

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

TECNOLOGIA EM PROCESSOS QUÍMICOS

ANDERSON PYC HARTMANN

**CULTIVO DE MICROALGAS EM RESÍDUO LÍQUIDO DA INDÚSTRIA DE
LATICÍNIOS**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

TOLEDO, 2017

ANDERSON PYC HARTMANN

**CULTIVO DE MICROALGAS EM RESÍDUO LÍQUIDO DA INDÚSTRIA DE
LATICÍNIOS**

Trabalho de conclusão de Curso apresentado a Coordenação do Curso Superior de Tecnologia em Processos Químicos – COPEQ – da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR *Campus* Toledo, como requisito parcial para obtenção do título de Tecnólogo em Processos Químicos.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Bittencourt
Sydney

TOLEDO, 2017

**TERMO DE APROVAÇÃO
DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

ANDERSON PYC HARTMANN

**CULTIVO DE MICROALGAS EM RESÍDUO LÍQUIDO DA INDÚSTRIA DE
LATICÍNIOS**

Trabalho apresentado como forma de avaliação para o Trabalho de Conclusão de Curso I do curso de Tecnologia em Processos Químicos da UTFPR, *Campus Toledo*, e aprovado pela banca examinadora abaixo.

Prof. Dr. Eduardo Bittencourt Sydney

Prof^a.Dr^a.Alessandra Cristine Novak Sydney

Prof. Dr Thiago Cintra Maniglia

TOLEDO, 2017¹

¹A Folha de Aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Curso.

RESUMO

Hartmann, Anderson P. **Cultivo de microalgas em resíduo líquido da indústria de laticínios**. 2017. 34f. Trabalho de conclusão de curso, Curso Superior de Tecnologia em processos Químicos – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo, 2017.

As microalgas são seres unicelulares, de fácil cultivo, que vem sendo estudadas e utilizadas cada vez mais no mercado mundial, devido a suas amplas características e pontenciais de biomassa. Cada espécie de microalga produz algum produto específico em sua biomassa, como astaxantina, proteínas, pigmentos. O modo como cada espécie é cultivada interfere na quantidade de biomassa produzida e no produto final. Este trabalho teve como foco avaliar o potencial de crescimento microalgal em soro de leite, comparando com o crescimento em meio sintético que já contém os nutrientes necessário para a melhor de extração de biomassa. Foram aplicados diferentes diluições de soro de leite e meio sintético para comparar a linearidade de crescimento de ambas as soluções. As diluições também foram realizadas para testar a toxicidade do soro de leite às microalgas, pois este resíduo é tóxico ao meio ambiente. Para análises todos os materiais foram esterelizados em autoclave e manuseados em fluxo laminar, sendo seu crescimento em Shaker com 150 rpm e 25°C durante 15 dias. As microalgas apresentaram crescimentos lineares em meio sintético com soro de leite, porém em soro de leite diluídos com água mostraram crescer em apenas soluções com 10% de soro para as espécies *Spirulina platensis* e *Haematococcus pluvialis*. Para a espécie *Botryococcus braunii* o crescimento foi em 30% e 50% de soro, mas com quantidade de biomassa menor.

Palavras chave: microalgas, soro de leite, biomassa.

ABSTRACT

Hartmann, Anderson P. **Cultivation of microalgae in liquid waste from the dairy industry**. 2017. 34f. Work Completion of course, college of Technology in Chemical Process – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo, 2017.

The microalgae are unicellular beings, easy to grow, that have been studied and used more and more in the world market, due to their broad characteristics and biomass. Each species of microalga produces some specific product in its biomass, such as astaxanthin, proteins, pigments. The way each species is cultivated interferes with the amount of biomass produced and the final product. This work aimed to evaluate the potential of microalgal growth in whey, compared to growth in synthetic medium that already contains the nutrients necessary for the best biomass extraction. Different dilutions of whey and synthetic medium were applied to compare the linearity of growth of both solutions. Dilutions were also performed to test whey toxicity to microalgae, as this residue is toxic to the environment. For analysis all the materials were autoclaved and handled in laminar flow, being its growth in Shaker with 150 rpm and 25°C during 15 days. The microalgae presented linear growths in synthetic medium with whey, but in whey diluted with water they showed to grow in only solutions with 10% of serum for *Spirulina platensis* and *Haematococcus pluvialis* species. For the species *Botryococcus braunii* the growth was in 30% and 50% of serum, but with less amount of biomass.

Keywords: microalgas, whey, biomass.

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

%:	Por cento
µm:	Micrometro
3N-MBM:	Meio basal modificado com 3 vezes a concentração de nitrogênio
Lux:	Unidade de iluminação
°C:	Grau Celsius
UTFPR:	Universidade Tecnológica Federal do Paraná
mL:	Mililitro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Crescimento da microalga <i>Spirulina platensis</i> em meio sintético e soro.....	21
Figura 2 - Crescimento da microalga <i>Spirulina platensis</i> em água e soro.....	22
Figura 3 - Crescimento da microalga <i>Haematococcus pluvialis</i> em meio sintético e soro	23
Figura 4 - Crescimento da microalga <i>Haematococcus pluvialis</i> em água e soro.....	24
Figura 5 - Crescimento da microalga <i>Botryococcus braunii</i> em meio sintético e soro.....	25
Figura 6 – Crescimento da microalga <i>Botryococcus braunii</i> água e soro.....	25

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Evolução da produção leiteira.....	14
Tabela 2 - Municípios com maior produção leiteira no Brasil.....	15
Tabela 3 - Sais minerais utilizados nomeio sintético para as microalgas <i>Spirulina platensis</i> e <i>Botryococcus braunii</i>	18
Tabela 4 - Sais para preparo do meio sintético da microalga <i>Haematococcus pluvialis</i>	18
Tabela 5 - Diluições dos Erlenmeyers, com meio sintético e soro de leite.....	19

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
1.1 OBJETIVOS.....	10
1.1.1 Objetivos Gerais	10
1.1.2 Objetivos Específicos.....	10
1.2 JUSTIFICATIVA.....	10
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
2.1 MICROALGAS: ESTRUTURA, COMPOSIÇÃO E CULTIVO	12
2.2 APLICAÇÕES DAS MICROALGAS	13
2.3 VANTAGENS E DESVANTAGENS DA PRODUÇÃO MICROALGAL	15
2.4 PRODUÇÃO REGIONAL E LOCAL DE LEITE	16
2.5 RESÍDUOS DE INDÚSTRIAS LATICÍNEAS	18
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
3.1 ESPÉCIES UTILIZADAS	19
3.2 PREPARO DAS SOLUÇÕES E MEIOS DE CULTIVO	19
3.3 CRESCIMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE BIOMASSA.....	22
3.4 ANÁLISES DO SORO DE LEITE.....	22
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	23
CONCLUSÃO.....	29
REFERÊNCIAS.....	30

1 INTRODUÇÃO

As microalgas são seres unicelulares, que dependem apenas de luz, oxigênio e poucos nutrientes para seu crescimento. O cultivo, de certa forma, é simples e não requer tecnologia avançada, o que facilita sua aplicação industrial. O maior desafio a nível industrial é atingir alta produtividade de biomassa (CARDOSO et al., 2011).

