dos dados experimentais, correspondentes à seleção das condições ótimas de produção de pigmentos, tendo com base a produção de clorofila-*a*; estimativa da produção de pigmentos; dinâmica da distribuição de nitrogenados na biomassa de *Aphanothece microscopica* Nägeli; estimativa da produção de proteínas e caracterização das proteínas quanto ao perfil aminoacídico. Cada etapa do trabalho foi desenvolvida a partir de três repetições.

**Figura 6** - Fluxograma operacional



### 4.1 Micro-organismo

#### 4.1.1 Manutenção do Inóculo

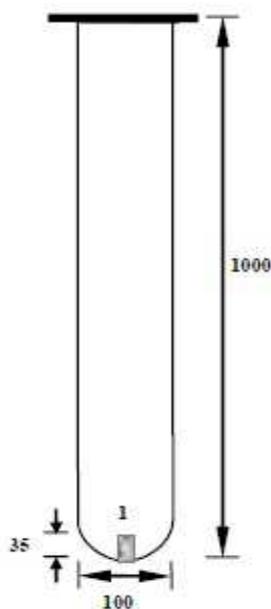
Uma monocultura de *Aphanothece microscopica* Nägeli (RSMAN92), originalmente isolada da Lagoa dos Patos, no estado do Rio Grande do Sul, Brasil (32°01'S-52°05'W) foi utilizada, propagada e mantida em meio sintético BG-11 (Braun-Grunow), conforme indicado por Rippka et al. (1979). O meio B-G11 é constituído da seguinte composição:  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$  (0,04 g.L<sup>-1</sup>),  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (0,075 g.L<sup>-1</sup>),  $Na_2CO_3$  (0,15 g.L<sup>-1</sup>),

$\text{NaNO}_3$  ( $0,15 \text{ g.L}^{-1}$ ),  $\text{EDTA}$  ( $0,001 \text{ g.L}^{-1}$ ),  $\text{H}_3\text{BO}_3$  ( $2,86 \text{ g.L}^{-1}$ ),  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  ( $1,81 \text{ g.L}^{-1}$ ),  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ( $0,222 \text{ g.L}^{-1}$ ),  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ( $0,39 \text{ g.L}^{-1}$ ),  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  ( $0,079 \text{ g.L}^{-1}$ ),  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  ( $0,040 \text{ g.L}^{-1}$ ), ácido cítrico ( $0,006 \text{ g.L}^{-1}$ ) e citrato férrico de amônio ( $0,006 \text{ g.L}^{-1}$ ) (RIPPKA et al., 1979). As culturas foram mantidas nas condições de  $25^\circ\text{C}$ , intensidade luminosa de  $15 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , com fotoperíodo de 12h, pH 7,6 e agitação constante (QUEIROZ et al., 2004b). Para a manutenção das condições de luz e temperatura foram utilizados termostatos e lâmpadas fluorescentes, com temperatura e intensidade luminosa controlada. A intensidade luminosa foi otimizada em função do número de lâmpadas que foram mantidas acesas.

## 4.2 Experimentos

Experimentos em condições autotróficas e heterotróficas foram desenvolvidos. Os cultivos autotróficos foram conduzidos utilizando o meio sintético BG-11 a  $20^\circ\text{C}$ , com pH aferido a 7,6. Foi utilizado um biorreator de coluna de bolhas, construído de vidro borossilicato de 4 mm de espessura, diâmetro de 100 mm e altura de 1000 mm, perfazendo um volume útil de trabalho de 5 L. O sistema de dispersão de gases consistiu em um difusor de ar de 35 mm de altura, localizado no centro da base da coluna (Figura 7).

**Figura 7** - Esquema do aparato experimental utilizado nos experimentos



Os cultivos heterotróficos foram conduzidos em biorreatores constituído de um tubo de PVC de 4 mm de espessura, mantendo as mesmas dimensões do biorreator autotrófico, bem como igual sistema de aeração; operando em batelada, pH inicial ajustado a 7,6, temperatura de 20°C, ausência de luz e aeração contínua de 1VVM (volume de ar, por volume de efluente, por minuto). Foi utilizada, como meio de cultivo, a água residuária proveniente do tanque de equalização do sistema de tratamento de efluentes, de uma indústria de laticínios localizada na cidade de Pelotas, RS (Cooperativa Sul-Riograndense de Laticínios-COSULATI), por um período de 36 meses, com amostragem mensal. As amostras foram transportadas em garrafas de polietileno para o Laboratório de Biotecnologia, da Universidade Federal do Rio Grande e congeladas a -18°C. O efluente foi caracterizado quanto aos parâmetros: pH, demanda química de oxigênio (DQO), nitrogênio total (N-TK), nitrogênio amoniacal ( $\text{NH}_4^{+1}$ ), e fósforo ( $\text{P-PO}_4^{-3}$ ), de acordo com Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, 2005). Os dados da caracterização do efluente são expressos na Tabela 1. As razões C/N e N/P foram determinadas a partir das concentrações de DQO, N-TK e  $\text{PO}_4^{-3}$ .

**Tabela 1** - Caracterização do efluente da indústria de laticínios

Parâmetro	Máximos	Mínimos	Média	CV
pH	9,4	7,8	8,3	6,23
N-TK ( $\text{mg.L}^{-1}$ )	53,2	28	43,9	18,64
N- $\text{NH}_4^{+1}$ ( $\text{mg.L}^{-1}$ )	2,7	0,7	1,8	47,9
P- $\text{PO}_4^{-3}$ ( $\text{mg.L}^{-1}$ )	7,5	0,3	4,4	78,5
DQO ( $\text{mg.L}^{-1}$ )	2100	551	1019	3,9

pH: potencial hidrogeniônico; N-TK: nitrogênio total kjeldahl; N- $\text{NH}_4^{+1}$ : nitrogênio amoniacal; P- $\text{PO}_4^{-3}$ : fósforo; DQO: demanda química de oxigênio; CV: coeficiente de variação; amostragem mensal por um período de 36 meses.

#### 4.2.1 Seleção das condições ótimas de produção de pigmentos

Para a avaliação das condições ótimas de cultivo para produção de pigmentos, foi tomada como base a produção de clorofila-*a*, em condições heterotróficas. Foi feito um planejamento fatorial  $2^3$ , com três repetições no ponto central. As variáveis consideradas foram: concentração inicial de inóculo (100, 200 e 300  $\text{mg.L}^{-1}$ ), razão C/N (20, 40 e 60), razão N/P (5, 10 e 15). A concentração celular, na fase estacionária de crescimento, foi determinada

por gravimetria, mediante filtração de um volume conhecido de meio de cultura em membrana de 0,45 µm e levada a peso constante a 60°C.

As concentrações de DQO, N-TK e P-PO<sub>4</sub><sup>-3</sup>, foram monitorados a cada 4 horas (APHA, 2005). A determinação de clorofila-*a* foi realizada através da extração com acetona 90% a 5°C por 24 h. As concentrações foram determinadas na fase estacionária de crescimento celular, por espectrofotometria, em 664, 647 e 630 nm, de acordo com a Eq.1, descrita por Jeffrey e Humphrey (1975). A biomassa foi separada dos meios de cultivos por centrifugação a 4000xg por 15 minutos e filtradas em filtros millipore (0,45µm). Os filtros foram secos a 60°C até peso constante e a quantidade de amostra foi estimada e, então, submetida à análise de clorofila-*a*.

$$[Cl\ a] \mu\text{g. L}^{-1} = \frac{(11,85. (A - bt) - 1,54. (B - bt) - 0,08. (C - bt).v}{V} \quad \text{Eq. 1}$$

Onde:

[Cl *a*]: clorofila-*a*; A: Absorbância em 664nm; bt: branco da turbidez em 750nm; B: Absorbância em 647nm; C: Absorbância em 630nm; v: Volume da acetona em mL; V: Volume filtrado em L.

A estimativa de pigmentos foi calculada tomando como base de cálculos a capacidade industrial de geração de efluentes de 950.000 L.d<sup>-1</sup>, o período operacional de 336 dias por ano e o volume anual de efluente gerado de 319.200.000 L.

#### 4.2.2 Estimativa da produção de pigmento

A estimativa de clorofila-*a* e ficobiliproteínas (ficocianina, aloficocianina e ficoeritrina), por *Aphanothece microscopica* Nägeli, desenvolvida em condições autotróficas e heterotróficas, foram realizadas, tomando como base a melhor condição selecionada (200 mg.L<sup>-1</sup> de inóculo, razão C/N 20 e N/P 10). Os dados foram obtidos a partir das biomassas tomadas no início do cultivo, na fase logarítmica e estacionária, de acordo com o comportamento cinético das curvas de crescimento (Figura 8). Para avaliar a relação entre os teores de pigmentos e proteína, o teor proteico foi determinado, segundo o método de Kjeldhal (AOAC, 2000), utilizando 6,25 como fator de conversão do nitrogênio total em proteína.

##### 4.2.2.1 Avaliação da cinética de crescimento

As variáveis cinéticas, velocidade específica de crescimento máxima ( $\mu_{\text{máx}}$ ), tempo de geração (tg) e fator de conversão de substrato em células ( $Y_{x/s}$ ), foram determinadas

conforme indicado por Beltran-Heredia et al. (2000). O procedimento de avaliação teve como base as equações 2, 3, 4, 5 e 6.

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad \text{Eq.2}$$

onde:

$\mu_{\max}$ : velocidade específica de crescimento do micro-organismo ( $\text{h}^{-1}$ );

$dx$ : variação da concentração celular ( $\text{mg.L}^{-1}$ );

$dt$ : variação do tempo (h);

$X$ : concentração celular ( $\text{mg.L}^{-1}$ ).

Integrando-se a equação 1 obtém-se a equação 2.

$$X = X_0 e^{\mu_{\max} (\Delta t)} \quad \text{Eq.3}$$

$X$ : concentração celular no final da fase exponencial ( $\text{mg.L}^{-1}$ );

$X_0$ : concentração celular no início da fase exponencial ( $\text{mg.L}^{-1}$ );

$\mu_{\max}$ : máxima velocidade específica de crescimento do micro-organismo ( $\text{h}^{-1}$ );

$\Delta t$ : intervalo de tempo do crescimento exponencial (h).

$$tg = \frac{\ln 2}{\mu_{\max}} \quad \text{Eq.4}$$

onde:

$tg$ : tempo de geração (h);

$\mu_{\max}$ : máxima velocidade específica de crescimento ( $\text{h}^{-1}$ ).

$$Y_{X/S} = -\frac{dX}{dS} \quad \text{Eq.5}$$

onde:

$Y_{X/S}$  = fator de conversão substrato em células ( $\text{mg biomassa.mg.S}^{-1}$ )

$dX$  = variação da concentração celular ( $\text{mg.L}^{-1}$ )

$dS$  = variação da concentração de substrato ( $\text{mg.L}^{-1}$ )

$$P_x = \frac{\Delta X}{\Delta t} \quad \text{Eq.6}$$

onde:

$P_x$ : produtividade ( $\text{mg.L}^{-1}\text{h}^{-1}$ )

$\Delta X$ : variação da concentração final e inicial ( $\text{mg.L}^{-1}$ )

$\Delta t$ : diferença entre o tempo final e inicial (h)

#### 4.2.2.2 Avaliação da produção de pigmentos

A biomassa foi separada dos meios de cultivo, conforme descrito em 4.2.1 e, então, submetidas à análise dos teores de clorofila-*a*, ficocianina, aloficocianina e ficoeritrina.

##### 4.2.2.2.1 Determinação de Clorofila-*a*

A concentração de clorofila-*a* foi determinada, conforme descrito no item 4.2.1.

##### 4.2.2.2.2 Determinação de Ficobiliproteínas

A biomassa utilizada para as análises de ficocianina, aloficocianina e ficoeritrina foi submetida à ruptura celular por 2 horas, através de um ciclo de congelamento (-8°C) e descongelamento (25°C), com posterior extração, utilizando o tampão fosfato pH 5,5; segundo metodologia descrita por Kursar et al (1983). O sobrenadante, contendo os pigmentos, foi transferido para tubos de ensaio, vedados e mantidos no escuro até a leitura em espectrofotômetro. A quantificação de ficocianina e aloficocianina foi determinada pela medida da absorbância em 614 e 651 nm, e de ficoeritrina nos comprimentos de onda de 499, 614 e 651 nm, segundo as Eq. 7, 8 e 9, descritas por Jeffrey e Humphrey (1975).

$$[\text{FC}]\mu\text{g. mL}^{-1} = 151,1.A_{614} - 99,1.A_{651} \quad \text{Eq. 7}$$

$$[\text{AFC}]\mu\text{g. mL}^{-1} = 181,3.A_{651} - 22,3.A_{614} \quad \text{Eq. 8}$$

$$[\text{FE}]\mu\text{g. mL}^{-1} = 155,8.A_{498,5} - 40,0.A_{614} - 10,5.A_{651} \quad \text{Eq. 9}$$

Onde:

[FC]: ficocianina; [AFC]: aloficocianina; [FE]: ficoeritrina;  $A_{614}$ : absorbância em 614 nm;  $A_{651}$ : absorbância em 651 nm;  $A_{499}$ : absorbância em 499 nm.

#### 4.2.3 Dinâmica da distribuição de nitrogênio na biomassa e estimativa da produção de proteína

A dinâmica de distribuição de nitrogênio, nas biomassas cultivadas em condições autotróficas e heterotróficas, foi avaliada, quanto ao nitrogênio inorgânico intracelular ( $\text{NO}_3^-$ ,

$\text{NO}_2^-$ ,  $\text{N-NH}_4^{+1}$ ), nitrogênio total Kjeldahl (N-TK), nitrogênio não proteico (N-NP), nitrogênio proteico (NP), bem como a contribuição do nitrogênio pigmentar na fração N-NP. A estimativa real da produção de proteínas foi calculada a partir da base de cálculo descrita em 4.2.2, descontando dos teores de N-TK as concentrações em N-NP. Para o cálculo da concentração em proteína foi utilizado como fator de conversão de nitrogênio total em proteína o fator 6,25.

#### **4.2.3.1 Nitrogênio não proteico (N-NP)**

O nitrogênio não proteico (N-NP) foi determinado no sobrenadante, obtido após precipitação das proteínas, com ácido tricloroacético (TCA) 20 % (AOAC, 2000).

#### **4.2.3.2 Determinação de Nitrogênio inorgânico intracelular**

Para determinação do nitrogênio intracelular (nitrato, nitrito e amônio), o filtro Millipore (0,45 $\mu\text{m}$ ), contendo a biomassa, separada dos meios de cultivos, conforme descrito em 4.2.1, foi imerso em água destilada por 15 horas. Após este período, o material foi filtrado por sistema à vácuo e lavado com água a 80°C até atingir um volume aproximado de 50 mL (HORNES et al., 2010).

Os íons amônio foram determinados após a adição de solução de fenol e nitroprussiato de sódio, na presença de excesso de hipoclorito de sódio em meio alcalino, formando o azul de indofenol, absorvido em 640 nm (APHA, 2005).

A determinação de nitrito teve como base a reação dos íons nitrito com a sulfanilamida, em meio ácido, formando um íon diazótico, o qual reage com N-naftil etilenodiamina, resultando em coloração rósea, cuja densidade óptica foi medida a 543 nm (APHA, 2005).

Os íons nitrato foram determinados pela reação com o ácido fenoldissulfônico, resultando em um complexo colorido absorvido em 410 nm (APHA, 2005).

#### **4.2.3.3 Nitrogênio total kjeldahl e nitrogênio proteico**

A concentração em N-TK, na biomassa, foi determinada segundo o método de Kjeldahl, referenciado em 4.2.2, e o nitrogênio proteico, mediante a subtração da concentração de N-NP dos teores de N-TK.

#### 4.2.3.4 Contribuição do nitrogênio pigmentar na fração N-NP

A contribuição dos pigmentos na fração N-NP foi avaliada, mediante determinação dos teores de clorofila-*a* e ficobiliproteínas (ficocianina, aloficocianina e ficoeritrina), mediante metodologia descrita em 4.2.1 e 4.2.2.2.2.

#### 4.2.4 Caracterização das proteínas quanto ao perfil aminoacídico

Os teores de proteína foram monitorados nas biomassas geradas no início do cultivo, fase logarítmica e estacionária, em ambos os cultivos, mediante determinação de N-TK, utilizando 6,25 como fator de conversão.

##### 4.2.4.1 Determinação do perfil aminoacídico

Para a determinação do perfil de aminoácidos, amostras em triplicata de *Aphanothece microscopica* Nägeli, foram liofilizadas. A posteriori, alíquotas de 10 mg foram transferidas para tubos de eppendorf e submetidas a hidrólise, mediante adição de 600 $\mu$ L de HCl 6 M e então submetida a banho seco a 110°C por 24 h. Após a hidrólise, as amostras foram ressuspensas em 7 mL de água mili-Q e filtradas para tubos falcon mediante utilização de filtros millipore (0,45 $\mu$ ). O material foi liofilizado e ressuspenso em 500 $\mu$ L de fase móvel, antes da injeção no cromatógrafo.

##### 4.2.4.2 Análise cromatográfica

Para determinação dos aminoácidos foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE), marca Shimadzu, modelo LC-20AD, equipado com uma coluna Shim-pack Amino-Na (6,0 mm D.I. x 100 mm L), mantida a uma temperatura constante de 60°C, detector de fluorescência e derivatização pós-coluna, com lâmpada de xenônio. A detecção dos aminoácidos foi realizada nos comprimentos de onda de 450 nm e 350 nm de emissão e excitação, respectivamente, à partir do complexo colorido formado na derivatização entre os aminoácidos de uma alíquota de 50  $\mu$ L do hidrolizado e orto-ftalaldeído (OPA). Para a eluição das amostras foi utilizado um sistema de gradiente, empregando, como fases móveis o tampão de ácido cítrico (0,2 mol.L<sup>-1</sup>) pH 3,23, tampão ácido cítrico (0,2 mol.L<sup>-1</sup>) e ácido bórico (0,2 mol.L<sup>-1</sup>), pH 10 e hidróxido de sódio (0,2 mol.L<sup>-1</sup>). A quantificação de todas as amostras ocorreu em um intervalo de tempo de 29 min com gradiente dos tampões. Após, a solução de NaOH foi injetada por mais 4 min e, por último, a fase móvel inicial percorreu o sistema por mais 12 min, com o objetivo de preparar o sistema para a análise da próxima

amostra. Os derivatizantes pós-coluna (A e B), foram preparados a partir de uma mistura base de tampão misto de carbonato de sódio ( $0,384 \text{ mol.L}^{-1}$ ), ácido bórico ( $0,216 \text{ mol.L}^{-1}$ ) e de sulfato de potássio ( $0,108 \text{ mol.L}^{-1}$ ), com pH ajustado a 10. O derivatizante A foi preparado adicionando hipoclorito de sódio 4-6 % (1 mL) à mistura base de tampão misto. Para o preparo do derivatizante B foi adicionado OPA, N-acetil-L-cisteína, etanol e 2-mercaptoetano. A quantificação dos aminoácidos teve como base a comparação dos cromatogramas gerados a partir dos aminoácidos da amostra e padrões de concentração conhecida. Os padrões foram derivados nas mesmas condições e ao mesmo tempo que as amostras. Foram realizadas três repetições.

### **4.3 Determinações do escore químico**

A determinação do escore químico foi obtida através do quociente de cada um dos aminoácidos, dieteticamente indispensáveis, contido na proteína teste, pela quantidade do mesmo aminoácido, contido na proteína usada como referência padrão (FAO/WHO, 1985). O escore químico é representado pelo aminoácido limitante da proteína teste.

### **4.4 Análise estatística**

Os dados foram estatisticamente avaliados, mediante os módulos de análise de variância e módulo básico do software Statistica 7.0 (Statsoft, Tulsa-OK, USA).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Seleção das condições ótimas de produção de pigmentos

A produção de pigmentos, a partir da biomassa microalgal, é dependente de diversos fatores físico-químicos, que direcionam a síntese destas biomoléculas. Entretanto, deve-se considerar que, independente destas características, os pigmentos são bioprodutos de natureza intracelular e, portanto, a produtividade global é o produto entre o conteúdo de pigmento da célula e a produtividade em biomassa. Neste sentido, a Tabela 2 apresenta os valores de produção e produtividade de clorofila-*a*, a partir de cultivos em diferentes condições de concentrações de inóculo, razão C/N e razão N/P de acordo com o planejamento experimental.

**Tabela 2** - Produção e produtividade de clorofila-*a* em função da concentração inicial do inóculo, razão C/N e N/P

Experimento	X	C/N	N/P	Produção (mg.g <sup>-1</sup> )	Produtividade (mg.L.d <sup>-1</sup> )
1	100	40	5	0,35±1,90	0,34±3,01
2	300	40	5	0,40±2,26	0,43±7,76
3	100	60	5	0,24±2,97	0,28±0,55
4	300	60	5	0,49±1,84	1,94±27,21
5	100	40	15	0,20±2,97	0,14±2,20
6	300	40	15	0,40±1,55	0,15±2,61
7	100	60	15	0,18±2,83	0,59±0,93
8	300	60	15	0,26±2,05	0,31±7,70
9	200	20	10	0,65±2,12	4,75±90,17
10	200	20	10	0,65±0,64	4,75±91,03
11	200	20	10	0,65±0,78	4,75±91,20

X: concentração celular; C/N: razão carbono/nitrogênio; N/P: razão nitrogênio fósforo; ±: desvio padrão.

Observa-se, a partir da análise dos dados, uma variabilidade pronunciada do conteúdo de clorofila-*a* da biomassa, em função dos fatores avaliados. Produções máximas na ordem de 0,65 mg<sub>clorofila-a</sub>/g<sub>biomassa</sub> foram obtidas, em paralelo a produtividades de 4,75 mg.L.d<sup>-1</sup> em concentrações iniciais de inóculo de 200 mg.L<sup>-1</sup>, razões C/N de 20 e razões N/P de 10.

### 5.1.1 Análise dos efeitos dos fatores concentração de inóculo, razão C/N e razão N/P na produção e produtividade de clorofila-*a*

A Tabela 3 apresenta o resultado dos efeitos e interações entre os fatores concentração inicial do inóculo, razão C/N e razão N/P, bem como os coeficientes do modelo de predição.