A descoberta dos diversos potenciais e da vasta aplicação das microalgas é um fator decisivo para o enfoque em novos estudos. Muitas áreas importantes, tais como, a indústria de fármacos, indústria alimentícia e do biodiesel, vem evoluindo na utilização de componentes obtidos das microalgas (DERNER et al., 2006).

Os resíduos gerados são um grande problema tanto para as empresas quanto para o meio ambiente, devido ao fato da grande maioria possuir alto potencial toxicológico, poluindo o meio ambiente e dificultando o seu descarte.

A região onde foi realizado este trabalho tem uma alta produção de leite, situando-se entre os 20 maiores produtores do Brasil. O processamento do leite, muitas vezes gera grandes quantidades de resíduos, especificamente o soro de leite, que é gerado na produção de queijo (1 kg de queijo gera aproximadamente 9 kg de soro) (FAEP, 2014).

Devido a suas características (físico-químicas), o soro não pode ser simplesmente descartado ao meio ambiente, devendo ser tratado. Muitas vezes ele é utilizado na fabricação de concentrados protéicos (chamados “wheyprotein”), bem como sua adição na produção de produtos lácteos, como o iogurte, e aplicações na fermentação de bebidas lácteas, enriquecendo seu valor protéico. Porém essas reutilizações são de baixo valor agregado.

Portanto, este trabalho foi baseado no cultivo de microalgas em resíduos de soro de leite, com a proposta de promover o tratamento do resíduo associado à obtenção de novos produtos, que sejam de interesse industrial.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivos Gerais

Avaliar a capacidade de produção de biomassa de diferentes microalgas em resíduo líquido da indústria de laticínios.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Determinar a capacidade de diferentes microalgas, tais como: *Spirulina platensis*, *Haematococcus pluvialis* e *Botryococcus braunii*, crescerem em resíduo líquido da indústria de laticínios e determinar parâmetros de produção de biomassa.
- Avaliar o crescimento de cepas isoladas em resíduos de laticínios para futuros estudos na produção de suplementos alimentares ou outros bioprodutos.
- Realizar a criação de um banco de cepas de microalgas no Campus da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, situada na cidade de Toledo-PR.

1.2 JUSTIFICATIVA

As microalgas possuem um grande campo de aplicação na indústria. Tradicionalmente utilizadas como alimentos por povos antigos, as microalgas e cianobactérias são capazes de produzir pigmentos que podem ser utilizados na alimentação animal e na indústria farmacêutica, na produção de proteínas bioativas, lipídeos que podem ser transformados em combustíveis ou com

propriedades nutraceuticas, entre outras aplicações. Isso se deve à versatilidade metabólica destes microrganismos, que são capazes de se adaptar a diversas condições de cultivo (presença ou ausência de carbono orgânico, pH, temperaturas, incidência solar, entre outras). É estimada a existência de 200.000 a 800.000 espécies de microalgas, dentre as quais somente 35.000 estão descritas (DERNER et al., 2006). Configura-se, portanto, uma grande oportunidade a exploração desta biodiversidade, sendo difícil mensurar os possíveis benefícios econômicos e ambientais que podem ser gerados.

Toledo é o 3º maior produtor de leite do Paraná (20º a nível nacional) com uma produção média de 70 milhões de litros/ano (FAEP, 2014). O leite é coletado e passa por um processamento que gera novos produtos, processo no qual ocorre a formação de resíduo líquido como o soro de leite.

Aproximadamente 85 a 90% do volume de leite usado na fabricação do queijo é descartado em forma de soro, o qual é reutilizado para suplementar produtos lácteos, como o iogurte e bebidas lácteas e suplemento alimentar humano (chamado “wheyprotein”). Porém esse reaproveitamento não apresenta alto valor agregado nos produtos como iogurte e bebidas lácteas, pois os produtos obtidos por ele são comercializados a preços baixos.

Este soro retém 55% dos nutrientes encontrados no leite, contendo proteínas solúveis, lactose, vitaminas e minerais, entre outros nutrientes (MULLER, 2002). Portanto, caracteriza-se como um interessante meio de cultivo para microalgas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 MICROALGAS: ESTRUTURA, COMPOSIÇÃO E CULTIVO

As microalgas são seres que se encaixam em um grupo de organismos heterogêneos. É uma classe compostas por seres procarióticos (chamados cianobactérias) ou eucarióticos (seres unicelulares, de simples composição, e predominantemente aquáticos). O tamanho das microalgas varia de 5 até 50 μm , podendo serem vistas através de microscópios, e sua coloração é muito variada, devido a presença de pigmentos e mecanismo fotoautotrófico, que são característicos de cada espécie (SCHMITZ et al., 2012).

Pelo fato do termo “microalgas” incluir os organismos que realizam fotossíntese oxigênica, esta fotossíntese não agrega valor taxonômico, pois diversos organismos também a realizam, sendo assim, sua classificação implicaria em diversos quesitos. Microalga é adotado então como um termo “genérico” (SCHMITZ et al., 2012).

Sua composição está ligada diretamente com a natureza de cada espécie, pois os fatores ambientais de cada região em que o cultivo é aplicado influenciam seu metabolismo, como o nitrogênio que, por exemplo, ao ter sua concentração aumentada ou diminuída influencia na produção de lipídeos e proteínas nas microalgas, respectivamente. A incidência de luz colabora com o fator de produção de pigmentos das microalgas. Portanto o local e meio de cultivo adotado estará ligado diretamente com o objetivo específico de seu crescimento (CARDOSO et al., 2011).

As técnicas de cultivo de microalgas que estão sendo utilizadas nas pesquisas sobre o biodiesel nos EUA, e por pesquisadores brasileiros na UFSCAR (Universidade Federal de São Carlos), são os fotobiorreatores fechados e as lagoas aeradas abertas. O tipo de reator a ser escolhido depende do tipo do produto que se deseja obter e sua aplicação, já que nos reatores abertos restringe as formas de se controlar a contaminação do meio de cultivo (CARDOSO et al., 2011).