Avaliando os dados da Tabela 3, observa-se que, todos os fatores avaliados influenciam isoladamente ( $p < 0,05$ ), na produção e produtividade de clorofila-*a*, além do efeito combinado entre as interações dos fatores. A razão N/P ( $X_3$ ) foi a variável de mais pronunciado efeito na produção de clorofila-*a*, enquanto a produtividade de clorofila-*a* foi fortemente influenciada pela razão C/N ( $X_2$ ) e razão N/P ( $X_3$ ), além do efeito combinado entre razão C/N e razão N/P ( $X_2X_3$ ). De acordo com JACOB-LOPES et al. (2013), a disponibilidade de macronutrientes (carbono orgânico, nitrogênio e fósforo) em cultivos heterotróficos microalgais é o principal fator de controle do bioprocessamento. Embora existam condições pontuais, em que estas relações favorecem o máximo desempenho, há faixas relativamente amplas, onde o desempenho dos biorreatores heterotróficos microalgais mantém-se próxima da faixa ótima.

Neste sentido, as equações 10 e 11 apresentam os modelos estatísticos para a predição da produção e produtividade de clorofila-*a* por *Aphanothece microscopica* Nägeli no efluente do processamento de laticínios.

$$Y_{\text{Produção}} = 345,0 + 42,4X_1 - 53,9X_2 - 85,4X_3 + 37,7X_1X_2 + 25,4X_1X_3 + 11,1X_2X_3 - 66,9X_1X_2X_3 \quad \text{Eq.10}$$

$$Y_{\text{Produtividade}} = 856,2 - 140,5X_1 - 263,0X_2 - 685,2X_3 + 673,7X_1X_2 + 196,4X_1X_3 + 275,5X_2X_3 - 605,0X_1X_2X_3 \quad \text{Eq.11}$$

**Tabela 3** - Análise dos efeitos dos fatores concentração de inóculo, razão C/N e razão N/P na produção e produtividade de clorofila-*a*

Fator	Produção				Produtividade			
	Efeito	Erro puro	t(2)	p	Efeito	Erro puro	t(2)	p
Média	345,03	0,05	6726,65	≤ 0,01	856,23	0,37	2295,67	≤ 0,01
X1	84,86	0,10	825,49	≤ 0,01	-281,13	0,74	-376,07	≤ 0,01
X2	-105,88	0,10	-1030,01	≤ 0,01	-1370,54	0,74	-703,80	≤ 0,01
X3	-170,83	0,10	-1661,80	≤ 0,01	1347,41	0,74	-1833,44	≤ 0,01
X <sub>1</sub> × X <sub>2</sub>	75,58	0,10	733,77	≤ 0,01	392,83	0,74	1798,87	≤ 0,01
X <sub>1</sub> × X <sub>3</sub>	50,83	0,10	493,50	≤ 0,01	551,15	0,74	524,46	≤ 0,01
X <sub>2</sub> × X <sub>3</sub>	22,28	0,10	216,34	≤ 0,01	-1210,00	0,74	735,82	≤ 0,01
X <sub>1</sub> × X <sub>2</sub> × X <sub>3</sub>	-133,50	0,10	-1293,55	≤ 0,01	856,23	0,75	-1612,31	≤ 0,01

X<sub>1</sub>: Concentração do inóculo; X<sub>2</sub>: razão C/N; X<sub>3</sub>: razão N/P.

A eficiência estatística das equações é validada pelo teste de Fisher, em que 95% da variabilidade das respostas produção e produtividade, respectivamente, podem ser explicadas pelos modelos propostos, indicando que estes se ajustam aos dados experimentais. A 95% de confiança, o valor de Fcalculado foi maior que três vezes o Fcrítico. Para a produção e produtividade de clorofila-*a*, indicando, assim, que os modelos propostos, além de serem significativos também são estatisticamente preditivos.

## 5.2 Estimativa da produção de pigmentos

### 5.2.1 Avaliação da curva de crescimento da *Aphanothece microscopica* Nägeli em meio autotrófico e heterotrófico

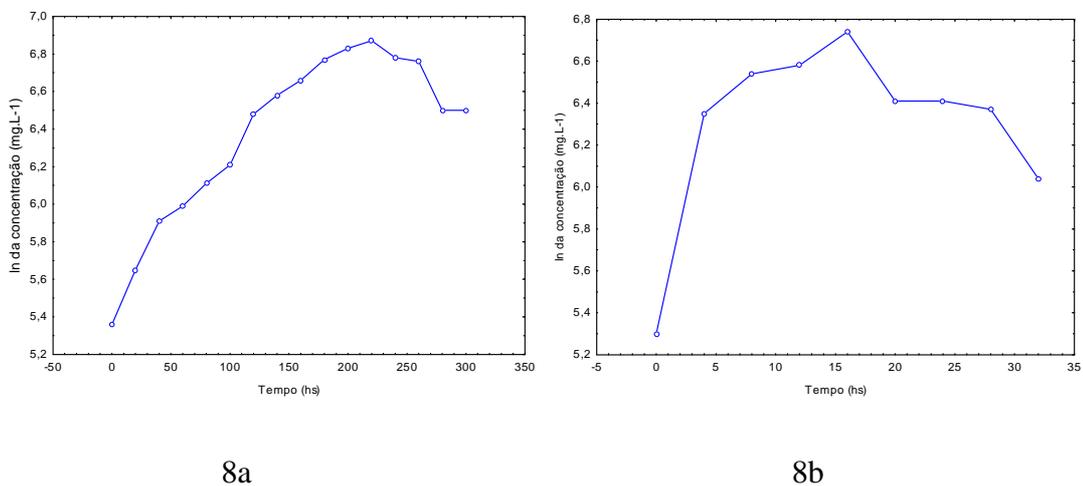
A Figura 8 apresenta as curvas de crescimento da *Aphanothece microscopica* Nägeli cultivada em meio sintético (8a), a  $15\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , e no efluente da indústria de laticínios (8b), na ausência de luz. Os dados foram obtidos a partir de três experimentos para cada condição avaliada. Os comportamentos das fases logarítmicas de crescimento são descritas pelos seguintes modelos de regressão lineares:

$$Y = 5,5488 + 0,0068 X \quad (\text{equação 12})$$

$$Y = 5,4300 + 0,0615 X \quad (\text{equação 13})$$

Os coeficientes de correlação apresentados foram de 0,9808 e 0,9900, respectivamente. Nestes modelos, Y é o logaritmo neperiano da concentração celular e X é definido como tempo de cultivo. Comparando-se as curvas de crescimento entre si, verifica-se a ausência da fase de adaptação para ambas as condições. Esta condição, em curvas de crescimento de microalgas, desenvolvidas em sistemas fotossintéticos, é característica de meios de cultura, com disponibilidade de carbono e nutrientes, como os meios sintéticos (GUERRERO et al., 1999), bem como, quando é utilizado como meio de cultura efluentes agroindustriais (GUERRERO et al., 1998). Este comportamento foi registrado para o microorganismo em estudo, quando cultivado em efluente da parboilização do arroz e da indústria da pesca (QUEIROZ et al., 2002; BASTOS et al., 2004; QUEIROZ et al., 2006; ZEPKA et al., 2008; QUEIROZ et al., 2011).

**Figura 8** - Curvas de crescimento para a *Aphanothece microscopica* Nägeli, desenvolvida em meio BG-11 (8a), e no efluente da indústria de laticínios (8b)



A Tabela 4 apresenta a caracterização da cinética de crescimento da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli, em termos de concentrações celulares iniciais ( $X_0$ ), e máximas ( $X_{max}$ ), tempo de duração da fase logarítmica ( $t_{log}$ ), velocidades máximas específicas de crescimento ( $\mu_{max}$ ) e tempo de geração ( $t_g$ ).

**Tabela 4** - Variáveis cinéticas para a *Aphanothece microscopica* Nägeli desenvolvida em condições autotróficas e heterotróficas

Variáveis Cinéticas	Cultivo Autotrófico	Cultivo Heterotrófico
$t_{\log}(\text{h})$	196	15,45
$X_{\max}$ (mg. L <sup>-1</sup> )	960	590
$X_0$ (mg. L <sup>-1</sup> )	213	212
$\mu_{\max}$ (h <sup>-1</sup> )	0,0068	0,066
tg (h)	102	10,50

$t_{\log}$ : duração da fase logarítmica;  $X_{\max}$ : concentração máxima de biomassa;  $X_0$ : concentração inicial de biomassa;  $\mu_{\max}$ : velocidade específica de crescimento máxima; tg: tempo de geração.

O intervalo de duração da fase logarítmica de crescimento varia com a espécie, em função das condições do meio, idade do inóculo e estado fisiológico da cultura (MEEKS; CASTENHOLZ, 1971). As fases logarítmicas de crescimento, determinadas por regressão linear dos dados, indicaram crescimento logarítmica em 196 h, quando cultivada em meio BG-11, na presença de luz, e de 15,45 h no efluente da indústria de laticínios, em ausência de luz, limitadas pelas máximas concentrações de biomassa obtidas,  $960 \pm 19,9$  e  $590 \pm 1,52$  mg.L<sup>-1</sup> para os cultivos autotróficos e heterotróficos, respectivamente. A partir do final da fase logarítmica, pôde-se observar a formação das fases estacionárias.

Jacob-Lopes, Silva e Franco (2008) avaliaram o crescimento da *Aphanothece microscopica* Nägeli em meio BG-11, em diferentes temperaturas, intensidades luminosas e concentrações de CO<sub>2</sub>. Os valores mais próximos aos dados expressos na Tabela 4 foram  $\mu_{\max}$  de  $0,008 \text{ h}^{-1}$ , a qual correspondeu a um tg de 86,94 h, quando o micro-organismo foi cultivado a 30°C e 0,96 Klux. O valor de  $\mu_{\max}$  obtido por estes autores, bem como no presente trabalho, é similar aos obtidos por outros autores, para outras cianobactérias, cultivadas em condições fotossintéticas, como para a cianobactéria *Anabaena viridabilis* (YOON, 2002). Esta constatação salienta a influência do meio de cultivo no crescimento celular. O fato é corroborado, quando são avaliados, comparativamente, os valores de  $\mu_{\max}$  obtidos para o micro-organismo em cultivo autotrófico e heterotrófico (Tabela 4).

Diferenças nas velocidades específicas de crescimento têm sido atribuídas, entre outros fatores, à fonte de nitrogênio. Segundo Von Rückert e Giani (2004), o crescimento de microalgas tem se revelado mais lento em meio contendo nitrato. Nos efluentes agroindustriais, a fonte de nitrogenados é constituída de compostos orgânicos e nitrogênio

amoniaco (QUEIROZ; KOETZ, 1997; GUERRERO et al., 1999; BASTOS et al., 2004; QUEIROZ et al., 2006; ZEPKA et al., 2007; ZEPKA et al., 2008; JACOB-LOPES; SILVA; FRANCO, 2008; HORNES et al., 2010; SILVA-MANETTI et al., 2012).

A velocidade específica máxima de crescimento, para o micro-organismo desenvolvido no efluente de laticínios, foi 10 vezes maior, que a verificada quando se utiliza o meio BG-11. Este comportamento é típico de cianobactérias, cultivadas em efluentes agroindustriais, o que demonstra a capacidade destes micro-organismos em assimilarem, heterotroficamente, compostos orgânicos e inorgânicos dos efluentes (GUERRERO et al., 1999; BASTOS et al., 2004; QUEIROZ et al., 2007a; HORNES et al., 2010; JACOB-LOPES, 2010; VIEIRA et al., 2012b; QUEIROZ et al., 2013). Este valor, de velocidade específica de crescimento ( $0,0905 \text{ h}^{-1}$ ), é equivalente ao registrado para este micro-organismo, quando cultivado no efluente da parboilização do arroz (QUEIROZ et al., 2007a; BASTOS et al., 2010) e, substancialmente superior, quando é utilizado como meio de cultivo o efluente da indústria da pesca (GOLDBECK et al., 2006; HORNES et al., 2010). Os dados cinéticos, obtidos para a *Aphanothece microscopica* Nägeli, demonstram a potencialidade de exploração de bioprocessos, para a geração de insumos intermediários, ou produtos finais, na indústria de alimentos, utilizando como meio de cultivo o efluente da indústria de laticínios.

### **5.2.2 Avaliação da produção de pigmentos em biomassa de *Aphanothece microscopica* Nägeli cultivada em meio autotrófico e heterotrófico**

O emprego de microalgas, como biocatalizadores em reações de conversão, resulta em bioprodutos de natureza intracelular, além de metabolitos extracelulares, passíveis de utilização como insumos intermediários ou produtos finais. As proteínas, lipídios e pigmentos são os principais constituintes intracelulares de interesse, os quais tornam-se importante foco da biotecnologia, e são altamente influenciados por fatores ambientais, como a luz (DANESI et al., 2004; SPOLAORE et al., 2006). A Tabela 5, expressa os resultados obtidos neste trabalho, em termos de concentração em clorofila-*a* e ficobiliproteínas (ficocianina, aloficocianina e ficoeritrina), para a biomassa de *Aphanothece microscopica* Nägeli no início, fase logarítmica e estacionária de crescimento, quando cultivada em condições autotróficas e heterotróficas.

**Tabela 5** - Concentração de clorofila-*a* e ficobiliproteínas (mg.g<sup>-1</sup>) na biomassa da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli durante as fases inicial, logarítmica e estacionária nos cultivos heterotrófico e fotossintético

	Autotrófico			Heterotrófico		
	Início	Fase Log	Fase Est	Início	Fase Log	Fase Est
Clorofila- <i>a</i>	2,1±0,2 <sup>a</sup>	10,7±0,5 <sup>b</sup>	8,4±0,3 <sup>c</sup>	2,1±0,2 <sup>a</sup>	1,0±0,1 <sup>d</sup>	0,8±0,1 <sup>e</sup>
Ficocianina	23,3±0,4 <sup>a</sup>	77,4±0,4 <sup>b</sup>	64,1±0,7 <sup>c</sup>	23,3±0,3 <sup>a</sup>	73,1±0,9 <sup>d</sup>	79,0±1,1 <sup>e</sup>
Alofiocianina	13,5±1,1 <sup>a</sup>	10,4±0,3 <sup>b</sup>	13,9±0,9 <sup>c</sup>	12,8±0,4 <sup>d</sup>	15,0±1,3 <sup>e</sup>	14,0±0,6 <sup>f</sup>
Ficoeritrina	1,5±0,2 <sup>a</sup>	1,4±0,1 <sup>b</sup>	1,1±0,1 <sup>c</sup>	1,5±0,2 <sup>a</sup>	2,2±0,1 <sup>d</sup>	1,7±0,1 <sup>e</sup>

Log: logarítmica; Est: estacionária; experimentos em triplicata; médias de 3 repetições; meio de cultivo heterotrófico: efluente de laticínios; cultivo fotossintético: meio BG-11; letras diferentes na horizontal indicam diferenças significativas a 5% de significância.

Danesi et al (2004), estudaram a influência da luz no crescimento e produção de clorofila-*a* por *Spirulina platensis*, cultivada em meio contendo como fonte de nitrogênio KNO<sub>3</sub>. Os autores observaram um aumento de 29% na produção deste pigmento, nas condições de 2 Klux de intensidade luminosa e 30°C de temperatura, em relação a culturas cultivadas a 5Klux na mesma temperatura. O aumento na concentração de clorofila-*a* foi atribuído, ainda, ao fato do conteúdo de nitrogênio no meio não ser um fator limitante, condição esta equivalente para o cultivo autotrófico da cianobactéria em estudo, considerando-se o meio sintético BG-11. Nestes experimentos, valores médios na ordem de 3,67 mg.g<sup>-1</sup>, com intensidade luminosa equivalente a 2 Klux foram registrados, valor este superior ao obtido para o inóculo de *Aphanothece microscopica* Nägeli (2,1 mg.g<sup>-1</sup>), cultivada em condições autotróficas e temperatura de 20°C. É possível destacar que, independente da espécie, as diferenças de concentrações são refletidas também pelas temperaturas de cultivo.

Austin, Ross e Mills (1996), avaliaram o efeito da luz na produção de clorofila-*a* e ficocianina na cianobactéria *Nostoc sp.*, cultivada em meio BG-11. Os resultados obtidos indicaram menores concentrações em clorofila-*a* quando a cianobactéria foi cultivada no escuro, em relação à biomassa gerada na presença de luz; no entanto, apresentou concentrações similares em ficocianina. Este comportamento pode ser visualizado na Tabela 5, para os dados obtidos neste trabalho, comparando os valores obtidos para a biomassa desenvolvida em meio BG-11, com intensidade luminosa de 2 Klux e heterotrófico na ausência de luz. Por outro lado, Austin, Ross e Mills (1996), reportam que a adaptação de algas unicelulares em meio heterotrófico resultam em baixa produção de clorofila. Esta

constatação pode justificar as menores concentrações em clorofila-*a* registradas para a *Aphanothece microscopica* Nägeli em cultivo heterotrófico.

A *Spirulina platensis* caracteriza-se por apresentar em sua constituição concentrações de clorofila-*a* que correspondem a 1,15% de sua biomassa (HENRIKSON, 1989; DANESI et al., 2004; MORIST et al., 2001). Os resultados em clorofila-*a*, registrados para *Aphanothece microscopica* Nägeli, em condições fotossintéticas na fase logarítmica de crescimento, são bastante próximos (1,06%) ao expresso pela literatura para *Spirulina platensis*. Neste sentido, estes resultados fazem do micro-organismo em análise, fonte potencial de produção de clorofila-*a*. Por outro lado, mesmo que em cultivo heterotrófico a produção de clorofila-*a* seja em torno de 10,86 vezes menor (Tabela 5) que no autotrófico, quando se avalia o comportamento das curvas de crescimento da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli (Figuras 8a e 8b), observa-se que, quando o micro-organismo é cultivado na ausência de luz, utilizando como meio de cultivo o efluente da indústria de laticínios, o meio da fase logarítmica é atingido entre 10 e 12 horas. No entanto, em fotoautotrofia o meio da fase logarítmica é registrado somente após 120 a 140 horas de cultivo. Neste sentido, a menor produção em clorofila-*a* no sistema heterotrófico é compensada pelo tempo para atingir a concentração máxima em clorofila-*a* no sistema autotrófico.

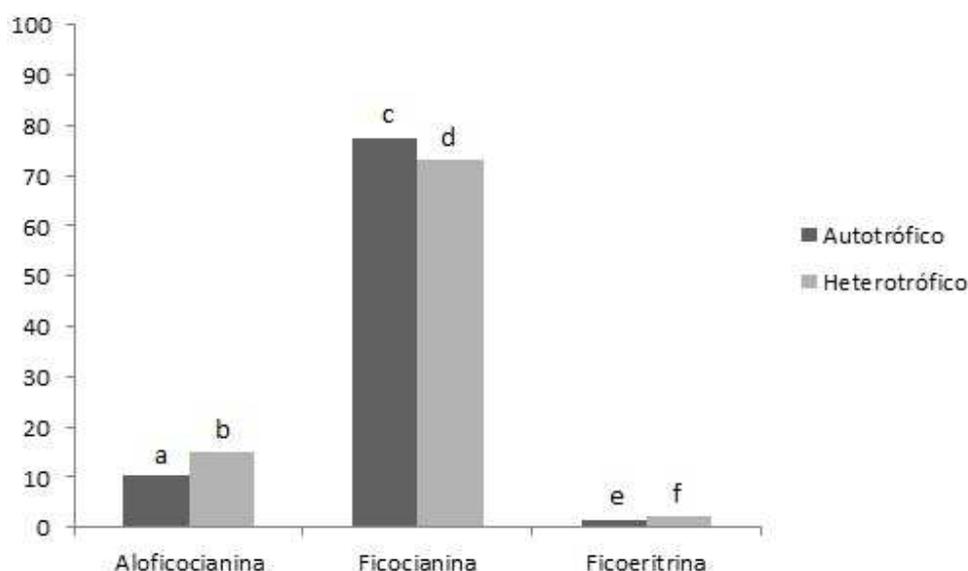
No que se refere à ficobiliproteínas, em especial a ficocianina e aloficocianina, maiores concentrações foram obtidas na fase estacionária, em que são verificados maiores teores em aloficocianina na biomassa gerada em cultivo autotrófico (13,9 mg.g<sup>-1</sup>) e em ficocianina (79,0 mg.g<sup>-1</sup>) na biomassa gerada em condições heterotróficas.

De acordo com Zuber (1983), o número de moléculas de ficobiliproteínas em cianobactérias aumenta da aloficocianina para a ficocianina. Este comportamento pode ser elucidado pelos dados expressos na Figura 9, que expressam a porcentagem das frações de ficobilinas em função da porcentagem de ficobilinas totais para biomassa de *Aphanothece microscopica* Nägeli, independente da condição utilizada. Observam-se percentuais de 11,63 e 86,11% de aloficocianina e ficocianina, em relação à concentração total de ficobilinas, produzidas em sistema autotrófico, e 17,27 e 80,32 % de aloficocianina e ficocianina, para a biomassa produzida na ausência de luz, utilizando como meio de cultivo o efluente da indústria de laticínios.

Dentre as inúmeras espécies de cianobactérias que povoam o planeta, poucas são devidamente caracterizadas e exploradas comercialmente (MISHRA, 2007; MISHRA et al.,

2012). A *Spirulina* sp. é uma das mais estudadas e, em especial, também quanto a produção de pigmentos com valor comercial, aplicados em cosméticos, produtos farmacêuticos e na indústria de alimentos (DANESI et al., 2004; AJAYAN; SELVARAJU; THIRUGNANAMOORTHY, 2012).

**Figura 9** - Percentuais das frações individuais de ficobiliproteínas, em relação ao total de ficobiliproteínas, nas biomassas obtidas na fase logarítmica de crescimento, em condições autotróficas e heterotróficas



A ficocianina tem sido descrita como a principal ficobiliproteína que constitui os pigmentos que caracterizam as cianobactérias (SARADA et al., 1999; ANUPAMA; RAVINDRA, 2000). A ficocianina e a alocianina comportam, normalmente, cerca de 20% da proteína celular na cianobactéria *Spirulina platensis*, e ambas são os pigmentos quantitativamente dominantes (RICHMOND, 1988; AJAYAN; SELVARAJU; THIRUGNANAMOORTHY, 2012). Este comportamento pode ser avaliado nos dados expressos na Figura 9 e Tabelas 5 e 6, para o micro-organismo em avaliação.