2.2 APLICAÇÕES DAS MICROALGAS

O interesse no potencial biotecnológico das microalgas tem crescido em alta escala nos últimos anos. Seu foco prevalece principalmente pela descoberta de inúmeras substâncias sintetizadas por estes microorganismos para utilização em uma vasta área de aplicações.

Estes seres possuem uma enorme biodiversidade, conseqüentemente uma grande variabilidade em sua composição bioquímica, que ligadas aos estudos de melhoramento genético e de novas tecnologias de cultivo em grande escala, vem possibilitando que algumas espécies possam ser comercializadas.

O cultivo das microalgas visa a produção de biomassa (alimentação humana e animal), além dos mais variados compostos naturais (pigmentos, biocombustíveis, proteínas, moléculas bioativas), que apresentam grande interesse industrial. Portanto suas aplicações dependem diretamente do perfil químico e taxa de crescimento das espécies, sendo necessário realizar análise de aproveitamento para cada setor (DERNER et al., 2006).

Dentre as aplicações atuais das microalgas destacam-se a aquicultura e indústria de alimentos. Sua aplicação na aquicultura é a utilização de biomassa, de forma direta ou indireta, como fonte de alimentação para moluscos, crustáceos, peixes e diversos organismos de interesse econômico na alimentação humana (CAMPOS et al., 2010).

O interesse industrial e comercial na *Haematococcus pluvialis* é devido a sua capacidade de acumular astaxantina em sua célula, cerca de 1,5 a 3% na biomassa seca, que é especialmente empregada para dar cor avermelhada à carne do salmão. Sendo assim a aquicultura é o setor que mais se interessa pela astaxantina (95% do consumo mundial), e seu preço é de aproximadamente US\$2.500,00 o quilograma. São encontrados produtos à venda a base de astaxantina na forma de pós, liofilizados ou extrato em óleo vegetal (DERNER et al., 2006).

Há um interesse crescente na incorporação da astaxantina visando o consumo humano, através de suplementos dietéticos, que já são aprovados em países europeus(DERNER et al., 2006).

As espécies *Spirulina platensis* e *Chlorella vulgaris* que não são tóxicas aos seres humanos são utilizadas para produção de suplementos alimentares, para atletas e pessoas com alguma deficiência em seu organismo e comercializados na forma de alimentos naturais. Observa-se também sua utilização para enriquecimento nutricional ou como corante em bebidas, doces e massas (DERNER et al., 2006).

Outros estudos estão bem avançados sobre a espécie *Botriococcus braunii*, como na utilização para produção de biodiesel, devido à alta capacidade de acúmulo de lipídios de muitas espécies. Na área ambiental, as microalgas podem ser utilizadas no sequestro de CO₂ e tratamento de águas residuais (CAMPOS et al., 2010).

A microalga *Botriococcus braunii* está sendo estudada para aplicação cosméticas devido ao seu potencial, pois seu extrato aquoso já mostra redução da desidratação cutânea, bem como indução da produção do colágeno no organismo. Os estudos já mostram que a *Botriococcus braunii* possui atividade antioxidante (ARIEDE, 2016).

A *Botriococcus braunii* tem a característica de acumular lipídeos, como hidrocarbonetos de cadeia longa, que são moléculas de interesse na área de biocombustíveis. Por outro lado, é uma microalga de crescimento lento, necessitando a utilização da estatística para melhoramento das condições de cultivo e maximização da produção da biomassa (SALAZAR, 2014).

A *Botriococcus braunii*, consegue atingir de 15% a 75% do peso seco com sua produção de hidrocarbonetos de cadeia longa e lipídeos. Esse fator tem atraído cada vez mais a exploração desta espécie devido ao interesse na produção de biodiesel (TAVARES, 2009).

Estudos para melhoramento dos cultivos e aumento das aplicações das microalgas, bem como introdução de produtos à base das mesmas no mercado já são realizados mundialmente.

Portanto as microalgas apresentam potenciais fortes e atrativos a longo prazo, pois mundialmente a demanda de matérias primas renováveis vem crescendo em larga escala.

2.3 VANTAGENS E DESVANTAGENS DA PRODUÇÃO MICROALGAL

De acordo com DERNER et al.(2006), ao analisar a produção microalgal, verificou-se que existem inúmeras vantagens, podendo-se destacar que o cultivo desponta como uma interessante alternativa aos processos de obtenção de matérias primas, visto que para seu crescimento necessita-se apenas da energia solar e oxigênio para obter matéria orgânica. Várias espécies crescem mais rápidas quando comparadas com plantas terrestres, o que possibilita uma maior produtividade de biomassa por ano.

Devido às microalgas serem de natureza unicelular, pode-se afirmar que elas resultam em uma biomassa cujas células possuem composição bioquímica idênticas. Esse fator é vantajoso, pois ao produzir alguma matéria, sua extração é de modo único, sendo de interesse relevante quando comparadas com as plantas terrestres, pois as plantas apresentam características próprias em determinados locais específicos como: nas folhas, sementes, raízes ou frutos, além de serem modificadas através de condições do ambiente onde são cultivadas (luz, nutrientes e temperatura), necessitando assim de técnicas específicas (DERNER et al., 2006).

Existem várias espécies de microalgas que conseguem ser estimuladas a acumular concentrações altas de proteínas, lipídios e carboidratos, por exemplo. Ao analisar esse fator, verifica-se que estes compostos podem ser comercializados como produtos de alto valor agregado, tornando o processo de produção de microalga bastante viável economicamente (RAVEN et al., 2001).

Quando comparadas às bactérias e fungos, as microalgas possuem a desvantagem de produzir menos biomassa e necessitar de áreas maiores para a obtenção da mesma quantidade de biomassa (CARDOSO et al., 2011). No entanto, as vantagens de crescerem sob certas condições ou produzirem produtos que bactérias e fungos não produzem, pode reverter esse cenário.

2.4 PRODUÇÃO REGIONAL E LOCAL DE LEITE

A atividade leiteira é considerada um dos segmentos mais importantes do agronegócio brasileiro e colabora para a diminuição do êxodo rural, visto que promove ao pequeno produtor rural uma fonte de renda complementar e propícia para o surgimento de estabelecimentos agroindustriais no entorno das bacias leiteiras, à medida que a cadeia se desenvolve (BIEGER & RINALDI, 2009).

Segundo a Federação da Agricultura do Estado do Paraná (FAEP, 2014), entre os anos de 1996 a 2006, enquanto a produção de leite no Brasil obteve crescimento de 37,3%, a produção do Paraná alcançou a marca de um crescimento de 78%.