**Tabela 6** - Percentagem em ficocianina e aloficocianina, em função da concentração em proteína unicelular, de *Aphanothece microscopica* Nägeli, desenvolvida em condições autotróficas e heterotróficas, nas fases logarítmicas de crescimento.

Cultivo	Proteína (g.100g <sup>-1</sup> )	Aloficocianina + Ficocianina (g.100g <sup>-1</sup> de proteína)
Autotrófico	45,90±0,27	19,04±0,15
Heterotrófico	41,53±0,25	21,46±0,13

média de 3 repetições; AFC: aloficocianina; FC: ficocianina.

A Tabela 7 nos fornece a relação existente entre concentrações de diferentes pigmentos estudados neste trabalho. Observa-se uma alta relação entre ficocianina e aloficocianina, na ordem de 7,44 e 4,87, nas biomassas cultivadas em sistemas autotróficos e heterotróficos, respectivamente. Estes valores são notadamente maiores ao registrado para a cianobactéria *Spirulina platensis* (3,7), cultivada em condições autotróficas, a temperatura de 28 a 30°C. No entanto, com valores próximos para as relações clorofila/ficocianina (0,13), ficocianina/clorofila (7,52), ficocianina/ficoeritrina (47), aloficocianina/ficocianina (0,27), conforme descrito por Ajayan, Sevaraju e Thirugnanamoorthy (2012). Considerando as variações características da espécie, e o fato da ficocianina, somada a aloficocianina, representar a maior fração dos pigmentos totais, que compõem a biomassa do micro-organismo em questão (Tabela 5), independente das condições de cultivo, é possível considerar a alta relação ficocianina/aloficocianina como característico da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli.

**Tabela 7** - Relação entre concentrações de pigmentos na biomassa de *Aphanothece microscopica* Nägeli, cultivada em meio autotrófico e heterotrófico, na fase logarítmica de crescimento

	Autotrófico				Heterotrófico			
	A	B	C	D	A	B	C	D
A	1	0,14	1,03	7,64	1	0,01	0,06	0,46
B	7,23	1	7,44	55,30	74,44	1	4,87	33,23
C	0,97	0,21	1	6,82	0,97	0,13	1	6,81
D	0,13	0,02	0,13	1	2,16	0,03	0,15	1

A: clorofila-a; B: ficocianina; C: aloficocianina; D: ficoeritrina.

A ficoeritrina é reconhecida como um biopigmento, portador de propriedades que trazem benefícios a saúde humana, o que se reflete na estabilização dos radicais livres, ação antioxidante, anti-inflamatória e anti-cancerígena (SONI; TRIVEDI; MADAMWAR, 2008). Rodríguez et al. (1991), reportam que a concentração de ficoeritrina na cianobactéria *Nostoc* sp., aumenta, em resposta a redução da luz. Avaliando os resultados obtidos, no presente trabalho (Tabela 5), observa-se, nitidamente, a influência da luz, na produção deste composto, com um aumento pronunciado na concentração após 12h no escuro, cultivado em sistema heterotrófico.

A ficoeritrina destaca-se por ser uma das ficobilinas mais flexíveis, facilmente se adaptando a mudanças ambientais (AJAYAN; SELVARAJU; THIRUGNANAMOORTHY, 2012). Esta facilidade de adaptação da ficoeritrina se reflete na *Aphanothece microscopica* Nägeli, demonstrando sua versatilidade metabólica, quanto à produção deste biopigmento, uma vez que são registradas maiores concentrações em biomassa, quando cultivada no escuro e no efluente da indústria de laticínios, quando comparada a produção deste pigmento, na biomassa desenvolvida em condições autotróficas. É registrado um aumento na ordem de 57 % na fase logarítmica de crescimento, quando na ausência de luz, ainda que cultivada no efluente da indústria de laticínios, condição esta, que demonstra, concomitantemente, a influência do meio de cultivo. Estes resultados indicam o organismo em questão, como potencial fonte de ficoeritrina, quando cultivado heterotroficamente, utilizando como meio de cultivo o efluente de laticínios. Por outro lado, é notória, também, a superioridade em produção de clorofila-*a*, em condições fotossintéticas. Isso se justifica, uma vez que a luz é um dos mais importantes fatores que influenciam a biossíntese de clorofila (DANESI et al., 2004). De acordo com Wyman e Fay (1987), as modificações nos níveis de ficobilinas e clorofila-*a* são respostas à adaptação dos micro-organismos à ausência de luz.

### **5.2.3 Análise de sensibilidade da produção de pigmentos por *Aphanothece microscopica* Nägeli, desenvolvida no efluente da indústria de laticínios**

Os processos convencionais de remoção de nitrogênio de águas residuárias, estão focados na volatilização de compostos nitrogenados na forma de gás nitrogênio. Esta estratégia, embora eficiente do ponto de vista de depuração de resíduos, não permite o uso sustentável destes compostos, que servem como blocos construtores de inúmeras substâncias de valor comercial, como proteínas, ácidos graxos e pigmentos (QUEIROZ et al., 2006; QUEIROZ et al., 2007b; BASTOS et al., 2010; QUEIROZ et al., 2013).

Daneshkhah e Bedford (2013) relatam que as análises de sensibilidade são ferramentas de fundamental importância na predição das incertezas que as variáveis de entrada de um processo podem causar no resultado final. Segundo estes autores este tipo de abordagem pode auxiliar na melhor estratégia a ser adotada no intuito de viabilizar técnico-economicamente um processo ou produto.

A Tabela 8 apresenta a análise de sensibilidade da produção de pigmentos por *Aphanothece microscopica* Nägeli, a partir da geração anual de efluente de uma indústria de laticínios regional, quando o micro-organismo é cultivado em sistema autotrófico e heterotrófico.

**Tabela 8** - Estimativa de produção de pigmentos por *Aphanothece microscopica* Nägeli na fase logarítmica de crescimento, cultivada em sistema heterotrófico, utilizando como meio de cultivo o efluente de laticínios

Parâmetros	Estimativas
Volume de efluente.dia <sup>-1</sup> (L)	950.000
Volume anual (L)	319.200.000
Período operacional (d.ano <sup>-1</sup> )	336
Sistema autotrófico	
Produtividade em biomassa (Kg.L.ano <sup>-1</sup> )	0,04
Produtividade anual em biomassa	12.770 ton.ano <sup>-1</sup>
Produtividade anual em clorofila- <i>a</i> (10,7 mg.g <sup>-1</sup> )	137 ton.ano <sup>-1</sup>
Produtividade anual em ficocianina (77,4 mg.g <sup>-1</sup> )	988,4 ton.ano <sup>-1</sup>
Produtividade anual em aloficocianina (13,9 mg.g <sup>-1</sup> )	178 ton.ano <sup>-1</sup>
Produtividade anual em ficoeritrina (1,5 mg.g <sup>-1</sup> )	19,2 ton.ano <sup>-1</sup>
Sistema heterotrófico	
Produtividade em biomassa (Kg.L.ano <sup>-1</sup> )	0,20
Produtividade anual em biomassa	63.840 ton.ano <sup>-1</sup>
Produtividade anual em clorofila- <i>a</i> (2,1 mg.g <sup>-1</sup> )	134 ton.ano <sup>-1</sup>
Produtividade anual em ficocianina (79 mg.g <sup>-1</sup> )	5043,4 ton.ano <sup>-1</sup>
Produtividade anual em aloficocianina (15 mg.g <sup>-1</sup> )	957,6 ton.ano <sup>-1</sup>
Produtividade anual em ficoeritrina (2,2 mg.g <sup>-1</sup> )	140,4 ton.ano <sup>-1</sup>

O biorrefino é um conceito de produção, que tem por base o desenvolvimento sustentável. São sistemas que combinam tecnologias necessárias, entre a concepção, exploração das matérias-primas biológicas, produção de insumos intermediários e produtos

finais (SINGH; GU, 2010; QUEIROZ et al., 2013). Avaliando-se os dados da Tabela 8 obtidos através das condições otimizadas é possível estimar, através da produção anual de pigmentos, a capacidade de produção de clorofila-*a* em meio heterotrófico (134 ton.ano<sup>-1</sup>) equivalente a produção autotrófica (137 ton.ano<sup>-1</sup>), em um período de tempo 12,7 vezes menor (Tabela 4).

A clorofila-*a* é considerada um insumo de valor agregado, podendo atingir valores de mercado de até R\$ 745,00/mg, tomando como base a microalga *Anacistis nidulans* (DANESHKHAH; BEDFORD, 2013). Uma estimativa mundial para o comércio de ficobiliproteínas, ultrapassando a ordem de US\$ 50 milhões, já era preconizada em 1997 (SPOLAORE et al., 2005; YEN et al., 2013). De acordo com Milledge (2011), o preço das ficobiliproteínas, no mercado internacional, podem atingir cerca de US\$ 25 por mg. Independente disto, deve-se considerar, que a produção destes co-produtos, está suportada nos resíduos resultantes do processamento industrial. Desta forma, haverá, invariavelmente, a conversão dos poluentes dispersos nas águas residuárias, contribuindo para desonerar, ambientalmente, o processo produtivo, uma vez que, haverá a estabilização destes compostos, permitindo o descarte adequado nos corpos hídricos receptores, adjacentes a unidade industrial.

**Tabela 9** - Parâmetros cinéticos de remoção de poluentes do efluente

Parâmetro	C <sub>0</sub> (mg.L <sup>-1</sup> )	C (mg.L <sup>-1</sup> )	ER (%)
DQO	1478,3	45,8	96,9
N-TK	32,0	8,5	73,5
PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup>	23,0	2,3	89,8

C<sub>0</sub>: concentração inicial; C: concentração final; ER: eficiência de remoção.

Nas condições operacionais, previamente otimizadas, remoções de 96,9, 73,5 e 89,8% de matéria orgânica, nitrogênio total e fósforo total foram constatadas (Tabela 9), indicando que esta água residuária cumpre com os padrões de emissão, estabelecida pela legislação do estado do Rio Grande do Sul (Rio Grande do Sul, 2006). Estes resultados são bastante promissores, considerando que Queiroz et al. (2007a), obtiveram remoções do efluente da parboilização do arroz por esta cianobactéria, em 15 h de cultivo, na ordem de 83,4 e 72,7% de DQO e N-TK, respectivamente. Esta elevada capacidade de remoção de

matéria orgânica (96,9%), demonstra a adaptação da *Aphanothece microscopica* Nägeli as condições heterotróficas estudadas. Esta constatação é corroborada, pelos valores de coeficiente de transformação de matéria orgânica em biomassa (0,26mg de biomassa/mg de DQO), como pode ser verificado na Tabela 10. Isso sugere que ocorre um elevado consumo de matéria orgânica, com baixa conversão em biomassa. Observa-se, no final da fase logarítmica, período descrito de 15,45 a 16 h (Tabelas 4 e 12), uma concentração de biomassa de 590 mg.L<sup>-1</sup>, concentração esta, que corresponde a 61,5% da biomassa gerada em condições autotróficas em 196 a 200 h (Tabela 12).

**Tabela 10** - Coeficientes de conversão de matéria orgânica, nitrogênio e fósforo por *Aphanothece microscopica* Nägeli, cultivada no efluente da indústria processadora de laticínios, na ausência de luz

Variáveis	mg <sub>biomassa</sub> /mg <sub>substrato</sub>
Y <sub>S/DQO</sub>	0,26
Y <sub>S/N-TK</sub>	16,1
Y <sub>S/PO4-3</sub>	18,3

Y<sub>S/DQO</sub> : Coeficiente de transformação de DQO em biomassa; Y<sub>S/N-TK</sub>: Coeficiente de transformação de N-TK em biomassa; Y<sub>S/PO4-3</sub>: Coeficiente de transformação de PO<sub>4</sub><sup>-3</sup> em biomassa.

Elevadas reduções de matéria orgânica, com baixa conversão em biomassa, a partir de moléculas orgânicas, em metabolismo heterotrófico, indica a existência de rotas metabólicas capazes de assegurar o crescimento celular na ausência de luz (TAM; WONG, 2000). Por outro lado, o coeficiente de conversão em biomassa a partir de nitrogênio (16,1 mg de biomassa/mg de N-TK), demonstra que, elevadas conversões deste nutriente, ocorre na forma de biomassa. Efeito este ainda mais pronunciado para o fósforo (18,3mg de biomassa/mg de P-PO<sub>4</sub><sup>-3</sup>). A concentração inicial deste nutriente (23,3 mg.L<sup>-1</sup>), torna este valor de coeficiente de conversão altamente significativa.

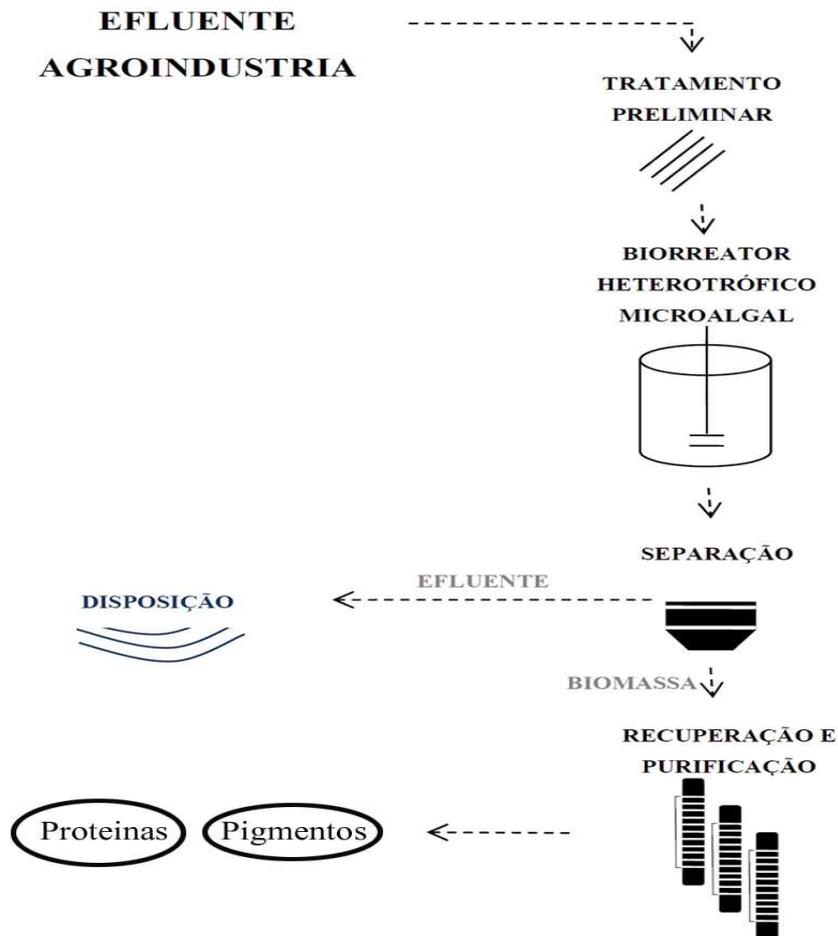
As eficiências de remoção, associadas aos fatores de conversão, e a produção em pigmentos e proteína, obtidos em condições heterotróficas, demonstra que o processo proposto, utilizando o efluente de laticínios como fonte de nutrientes, viabiliza o processo de biorrefino, a ser aplicado a uma indústria de processamento de leite. Para tal, é proposto o uso de biorreatores heterotróficos microalgais, para o tratamento de efluentes, considerando a associação do tratamento da água residuária, com a produção de insumos de valor comercial,

tais como pigmentos e proteínas. O processo deve ser contínuo para manter a produtividade durante todo o tempo.

O processo de separação tem como base, a carga superficial negativa, presente nas cianobactérias, a qual pode ser neutralizada ou reduzida, pela adição de agentes flocculantes, tais como cátions multivalentes (KIM et al., 2005). A biomassa de *Aphanothece microscopica* Nägeli é eficientemente separada do cultivo, mediante a utilização de cloreto férrico, conforme descrito por Silva-Manetti et al. (2011).

Estes processos, que resultam no tratamento de efluentes e obtenção de componentes de interesse comercial, em um só estágio, vêm sendo considerados, como uma atitude efetiva do ponto de vista sustentável industrial (QUEIROZ et al., 2013).

**Figura 10** - Estratégia de biorrefino aplicado a indústrias do processamento de leite.



### 5.3 Dinâmica de nitrogênio na biomassa

#### 5.3.1 Avaliação de N-TK e N-NP

Condições de cultivo como luz, temperatura, tamanho do inóculo e fonte de nutrientes nas quais as microalgas são desenvolvidas, têm sido exaustivamente discutidas na literatura (TOUCHETTE, 2000; MUROPASTOR; FLORENCIO, 2003; VON RUCKERT; GIANI, 2004; QUEIROZ et al., 2007a; ANDERLA; ZAMERA, 2010; PEREZ-GARCIA et al., 2010; HORNES et al., 2010; VIEIRA et al., 2012b).

Vieira et al. (2012b), reportam a influência da temperatura na produção de biomassa, quando a cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli é cultivada, em condições heterotróficas, utilizando como meio de cultura o efluente de laticínios. Os autores indicam a temperatura de 20°C e o inóculo de 200 mg.L<sup>-1</sup>, como a melhor condição. Estas condições tornam-se importantes, quando se visa a aplicação de cianobactérias, na produção de compostos de interesse comercial.

Na Tabela 11, observa-se o comportamento das concentrações em nitrogênio total Kjeldahl (N-TK) e nitrogênio não proteico (N-NP), obtidas para a biomassa gerada a 20°C, a partir de inóculos de 200 mg.L<sup>-1</sup>, em sistemas autotróficos, utilizando como meio de cultivo o meio padrão BG-11, intensidade luminosa de 15µmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> e heterotrófico, tendo como meio de cultivo o efluente da indústria de laticínios.

**Tabela 11** - Concentração em nitrogênio total Kjeldahl (N-TK) e nitrogênio não proteico (N-NP) na *Aphanothece microscopica* Nägeli, desenvolvida em condições autotróficas e heterotróficas

	Autotrófico		Heterotrófico	
	N-TK (g.100g <sup>-1</sup> )	N-NP (g.100g <sup>-1</sup> )	N-TK (g.100g <sup>-1</sup> )	N-NP (g.100g <sup>-1</sup> )
Início	5,7±0,2 <sup>a</sup>	1,7±0,1 <sup>d</sup>	5,7±0,3 <sup>a</sup>	2,0±0,2 <sup>fi</sup>
Fase logarítmica	6,9±0,2 <sup>b</sup>	2,4±0,1 <sup>e</sup>	5,6±0,2 <sup>a</sup>	2,3±0,2 <sup>e</sup>
Fase Estacionária	6,5±0,2 <sup>c</sup>	2,0±0,1 <sup>fg</sup>	6,2±0,3 <sup>h</sup>	1,9±0,2 <sup>dgi</sup>

Média de 3 repetições; letras diferentes indicam diferenças significativas (p≤0,05).

Analisando os dados da Tabela 11, verificam-se comportamentos distintos das formas nitrogenadas para a biomassa obtida nos diferentes sistemas de cultivo. Observa-se, que a maior concentração de N-TK presente na biomassa cultivada no efluente de laticínio é registrada na fase estacionária, valor este ( $6,2 \text{ g.}100\text{g}^{-1}$ ), que difere significativamente ( $p \leq 0,05$ ) da concentração obtida a partir do meio BG-11 ( $6,5\text{g.}100\text{g}^{-1}$ ), nesta fase de crescimento. A maior produção de N-TK quando comparados os dois experimentos foi obtida para a biomassa gerada em condições autotróficas ( $6,9 \text{ g.}100\text{g}^{-1}$ ), na fase logarítmica.

Von Ruckert e Giani, (2004), avaliando o efeito do nitrato e do amônio, no crescimento e na concentração de proteína, na cianobactéria *Microcystis viridis* Lemmermann, quando a proteína é calculada, tendo como base a multiplicação de N-TK, pelo fator 6,25, verificaram maiores concentrações em proteína, quando o micro-organismo foi cultivado em meio de nitrato. Isso justifica as maiores concentrações em N-TK registrada para a biomassa obtida em cultivo utilizando o meio BG-11 que utiliza como fonte de nitrogênio  $\text{NaNO}_3$  (RIPPKA et al., 1979). Por outro lado, tem sido verificados maiores velocidades de crescimento, quando cianobactérias desenvolvem-se em meios cuja fonte de nitrogênio é o amônio (VON RUCKERT; GIANI, 2004). Esta constatação se reflete nas Tabelas 1 e 12, onde pode ser visualizada a caracterização do efluente da indústria de laticínios (Tabela 1), bem como as concentrações celulares, em função do tempo, para ambos os experimentos (Tabela 12). O efluente de laticínios, utilizado nos experimentos, teve como fonte de nitrogênio os nitrogenados oriundos de sua composição (Tabela 1), onde a concentração de nitrogênio amoniacal foi em média de  $1,8 \text{ mg.L}^{-1}$ .

O aumento da concentração em biomassa está relacionado com a velocidade específica de crescimento e a concentração do inóculo, os quais, normalmente, estão associados à concentração inicial de substrato (CONTRERAS et al., 2000). A biomassa de cianobactérias é reconhecida como de elevado valor nutritivo, ao qual, é atribuído ao alto teor em proteínas e perfil de aminoácidos essenciais, caracterizado por teores de lisina, leucina e valina em concentrações superiores ao recomendado pela FAO (ANUPAMA; RAVINDRA, 2000).

A análise da Tabela 12, demonstra que o máximo em concentração celular ( $590 \text{ mg.L}^{-1} \pm 1,53$ ) foi registrado em 16 horas de cultivo em sistema heterotrófico. Em condições autotróficas este teor em biomassa, só foi atingido após pelo menos 100 horas de experimento, o que se traduz em menor velocidade de crescimento (Tabela 4) para o micro-organismo em estudo. São registrados valores de  $\mu_{\text{max}}$  na ordem de 13,51 vezes maior, quando

este é desenvolvido na ausência de luz, utilizando como meio de cultivo o efluente de laticínio, que quando desenvolvido em condições autotróficas em meio BG-11.

A produção de biomassa é dependente de outros fatores, além da espécie e do metabolismo utilizado. Bastos et al. (2004) estudaram o cultivo do micro-organismo em análise, no efluente da parboilização do arroz, a 30°C, ausência de luz e inóculo de 100 mg.L<sup>-1</sup>, obtendo concentrações celulares de 650 mg.L<sup>-1</sup> em 72 h de cultivo. Nas condições experimentais deste trabalho, este micro-organismo produz concentrações em torno de 90,8% da biomassa considerada, em 15 a 16 h (Tabela 12).

**Tabela 12** - Valores médios de biomassa obtidos para *Aphanothece microscopica* Nägeli, nas curvas de crescimento, dos cultivos autotrófico e heterotrófico

Autotrófico		Heterotrófico	
Tempo (h)	mg.L <sup>-1</sup>	Tempo (h)	mg.L <sup>-1</sup>
0	213±3,53	0	212±3,06
20	285±2,05	8	384±3,79
40	370±4,30	12	478±2,08
80	450±3,00	16	590±1,53
100	500±3,46	20	461±3,79
120	650±3,46	24	462±2,65
220	960±1,95	28	457±1,73
280	669±2,00	32	293±2,00

Média de 3 repetições

Esta dinâmica na distribuição do nitrogênio, em relação às fases de crescimento, se reflete quando avaliamos também as concentrações intracelulares de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (Tabela 13) e N-NP (Tabela 11) na biomassa cultivada. É notória a influência do N-NP, nos teores de N-TK, nas fases logarítmica e estacionária, independente do sistema de cultivo. No entanto, quando comparamos estes valores com as concentrações em nitrogênio intracelular, observam-se diferenças significativas (p≤0,05), para os teores de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, na fase logarítmica de crescimento, nos sistemas considerados. Esta forma de nitrogenado se encontra em concentrações significativamente (p≤0,05) superiores na biomassa quando o crescimento é realizado na ausência de luz, tendo como meio de cultura o efluente da indústria de laticínio. Observa-se, que o íon N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> intracelular perfaz 30% e 15,83% do nitrogênio N-NP

registrado para biomassa desenvolvida em meio heterotrófico e autotrófico, respectivamente, salientando a importante contribuição do nitrogênio intracelular nos teores de N-NP e, conseqüentemente, a influência nos resultados de quantificação de proteínas, quando o N-TK é convertido neste nitrogenado, mediante a utilização do fator 6,25. Este fato torna-se mais relevante ainda, quando o N-NP representa em torno de 35% dos teores de N-TK, na fase logarítmica de crescimento, conforme podemos verificar na Tabela 15, que apresentam a contribuição em N-NP, por diferentes compostos não nitrogenados. Lavín e Lourenço et al. (2005), reportam que quando o íon  $\text{N-NH}_4^+$  encontra-se em altas concentrações no meio intracelular de microalgas, gera alterações no metabolismo, que culminam em muitos casos, em redução ou interrupção do processo de crescimento. Esta constatação pode justificar a menor velocidade de crescimento obtida para o micro-organismo desenvolvido em meio BG-11, a qual é refletida nas concentrações celulares registradas (Tabela 12), quando os teores de biomassa são comparados em função do tempo de cultivo, com a biomassa desenvolvida no efluente da indústria de laticínios. Estes resultados demonstram não só a influência do meio de cultivo na dinâmica de distribuição dos compostos nitrogenados no micro-organismo em estudo, como também a contribuição dos diferentes metabolismos envolvidos. De acordo com Mori et al. (2003), as cianobactérias respondem a mudanças no ambiente físico químico, com adaptações fisiológicas geneticamente programadas.

**Tabela 13** - Concentração de íon amônio, nitrato e nitrito intracelular em  $\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ , na biomassa da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli, cultivada em sistema autotrófico e heterotrófico

	Início	Fase Logarítmica	Fase Estacionária
<b>Autotrófico</b>			
$\text{N-NH}_4^+$	$0,41\pm 0,03^a$	$0,38\pm 0,04^b$	$0,55\pm 0,05^c$
$\text{NO}_3^+$	$0,046\pm 0,005^d$	$0,071\pm 0,007^e$	$0,024\pm 0,003^f$
$\text{NO}_2^-$	$0,030\pm 0,005^g$	$0,009\pm 0,003^h$	$0,018\pm 0,003^i$
<b>Heterotrófico</b>			
$\text{N-NH}_4^+$	$0,39\pm 0,05^j$	$0,69\pm 0,09^k$	$0,56\pm 0,08^l$
$\text{NO}_3^+$	$0,046\pm 0,005^d$	$0,015\pm 0,003^m$	$0,083\pm 0,007^n$
$\text{NO}_2^-$	$0,038\pm 0,006^o$	$0,006\pm 0,002^h$	$0,030\pm 0,003^g$

Média de 3 repetições;  $\text{N-NH}_4^+$ : íon amônio;  $\text{NO}_3^+$ : nitrato;  $\text{NO}_2^-$ : nitrito; letras diferentes indicam diferenças significativas ( $p\leq 0,05$ ).

A literatura reporta o fato de que as microalgas são capazes de acumular sais nitrogenados não assimilados, em aminoácidos e proteínas (DORTCH et al., 1984; FLYNN et al., 1994; LAVÍN; LOURENÇO, 2005; HORNES et al., 2010). Esta constatação corrobora com os dados expressos na Tabela 13, onde se observa, para ambas as formas de cultivo, a presença intracelular de  $\text{NO}_3^{-1}$ ,  $\text{NO}_2^{-1}$  e  $\text{N-NH}_4^{+1}$ , com a predominância de íons  $\text{N-NH}_4^{+1}$ , seguindo-se de  $\text{NO}_3^{-1}$  e, em menores concentrações, o  $\text{NO}_2^{-1}$ . A ocorrência de maiores concentrações de  $\text{N-NH}_4^{+1}$ , em relação às concentrações de  $\text{NO}_3^{-1}$  e  $\text{NO}_2^{-1}$ , podem sugerir que as taxas de redução de  $\text{NO}_3^{-1}$  a  $\text{NO}_2^{-1}$  e, em seguida, a  $\text{N-NH}_4^{+1}$  podem ser mais rápidas do que a taxa de absorção de  $\text{N-NH}_4^{+1}$  pela matéria orgânica, como consequência, o  $\text{N-NH}_4^{+1}$  pode acumular (LAVÍN; LOURENÇO, 2005). Esta dinâmica, de distribuição das formas nitrogenadas inorgânicas intracelulares, armazenadas, é justificada, uma vez que o íon  $\text{N-NH}_4^{+1}$ , é o estado de oxidação do nitrogênio de mais fácil assimilação, precisando o  $\text{NO}_3^{-}$  e o  $\text{NO}_2^{-}$  primeiro, serem reduzidos, para posterior incorporação em proteínas e pigmentos (ASPÉ; MARTIR; OECKEL, 1997; LIM; KHIM; HWANG, 2003). Um importante fator, que condiciona o conteúdo intracelular de  $\text{N-NH}_4^{+1}$ ,  $\text{NO}_3^{-1}$  e  $\text{NO}_2^{-1}$  são a atividade do sistema enzimático, para a redução do nitrogênio (ASANO et al., 1995; RAMALHO et al., 1995). De acordo com Herrero et al. (2001), a maioria das cianobactérias desenvolvem um sistema para a detecção do nitrogênio disponível na forma reduzida. Quando o íon  $\text{N-NH}_4^{+1}$  está disponível, enzimas e transportadores envolvidos na assimilação de nitrogênio inorgânico, são inibidos pelo NtcA, uma proteína repressora, assim o  $\text{N-NH}_4^{+}$ , que é a forma mais reduzida do nitrogênio, portanto, não necessitando de atividade enzimática para sua redução, é absorvida. A extensão deste processo inibitório varia com a concentração de  $\text{N-NH}_4^{+}$ , estado metabólico do micro-organismo, e variáveis ambientais como, temperatura, pH e luz (VON RUCKERT; GIANI, 2004).

O aumento significativo ( $p \leq 0,05$ ) de N-NP, entre as fases logarítmicas e estacionárias de crescimento, independente do nitrogênio amoniacal intracelular, sugere a conversão do nitrogênio absorvido em componentes não proteicos, como aminoácidos livres e pigmentos.

A Tabela 14 apresenta os resultados em aminoácidos livres e pigmentos, para as biomassas, obtidas nas fases logarítmicas de crescimento, para ambos os sistemas em avaliação.

**Tabela 14** - Teores de pigmentos, e aminoácidos livres ( $\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ ), nas biomassas geradas em sistemas autotrófico e heterotrófico, na fase logarítmica de crescimento

	Clorofila- <i>a</i>	Ficocianina	Aloficocianina	Ficoeritrina	Aa livres
Autotrófico	10,7 <sup>a</sup>	77,4 <sup>b</sup>	10,4 <sup>c</sup>	1,4 <sup>d</sup>	$1,36 \times 10^{-4e}$
Heterotrófico	1,01 <sup>f</sup>	73,1 <sup>g</sup>	15,0 <sup>h</sup>	2,2 <sup>i</sup>	$1,29 \times 10^{-4j}$

Média de três repetições; Aa: aminoácidos; letras diferentes indicam diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ).

De acordo com Dortch et al. (1984), em período de carência de nitrogênio, as microalgas tendem a consumir compostos orgânicos, primeiramente, aminoácidos livres, seguido de ficobilinas, proteínas e clorofilas. Isso sugere, tomando-se como base os baixos teores em  $\text{N-NH}_4^+$ , disponibilizados no efluente da indústria de laticínio (Tabela 1), e o fato das cianobactérias assimilarem, preferencialmente,  $\text{N-NH}_4^+$  (DORTCH et al., 1984; ASPÉ; MARTIR; OECKEL, 1997; LIM; KHIM; HWANLIG, 2003; HONG; WANG; WANG, 2011), que as diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ), em aminoácidos livres, registradas na biomassa desenvolvida em condições heterotróficas, na ausência de luz, em relação a biomassa gerada em meio BG-11, a  $15 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  de luminosidade, possam ser justificadas. Nesse sentido, corroboram esta constatação as baixas concentrações em clorofila-*a* ( $1,01 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) registrada para biomassa gerada no efluente da indústria de laticínio (Tabela 5). Assim, comparando-se a Tabela 14, observa-se um comportamento diferenciado entre as contribuições em N-NP, por aminoácidos livres e pigmentos. Verifica-se uma baixa contribuição, no que se refere à geração de aminoácidos livres, nas biomassas, na ordem de  $1,36 \times 10^{-4} \text{ g}\cdot 100\text{g}^{-1}$  e  $1,29 \times 10^{-4} \text{ g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ , para o cultivo autotrófico e heterotrófico, respectivamente. No entanto, quando avaliamos a Tabela 6, é notória a contribuição em pigmentos para a fração de N-NP, perfazendo as ficobiliproteínas, associadas à clorofila-*a*, de 9 a 10% da biomassa seca. Este fato é melhor elucidado, quando avaliamos a contribuição em nitrogênio individualmente por pigmento (Tabela 15), calculada tomando como base a concentração de cada componente, a fórmula estrutural e as respectivas massas moleculares da clorofila-*a* ( $\text{C}_{55}\text{H}_{72}\text{O}_5\text{Mg}$ ; mol: 892g), aloficocianina e ficocianina ( $\text{C}_{34}\text{H}_{39}\text{N}_4\text{O}_6\text{S}$ ; mol: 629g) e ficoeritrina ( $\text{C}_{33}\text{H}_{42}\text{N}_4\text{O}_6\text{S}$ ; mol: 620g). Analisando estes dados, observa-se a grande contribuição dos pigmentos na fração de N-NP, perfazendo o nitrogênio oriundo dos pigmentos, somado ao nitrogênio amoniacal intracelular, percentuais de 47,72 e 58% do N-NP computado, para as biomassas geradas em condições autotróficas e heterotróficas,

respectivamente. Lourenço et al. (1998), reportam que a presença de substâncias nitrogenadas não proteicas, em altas concentrações, tais como clorofila, ficocianina e nitrogênio inorgânico (nitrato, nitrito e amônia), superestimam o conteúdo de proteína, quando calculada mediante conversão do nitrogênio total pelo fator 6,25. Neste sentido, os resultados obtidos neste trabalho, tornam-se extremamente importantes, quando se visa o cultivo de cianobactérias, para produção de proteínas, sob o escopo de uma biorrefinaria.

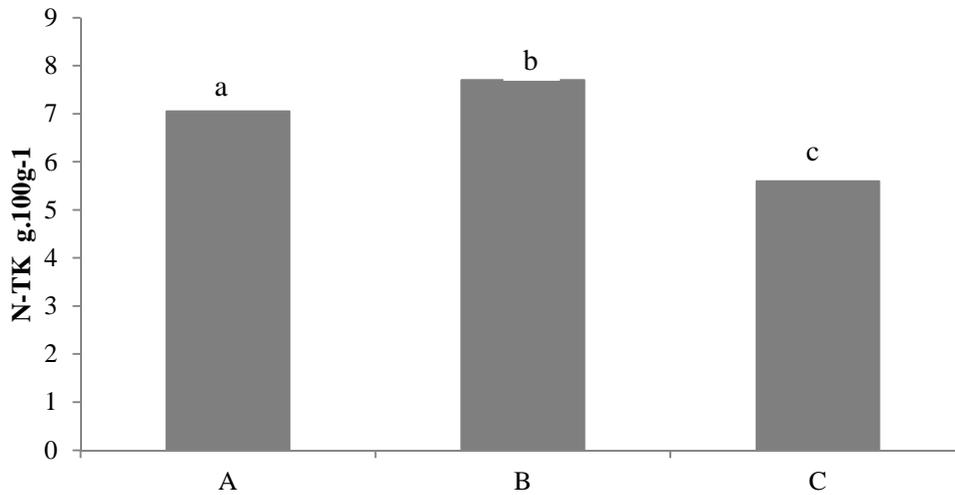
**Tabela 15** - Contribuição de nitrogênio na fração de N-NP por pigmentos e  $\text{N-NH}_4^+$  intracelular ( $\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ ), nas biomassas geradas em meios autotrófico e heterotrófico, na fase logarítmica de crescimento e porcentagem de contribuição de cada fração

	Autotrófico		Heterotrófico	
	$\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$	%	$\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$	%
Clorofila- <i>a</i>	0,0634	2,64	0,0063	0,27
Ficocianina	0,6849	28,54	0,6515	28,33
Aloficocianina	0,0890	3,71	0,1205	5,24
Ficoeritrina	0,0122	0,51	0,0192	0,83
$\text{N-NH}_4^+$	0,2956	12,32	0,5367	23,33
Total	1,1451	47,72	1,3342	58,00

Média de 3 repetições;  $\text{N-NH}_4^+$ ; íon amônio; N-NP: nitrogênio não proteico.

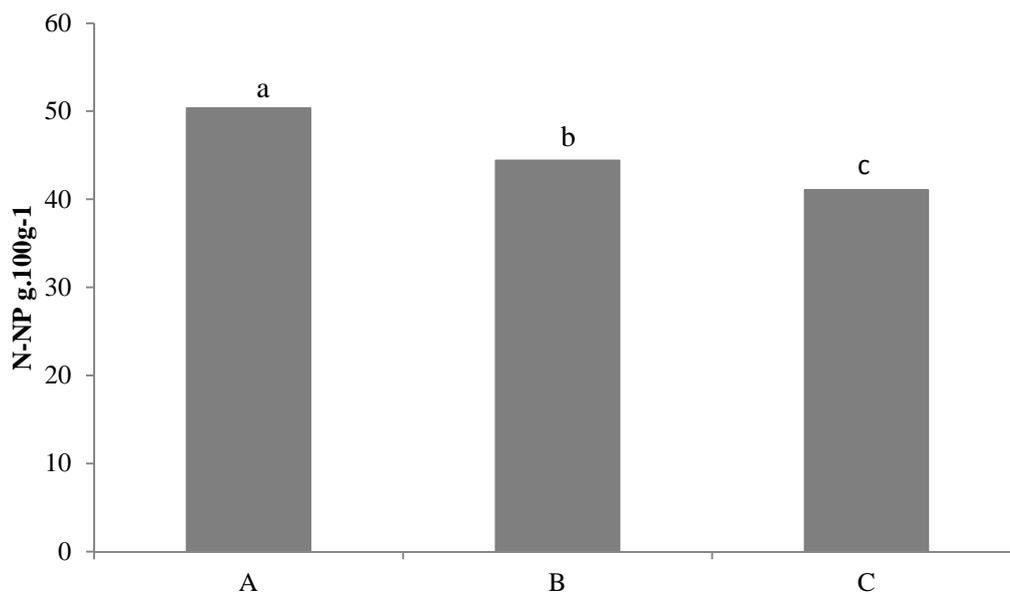
Hornes et al. (2010), avaliando a dinâmica de nitrogênio por *Aphanothece microscopica* Nägeli, desenvolvida no efluente da indústria da pesca, e em meio padrão BG-11, reportam, que os diferentes meios de cultivo, associados ao metabolismo respiratório e fotossintético, resultam em perfis distintos, quanto a composição de nitrogenados nas biomassas geradas. Esta constatação é bastante evidenciada, quando se avaliam as Figuras 11 e 12, que compara a dinâmica de distribuição de nitrogenados na biomassa de *Aphanothece microscopica* Nägeli, desenvolvida no efluente de laticínio, com a biomassa deste microorganismo cultivada em condições heterotróficas, quando é utilizado como meio de cultura diferentes efluentes agroindustriais, como o da parboilização do arroz (GOLDBECK et al., 2006) e da indústria processadora de pescado (HORNES et al. 2010).

**Figura 11** - Comparação entre os valores de N-TK em  $\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ , na biomassa da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli, na fase logarítmica, cultivada em diferentes fontes de efluentes.



N-TK: nitrogênio total kjeldahl; A (efluente da parboilização do arroz – Fonte: GOLDBECK et al., 2006); B (efluente da indústria do processamento de pescado – Fonte: HORNES et al., 2010); C (efluente de laticínios – Fonte: dados obtidos neste trabalho). Letras diferentes minúsculas indicam diferenças significativas  $\leq 0,05$ .

**Figura 12** - Comparação entre os valores de N-NP em  $\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ , na biomassa da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli, na fase logarítmica, cultivada em diferentes fontes de efluentes



N-NP: nitrogênio não proteico; A (efluente da parboilização do arroz – Fonte: GOLDBECK et al., 2006); B (efluente da indústria do processamento de pescado – Fonte: HORNES et al., 2010); C (efluente de laticínios – Fonte: dados obtidos neste trabalho). Letras diferentes minúsculas indicam diferenças significativas  $\leq 0,05$ .

Avaliando o comportamento da distribuição dos compostos nitrogenados, expressos como N-TK e N-NP, verifica-se, notadamente, a influência do meio de cultivo nos teores de N-TK e, por consequência, em N-NP. As concentrações obtidas destes constituintes diferem significativamente ( $p \leq 0,05$ ), com o meio de cultura utilizado, perfazendo os teores de N-NP a 50,35, 44,41 e 41,07%. Estes resultados sugerem a impossibilidade de utilização indiscriminada de fatores de conversão, para o cálculo de proteína em biomassa, gerada em condições heterotróficas, utilizando como meio de cultivo efluentes industriais.

## **5.4 Estimativa da produção de proteína e perfil aminoacídico**

### **5.4.1 Avaliação da concentração de proteína na biomassa de *Aphanothece microscopica* Nägeli, desenvolvida em condições autotróficas e heterotróficas**

Um dos maiores constituintes das microalgas são as proteínas, desempenhando importante papel na biorrefinaria algal (WILLIAMS; LAURENS, 2010). Devido às altas concentrações em proteína e excelente perfil aminoacídico, comparável e até mesmo superior a alimentos convencionais, como carne, arroz e feijão, as microalgas e cianobactérias vêm sendo consideradas fonte potencial em proteínas (ALOMNAR; FUCHSLOCHER; STOCKBRANDE, 1999; ANUPAMA; RAVINDRA, 2000; QUEIROZ et al., 2007b; ZEPKA et al., 2008; QUEIROZ et al., 2011).

Zepka et al. (2008) avaliaram a conversão dos nutrientes do efluente da parboilização do arroz em componentes bioquímicos, como proteínas, carboidratos e lipídios, em reator biológico de mistura perfeita a 30°C, ausência de luz e tempo de detenção hidráulica de 72 h. O perfil bioquímico da biomassa variou de 41,3% a 49,3% de proteína para a biomassa seca a diferentes temperaturas de secagem, determinada pela multiplicação dos teores de N-TK pelo fator de conversão 6,25. Avaliando-se os dados da Tabela 16, que reportam os valores de proteína nas diferentes fases de crescimento, para a biomassa *Aphanothece microscopica* Nägeli, desenvolvida em condições autotróficas e heterotróficas, observa-se que, independente das fases de crescimento, ou sistemas de cultivo, os valores obtidos são muito próximos ao reportado por Zepka et al. (2008) para este micro-organismo.

**Tabela 16** - Concentração de proteína ( $\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ ) na biomassa gerada em cultivo autotrófico e heterotrófico

	Autotrófico Proteína ( $\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ )	Heterotrófico Proteína ( $\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ )
Fase Inicial	46,7 <sup>a</sup> ±0,35	46,7 <sup>a</sup> ±0,32
Fase exponencial	45,9 <sup>b</sup> ±0,40	41,8 <sup>c</sup> ±0,37
Fase estacionária	57,0 <sup>d</sup> ±0,30	47,4 <sup>e</sup> ±0,30

Experimentos em triplicata; médias de 3 repetições; meio de cultivo heterotrófico: efluente de laticínios; cultivo fotossintético: meio BG-11; letras iguais indicam não haver diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ).

O valor da biomassa está usualmente relacionado com o conteúdo de proteína, ainda que outros constituintes representem uma parcela significativa na composição dos alimentos (ANUPAMA; RAVINDRA, 2000; VOLTOLINA et al., 2005), uma vez que a fração proteica é o maior constituinte da biomassa. Os resultados obtidos encontram-se dentro da faixa de concentração (40 a 60 %), citada por diferentes autores para diferentes microalgas, em geral, quando o teor de proteína é quantificado, utilizando 6,25 como fator de conversão de N-TK em proteína (MORIST et al., 2001; DANESI et al., 2002; ZEPKA et al., 2007). Independente das condições de cultivo, quando se avalia a fase estacionária de crescimento, verifica-se que são registradas as maiores concentrações. Estes teores são superiores ao intervalo de concentração reportado na literatura para esta cianobactéria, quer coletada diretamente do meio ambiente (30,29 a 43,71%), conforme descrito por Queiroz et al. (1998), ou cultivada no efluente da parboilização do arroz a 30°C, com mínimos e máximos de 41,33 e 46,80%, respectivamente (ZEPKA et al., 2007). Estes resultados sugerem a possibilidade de utilização desta cianobactéria com o duplo propósito de tratamento do efluente da indústria de laticínios e na produção de proteína.