Quando analisados os números, o estado do Paraná apresentou um crescimento alto da produção de leite no período de 2002 a 2012, devido a grande valorização do produto que houve neste período. A Tabela 1 mostra o comparativo de litros de leite produzidos nesta época (DERAL, 2014).

Tabela 1: Evolução da produção de litros de leite no estado do Paraná entre 2002 e 2012.

Ano	Volume (Bilhões/litros)	Variação %
2002	1,9	-
2012	3,9	105

Fonte: Deral, 2014

Devido o leite apresentar concentrações altas de proteína, gordura, carboidratos, sais minerais e vitaminas, ele é considerado o mais nobre dos alimentos, oferecendo, além destes nutrientes, elementos anticarcinogênicos, presentes na gordura (MULLER, 2002).

A atividade de produção leiteira da região do oeste apresenta um fator decisivo na elaboração do presente trabalho, visto que ao analisar as três cidades entre si (Toledo, Cascavel e Marechal Cândido Rondon) a soma do volume produzido por elas supera em valor considerável o maior município

produtor de leite do Brasil, Castro, também localizada no estado do Paraná (FAEP, 2014).

Na Tabela 2 estão alguns dos maiores produtores de leite do Brasil. Nota-se que o volume produzido entre as 3 cidades vizinhas (Toledo, Cascavel e Marechal Cândido Rondon) ultrapassa 300.000 litros, superando o maior produtor brasileiro, Castro.

Tabela 2: Ranking dos 20 municípios brasileiros que apresentam a maior produção leiteira no ano de 2014, tendo destaque aos municípios do Paraná.

MUNICÍPIO	Produção (L)
1º - Castro – PR	239.000
2º Piracanjuba - GO	154.800
3º - Patos de Minas – MG	148.757
4º - Jataí – GO	144.700
5º - Carambei – PR	130.000
6º - Patrocínio - MG	128.000
7º - Coromandel – MG	119.814
8º - Ibiá - MG	119.153
9º - Marechal Cândido Rondon – PR	112.857
10º - Unaí - MG	112.000
11º - Pompéu - MG	109.022
12º - Prata - MG	106.000
13º - Monte Alegre de Minas - MG	102.191
14º - Cascavel - PR	98.962
15º - Toledo – PR	98.803
16º - Passos - MG	94.500
17º - Rio Verde - GO	91.000
18º - Concórdia - SC	89.780
19º - Curvelo - MG	86.713
20º - Uberlândia – MG	85.000

Fonte: SEAB

2.5 RESÍDUOS DE INDÚSTRIAS LATICÍNEAS

As indústrias de laticínios geram resíduos em seus processos de fabricação, tanto de origem sólida, quanto líquidas e atmosféricas (SILVA, 2011).

Os efluentes industriais, ou mais conhecidos como resíduos líquidos que uma empresa gera, são oriundos de diversos processamentos de produtos como o leite, açúcar, condimentos e alguns materiais de higiene utilizados.

Esses descartes líquidos são a causa mais considerável de poluição que uma indústria de laticínios gera, pois na maioria delas, o soro do leite, por exemplo, é descartado junto com os demais efluentes, o que agrava o teor de poluição. Tal fato se explica, pois, o soro do leite tem um potencial poluidor muito alto, que quando aliado aos demais resíduos, se torna um agravante poluidor (SILVA, 2011).

O soro de leite é cem vezes mais poluente que o esgoto doméstico. O leite ácido, o leiteiro e o soro possuem cargas orgânicas altas, por esse fato, devem ser captados e separados dos demais rejeitos, pois além do fator ambiental, podem ser aproveitados para utilização na fabricação de outros produtos.

Quando analisados números, verifica-se que uma empresa de laticínios que gere 300.000 litros de soro por dia, tem potencial poluidor igual a uma cidade de 150.000 habitantes (SILVA, 2011).

Várias pesquisas estão em andamento sobre o tema da reutilização do soro de leite descartado por indústrias laticíneas, estes estudos priorizam a redução da poluição ambiental ocasionado pelo potencial toxicológico do soro, além da sua introdução da dieta humana, em forma de suplementação e enriquecimento de produtos lácteos (OLIVEIRA, 2011).

Portanto, a reutilização do soro de leite é muito focada na formulação de novos produtos alimentícios, mas seus potenciais ainda não são totalmente explorados, pois é necessário que haja um maior incentivo em seu aproveitamento, podendo assim ser visado a aplicação com microalgas, para obtenção de novos produtos com maior valor agregado (OLIVEIRA, 2011).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ESPÉCIES UTILIZADAS

As espécies utilizadas neste estudo foram:

- *Spirulina platensis* LEB52;
- *Haematococcus pluvialis* SAG 49.81;
- *Botryococcus braunii* SAG 807/1.

3.2 PREPARO DAS SOLUÇÕES E MEIOS DE CULTIVO

O meio de cultivo utilizado na produção de microalgas no soro de leite era composto por soro de leite e meio sintético ou água destilada. Para observar a toxicidade do resíduo e a capacidade de adaptação das cepas, o soro foi utilizado em diferentes concentrações (0 a 100%), diluído com água ou meio sintético. O cultivo foi realizado em Shaker (Thot equipamentos, modelo 6430), com período de 15 dias, temperatura de 25°C em fotoperíodo de 12 horas a 3000 lux e rotação de 150 rpm.

O preparo dos meios sintéticos de cada microalga foi feito de acordo com a coleção de microalgas da Universidade Georg-August- Goettingen - SAG (Alemanha),

Os experimentos foram conduzidos em erlemeyers de 250 ml, com 85ml de volume útil, contendo 100%, 70%, 50%, 30%, 10% e 0% de soro de leite diluído com água e meio sintético, totalizando 12 experimentos.

Para cada espécie de microalga foi preparado um meio sintético diferente, de acordo com suas especificidades.

A tabela 3 apresenta a composição do meio sintético da microalga *Spirulina platensis*.

Tabela 3: Sais minerais utilizados na mistura para preparo do meio sintético para as microalgas *Spirulina platensis* em volume de 1000mL. Fonte: SAG

SOLUÇÃO I	
NaHCO ₃	13,61 g
Na ₂ CO ₃	4,03 g
K ₂ HPO ₄	0,50 g
Água Destilada	500 ml
SOLUÇÃO II	
NaNO ₃	2,50 g
K ₂ SO ₄	1,00 g
NaCl	1,00 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,20 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,04 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01 g
EDTA	0,08 g
Água Destilada	500 ml

A tabela 4 apresenta a composição do meio sintético das microalgas *Haematococcus pluvialis* *Botryococcus braunii*.