A composição proteica é influenciada pela natureza da fonte nitrogenada, sendo este efeito diferenciado e dependente da espécie e da fase de crescimento (FÁBREGAS et al., 1985; LOURENÇO et al., 1998; BENNING et al., 2004). Assim, nas condições avaliadas, a maior concentração proteica (57%), foi registrada na fase estacionária para a biomassa cultivada em condições autotróficas, concentração esta, significativamente ( $p \leq 0,05$ ) superior ao registrado para a biomassa desenvolvida em condições heterotróficas. Ainda analisando os dados da Tabela 16, comparando os teores de proteína gerados em condições autotróficas e heterotróficas, observa-se um aumento significativo ( $p \leq 0,05$ ) dos teores de proteína da fase

logarítmica para a estacionária, independente das condições de cultivo. No entanto, para os teores proteicos da biomassa gerada em condições fotossintéticas as concentrações aumentaram, praticamente, de forma crescente, fato este não verificado para biomassa desenvolvida na ausência de luz, tendo como meio de cultivo o efluente do processamento de laticínio. Isso pode ser atribuído à adaptação prévia do micro-organismo ao meio BG-11, uma vez que o experimento teve início com inóculos na fase logarítmica de crescimento, desenvolvidos neste mesmo meio de cultura. Por outro lado, Utting (1985), reporta que a composição proteica é influenciada pela quantidade de nitrogênio e reduções deste nutriente resultam em decréscimo significativo dos níveis celulares de proteína. Este fato se reflete mais pronunciadamente nos teores proteicos registrados para a biomassa desenvolvida em condições heterotróficas. São registradas concentrações em proteína de 46,7%, no início do experimento, quando a concentração em N-TK no efluente era registrada como 49,2 mg.L<sup>-1</sup> e reduções nas concentrações de proteína para 41,9% na fase logarítmica de crescimento, quando a concentração em N-TK no efluente era na ordem de 30,2 mg.L<sup>-1</sup> (Tabela 16).

Von Rückert e Giani (2004), estudando a influência do meio de cultivo na produção de proteína, verificaram que as concentrações de proteína na cianobactéria *Microcystis viridis* foram superiores quando a biomassa deste micro-organismo foi gerada em meio de nitrato, quando comparada ao teor proteico quando este micro-organismo foi cultivado tendo como fonte de nitrogênio a amônia ou amônia acrescida de nitrato. Esta constatação pode justificar os maiores teores de proteína registrada em condições fotossintéticas para a biomassa de *Aphanothece microscopica* Nägeli.

#### **5.4.2 Perfil aminoacídico da biomassa de *Aphanothece microscopica* Nägeli, desenvolvida em condições autotróficas e heterotróficas**

A Tabela 17 apresenta o perfil aminoacídico para a *Aphanothece microscopica* Nägeli no início do cultivo, fase logarítmica e estacionária, quando cultivada em meio padrão BG-11 (RIPPKA et al., 1979), a 15µmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> de luminosidade e no efluente da indústria de laticínios, na ausência de luz.

**Tabela 17** – Composição de aminoácidos totais na cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli, cultivada em sistema autotrófico e heterotrófico. Resultados (g.100g<sup>-1</sup> de biomassa seca) representam a recuperação de aminoácidos após a hidrólise ácida

	Autotrófico			Heterotrófico		
	Inicial	Log	Est	Inicial	Log	Est
Isoleucina	4,7 <sup>a</sup>	6,4 <sup>b</sup>	5,8 <sup>c</sup>	4,6 <sup>d</sup>	5,7 <sup>e</sup>	3,8 <sup>f</sup>
Leucina	4,9 <sup>a</sup>	5,9 <sup>b</sup>	4,0 <sup>c</sup>	4,9 <sup>a</sup>	5,3 <sup>d</sup>	5,7 <sup>e</sup>
Lisina	3,2 <sup>a</sup>	3,0 <sup>b</sup>	3,7 <sup>c</sup>	3,2 <sup>a</sup>	3,5 <sup>d</sup>	3,4 <sup>e</sup>
Metionina	1,7 <sup>a</sup>	1,5 <sup>b</sup>	1,8 <sup>c</sup>	1,6 <sup>d</sup>	1,7 <sup>a</sup>	1,9 <sup>e</sup>
Fenilalanina	4,0 <sup>a</sup>	4,4 <sup>b</sup>	4,1 <sup>c</sup>	4,0 <sup>a</sup>	4,9 <sup>d</sup>	4,6 <sup>e</sup>
Treonina	4,0 <sup>a</sup>	4,8 <sup>b</sup>	4,5 <sup>c</sup>	4,0 <sup>a</sup>	4,1 <sup>d</sup>	4,0 <sup>a</sup>
Valina	6,3 <sup>a</sup>	6,8 <sup>b</sup>	6,2 <sup>c</sup>	6,3 <sup>a</sup>	4,6 <sup>d</sup>	5,3 <sup>e</sup>
Arginina	3,5 <sup>a</sup>	5,3 <sup>b</sup>	2,6 <sup>c</sup>	3,5 <sup>a</sup>	3,9 <sup>d</sup>	3,9 <sup>d</sup>
Histidina	1,4 <sup>a</sup>	1,7 <sup>b</sup>	1,7 <sup>c</sup>	1,4 <sup>a</sup>	1,5 <sup>d</sup>	1,2 <sup>e</sup>
Alanina	2,1 <sup>a</sup>	2,7 <sup>b</sup>	2,7 <sup>c</sup>	2,1 <sup>a</sup>	2,8 <sup>d</sup>	1,5 <sup>e</sup>
Aspartato	7,0 <sup>a</sup>	5,3 <sup>b</sup>	3,8 <sup>c</sup>	6,5 <sup>d</sup>	5,2 <sup>e</sup>	8,4 <sup>f</sup>
Cisteína	3,3 <sup>a</sup>	4,6 <sup>b</sup>	3,3 <sup>a</sup>	3,3 <sup>a</sup>	4,4 <sup>c</sup>	3,7 <sup>d</sup>
Glutamato	8,8 <sup>a</sup>	8,4 <sup>b</sup>	7,3 <sup>c</sup>	8,8 <sup>a</sup>	9,8 <sup>d</sup>	10,2 <sup>e</sup>
Glicina	3,1 <sup>a</sup>	3,0 <sup>b</sup>	3,0 <sup>b</sup>	3,1 <sup>a</sup>	3,0 <sup>b</sup>	1,9 <sup>c</sup>
Prolina	2,4 <sup>a</sup>	2,6 <sup>b</sup>	2,7 <sup>c</sup>	2,4 <sup>a</sup>	2,5 <sup>d</sup>	1,3 <sup>e</sup>
Serina	3,0 <sup>a</sup>	3,6 <sup>b</sup>	3,6 <sup>c</sup>	3,0 <sup>a</sup>	3,5 <sup>d</sup>	2,6 <sup>e</sup>
Tirosina	2,6 <sup>a</sup>	2,2 <sup>b</sup>	2,7 <sup>c</sup>	2,6 <sup>a</sup>	3,0 <sup>d</sup>	3,1 <sup>e</sup>

média de três repetições; letras diferentes na horizontal para os cultivos autotrófico e heterotrófico indicam diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre as fases de crescimento; inicial: início do experimento; log: fase logarítmica; est: fase estacionária.

A composição bioquímica das microalgas incluem componentes, como pigmentos, carboidratos, lipídios e proteínas, os quais podem indicar o estado fisiológico e metabólico do organismo. As respostas do organismo às condições ambientais, como luz temperatura, pH e composição do meio de cultivo, podem resultar em importantes modificações nas concentrações destes constituintes (CHEN et al., 2013). Assim, as concentrações em aminoácidos nas microalgas, podem se tornar amplamente variáveis, independente da espécie. No entanto, observa-se uma característica, no que se refere à predominância em determinados aminoácidos, como o ácido glutâmico e o aspártico

(BROWN, 1991; ROMANO et al., 2000; LOURENÇO et al., 2002; DANESI et al., 2003; BARBARINO; LOURENÇO, 2005; QUEIROZ et al., 2013). Observa-se, para qualquer condição avaliada, o ácido glutâmico e aspártico como aminoácidos majoritários, seguidos por valina, isoleucina e leucina. São registrados como minoritários a lisina, metionina e glicina. Os valores registrados para lisina (3,2 a 3,7 g.100g<sup>-1</sup>) e metionina (1,5 a 1,9 g.100g<sup>-1</sup>), são inferiores aos indicados pela FAO/WHO (1995), que registram valores na ordem de 5,5 e 3,5 g.100g<sup>-1</sup> de amostra para lisina e metionina, respectivamente (Tabelas 17 e 18). A carência em lisina e metionina são características de cianobactérias (CAMPANELLA; CRESCENTINI; AVINO, 1999; SATO et al., 2000; MORIST et al., 2001; OMAR, 2002). Jacob-Lopes et al. (2006) reportam, para o micro-organismo em estudo, quando cultivado no efluente da parboilização do arroz, também teores em lisina em concentrações inferiores ao indicado pela FAO, julgando a baixa concentração, podendo estar associada as possíveis perdas ocorridas durante a secagem da biomassa, uma vez que, de acordo com diferentes autores, durante o processo de secagem, a lisina pode reagir com açúcares livres, ou mesmo com a parede celular, resultando na redução dos teores deste aminoácido (YANG; WING; MCGARRY, 1980; ALOMAR; FUCHSLOCHER; STOCKBRANDS, 1999; MORIST et al., 2001). Por outro lado, as concentrações obtidas para a cisteína, são superiores as registradas para muitos alimentos convencionais, como carne bovina, feijão, trigo (PIRES et al., 2006) e arroz (SGARBIERI, 1996). De acordo com a FAO/WHO (1985), os aminoácidos metionina e cisteína podem se converter um no outro, desta forma, o padrão FAO, por conveniência, pode considera-los como um único. Esta constatação pode justificar os valores de metionina e cisteína encontrados neste trabalho.

O comportamento geral da distribuição quantitativa dos aminoácidos, em ambas as condições de cultivo, é caracterizado por apresentar valores médios significativamente superiores ( $p \leq 0,05$ ) ao registrado na fase inicial de crescimento. Os dados demonstram ligeira tendência em superioridade quanto às concentrações obtidas para biomassa gerada em condições autotróficas, tendo destaque os aminoácidos valina e arginina (Tabela 17), os quais quando a biomassa é cultivada no efluente de laticínio na ausência de luz correspondem a 39,7 e 26,4 % da concentração obtida em condições autotróficas.

Para a biomassa desenvolvida em heterotrofia, apenas os aminoácidos fenilalanina e glutamato apresentam-se em concentração superior, em relação à biomassa gerada em condições fotossintéticas, na ordem de 11,2 e 14,3%, respectivamente (Tabela 17).

### 5.4.3 Escore químico da *Aphanothece microscopica* Nägeli

Os aminoácidos padrões, de quase todas as algas, se comparam, favoravelmente, com a de outras proteínas alimentares. À medida que as células são capazes de sintetizar todos os aminoácidos, podem fornecer os essenciais para seres humanos e animais (GUILGUERRERO et al., 2004).

De acordo com Blanco e Bressani (1991), a qualidade da proteína refere-se a sua capacidade de satisfazer os requerimentos nutricionais do homem por aminoácidos essenciais para fins de síntese proteica.

A Tabela 18 apresenta a análise comparativa dos aminoácidos essenciais, obtidos para a biomassa de *Aphanothece microscopica* Nägeli, quando cultivada no efluente da indústria de laticínios, na ausência de luz, com o modelo padrão da FAO/WHO (1985) e alimentos tradicionais, como arroz e feijão, bem como seus respectivos escores químicos.

**Tabela 18** - Avaliação comparativa da composição em aminoácidos essenciais (g.100g<sup>-1</sup> de amostra) obtidos para *Aphanothece microscopica* Nägeli (fase logarítmica), cultivada em condições heterotróficas, com o padrão indicado pela FAO/WHO, arroz, feijão e escores químicos

Aminoácidos	FAO/WHO	Aphanothece	<i>EQ</i>	Arroz	<i>EQ</i>	Feijão	<i>EQ</i>
Lisina	5,8	3,5	0,60	3,8	0,66	9,4	1,62
Metionina+cisteína	2,5	6,1	2,44	5,0	2,00	2,0	0,80
Fenilalanina+tirosina	6,3	7,9	1,25	10,4	1,65	11,3	1,79
Leucina	6,6	5,3	0,80	8,2	1,24	7,8	1,18
Isoleucina	2,8	5,7	2,04	4,1	1,46	3,1	1,10
Valina	3,5	4,6	1,31	7,3	2,10	4,0	1,10
Treonina	3,4	4,1	1,21	4,3	1,28	4,8	1,41
<i>EQ</i> (%)		60,0		66,0		80,0	

*EQ*: Escore químico; Aminograma – referência (FAO/WHO, 1985); Aminograma arroz (SGARBIERI, 1996); Aminograma feijão (PIRES et al., 2006).

No Brasil, a principal fonte proteica da alimentação, é derivada da ingestão de arroz e feijão (SANTOS et al., 1979). Esta mistura tem adequado teor nitrogenado, suprimindo as necessidades em aminoácidos essenciais (PIRES et al., 2006).

O Arroz está entre os cereais mais consumidos do mundo. O Brasil é o nono maior produtor mundial, estando a produção distribuída pelos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Mato Grosso (GUIMARÃES et al., 2013).

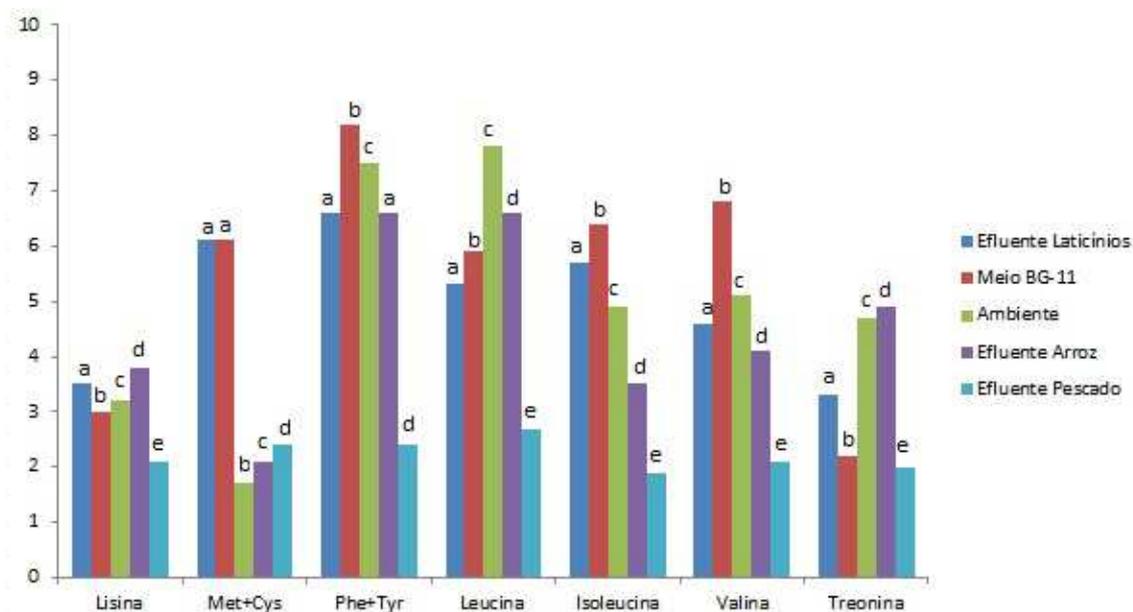
Avaliando-se, comparativamente, os dados obtidos para o micro-organismo em questão, com o padrão indicado pela FAO/WHO, e o perfil aminoacídico do arroz e do feijão, observa-se que, com exceção da lisina, metionina (já mencionada) e leucina, todos demais aminoácidos encontrados neste micro-organismo, encontram-se em concentrações superiores ao modelo FAO/WHO.

A composição de aminoácidos em uma proteína determinada por análise química é comparada com uma proteína utilizada como referência para crianças entre dois a cinco anos de idade, o então citado padrão FAO/WHO, obtendo-se o escore químico (*EQ*) de aminoácidos (FAO/1985). O *EQ* encontrado para a *Aphanothece* (60,0%) apresentou valor próximo ao reportado pela literatura para o arroz (65,55%). Jacob-Lopes et al. (2006), reportam um valor de *EQ* (65,86%) para este micro-organismo, quando cultivado no efluente da parboilização do arroz. De acordo com a FAO/WHO (1985), o aminoácido que apresentar  $EQ < 1$ , é denominado aminoácido limitante. Os dados da Tabela 18 indicam como aminoácidos limitantes para a *Aphanothece* a lisina ( $EQ=0,60$ ) e leucina ( $EQ=0,80$ ).

#### **5.4.4 Influência do meio de cultivo, no perfil aminoacídico, da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli**

O meio de cultivo é considerado um dos principais fatores que definem o valor nutricional de uma biomassa (ROMANO et al., 2000; RICHMOND, 2005; AZMA et al., 2011). Neste sentido, as Figuras 13 e 14 fornecem a avaliação comparativa do perfil de aminoácidos da *Aphanothece microscopica* Nägeli, cultivada no efluente de laticínios, em condições autotróficas e heterotróficas, no meio ambiente (QUEIROZ et al., 1998), no efluente da parboilização do arroz (JACOB-LOPES et al., 2006) e da indústria processadora de pescado (QUEIROZ et al., 2013). Avaliando-se estes dados, verificam-se notadas diferenças quantitativas ( $p \leq 0,05$ ) na composição aminoacídica.

**Figura 13** - Comparação dos teores de aminoácidos essenciais ( $\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ ) na biomassa da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli em diferentes meios de cultivo



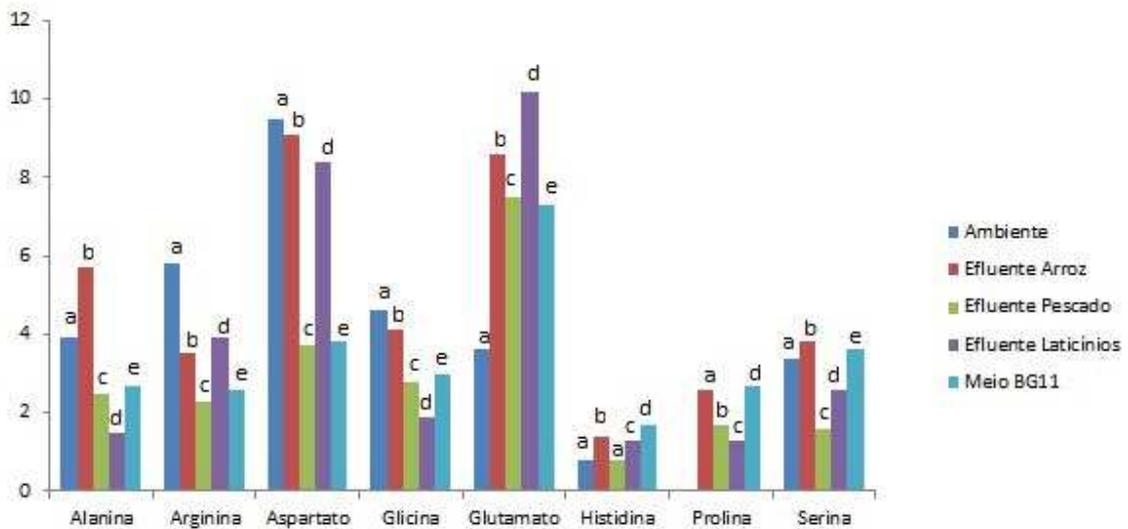
Valores médios de três repetições; letras diferentes indicam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ), quando comparados os aminoácidos em separado.

Analisando-se o comportamento da Figura 13, observa-se, que o aminoácido leucina, considerado limitante na biomassa, cultivada no efluente de laticínio, por apresentar  $EQ < 1$ , apresenta concentrações estatisticamente superiores ( $p \leq 0,05$ ), quando esta biomassa é desenvolvida no efluente da parboilização do arroz, ou no meio ambiente. Isso demonstra que, a carência em leucina não é uma característica da espécie, mas, consequência do meio de cultivo. Este fato é corroborado quando se observa o teor de leucina registrado para a biomassa desenvolvida, também, no efluente da indústria processadora de pescado. No que se refere ao perfil de aminoácidos essenciais, destacam-se, ainda, os valores de isoleucina e valina, principalmente, na biomassa desenvolvida em meio BG-11, notadamente superiores aos teores encontrados nas biomassas desenvolvidas nos demais meios de cultivo.

Na Figura 14, pode-se observar o comportamento para os aminoácidos não essenciais para as biomassas geradas nestas mesmas fontes de nutrientes. Verificam-se diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ), para maioria das biomassas, cultivadas nos diferentes meios de cultivos, considerados com comportamento similar aos aminoácidos essenciais para a biomassa gerada no efluente do processamento de pescado, para a qual são registrados os menores valores, indicando alterações no perfil aminoacídico do micro-organismo em estudo, quando cultivado no efluente da indústria da pesca. Estas constatações sugerem a

possibilidade de manipulação do meio de cultivo para melhor rendimento do perfil aminoacídico.

**Figura 14** - Comparação dos teores de aminoácidos não essenciais (g.100g<sup>-1</sup>) na biomassa da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli em diferentes meios de cultivo



Valores médios de três repetições; letras diferentes, indicam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ), quando comparados os aminoácidos em separado.

#### 5.4.5 Análise de sensibilidade da produção de proteína por *Aphanothece microscopica* Nägeli desenvolvida no efluente de laticínio

A bioconversão do nitrogênio pelo metabolismo heterotrófico é decorrente da síntese de compostos como pigmentos e proteínas (Fay, 1983).

As Tabelas 9 e 19 apresentam a variação nos teores de nitrogênio total no efluente e na biomassa de *Aphanothece microscopica* Nägeli. Observa-se uma eficiência de remoção de 73,5 de nitrogênio (tabela 9), o que sugere a conversão parcial do nitrogênio do efluente em biomassa.

Assim, se considerarmos o fator geral de conversão de nitrogênio em proteína (6,25), é possível estimar os teores proteicos da biomassa, com mais exatidão, como estando entre 26,3% e 35%, a partir da concentração em N-TK (N-TKc), a qual é obtida, quando ao valor de N-TK é subtraído o valor de N-NP (Tabela 19).

**Tabela 19** - Concentrações de proteínas (N-TKc x 6,25) corrigidas, a partir dos de nitrogênio não proteico no cultivo heterotrófico

	N-TK (g.100g <sup>-1</sup> )	N-NP (g.100g <sup>-1</sup> )	N-TKc (g.100g <sup>-1</sup> )	N-TKc x 6,25 (g.100g <sup>-1</sup> )
Início	7,5±0,12	2,2±0,26	5,3	33,1
Fase logarítmica	6,6±0,12	2,4±0,23	4,2	26,3
Fase estacionária	7,6±0,13	2,0±0,30	5,6	35,0

N-TK: nitrogênio total Kjeldahl, obtido mediante teor de proteína (Tabela 16); N-NP: nitrogênio não proteico; N-TKc: nitrogênio total Kjeldahl corrigido.

Desta maneira, o balanço de massa, no tempo de residência de 15,45-16h, no qual o N-TKc da biomassa foi 0.056 g (Tabela 19), corresponde a uma conversão do nitrogênio do efluente em proteína de 17,15 %. Este valor representa a possibilidade de produzir a partir da água residuária do efluente de laticínio, segundo a análise de sensibilidade da produção de proteína, 22.344 ton.ano<sup>-1</sup> de proteína (Tabela 20).

**Tabela 20** - Balanço de nitrogênio do processo de conversão de nitrogênio em proteína

Parâmetros	Valores
Volume de efluente (L.ano <sup>-1</sup> )	319.200.000
Nitrogênio no efluente (g.m <sup>3</sup> )	32
Nitrogênio total gerado (ton.ano <sup>-1</sup> )	102,14
Produtividade em biomassa (ton.ano <sup>-1</sup> )	63.840
Produtividade anual em proteína (mg.g <sup>-1</sup> )	350
Produtividade anual em proteína (ton.ano <sup>-1</sup> )	22.344

## 6 CONCLUSÃO

A produção de clorofila-*a* por *Aphanothece microscopia* Nägeli, a partir do efluente do processamento de laticínios, a 20°C, é controlada pelos fatores concentração inicial de inóculo, razão C/N e razão N/P. Ficou demonstrado que a melhor condição para produção de pigmentos, quando este micro-organismo é cultivado no efluente da indústria processadora de laticínio, a 20°C, tomando como base a produção de clorofila-*a*, que razão C/N 20, N/P 10 e concentração de inóculo de 200 mg.L<sup>-1</sup>, expressam as melhores condições de cultivo;

A velocidade específica máxima de crescimento, para o micro-organismo desenvolvido no efluente de laticínio, é 10 vezes maior que a registrada para o meio BG-11. Assim, os dados cinéticos obtidos, demonstram a potencialidade de exploração de bioprocessos, para a geração de insumos intermediários, ou produtos finais na indústria de alimentos, utilizando como meio de cultivo o efluente da indústria de laticínios;

O efeito das condições de cultivo foram marcantes, principalmente, quanto à produção de clorofila-*a*, notadamente superior em condições autotróficas, quando comparada ao cultivo heterotrófico, e de ficoeritrina, em que foram registradas concentrações na ordem de 57% maiores em cultivo heterotrófico, em relação ao fotossintético;

A *Aphanothece microscopica* Nägeli caracterizou-se por apresentar alta relação ficocianina/aloficocianina;

A produção de ficocianina, embora significativamente superior em meio fotossintético, não diferiu quantitativamente, ao se comparar este comportamento com a produção de clorofila-*a* e ficoeritrina;

A avaliação da dinâmica de distribuição dos compostos nitrogenados, demonstrou que os pigmentos são os responsáveis pela maior contribuição em nitrogênio não proteico, seguido do nitrogênio amoniacal intracelular;

Os resultados obtidos neste trabalho indicam a inadequação do uso de fatores de conversão para quantificar proteína em cianobactérias, a partir dos teores de nitrogênio total Kjeldhal, quando se visa à produção de proteína unicelular, sob escopo de uma biorrefinaria agroindustrial.

Os aminogramas das biomassas geradas indicam, para qualquer condição avaliada, o ácido glutâmico e o aspártico, como aminoácidos majoritários, seguidos por valina, isoleucina e leucina e, como minoritários, os aminoácidos, lisina, metionina e glicina;

A análise comparativa dos aminogramas, descritos para as biomassas geradas, em condições autotróficas e heterotróficas, demonstram ligeira superioridade em concentração, quando a biomassa é gerada em condições fotossintéticas. São destaques nestes aminogramas, os aminoácidos arginina e valina, na ordem de 39,4 e 26,4%, fazendo-se destaque ainda, o glutamato e fenilalanina, na biomassa gerada em heterotrofia, em concentrações superiores na ordem de 11,2 e 14,3 %, respectivamente, em relação a biomassa gerada em autotrofia;

Os valores de  $EQ$ , obtidos para a biomassa de *Aphanothece microscopica* Nägeli, cultivada nas condições experimentais, indicaram o aminoácido lisina e leucina, como aminoácidos limitantes. No entanto, a carência em leucina, indicada pelo valor de  $EQ < 1$ , não representa uma característica da espécie, mas uma consequência do meio de cultivo;

As diferenças registradas para o perfil aminoacídico, para as biomassas obtidas em diferentes meios de cultivo, sugerem a possibilidade de manipulação do meio de cultivo, para melhor rendimento do perfil aminoacídico;

O efluente da indústria de laticínio é um meio de cultivo em potencial para a biorrefinaria microalgal;

A análise de sensibilidade demonstrou, que substanciais produções de biomoléculas, como pigmentos e proteínas, podem ser obtidas, em condições otimizadas (concentrações iniciais de inóculo de  $200\text{mg.L}^{-1}$ , razões C/N de 20 e razões N/P de 10) a partir do efluente da indústria processadora de laticínios, na ordem de até  $134\text{ ton.ano}^{-1}$  de clorofila-*a*,  $5.043,4\text{ ton.ano}^{-1}$  de ficocianina,  $957,6\text{ ton.ano}^{-1}$  de aloficocianina,  $140\text{ ton.ano}^{-1}$  de ficoeritrina e  $22.344\text{ ton.ano}^{-1}$  de proteína. Em paralelo a produção de pigmentos, foram evidenciadas conversões de 96,9% (matéria orgânica), 73,5% (nitrogênio total) e 89,8% (fósforo total) do efluente, enquadrando-o dentro dos padrões exigidos pela legislação. Desta forma, a implementação do conceito do biorrefino, neste tipo de agroindústria, poderá representar importantes possibilidades de aproveitamento sustentável dos recursos.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-RAOUF, N.; AL-HOMAIDAN, A. A.; IBRAHEEM, I. B. M. Microalgae and wastewater treatment. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 19, p. 257–275, 2012.
- ABELSON, P. H. A potential phosphate crisis, **Science**, v. 283 p. 2015, 1999.
- ADAMS, D. G. **Symbiotic interactions**. In: Whitton, B, Potts, M. (eds.). Ecology of cyanobacteria: their diversity in time and space. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 523–561, 2000.
- ADIR, N.; ZER, H.; SHOCHAT, S.; OHAD, I. Photoinhibition – a historical perspective, **Photosynthesis Research**, v. 76, p. 343–370, 2003.
- AGUILAR, M. I.; SÁEZ, J.; LLORÉNS, M.; SOLER, A.; ORTUÑO, J. F. Nutrient removal and sludge production in the coagulation-flocculation process. **Water Research**, v. 36, p. 2910-2919, 2002.
- AJAYAN, K. V.; SELVARAJU, M.; THIRUGNANAMOORTHY, K. Enrichment of chlorophyll and phycobiliproteins in *Spirulina platensis* by the use of reflector light and nitrogen sources: An in-vitro study. **Biomass and Bioenergy**, v. 47, p. 436-441, 2012.
- ALOMAR, D.; FUCHSLOCHER, R.; STOCKBRANDS, S. Effects of oven or freeze-drying on chemical composition and NIR spectra of pasture silage. **Animal Feed Science and Technology**. v. 80, p. 309-319, 1999.
- ANAGNOSTIDIS, K.; KOMÁREK, J. Modern Approach to the classification system of cyanophytes 3 - Oscillatoriales. **Archiv für Hydrobiologie Algological Studies**, v. 80, p. 327-472, 1988.
- ANUPAMA, P.; RAVINDRA, L. Value-added food: Single cell protein. **Biotechnology Advances**, v. 18, p. 459-479, 2000.
- ASANO, C. S.; COLEPICOLO, P.; AIDAR, E. Nitrate reductase activity in the diatom *Biddulphia longicruris*: characterization and daily oscillation. **Boletim do Instituto Oceanográfico**, S Paulo, v. 43, p. 123-128, 1995.
- ASPÉ, E.; MARTÍ, M. C.; ROECKEL, M. Anaerobic treatment of fishery wastewater using a marine sediment inoculum. **Water Research**, v. 31, p. 2147-2160, 1997.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official Methods of Analysis**, 15th ed. Washington, DC, 2000.
- APHA - **American Public Health Association**. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater , 21st Edition, 2005.
- ARDELEAN, I.; ZARNEA, G. **Photosynthesis respiration interplay in cyanobacteria: Fundamentals and Application**. In: Subramanian, G.; Kaushik, B. D.; Venkataraman, G. S. Cyanobacterial Biotechnology. Science Publishers, Inc., USA. p. 103-107, 1998.

AUSTIN, P. A.; ROSS, I. S.; MILLS, J. D. Regulation of pigment content and enzyme activity in the cyanobacterium *Nostoc* sp. Mac grown in continuous light, a light-dark photoperiod, or darkness. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, v. 1277, n. 1–2, p. 141–149, 1996.

ÁVILA-LEON, I.; CHUEI MATSUDO, M.; SATO, S.; DE CARVALHO, J. C. M. *Arthrospira platensis* biomass with high protein content cultivated in continuous process using urea as nitrogen source. **Journal Applied Microbiology**, v. 112, p. 1086–1094, 2012.

AZMA, M.; MOHAMED, M. S.; MOHAMAD, R.; RAHIM, R. A.; ARIFF, A. B. Improvement of medium composition for heterotrophic cultivation of green microalgae, *Tetraselmis suecica*, using response surface methodology. **Biochemical Engineering Journal**, v. 53, p. 187–195, 2011.

BALASUNDARAM, B.; SKILL, S. C.; LLEWELLYN, C. A. A low energy process for the recovery of bioproducts from cyanobacteria using a ball mill. **Biochemical Engineering Journal**, v. 69, p. 48–56, 2012.

BARBARINO, E.; LOURENÇO, S. O. An evaluation of methods for extraction and quantification of protein from marine macro and microalgae. **Journal Applied Phycology**, v. 17, p. 447–460, 2005.

BARSANTI, L.; GUALTIERI, P. Algae: Anatomy. **Biochemistry and Bioengineering**, p. 1–34, 2006.

BÁSACA-LOYA, G. A.; VALDEZ, M. A.; ENRÍQUEZ-GUEVARA, E. A.; GUTIÉRREZ-MILLÁN, L. E.; BURBOA, M. G. Extraction and purification of B-phycoerythrin from the red microalga *Rhodospira rubra*. **Ciencias Marinas**, v. 35, n. 4, 359–368, 2009.

BASTOS, R. G.; QUEIROZ, M. I.; BENERI, R. L.; ALMEIDA, R. V. Evaluación del Crecimiento de la *Aphanethece microscopica* Nägeli en las Aguas Residuales de la Parboilización del Arroz. **Información Tecnológica**, La Serena, Chile, v. 13, n.1, p. 61–65, 2002.

BASTOS, R. G.; QUEIROZ, M. I.; ALMEIDA, T. L.; ALMEIDA, R. V.; BENERI, R. L. Remoção de Nitrogênio e Matéria Orgânica do Efluente da Parboilização do Arroz por *Aphanethece microscopica* Nägeli na Ausência de Luminosidade. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 9, p. 112–116, 2004.

BASTOS, R. G.; ZEPKA, L.; LOPES, E.; SEVERO, M.; VOLPATO, G.; QUEIROZ, M. I. Bioconversão do nitrogênio do efluente da parboilização do arroz por incorporação em biomassa da cianobactéria *Aphanethece microscopica* Nägeli. **Revista Ambiente & Água**, v. 5, p. 258–264, 2010.

BASTOS, R. G.; BONINI, M. A.; ZEPKA, L. Q.; JACOB-LOPES, E.; QUEIROZ, M. I. Treatment of rice parboiling wastewater by cyanobacterium *Aphanethece microscopica* Nägeli with potential for biomass products. **Desalination and Water Treatment**, p. 1–7, 2014.

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

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

BENEMANN J. R. Production of nitrogen fertilizer with nitrogen-fixing blue green algae. **Enzyme Microbiology Technology**, v. 1, p. 83–90, 1979.

BELTRAN-HEREDIA, J.; TORREGROSA, J.; DOMINGUEZ, J. R.; GARCÍA, J. Aerobic biological treatment of black table olive washing wastewaters: effect of an ozonation stage. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 1183–1190, 2000.

BENNING, L. G.; PHOENIX, V. R.; YEE, N.; TOBIN, M. J. Molecular characterization of cyanobacterial silicification using synchrotron infrared micro-spectroscopy. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 68, p. 729-741, 2004.

BERGES, J. A. Algal nitrate reductases. **European Journal of Phycology**, v. 32, n. 1, p. 3-8, 1997.

BERMEJO ROMÁN, R.; ALVÁREZ-PEZ, J. M.; ACIÉN FERNÁNDEZ, F. G.; MOLINA GRIMA, E. Recovery of pure B-phycoerythrin from the microalga *Porphyridium cruentum*. **Journal of Biotechnology**, v. 93, p. 73–85, 2002.

BLANCO, A.; BRESSANI, R. Biodisponibilidad de aminoácidos en el frijol (*Phaseolus vulgaris*). **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, Venezuela, v. 41, n. 1, p. 38-51, 1991.

BOROWITZKA, M. A. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. **Journal of Biotechnology**, v. 70, p. 313–321, 1999.

BROWN, E.M. Extracellular Ca<sup>2+</sup> sensing, regulation of parathyroid cell function and role of Ca<sup>2+</sup> and other ions as extracellular (first) messengers. **Physiological Reviews**, v. 71, p. 371-411, 1991.

BURJA, A.; BANAIGS, B.; ABOU-MANSOUR, E.; BURGESS, J.; WRIGHT, P. Marine cyanobacteria-a prolific source of natural products. **Tetrahedron**, v. 57, n. 590, p. 9347-9377, 2001.

CAMPANELLA, L.; CRESCENTINI, G.; AVINO, P. Chemical composition and nutritional evaluation of some natural and commercial food products based on *Spirulina*. **Analysis**, v.27, p. 533-540, 1999.

CAMPBELL, D.; ERIKSSON, M. J.; OQUIST, G.; GUSTAFSSON, P.; CLARKE, A. K. The cyanobacterium *Synechococcus* resists UV-B by exchanging photosystem II reaction-center D1 proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 95, 364-369, 1998.

CHAIKLAHAN, R.; NATTAYAPORN, C.; WIPAWAN, S.; KALYANEE, P.; BOOSYA, B. Cultivation of *Spirulina platensis* using pig wastewater in a semi-continuous process. **Journal Microbiology Biotechnology**, v. 20, p. 609–14, 2010.

CHEN, F. High cell density culture of microalgae in heterotrophic growth. **Trends Biotechnology**, v. 14, n.11, p. 421–426, 1996.

CHEN, X.; YVONNE GOH, Q.; TAN, W.; HOSSAIN, I.; CHEN, W.; LAU, R. Lumostatic strategy for microalgae cultivation utilizing image analysis and chlorophyll a content as design parameters. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 6005–6012, 2011.

CHEN, Y.; VAIDYANATHAN, S. Simultaneous assay of pigments, carbohydrates, proteins and lipids in microalgae. **Analytica Chimica Acta**, v. 776, p. 3–40, 2013.

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

COHEN, Y.; GUREVITZ, M. **The cyanobacteria – Ecology, physiology and molecular genetics**. In: Dworkin, M.; Falkows, S.; Rosemberg, E.; Schleifer, K. H.; Stackebrandt, E.; (ed.) *The procaryotes*. 3.ed, New York, Springer-Verlag, v. 4, p. 1074-1098, 2006.

CONTRERAS, E. M.; GIANNUZZI, L.; ZARITZKY, N. E. Growth kinetics of the filamentous microorganism *Sphaerotilus natans* in a model system of a food industry wastewater. **Water Research**, v. 34, p. 4455-4463, 2000.

CONVERTI, A.; SCAPAZZONI, S.; LODI, A.; CARVALHO, J. C. M. Ammonium and urea removal by *Spirulina platensis*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 33, n. 1, p. 8-16, 2006.

CORNET, J. F. Le technoscope: les photobioréacteurs. **Biofutur**, v. 176, p. 1–10, 1998.

COUTINHO, R., 1982. **Taxonomia, distribuição, crescimento sazonal, reprodução e biomassa das algas bentônicas no estuário da Lagoa dos Patos (RS)**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 232p.

DANESHKHAH, A.; BEDFORD, T. Probabilistic sensitivity analysis of system availability using Gaussian processes. **Reliability Engineering and System Safety**. v. 112, p. 82–93, 2013.

DANESI, E. D. G.; RANGEL-YAGUÍ, C. O.; CARVALHO, J. C. M.; SATO, S. An investigation of the effect of replacing nitrate by urea in the growth and production of chlorophyll by *Spirulina platensis*. **Biomass Bioenergy**, v. 23, p. 261-269, 2002.

DANESI, E. D. G.; RANGEL-YAGUI, C. O.; CARVALHO, J. C. M.; SATO, S. Effect of reducing the light intensity on the growth and production of chlorophyll by *Spirulina platensis*. **Biomass and Bioenergy**, v. 26, n. 4, p. 329-335, 2004.

DAVID, C.; ENRIQUE, M.; THAMAR, P.; CARIDAD, DE H.; LARS, W.; DANIEL, S.; SAMUEL C.; DELIA, M.; GEOFFREY A. C.; ANTONIO Q. Anatoxin-a occurrence and potential cyanobacterial anatoxin-a producers in spanish reservoirs. **Journal of Phycology**, v. 43, p. 1120–1125, 2007.

DE-BASHAN, L. E.; MORENO, M.; HERNANDEZ, J. P.; BASHAN, Y. Removal of ammonium and phosphorus ions from synthetic wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* coimmobilized in alginate beads with the microalgae growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. **Water Research**, v. 36, p. 2941–2948, 2002.

DE-BASHAN, L. E., BASHAN, Y. Immobilized microalgae for removing pollutants:review of practical aspects. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 1611–1627, 2010.

DE LORENZO, M. **Relação de nutrientes de fatores ambientais na ocorrência de cianobactérias *Aphanothece* sp., ao redor da cidade do Rio Grande.** FURG: Curso de Oceanografia. (Trabalho de Graduação), 1995.

DEVI, M. P.; SUBHASH, G. V.; MOHAN, S. V. Heterotrophic cultivation of mixed microalgae for lipid accumulation and wastewater treatment during sequential growth and starvation phases: effect of nutrient supplementation. **Renewable Energy**, v. 43, p. 276-283, 2012.

DILLON, J. C.; PHAN, P. A Spirulina as a source of proteins in human nutrition. In: Doumengue, F.; Durand-Chastel, H.; Toulemont, A. (eds) Spiruline algue de vie Musée Océanographique, v. 12. **Bulletin de Institut Océanographique**, Monaco, p. 103–107, 1993.

DISMUKES, G.; CARRIERI, D.; BENNETTE, N.; ANANYEV, G.; POSEWITZ, M. Aquatic phototrophs: efficient alternatives to land-based crops for biofuels. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 19, p. 235-240, 2008.

DORTCH, Q.; CLAYTON, J. R. JR.; THORENSEN, S. S.; AHMED, S. I. Species differences in accumulation of nitrogen pools in phytoplankton. **Marine Biology**, v. 81, p. 237–50, 1984.

DUMAS, A.; LALIBERÉ, G.; LESSARD, P.; DE LA NOÛE, J. Biotreatment of fish farm effluents using the cyanobacterium *Phormidium bohneri*. **Aquacultural Engineering**, v. 17, p. 57-68, 1998.

ESQUIVEL, B.; VOLTOLINA, D.; SANDOVAL, F.C. The biochemical composition of two diatoms after different preservation techniques. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 105, p. 369-373, 1993.

ESTELA, J. M.; CERDÁ, V. Flow analysis techniques for phosphorus: An overview, **Talanta**, v. 66, p. 307–331, 2005.

FÁBREGAS, J.; HERRERO, C.; CABEZAS, B.; ABALDE, J. Mass culture and biochemical variability of the marine microalgae *Tetraselmis suecica* (Kyllin) Butch with high nutrients concentrations. **Aquaculture**, v. 49, p. 231-244, 1985.

FAO/WHO. **Report of ad Hoc Expert Committee on energy and protein requirements.** Tech. Report. Series 522. WHO, Roma, 1985.

FAY, P. **The blue-greens (Cyanophyta-Cyanobacteria).** First published in Great Britain. p. 01-88, 1983.

FERRUZI, M. G.; BLAKESLEE, J. Digestion, absorption, and cancer preventive activity of dietary chlorophyll derivatives. **Nutrition Research**, v. 27, p. 1-12, 2007.

FLYNN, K. J.; DAVIDSON, K.; LEFTLWY, J. W. Carbon:nitrogen relations at whole cell and free amino acid levels during batch growth of *Isocrysis galbana* (Prasinophyceae) under conditions of altering light and dark. **Marine Biology**, v. 188, p. 229-237, 1994.

FLORES, E.; HERRERO, A. **Assimilatory nitrogen metabolism and its regulation**. In: Bryant, D.A., (Ed.). *The Molecular Biology of Cyanobacteria*, p. 487–517. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1994.

GANTT, E. Phycobilisomes. **Annual Review Plant Physiology**, v. 32, p. 327-347, 1981.