Tabela 4: Sais em suas devidas proporções para preparo do meio sintético para crescimento das microalgas *Haematococcus pluvialis* *Botryococcus braunii* em volume de 1000ml. Fonte: SAG

SOLUÇÃO 1	
NaNO ₃	10 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	1 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	3 g
K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	3 g
KH ₂ PO ₄	7 g
NaCl	1 g

As soluções foram diluídas de 0 a 100% em meio sintético com soro e água com soro para analisar a capacidade toxicológica do soro de leite para a microalga.

A tabela 5 apresenta as diluições preparadas em cada Erlenmeyer, respectivamente.

Tabela 5: Diluições em suas devidas proporções nos Erlenmeyers, com meio sintético e soro de leite.

FRASCOS COM 75 ML, MEIO COM SORO						
	100%SORO	70%SORO	50%SORO	30%SORO	10%SORO	0%SORO
SORO	75ml	52,5 ml	37,5 ml	22,5 ml	7,5 ml	0 ml
MEIO	0 ml	22,5 ml	37,5 ml	52,5 ml	67,5 ml	75 ml
FRASCOS COM 75 ML, SORO COM ÁGUA						
	100%SORO	70%SORO	50%SORO	30%SORO	10%SORO	0%SORO
SORO	75ml	52,5 ml	37,5 ml	22,5 ml	7,5 ml	0 ml
ÁGUA	0 ml	22,5 ml	37,5 ml	52,5 ml	67,5 ml	75 ml

A esterilização dos frascos foi realizada em autoclave vertical (modelo CS da marca Prismatec). Em seguida os pH's dos meios foram corrigidos. A inoculação foi realizada em condições assépticas em fluxo laminar (modelo CFLV09, grupo veco).

Em cada experimento foi inoculado 10 ml do cultivo em fase exponencial, totalizando 85 mL de solução. Amostras de 20 mL do cultivo em fase exponencial de microalgas e do soro de leite foram também retiradas para quantificar a biomassa de microalgas inicial e sólidos totais do soro com auxílio da centrífuga (marca daiti), (centrifugação a 4000 rpm por 30 minutos).

3.3 CRESCIMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE BIOMASSA

Depois de inoculado, os frascos foram levados para o shaker a uma temperatura de 25°C a 150 rpm, com crescimento de 15 dias com iluminação à luz do dia e fotoperíodo 12h:12h.

Após os 15 dias, as amostras foram retiradas, levadas a estufa, e retiradas no dia seguinte para pesagem e quantificação da biomassa produzida, através da seguinte relação

$$\text{Biomassa} = (\text{peso Falcon pós cultivo} - \text{peso Falcon vazio}) - \text{precipitado do soro- inóculo da microalga}$$

3.4 ANÁLISES DO SORO DE LEITE

O soro de leite foi analisado quanto ao seu pH e turbidez. O pH foi aferido através de amostra de 100 mL do mesmo soro utilizado para cultivo, em pHmetro (modelo pH-250, marca Policontrol), enquanto o teste de turbidez foi realizado com amostra do mesmo soro em turbidímetro (modelo TB-1000 MS, marca Tecnopon).

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

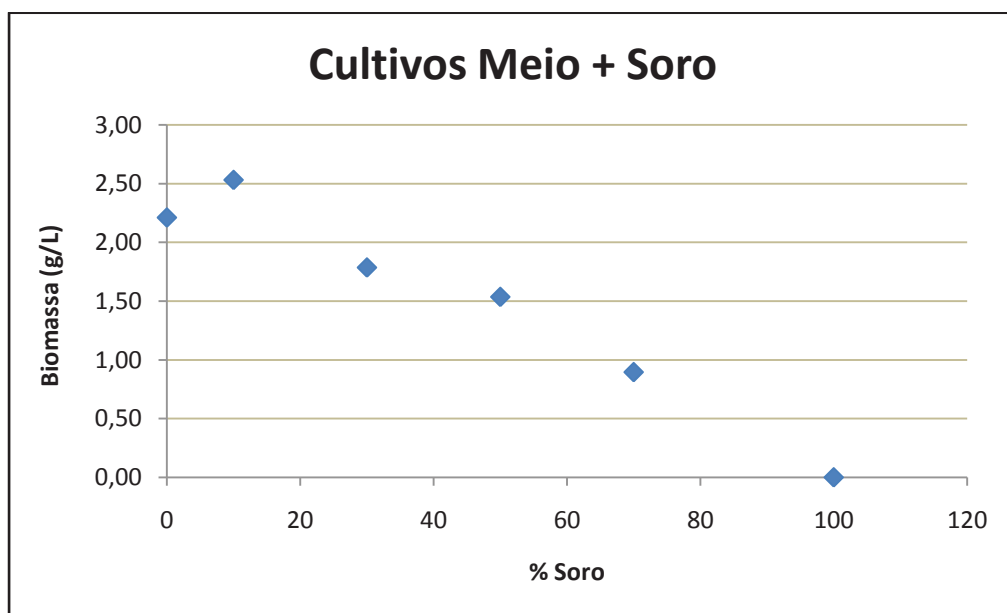
O soro do leite possui vários nutrientes que auxiliam no crescimento microalgal, porém pode ser tóxico ao microrganismo a ponto de inibir seu crescimento.

No teste de pH e turbidez para o soro de leite os resultados obtidos foram pH = 6,2, e turbidez = 847 NTU, mostrando então que o pH para estudo está em boas condições, visto que o ideal para crescimento das microalgas é 7,0 e sua turbidez é relativamente alta, pois quanto mais incidência de luz na solução melhor para o crescimento microalgal, portanto o melhor é a turbidez baixa.

As figuras a seguir demonstram os resultados de crescimento de cada espécie.