GARCÍA-FERNANDÉZ, J. M.; DIEZ, J. Adaptive mechanisms of nitrogen and carbon assimilatory pathways in the marine cyanobacteria *Prochlorococcus*. **Research in Microbiology**, v. 155, n. 10, p. 795-802, 2004.

GASPERI, J.; GARNAUD, S.; ROCHER, V.; MOILLERON, R. Priority pollutants in wastewater and combined sewer overflow. **Science Total Environmental**, 407, 263–272, 2008.

GLAZER, A. N.; STRYER, L. Phycofluor probes. **Trends Biochemistry Science**, v.9, p.423-427, 1984.

GLAZER, A. N.; MELIS, A. Photochemical Reaction Centers: Structure, Organization, and Function. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 38, p. 11-45, 1987.

GEIDER, R. J.; OSBORNE, B. A. Respiration and microalgal growth: a review of the quantitative relationship between dark respiration and growth. **New Phytologist**, v. 112, n. 3, p. 327-341, 1989.

GOLDBECK, R.; SILVA, A. G.; JACQUES, A. C.; COGO, S. L.; MITTERER, M. L.; QUEIROZ, M. I. Relação entre o nitrogênio total e não-proteico na cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli, **Vetor**, Rio Grande, v. 16, n. 1/2., p. 47-53, 2006.

GUERRERO, L.; OMIL, F.; MENDEZ, R.; LEMA, J. M. Protein recovery during the overall treatment of wastewaters from fish-meal factories. **Bioresource Technology**, v. 63, p. 221–229, 1998.

GUERRERO, L.; OMIL, F.; MÉNDEZ, R.; LEMA, J. M. Anaerobic hidrolisis and acidogenesis of wastewaters from food industries with high content of organic solids and protein. **Water Research**, v. 33, p. 3281-3290, 1999.

GUIL-GUERRERO, J. L.; NAVARRO-JUAREZ, A.; LÓPEZ-MARTINEZ, J. C.; CAMPRAMADRID, P.; REBOLLOSO-FUENTES, M. M. Functional properties of the biomass of three microalgal species. **Journal of Food Engineering**, n. 30, p. 312-318, 2004.

GUIMARÃES, I. C. O.; PEREIRA, J.; CORNÉLIO, V. M. O.; BATISTA, L. R.; FERREIRA, E. B. Qualidade tecnológica do arroz branco polido submetido à irradiação gama (Co60). **Revista Ceres**, v. 60, n. 6, p. 752-756 Universidade Federal de Viçosa, Vicosá, Brasil, 2013.

GUIRY, M. D., GUIRY, G. M. **Algae Base: World-wide electronic publication**, National University of Ireland, Galway. 2014. Disponível em: <http://www.algaebase.org>. Acesso em: 10 Jul. 2014, 17:50.

GUPTA, V.; RATHA, S. K.; SOOD, A.; CHAUDHARY, V.; PRASANNA, R. New insights into the biodiversity and applications of cyanobacteria (blue-green algae)—Prospects and challenges. **Algal Research**, v. 2, P. 79–97, 2013.

HALPERIN, D. R.; ZULPA DE CAIRE, G.; ZACCARO, M. C. Contenido Proteico de *Aphanothece stagnina* (Sprengel). A. Braun (Cyanophyta, Chorococcaceae). **Physis sección B**, v. 33, p. 159-164, 1974.

HARUN, R.; SINGH, M.; FORDE GARETH, M.; DANQUAH MICHAEL, K. Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. **Renewable Sustainable Energy Review**, v.14, p. 1037-47, 2010.

HEMLATA; FATMA T. Screening of cyanobacteria for phycobiliproteins and effect of different environmental stress on its yield. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 83 p. 509-515, 2009.

HENRIKSON, R. **Earth Food Spirulina. How this remarkable blue-green algae can transform your health and our planet**, Ronore Enterprises Inc., Laguna Beach, California; CA: Ronore Enterprises p. 180, 1989.

HERRERO, A.; MURO-PASTOR, A. M.; FLORES, E. Nitrogen control in cyanobacteria. **Journal of Bacteriology**, v. 183, p. 411-425, 2001.

HERRERO, M.; IBÁÑEZ, E.; SIÑORANS, J.; CIFUENTES, A. Pressurized liquid extracts from spirulina platensis microalgae determination of their antioxidant activity and preliminary analysis by micellar eletrokinetics chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 1047, p. 195-203, 2004.

HOEK, C. V.; MANN, D. G.; JAHNS, H. M. **Algae: An introduction to phycology**. Oakleigh: Cambridge University Press, 1995.

HONG, H. S.; WANG, Y. J.; WANG, D. Z. Response of phytoplankton to nitrogen addition in the Taiwan strait upwelling region: Nitrate reductase and glutamine synthetase activities. **Continental Shelf Research**, v. 31, p. 557-566, 2011.

HORNES, M.; SILVA, A. G; MITTERER, M. L; QUEIROZ, M. I. Influência dos compostos nitrogenados na concentração de proteína da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, p. 1-371, 2010.

HU, Q.; SOMMERFELD, M.; JARVIS, E.; GHIRARDI, M.; POSEWITZ, M.; SEIBERT, M.; DARZINS, A. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. **Plant Journal**, v. 54, p. 621-639, 2008.

HUMPHREY A. M. Chlorophyll as a colour and functional ingredient. **Journal Food Science**, v. 69, p. 422-425, 2004.

JACOB-LOPES, E.; ZEPKA, L. Q.; QUEIROZ, M. I.; NETTO, F. M. Caracterização da fração proteica da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli cultivada no efluente da parboilização do arroz. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 2, p. 482-488, abril-junho, 2006.

JACOB-LOPES, E.; ZEPKA, L. Q.; QUEIROZ, M. I.; NETTO, F.M. Influência das condições de secagem nas propriedades funcionais da *Aphanothece microscopica* Nägeli cultivada no efluente da parboilização do arroz. **Boletim CEPPA**, Curitiba, v. 25, n. 2, p. 275-284, 2007.

JACOB-LOPES, E.; SCOPARO, C. H.; FRANCO, T. T. Rates of CO<sub>2</sub> removal by *Aphanothece microscopica* Nägeli in tubular photobioreactors. **Chemical Engineering and Processing**, v. 47, p. 1371-1379, 2008.

JACOB-LOPES, E.; SILVA, L. M. C. F. L.; FRANCO, T. T. Biomass production and carbon dioxide fixation by *Aphanothece microscopica* Nägeli in a bubble column photobioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 40, p. 27-34, 2008.

JACOB-LOPES, E.; SCOPARO, C. H. G.; QUEIROZ, M. I.; FRANCO, T. T. Biotransformations of carbon dioxide in photobioreactors. **Energy conversion and management**, v. 51, n. 11, p. 894-900, 2010.

JACOB-LOPES, E.; SANTOS, A. M.; RODRIGUES, D. B.; LUI, M. C. Y.; SOUZA, C.; PRUDENTE, D.; ZEPKA, L. Q. **Bioprocesso de conversão de efluentes híbridos, biorreator heterotrófico, bioprodutos e seus usos**. 2013, Brasil. BRPI 10 2013 020471 4, 2013.

JANAUN, J, ELLIS, N. Perspectives on biodiesel as a sustainable fuel. **Renew Sustain Energy Review**, v. 14, p. 1312-1320, 2010.

JANCZUKOWICZ, W.; ZIELINSKI, M.; DEBOWSKI, M. Biodegradability evaluation of dairy effluents originated in selected sections of dairy production. **Bioresource Technology**, New York, v. 99, n.10, p.4199–4205, 2008.

JEFFERSON, B.; BURGESS, J. E.; PICHON, A.; HARKNESS, J.; JUDD, S. J. Nutrient addition to enhance biological treatment of greywater. **Water Research**, v. 35, p. 2702-2710, 2001.

JEFFREY, S. W.; HUMPHREY, G. F. New spectrophotometric equations for the determination of chlorophylls a, b, c1, and c2 in higher plants, algae, and natural phytoplankton. **Biochemistry Physiology Pflanzen**, v. 167, p. 191-194, 1975.

JIMÉNEZ, J. M.; COSSÍO, B.; LABELLA, D.; NIEL., X. The feasibility of industrial production of *Spirulina* in Southern Spain. **Aquaculture**, v. 217, p. 179-190, 2003.

JOHNSON, E. M.; KUMAR, K.; DAS, D. Physicochemical parameters optimization, and purification of phycobiliproteins from the isolated *Nostoc* sp. **Bioresource Technology**, v. 166, p. 541–547, 2014.

KAMM, B.; KAMM, M. Principles of biorefineries. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, p. 137-145, 2004.

KAPLAN, K.; RICHMOND, A. E.; DUBINSKY, Z.; AARONSON, S. **Algal nutrition**. In: Richmond, A. E. (Ed.), *CRC Handbook of Microalgal Mass Culture*. CRC Press, Boca Raton, 1986.

KIM, S. H.; MOON, S. Y.; YOON, C. H.; YIM, S. K.; CHO, J. W. Role of coagulation in membrane filtration of wastewater for reuse. **Desalination**, v. 173, p. 301-307, 2005.

KNOLL, A. H. **Cyanobacteria and Earth history, in The Cyanobacteria**. In: Herrero, A.; Flores, E. (Eds.). *Molecular Biology, Genomics and Evolution*, Caister Academic Press, Norfolk, p. 1-19, 2008.

KOMÁREK, J. **Modern classification of cyanobacteria**. In: Sharma, N. K.; Rai, A. K.; Stal, L. J. (eds.). *Cyanobacteria: An Economic Perspective*, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK., 2014.

KUHAD, R. C.; SINGH, A.; TRIPATHI, K. K.; SAXENA, R. K.; ERIKSSON, K. E. L. Microorganisms as an alternative source of protein. **Nutrition Reviews**, v. 55, p. 65-75, 1997.

KUMAR, M. S.; MIAO, Z. H.; WYATT, S. K. Influence of nutrient loads, feeding frequency and inoculum source on growth of *Chlorella vulgaris* in digested piggery effluent culture medium. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 6012–6018, 2010.

KURSAR, T. A.; VAN DER MEER, J.; ALBERTE, R. S. Light-Harvesting System of the Red Alga *Gracilaria tikvahiae*. I. Biochemical Analyses of Pigment Mutations. **Plant Physiology**, v. 73, p. 353-360, 1983.

LARA, C.; GUERRERO, M. G. **Interactions between carbon and nitrogen metabolism**. In: Rai, A. K. (ed.), *Cyanobacterial nitrogen metabolism and environmental biotechnology*, New York Springer-Verlag; Vanarasi: Narosa Publishing house, p. 131-148, 1997.

LAVÍN, P. L.; LOURENÇO, S. O. An evaluation of the accumulation of intracellular inorganic nitrogen pools by marine microalgae in batch cultures. **Brazilian journal of oceanography**, v. 53, n. ½, 55-68, 2005.

LEHNINGER, A.; NELSON, D. L.; COX, M. C. **Principles of Biochemistry**, W. H. Freeman & Co., New York, 4th ed., 1119 p., 2005.

LEM, N.; GLINCK, B. Biotechnological uses of cyanobacteria. **Biotechnology Advances**, v. 3, p. 195-208, 1985.

LEVINE, R. B.; COSTANZA-ROBINSON, M. S.; SPATAFORA, G. A. *Neochloris oleoabundans* grown on anaerobically digested dairy manure for concomitant nutrient removal and biodiesel feedstock production. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, n. 1, p. 40-49, 2011.

LI, Y.; WANG, B.; WU, N.; LAN, C. Q. Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid production of *Neochloris oleoabundans*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 81, n. 4, p. 629-6, 2008.

LYBERATOS, G.; GAVALA, H. N.; STAMATELATOU, A. An integrated approach for management of agricultural industries wastewaters. *Nonlinear Analysis. Theory Methods e Applications*, v. 30, n. 4, p. 2341-2351, 1997.

LIM, J.; KIM, T.; HWANG, S. Treatment of fish-processing wastewater by co-culture of *Candida rugopelliculosa* and *Brachionus plicatilis*. **Water Research**, v. 37, p. 2228-2232, 2003.

LOURENÇO, S. O.; MARQUEZ, U.; FILHO, J. M.; BARBARINO, E.; AIDAR, E. Changes in biochemical profile of *Tetraselmis gracilis*. I. Composition of two culture media. **Aquaculture**, v.148, p. 153–168, 1997.

LOURENÇO, S. O.; BARBARINO, E. Distribution of intracellular nitrogen in marine microalgae: basis for the calculation of specific nitrogen-to-protein conversion factors. **Journal of Phycology**, v. 34, p. 798–811, 1998.

LOURENÇO, S. O.; BARBARINO, E.; DE-PAULA, J. C.; PEREIRA, L. O. S.; MARQUEZ, U. M. L. Amino acid composition, protein content and calculation of nitrogen-to-protein conversion factors for 19 tropical seaweeds. **Phycological Research**, v. 50, p. 233–241, 2002.

Mac COLL, R.; GUARD-FRIAR, D. **Phycobiliproteins**, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 1987.

MADHYASTHA, H. K.; VATSALA, T. M. Pigment production in *Spirulina fusciformis* in different photophysical conditions. **Biomolecular Engineering**, v. 24, p. 301–305, 2007.

MAGER, D. M.; THOMAS, A. D. Extracellular polysaccharides from cyanobacterial soil crusts: A review of their role in dryland soil processes. **Journal of Arid Environments**, v. 75, p. 91-97, 2011.

MARKOU, G.; GEORGAKAKIS, D. Cultivation of filamentous cyanobacteria (blue-green algae) in agro-industrial wastes and wastewaters: A review. **Apple Energy**, v. 88 p. 3389-3401, 2011.

MARONEZE, M. M.; MENEZES, C. R.; BARIN, J.S.; QUEIROZ, M. I.; ZEPKA, L.Q.; JACOB-LOPES, E. Treatment of cattle-slaughterhouse wastewater and the reuse of sludge for biodiesel production by microalgal bioreactors. **Scientia Agricola (USP Impresso)**, v. 1, p. 53, 2014.

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

MEEKS, J. C.; CASTENHOLZ, R. W. Growth and photosynthesis in thermophile *Synechococcus lividus* (cyanophyta). **Archives of Microbiology**, v. 78, p. 25-4, 1971.

MIHOVA, S. G.; GEORGIEV, D. I.; MINKOVA, K. M.; TCHERNOV, A. A. Phycobiliproteins in *Rhodella reticulata* and photoregulatory effects on their content. **Journal of Biotechnology**, v. 48, p. 251-257, 1996.

MILLEDGE, J. J. Commercial application of microalgae other than as biofuels: a brief review. **Reviews in Environmental Science and Biotechnological**, v. 10 p. 31–41, 2011.

MINKOVA, K. M.; TCHERNOV, A. A.; TCHORBADJIEVA, M. I.; FOURNADJIEVA, S. T.; ANTOVA, R. E.; BUSHEVA, M. C. Purification of C-phycoerythrin from *Spirulina (Arthrospira) fusiformis*. **Journal of Biotechnology**, v. 102, p. 55-59, 2003.

MISHRA, S. **Phycobiliproteins from microalgae**. In: Tewari, A. (Ed.), Recent advances on applied aspects of Indian marine algae with reference to Global scenario, v. 2, p. 273–284, 2007.

MISHRA, K.; SHRIVASTAV, A.; MISHRA, S. Effect of preservatives for food grade C-phycoerythrin Isolated from marine cyanobacteria *Pseudanabaena* sp, Int. **Journal of Biological Macromolecules**, v. 47, p. 597–602, 2010.

MISHRA, S. K.; SHRIVASTAV, A.; MAURYA, R. R.; PATIDAR, S. K.; HALDAR, S.; MISHRA, S. Effect of light quality on the C-phycoerythrin production in marine cyanobacteria *Pseudanabaena* sp. isolated from Gujarat coast, India a. **Protein Expression and Purification**. v. 81, p. 5–10, 2012.

MOHAMMADI, M.; AHIALIABADI, M. A. Biodiesel Production from Microalgae. **Journal of Biology and today's world**, v. 2, n. 2, p. 76-84, 2013.

MOLINA-GRIMA, E.; BELARBI, E. H.; ACIÉN-FERNANDEZ, F. G.; ROBLES, M. A.; CHISTI, Y. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process option and economics. **Biotechnology Advances**, v. 20, p. 491-515, 2002.

MONTOYA, J. P.; HOULL, C. M.; ZEHR, J. P.; ANDREW, H.; VILLAREAL, T. A.; CAPONE, D. G. High rates of N<sub>2</sub> fixation by unicellular diazotrophs in the oligotrophic Pacific Ocean. **Nature**, v. 430, p. 1027-1032, 2004.

MORI, S.; CASTORENO, A.; MULLIGAN, M. E.; LAMMERS, P. J. Nitrogen status modeluates the expression of RNA-binding proteins in cyanobacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v. 227, p. 203-210, 2003.

MORIST, A.; MONTESINOS, J. L.; CUSIDÓ, J. A.; GÓDIA, F. Recovery and treatment of *Spirulina platensis* cells cultured in a continuous photobioreactor to be used as food. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 535-547, 2001.

MULKERRINS, D.; DOBSON, A. D. W.; COLLERAN, E. Parameters affecting biological phosphate removal from wastewater. **Environment International**, v. 30, p. 249-259, 2004.

MURO-PASTOR, M. I.; FLORÊNCIO, F. J. Regulation of ammonium assimilation in cyanobacteria. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 41, p. 595-603, 2003.

NUÑEZ, V. J.; VONTOLINA, D.; NIEVES, M.; PIÑA, P.; MEDINA, A.; GUERRERO, M. Nitrogen budget in *Scenedesmus obliquus* cultures with artificial wastewater. **Bioresource Technology**, v. 78, p. 161-164, 2001

OLIVER, R. L.; GANF, G. G. **Freshwaters blooms**. In: Whitton, B. A.; Potts, M. (ed.). The ecology of cyanobacteria: their diversity in time and space. New York: Kluwer Academic Publishers; p. 149–94, 2000.

OHMORI, M.; OHMORI, K.; STROTMANN, H. Inhibition of nitrate uptake by ammonia in a blue-green alga, *Anabaena cylindrica*. **Archive Microbiology**, v. 114, p. 225–229, 1977.

OLGUÍN, E.; GALICIA, S.; ANGULO-GUERRERO, O.; HERNÁNDEZ, E. The effect of low light flux and nitrogen deficiency on the chemical composition of *Spirulina* sp. (*Arthrospira*) grown on digested pig waste. **Bioresource Technology**, v. 77, p. 19-24, 2001.

OLGUÍN, E. J. Phycoremediation : key issues for cost-effective nutrient removal processes. **Biotechnology Advances**, v. 22, p. 81-91, 2003.

- OMAR, H. H. Bioremoval of zinc ions by *Scenedesmus obliquos* and *Scenedesmus quadricauda* and its effects on growth and metabolism. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 5, p. 95-100, 2002.
- ORTIZ, C. P.; STEYER, J. P.; BORIES, A. Carbon and nitrogen removal from wastewater by *Candida utilis*: kinetic aspects and mathematical modeling. **Process Biochemistry**, v.32, p.179–189, 1997.
- PAHL, S. L.; LEWIS, D. M.; CHEN, F.; KING, K. D. **Journal Applied Phycology**, v. 22, p. 165, 2010.
- PANCHA, I.; CHOKSHI, K.; GEORGE, B.; GHOSH, T.; MAURYA, C. P. R.; MISHRA, S. Nitrogen stress triggered biochemical and morphological changes in the microalgae *Scenedesmus* sp. CCNM 1077. **Bioresource Technology**, v. 156, p. 146–154, 2014.
- PARMAR, A.; SINGH, N. K.; PANDEY, A.; GNANSOUNOU, E.; MADAMWAR, D. Cyanobacteria and microalgae: A positive prospect for biofuels. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 10163-10172, 2011.
- PELLETIER, F.; CAVENTOU, J. B. Sur la matiere verte des feuilles. **Annales de Chimie et de Physique**, v. 9, p. 194–196, 1818.
- PEREZ-GARCIA, O.; ESCALANTE, F. M. E.; DE-BASHAN, L. E.; BASHAN, Y. Heterotrophic culture of microalgae: metabolism and potential products. **Water Research**, v. 45, p. 11-36, 2011.
- PIGNOLET, O.; JUBEAU, S.; VACA-GARCIA, C.; MICHAUD, P. Highly valuable microalgae: biochemical and topological aspects. **Journal of Industrial Microbiology Biotechnology**, v. 40, p. 781–796, 2013.
- PIRES, C. V.; OLIVEIRA, M. G. A.; ROSA, J. C.; COSTA, N. M. B. Qualidade nutricional e escore químico de aminoácidos de diferentes fontes proteicas. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, v. 26, p. 179-187, 2006.
- PITTMAN, J. K.; DEAN, A. P.; OSUNDEKO, O. The potential of sustainable algae biofuel production using wastewater resource. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 1, p. 17-25, 2011.
- POWELL, N.; SHILTON, A.; CHISTI, Y.; PRATT, S. Towards a luxury uptake process via microalgae-Defining the polyphosphate dynamics. **Water Research**, v. 43, p. 4207–4213, 2009.
- PRIYADARSHANI, I.; RATH, B. Commercial and industrial applications of micro algae-A review. **Journal Algal Biomass Utilization**, v. 3, n. 4, p. 89–100, 2012.
- QUEIROZ, M. I.; KOETZ, P. Caracterização do efluente da parboilização do arroz. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.3, n. 3, p. 139-143, Set.-Dez., 1997.
- QUEIROZ, M. I.; TEIXEIRA, R. M. **Elaboração de macarrão a partir da *Aphanothece* sp congelada**. In: Simpósio Latino americano de Ciência dos Alimentos, 1997, Campinas, SP. Simpósio Latino americano de Ciência dos Alimentos, 1997.

QUEIROZ, M. I.; KOETZ, P. R.; TREPTOW, R. O. Caracterização sensorial do odor da *Aphanothece microscopica* Nägeli visando sua utilização na dieta alimentar. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, Curitiba, PR, v. 16, p. 55-70, 1998.

QUEIROZ, M. I.; SOARES, L. A. S.; KOETZ, P. R.; TREPTOW, R. O.; YUNES, J. S. **Avaliação do teor de proteína da *Aphanothece sp.* Caracterização de aminoácidos.** In: Anais do XVI. Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 2, n. 1, p. 1089-1091, 1998.