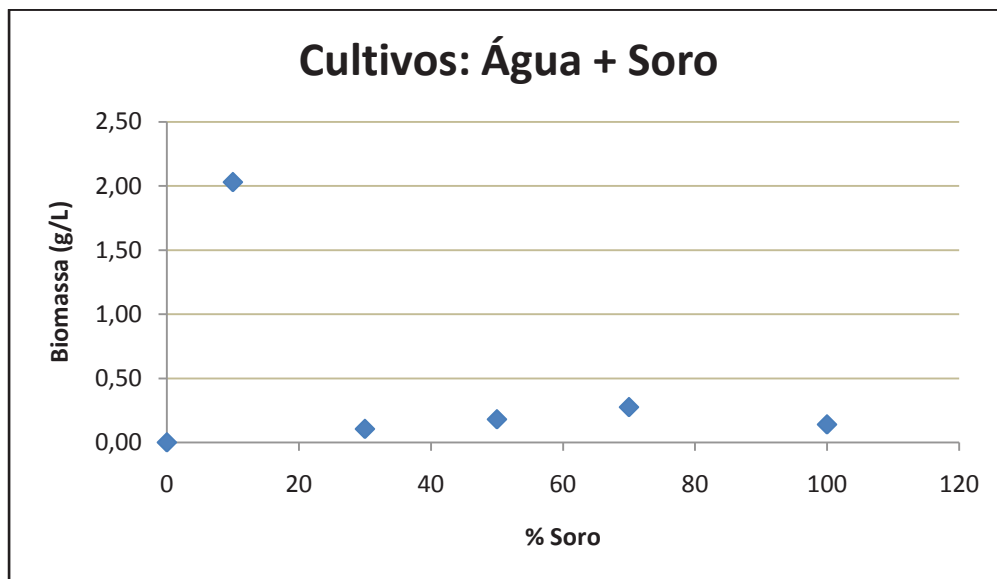
A figura 1 mostra o crescimento da espécie *Spirulina platensis* em soluções com meio sintético e soro de leite. Nota-se que o crescimento nestas condições é linear.

Figura 1: Crescimento da microalga *Spirulina platensis* em amostras contendo meio sintético e soro como nutrientes.



A figura 2 apresenta o crescimento da espécie *Spirulina platensis* em soluções contendo soro de leite diluído em água. Nestas condições a espécie apresentou bom crescimento em apenas um ponto.

Figura 2: Crescimento da microalga *Spirulina platensis* em amostras contendo água e soro como nutrientes.



O crescimento com meio sintético apresentou resultados melhores quando comparado ao com água e soro, o que era esperado, uma vez que este meio sintético contém todos os elementos necessários para o crescimento da microalga.

A adição de soro de leite gerou resultado positivo, pois com 10% de soro em meio sintético a produção de biomassa foi superior a produção com meio puro.

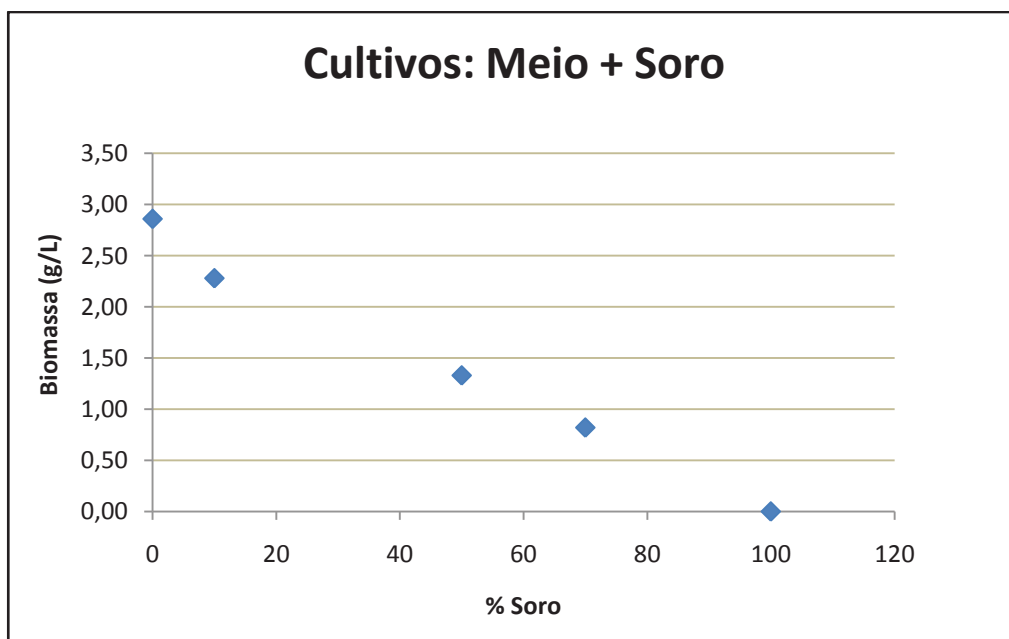
A *Spirulina platensis* apresentou um pico de crescimento de 2,03 g de biomassa em 10% soro diluído em água, o que se mostrou muito interessante, sendo notável a toxicidade das proporções maiores de soro.

O pico de crescimento da *Spirulina platensis* em 10% soro diluído em meio sintético foi de 2,53 g, sendo próximo ao resultado do soro diluído com água nas mesmas condições de crescimento (2,03g), o que é um resultado satisfatório para este ponto.

Portanto, o soro de leite contém nutrientes que auxiliam o crescimento microalgal, pois o meio sintético com 10% de soro produziu biomassa superior ao meio puro, porém o soro diluído em água em quase todos pontos cresceu pouco ou não cresceu, mostrando então que o soro é tóxico à microalga ou a quantidade de nutrientes é baixa.

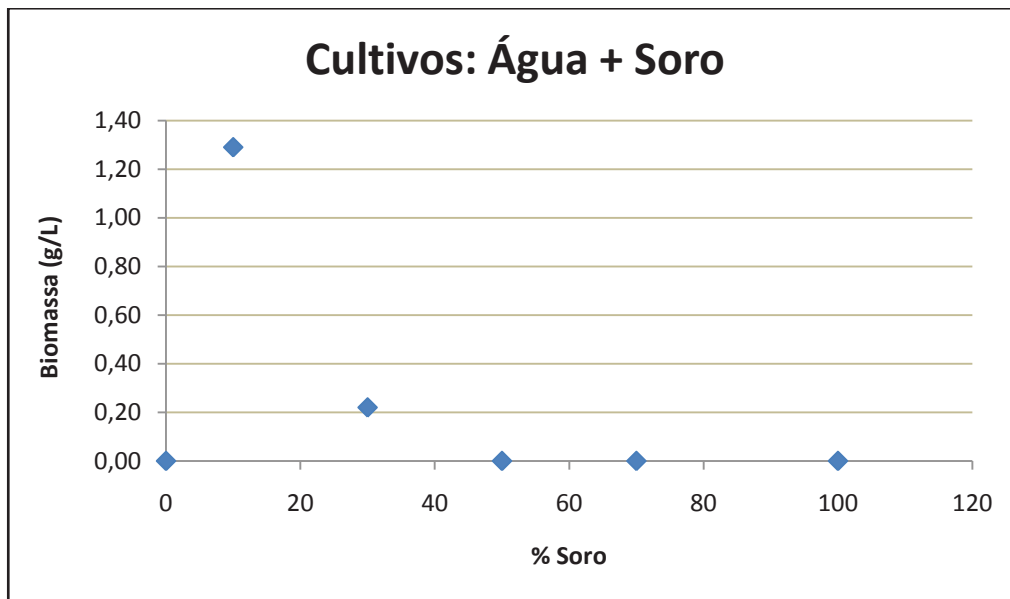
A figura 3 apresenta o crescimento da espécie *Haematococcus pluvialis* em meio sintético com soro de leite, mostrando também a linearidade do crescimento. O ponto de crescimento em 30% soro foi contaminado tanto no experimento quanto na duplicata, não gerando um resultado.

Figura 3: Crescimento da microalga *Haematococcus pluvialis* em amostras contendo meio sintético e soro como nutrientes.



A figura 4 apresenta o crescimento da espécie *Haematococcus pluvialis* em solução de soro de leite diluído em água. Nestas condições a espécie apresentou apenas dois pontos com crescimento.

Figura4: Crescimento da microalga *Haematococcus pluvialis* em amostras contendo água e soro como nutrientes.



A *Haematococcus pluvialis* obteve resultados parecidos com a *Spirulina platensis*, uma vez que ambas tiveram crescimento maior com o meio sintético, e seu melhor crescimento em soro e água sendo em 10% (1,29 g de biomassa).

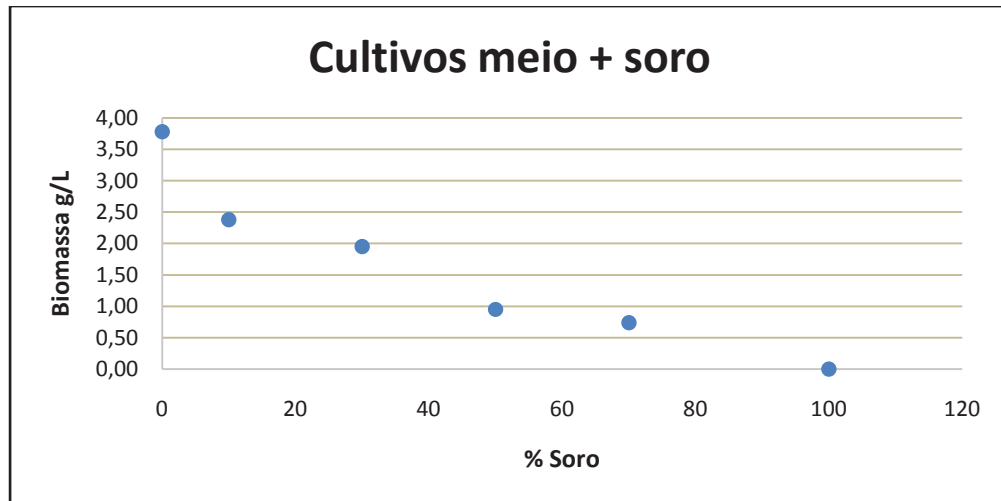
O crescimento em 10% meio sintético foi de 2,28 g de biomassa, mostrando-se mais distante do valor observado com soro diluído em água em relação a espécie anterior.

A amostra de 30% de soro diluído em meio sintético foi contaminada tanto no primeiro experimento quanto na duplicata, apresentando assim, um ponto de discordância no gráfico, que deveria ser linear.

O ponto de 30% em soro com água também apresentou crescimento, porém muito baixo, e deste ponto em diante não houve crescimento, mostrando a toxicidade do soro para esta espécie.

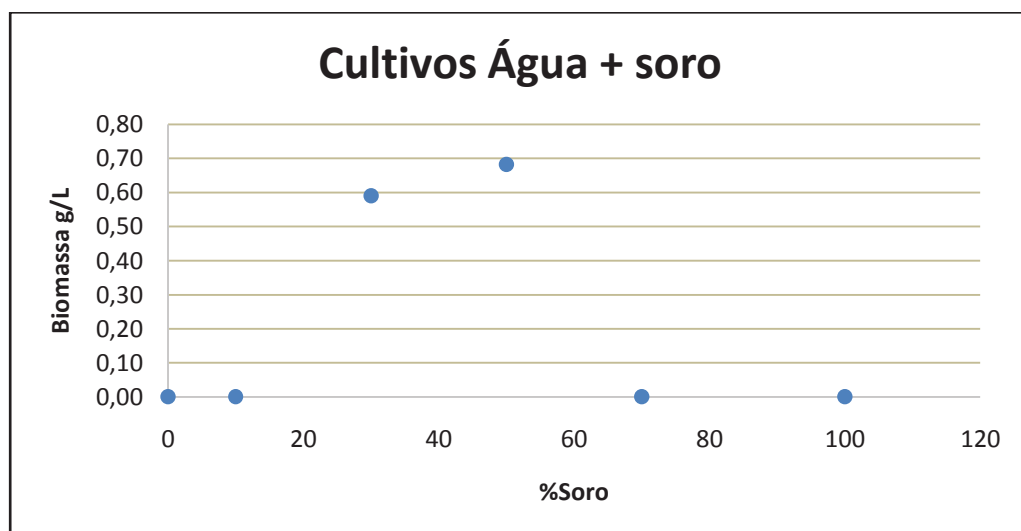
A figura 5 apresenta o crescimento da espécie *Botryococcus braunii* em meio sintético com soro, mostrando a melhor linearidade entre as espécies.

Figura 5: Crescimento da microalga *Botryococcus braunii* em amostras contendo meio sintético e soro como nutrientes.



A figura 6 mostra o crescimento da espécie *Botryococcus braunii* em solução com soro de leite diluído em água, onde apresentou dois pontos de crescimento expressivos

Figura 6: Crescimento da microalga *Botryococcus braunii* em amostras contendo água e soro como nutrientes.



A espécie *Botryococcus braunii* se mostrou diferente das outras duas. A *Botryococcus braunii* mostrou ter crescimento considerável com 30% e 50% de soro diluídos em água, onde seu pico de biomassa foi de 0,68g em 50 % soro. Estes dois pontos são relevantes para esta espécie, pois as duas espécies anteriores apresentaram apenas um ponto considerável, mas ao mesmo tempo com quantidade de biomassa maior.

As microalgas *Spirulina platensis* e *Haematococcus pluvialis* apresentaram o mesmo pico de produção de biomassa, em 30% de soro diluído em água, porém a *Spirulina platensis* se aproximou mais em quantidade de biomassa do cultivo em sintético.