QUEIROZ, M. I.; KOETZ, P. R.; TREPTOW, R. O. **The *Aphanothece microscopica* Nägeli potential in the production of the single-cell protein from the remaining water.** In: Chames, S. W.; Cánovas-Barbosa, G. V.; Aguilera, J. M. (Ed.) Proceedings of the Eighth International Congress on Engineering and Food (ICEF 8). Pennsylvania, USA, 2027-2031, 2001.

QUEIROZ, M. I.; BASTOS, R. G.; BENERI, R. L.; ALMEIDA, R. G. Evaluación del crecimiento de la *Aphanothece microscopica* Nägeli en las aguas residuales de la parbolización del arroz. **Revista Información Tecnológica**, v. 13, p. 61-66, 2002.

QUEIROZ, M. I.; BASTOS, A.; SARAIVA, E.; GOLDBECK, R. **Perspectiva de Utilização da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nageli no tratamento de efluente da indústria da pesca.** In: IV Congreso Iberoamericano de Ingeniería em Alimentos, 2003, Valparaíso, Chile. CIBIA IV, v. 1. p. 1-4, 2003.

QUEIROZ, M. I.; ZEPKA, L. Q.; LOPES, E. J.; BASTOS, R. Evaluation of single cell protein production by *Aphanothece microscopica* Nägeli in batch reactor. **Food Science and Biotechnology**, v. 13, p. 130-141, 2004a.

QUEIROZ, M. I.; BENERI, R.; BASTOS, R.; ALMEIDA, R. Single-cell protein production by *Aphanothece microscopica* Nägeli in rice parboiled effluent. **Food Science and Biotechnology**, v. 13, p. 142-150, 2004b.

QUEIROZ, M. I.; LOPES, E. J.; ZEPKA, L. Q.; NETTO, F. M. Caracterização da Fração Proteica da Cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli Cultivada no Efluente da Parboilização do Arroz. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, p. 482-488, 2006.

QUEIROZ, M. I.; JACOB-LOPES, E.; ZEPKA, L. Q.; BASTOS, R.; GOLDBECK, R. The kinetics of the removal of nitrogen and organic matter from parboiled rice effluent by cyanobacteria in a stirred batch reactor. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 2163-2169, 2007a.

QUEIROZ, M. I.; ZEPKA, L. Q.; LOPES, E. J.; GOLDBECK, R. Production and biochemical profile of the microalgae *Aphanothece microscopica* Nägeli submitted to different drying condition. **Chemical Engineering and Processing**, v. 50, p. 1-6, 2007b.

QUEIROZ, M. I.; JACOB-LOPES, E.; GOLDBECK, R.; SOUZA-SOARES, L. A.; QUEIROZ, M. I. Nutritional evaluation of single-cell protein produced by *Aphanothece microscopica* Nägeli. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 7107-7111, 2010.

QUEIROZ, M. I.; HORNES, M. O.; SILVA-MANETTI, A. G.; JACOB-LOPES, E. Single-cell oil production by cyanobacterium *Aphanothece microscopica* Nägeli cultivated heterotrophically in fish processing wastewater. **Applied Energy**, v. 88, p. 3438–3443, 2011.

QUEIROZ, M. I.; HORNES, M. O.; MANETTI, A. G. S.; ZEPKA, L. Q.; JACOB-LOPES, E. Fish processing wastewater as a platform of the microalgal biorefineries. **Biosystems engineering**, v. 115, p. 195-202, 2013.

RAGNI, M.; AIRS, R. L.; LEONARDOS, N.; GEIDER, R. J. Photoinhibition of PSII in *Emiliania huxleyi* (Haptophyta) under high light stress: the roles of photoacclimation, photoprotection, and photorepair. **Journal of Phycology**, v. 44, p. 670–683, 2008.

RAMALHO, C. B.; HASTINGS, J. W.; COLEPICOLO, P. Circadian oscillation of reductase activity in *Gonyaulax polyedra* is due to changes in cellular protein levels. **Plant Physiology**, v. 107, p. 225-231, 1995.

RANGEL-YAGUI, C. O.; DANESI, E. D. G.; CARVALHO J. C. M.; SATO, S. Chlorophyll production from *Spirulina platensis*: cultivation with urea addition by fed-batch process. **Bioresource Technology**, v.92, n.2, p.133–141, 2004.

RAPOSO, M. F. J.; MORAIS, R. M. S. C.; MORAIS, A. M. M. B. Health applications of bioactive compounds from marine microalgae. **Life Sciences**, v. 93, p. 479–486, 2013.

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

RENAUD, S. M.; THINH, L. V.; LAMBRINIDIS, G.; PARRY, D. L. Effect of temperature on growth, chemical composition and fatty acid composition of tropical Australian microalgae grown in batch cultures. **Aquaculture**, v. 211, p. 195-214, 2002.

RICHARDSON, L. L. Remote Sensing of Algal Bloom Dynamics: New research fuses remote sensing of aquatic ecosystems with algal accessory pigment analysis. **BioScience**, v. 46, n. 7, p. 492-501, 1996.

RICHMOND, A. **Spirulina** In: Borowitzka, M. A.; Borowitzka, L. J. (ed.). *Micro-Algal Biotechnology*, Cambridge University Press, 1988.

RICHMOND, A. Microalgal biotechnology at the turn of the century: a personal view. **Journal Applied Phycology**, v. 12, p. 441–451, 2005.

RIPPKA, R.; DERUELLES, J.; WATERBURY, J. B.; HERDMAN, M.; STANIER, R. Y. Generic assignments strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. **Journal of General Microbiology**. v. 111. p. 01-61, 1979.

RODOLFI, L.; ZITTELLI, G. C.; BASSI, N.; PADOVANI, G.; BIONDI, N.; BONINI, G.; TREDICI, M. R. Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 102, p. 100-112, 2008.

RODSRUD, G.; LERSCH, M.; SJÖDE, A. History and future of world's most advanced 212 biorefinery in operation. **Biomass and Bioenergy**, v. 46, p. 46-59, 2012.

RODRÍGUEZ, H.; RIVAS, J.; GUERRERO, M. G.; LOSADA, M. Nitrogen-fixing cyanobacterium with a high Phycoerythrin content. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, p. 758-760, 1989.

RODRÍGUEZ, H.; RIVAS, J.; GUERRERO, M. G.; LOSADA, M. Enhancement of phycobiliprotein production in nitrogen-fixing cyanobacteria. **Journal of Biotechnology**, v. 20, p. 263-270, 1991.

RODRÍGUEZ-SÁNCHEZ, R.; ORTIZ-BUTRÓN, R.; BLAS-VALDIVIA, V.; HERNÁNDEZ-GARCIA, A.; CANO-EUROPA, E. Phycobiliproteins or C-phycocyanin of *Arthrospira* (*Spirulina*) maxima protect against HgCl<sub>2</sub>-caused oxidative stress and renal damage. **Food Chemistry**, v. 135, n.4, p. 2359–2365, 2012.

ROMANO, I.; BELLITTIR, R.; NICOLAUS, B.; LAMA, N.; MANCA, C.; PAGNOTA, E.; GAMBACORTA, A. Lipid profile: a useful chemotaxonomic marker for classification of a new cyanobacterium in *Spirulina* genus. **Phytochemistry**, v. 50, p. 560-568, 2000.

ROSGAARD, L.; PORCELLINIS, A. J.; JACOBSEN, J. H.; FRIGAARD, N. U.; SAKURAGI, Y. Bioengineering of carbon fixation, biofuels, and biochemical In cyanobacteria and plants. **Journal of Biotechnology**, v. 162, p. 134–147, 2012.

SAFI, C.; CHARTON, M.; PIGNOLET, O.; SILVESTRE, F.; VACA-GARCIA, C.; PONTALIER, P. Y. Influence of microalgae cell wall characteristics on protein extractability and determination of nitrogen-to-protein conversion factors. **Journal Applied Phycology**, v. 25, p. 523–529, 2013.

SAHA, S. K.; UMA, L.; SUBRAMANIAN, G. Nitrogen stress induced changes in the marine cyanobacterium *Oscillatoria willei* BDU 130511. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 45, p. 263-272, 2003.

SAKAMOTO, T.; SHEN, G.; HIGASHI, S.; MURATA, N.; BRYANT, D. A. Alteration of low-temperature susceptibility of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7002 by genetic manipulation of membrane lipid unsaturation. **Archives of Microbiology**, v. 169, n. 1, p. 20-28, 1997.

SAMORI, G.; SAMORI, C.; GUERRINI, F.; PISTOCCHI, R. Growth and nitrogen removal capacity of *Desmodesmus communis* and of a natural microalgae consortium in a batch culture system in view of urban wastewater treatment: part I. **Water Research**, v. 47, p. 791–801, 2013.

SANTIAGO-SANTOS, M. C.; PONCE-NOYOLA, T.; OLVERA-RAMÍREZ, R.; ORTEGA-LOPES, J.; CAÑIZARES-VILLANUEVA, R. O. Extraction and purification of phycocyanin from *Calotrix* sp. **Process Biochemistry**, v.39, 2047-2052, 2004.

SANTOS, J. E.; HOWE, J. M.; DUARTE, F. A. M.; OLIVEIRA, J. E. D. Relationship between the nutritional efficacy of a rice and bean diet and energy intake in pre-school children. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 32, p. 1541-1544, 1979.

SARADA, R.; MANOJ, G.; PILLAI, G.; RAVINSHANKAR, A., Phycocyanin from *Spirulina* sp: influence of processing of biomass on phycocyanin yield, analysis of efficacy of

extraction methods and stability studies on phycocyanin. **Process Biochemistry**, v. 34, p. 795-801, 1999.

SARAIVA, L. B. **Remoção de nutrientes em efluente de indústria da parboilização do arroz**. Rio Grande, 2000, 81p. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos). Departamento de Química. Fundação Universidade Federal do Rio Grande.

SATO, Y.; MURAKAMI, M.; MIYAZAWA, K.; HORI, K. Purification and characterization of a novel from a freshwater cyanobacterium *Oscillatoria agardii*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 25, p. 169-177, 2000.

SARKAR, B; CHAKRABARTI, P. P; VIJAYKUMAR, A.; KALE, V. Wastewater treatment in dairy industries - possibility of reuse. **Desalination**, v. 195, p. 1-3, 2006.

SCANLAN, D. J.; POST, A. F. **Aspects of Marine Cyanobacterial Nitrogen Physiology and Connection to the Nitrogen Cycle**. In: Capone, D. G.; Bronk, D. A.; Mulholland, M. R.; Carpenter, E. J. Nitrogen in the marine environment, Elsevier 2th ed. cap. 24, p 1073-1090, 2008.

SCHMETTERER, G. **Cyanobacterial respiration**. In: Bryant, D. A. The molecular biology of cyanobacteria. Kluwer Academic Publisher. p. 409-435, 1994.

SCHOEFS B. Chlorophyll and carotenoid analysis in food products. Properties of the pigments and methods of analysis. **Trends in Food Science & Technology**, v. 13, p. 361-371, 2002.

SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos proteicos. Propriedades-Degradações-Modificações**. São Paulo: ed. UNICAMP, 1996.

SHUULUKA, D.; BOLTON, J. J.; ANDERSON, R. J. Protein content, amino acid composition and nitrogen-to-protein conversion factors of *Ulva rigida* and *Ulva capensis* from natural populations and *Ulva lactuca* from an aquaculture system, in South Africa. **Journal Applied Phycology**, 2012.

SILVA, A. G. S.; HORNES, M. O.; MITTERER, M. L.; QUEIROZ, M. I.; Application of coagulants in pretreatment of fish wastewater using factorial Design. **Desalination and Water Treatment**, v. 1, p. 208-214, 2009.

SILVA-MANETTI, A. G.; HORNES, M. O.; MITTERER, M. L.; QUEIROZ, M. I. Fish processing wastewater treatment by combined biological and chemical processes aiming at water reuse. **Desalination and Water Treatment**, v. 29, p. 196-202, 2011.

SINGH, J.; GU, S. Commercialization potential of microalgae for biofuels production. **A Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, p. 2596-2610, 2010.

SINGH, N. K.; PARMAR, A.; SONANI, R. R.; MADAMWAR, D. Isolation, identification and characterization of novel thermotolerant *Oscillatoria* sp. N9DM: change in pigmentation profile in response to temperature. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 2472-2479, 2012.

SINGH, S. P.; MONTGOMERY, B. L. Salinity impacts photosynthetic pigmentation and cellular morphology changes by distinct mechanisms in *Fremyella diplosiphon*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 33, p. 84-89, 2013.

SMITH, A. J. **Modes of cyanobacterial carbon metabolism**. In: Carr, N. G.; Whitton, B. A. (Eds.). *The biology of cyanobacteria*. Berkeley: University of California Press, 1982.

SPOLAORE, P.; JOANNIS-CASSAN, C.; DURAN, E.; ISAMBERT, A. Commercial applications of microalgae. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 101, n. 2, p. 87–96, 2006.

SOLETTO, D.; BINAGHI, L.; LODI, A.; CARVALHO, J. C. M.; CONVERTI, A. Batch and fed-batch cultivations of *Spirulina platensis* using ammonium sulphate and urea as nitrogen sources. **Aquaculture**, v. 243, p. 217–224, 2005.

SONI, B.; TRIVEDI, U.; MADAMWAR, D. A Novel Method of Single Step Hydrophobic Interaction Chromatography for the Purification of Phycocyanin from *Phormidium fragile* and its Characterization for Antioxidant Property. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 1, p. 188–2008.

STREIT, N. M.; CANTERLE, L. P.; CANTO, M. W.; HECKTHEUER, L. H. R. As Clorofilas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 3, p. 748-755, mai-jun, 2005.

SYRETT, P. J. Nitrogen metabolism of microalgae. In: *Physiological bases of phytoplankton ecology* (T. Platt, ed.). Canadian. **Bulletin of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 210, p. 182–210, 1981.

TAM, N. F. Y.; WONG, Y. S. Effect of immobilized microalgal bead concentrations on wastewater nutrient removal. **Environmental Pollution**, v. 107, p. 145-151, 2000

TANAKA, M.; HANIU, M.; ZEITLIN, S.; YASUNOBU, K. T.; EVANS, M. C. W.; RAO, K. K.; HALL, D. O. amino acid sequence of the spirulina maxima ferredoxin a, ferredoxin from a prokaryote. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, v. 64, p. 399-407, 1975.

TANAKA, A.; ITO, H.; TANAKA, R.; TANAKA, N. K.; YOSHIDA, K.; OKADA, K. Chlorophyll a oxygenase (CAO) is involved in chlorophyll-b formation from chlorophyll-a. **Plant Biology**, v. 95, p. 12719-12723, 1998.

TEIXEIRA, R.M.; QUEIROZ, M.I.; TREPTOW, R.O. **Composição química e perspectiva de utilização da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli na formulação de macarrão**. In: Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos; Minas Gerais, Poços de Caldas; SBCTA, 1996.

THAJUDDIN, N.; SUBRAMANIAN, G. Cyanobacterial biodiversity and potential applications in biotechnology. **Current Science**, v. 89, p. 46-57, 2005.

TING, C. S.; ROCAP, G.; KING, J.; CHISHOLM, S. W. Cyanobacterial photosynthesis in the oceans: the origins and significance of divergent light-harvesting strategies. **Trends in Microbiology**, v. 10, p. 134-142, 2002.

TOUCHETTE, B. W.; BURKHOLDER, J. M. Review of nitrogen and phosphorus metabolism in seagrasses. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 250, p. 133–167, 2000.

- UTTING, S. D. Influence of nitrogen availability on the biochemical composition of three unicellular marine algae of commercial importance. **Aquaculture Engineering**, v. 4, p. 173-190, 1985.
- VANTHOOR-KOOPMANS, M.; WIJFFELS, R. H.; BARBOSA, M. J.; EPPINK, M. H. M. Biorefinery of microalgae for food and fuel. **Bioresource Technology**, v. 135 p. 142–149, 2013.
- VIEIRA, J.; JACOB-LOPES, E.; SILVA MANETTI, A. G.; QUEIROZ, M. I. Influência da temperatura na remoção de fosfato por microalgas em biorreatores heterotróficos. Revista Ambiente & Água - An Interdisciplinary. **Journal of Applied Science**, v. 7, n. 2, 2012a.
- VIEIRA, J.; SILVA-MANETTI, A. G.; JACOB-LOPES, E.; QUEIROZ, M. I. Uptake of phosphorus from dairy wastewater by heterotrophic cultures of cyanobacteria. **Desalination and Water Treatment**, v. 40, n. 1-3, p. 224-230, 2012b.
- VILLANUEVA, R.; DOMINGUEZ, M.; CRUZ, M. Chemical composition of cyanobacteria grown in diluted, aerated swine wastewater. **Bioresource Technology**, v. 26, p. 89-96, 1994.
- VISKARI, P. J.; COLYER, C. L. Separation and quantitation of phycobiliproteins using phytic acid in capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, v. 972, p. 269-276, 2002.
- VISKARI, P. J.; COLYER, C. L. Rapid extraction of phycobiliproteins from cultured cyanobacteria samples. **Analytical Biochemistry**, v. 319, p. 263-271, 2003.
- VOET, D.; VOET, J. G. **Bioquímica**, [tradução: Ana Beatriz Gorini da veiga et al.]; 4th ed., Artmed, Porto Alegre, 1482 p., 2013.
- VOLTOLINA, D.; GÓMEZ-VILLA, H.; CORREA, G. Nitrogen removal and recycling by *Scenedesmus obliquus* in semicontinuous cultures using artificial wastewater and a simulated light and temperature cycle. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 359-362, 2005.
- VON ELBE J. H. **Colorantes**. In: FENNEMA, O. W. Química de los alimentos. 2th ed. Zaragoza : Wisconsin - Madison, cap. 10, p. 782-799, 2000.
- VON RÜCKERT, G.; GIANI, A. Effect of nitrate and ammonium on the growth and protein concentration of *Microcystis viridis* Lemmermann (Cyanobacteria). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 27, p. 325-331, 2004.
- VONSHAK, A. **Spirulina platensis (Arthrospira) – Physiology, cell-biology and biotechnology**. Wiltshire: Taylor & Francis Ltd, 233 p., 1997.
- VOURCH, M.; BALANNEC, B.; CHAUFER, B.; DORANGE, G. Treatment of dairy industry wastewater by reverse osmosis for water reuse. **Desalination**, v. 219, p.190–202, 2008.
- WAHAL, S.; VIAMAJALA, S. Maximizing algal growth in batch reactors using sequential change in light intensity. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 161, p. 511–522, 2010.

WANG, Y.; HUANG, X.; YUAN, Q. Nitrogen and carbon removals from food processing wastewater by an anoxic-aerobic membrane bioreactor. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 5, p. 1733-1739, 2005.

WIJFFELS, R. H.; BARBOSA, M. J. An outlook on microalgal biofuels. **Science**, v. 329, p. 796-799, 2010.

WILLIAMS, P. J. B.; LAURENS, L. M. L. Microalgae as biodiesel and biomass feedstocks: review and analysis of the biochemistry, energetics and economics. **Energy and Environmental Science**, v. 3, p. 554-590, 2010.

WU, F.; WANG, J.; CHEN, W.; SHUAI, S. A study on emission performance of a diesel engine fueled with five typical methyl ester biodiesels. **Atmospheric Environment**, v. 43, p. 1481-1485, 2009.

WYMAN, W.; FAY, P. **Acclimation to the natural light climate**. In: Fay, P.; Van Baalen, C., editors. *The Cyanobacteria*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam; p. 347-376, 1987.

XING, X. H.; JUN, B. M.; YANAGIDA, M.; TANJI, Y.; UNNO, H. Effect of C/N values on microbial simultaneous removal of carbonaceous and nitrogenous substances in wastewater by single continuous-flow fluidized-bed bioreactor containing porous carrier particles. **Biochemical Engineering Journal**, v. 5, p.29-37, 2000.

XU, W.; TANG, H.; WANG, Y.; CHITINS, P. Proteins of the cyanobacterial photosystem I. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1507, p. 32-40, 2001.

YANG, B. L.; WING, L.; Mc GARRY, D. Report of a work-shop on high-rates algae ponds. **Wastewater Treatment and Resource Recovery**, v. 27, p. 29-32, 1980.

YEN, H. W.; HU, I. C.; CHEN, C. Y.; HO, S. H.; LEE, D. J.; CHANG, J. S. Microalgae-based biorefinery-From biofuels to natural products. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 166-174, 2013.

YOON, J. H.; SIM, S. J., KIM, M. S.; PARK, T. H. High cell density culture of *Anabaena variabilis* using repeated injections of carbon dioxide for the production of hydrogen. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 27, n. 11-12, Nov.-Dec., p. 1265-1270, 2002.

ZEPKA, L. Q.; JACOB-LOPES, E.; QUEIROZ, M. I. Efecto del procesamiento térmico sobre el perfil de ácidos grasos de la microalga *Aphanothece microscopica* Nägeli. **Ciencia y Tecnología Alimentaria**, v. 5, n. 5, p. 368-371, 2007.

ZEPKA, L. Q.; JACOB-LOPES, E.; GOLDBECK, R.; QUEIROZ, M. I. Production and biochemical profile of the microalgae *Aphanothece microscopica* Nägeli submitted to different drying conditions. **Chemical Engineering and Processing**, v. 47, p. 1305-1310, 2008.

ZEPKA, L. Q.; JACOB-LOPES, E.; GOLDBECK, R.; SOUZA-SOARES, L. A.; QUEIROZ, M. I. Nutritional evaluation of single-cell protein produced by *Aphanothece microscopica* Nägeli. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 7107-7111, 2010.

ZHU, L.; WANG, Z.; SHU, Q.; TAKALA, J.; HILTUNEN, E.; FENG, P.; YUAN, Z. Nutrient removal and biodiesel production by integration of freshwater algae cultivation with piggery wastewater treatment. **Water Research**, v. 47, p. 4294–4302, 2013.

ZUBER, H. **Structure and function of the light harvesting phycobiliproteins from the cyanobacterium *Mastigocladus laminosus***. In: Papageorgiou, G. C.; Packer, L, (Ed.). *Photosynthetic prokaryotes: cell differentiation and function*. Amsterdam: Elsevier Biomedical; p. 23-42, 1983.