Portanto, todas espécies obtiveram crescimento em meio ao resíduo de soro de leite, mas as quantidades de biomassa foram inferiores as obtidas em meio sintético puro, e o crescimento não foi em todas as amostras.

O meio sintético apresenta um padrão de crescimento constante, com a diminuição da biomassa quando aumentada a concentração de soro de leite. Porém esse padrão é menos acentuado com o soro diluído em água, mostrando que o meio sintético consegue estabilizar o crescimento.

Um estudo a partir desses pontos pode ser realizado, diluindo as amostras em concentrações próximas a melhor obtida nesta pesquisa, para constatar realmente qual o melhor ponto e mais preciso de crescimento de cada espécie.

Em larga escala o meio sintético não é barato para preparo, enquanto o soro acaba reduzindo o custo, cabendo então realizar como trabalho futuro um levantamento de custo para constatar a viabilidade da utilização de soro de leite como componente do meio de cultivo para crescimento microalgal.

Estes cultivos podem ser implantados em biorrefinarias, onde a própria empresa já reutiliza o resíduo (soro de leite) para novos produtos, porém com o implemento da microalga, esses novos produtos terão potenciais e níveis de proteína maiores, bem como benefícios para saúde, agregando valor ao produto.

CONCLUSÃO

O soro de leite se mostrou satisfatório para o crescimento microalgal das espécies observadas, mas seu crescimento se deu em concentrações determinadas, o que não leva a ter uma linearização (crescimento x concentração) como o meio sintético puro.

Vale ressaltar que esse crescimento é uma forma de viabilizar grande parte do soro de leite que é tóxico ao meio ambiente, e que gera um processo em cadeia, começando no uso do soro para a reprodução microalgal, seguido da extração dos potenciais das microalgas que irão se tornar produtos com alto valor agregado no mercado.

Sua capacidade de crescimento a partir de nutrientes provenientes de descartes de indústrias de laticínios pode gerar no futuro, novas parcerias entre empresas, como a união do descarte para um efluente tóxico com a redução de custo de produção e agregação de valor de novas matérias primas, o que gera novas implantações de fluxos e fontes para o reaproveitamento destes resíduos, colaborando com o meio ambiente regional e produzindo produtos com potenciais de aplicações desejados.

REFERÊNCIAS

ARIEDE, M, B. **Aplicação do extrato da microalga *Botryococcusbraunii* em formulações cosméticas fotoprotetoras**. 2016. 119 f. Dissertação (Mestrado em produção e controle farmacêutico) - Universidade de São Paulo - 2016.

BIEGER, A.; RINALDI, R. N. **Reflexos do Reaproveitamento de Soro de Leite na Cadeia Produtiva de Leite do Oeste do Paraná**, RS. 2009. Disponível em: <<http://www.sober.org.br/palestra/13/516.pdf>> Acesso em: 12 de Abril de 2015.

CAMPOS, V. B.; BARBARINO, E.; LOURENÇO, S. O. **Crescimento e Composição Química de Dez Espécies de Microalgas Marinhas em Cultivos Estanques**. Revista Ciência Rural. v.40. n2. Santa Maria, 2010.

CARDOSO, A. S.; VIEIRA, G. E. G.; MARQUES, A.K. **O Uso de Microalgas para a Obtenção de Biocombustíveis**. Revista Brasileira de Biociências. V.9. n.4.p-542-549. Porto Alegre, 2011.

DERAL, Departamento de Economia Rural. **Análise da Conjuntura Agropecuária**, 2014. Disponível em: <http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/leite_2013_14.pdf> Acesso em 08 de abril de 2015.

DERNER, R. B.; OHSE, S.; VILLELA, M.; CARVALHO, S. M. C.; FETT, R. **Microalgas, Produtos e Aplicações**. Revista Ciência Rural. v.36. n.6. Santa Maria, 2006.

FAEP, Federação da Agricultura do Estado do Paraná. **Leite: Produção Aumenta 6% no Brasil e 10% no PR em 2013**. 2014. Disponível em: <<http://www.sistemafaep.org.br/leite-producao-aumenta-6-brasil-e-10-pr-em-2013.html#sthash.DF2g7Awy.cYpALj6G.dpuf>> Acesso em: 12 de Abril de 2015.

FERREIRA, F. N.; MONTEIRO, M. I. C.; SILVA, L. I. D. **Determinação de Nitrogênio Total em Amostras de Rocha Petrolífera pelo Método Kjeldahl / Indofenol**. Jornada do Programa de Capacitação Interna – CETEM. 2007. Disponível em: <http://www.cetem.gov.br/publicacao/serie_anais_I_jpci_2007/Fernanda_Nunes_Ferreira.pdf> Acesso em: 09 de abril de 2015.

MULLER, E. E. Simpósio sobre Sustentabilidade da Pecuária Leiteira na Região Sul do Brasil. P.216-217. Toledo-Pr. **Qualidade do Leite, Células Somáticas e Prevenção da Mastite**. NUPEL, 2002. Disponível em: <<http://www.nupel.uem.br/qualidadeleitem.pdf>>. Acesso em: 12 de abril de 2015.

OLIVEIRA, F. A. **Desenvolvimento de Bebida Láctea não Fermentada com Soro de Leite ácido**. 2011. 37f. Monografia (Tecnologia em Alimentos) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Francisco Beltrão, 2011.

RAVEN, P. H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. **Biologia vegetal**. 6. ed. 724p. Rio de Janeiro: Guanabara. Koogan, 2001.

SALAZAR, M, A, C. **produção de biomassa e hidrocarbonetos a partir da microalga *botryococcusbraunii* utilizando esgoto doméstico tratado secundariamente**. 2014. 98 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba – 20014.

SCHMITZ, R.; MAGRO, C. D.; COLLA, L. M. **Aplicações Ambientais de Microalgas**. Revista CIATEC. v.4. p.48-60, 2012.

SEAB- Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento. **Análise da conjuntura agropecuária ano 2015/16**. Disponível em: http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/2016/bovinocultura_de_leite_2016.pdf. Acesso em: 15 de junho de 2017.

SILVA, D. J. P. **Resíduos na Indústria de Laticínios** Departamento de tecnologia de alimentos e ciência e tecnologia de alimentos. Universidade Federal de Viçosa, 2011.

TAVARES, J, E, B. **Cultivo de microalgas do género *Botryococcus* visando a produção de biodiesel**. 2009. 68 f. Dissertação (Mestrado em biologia celular e biotecnologia) - Universidade de lisboa – 2010.