

1095 – AVALIAÇÃO DO POTENCIAL AMBIENTAL E BIOTECNOLÓGICO DA MICROALGA MARINHA *NANNOCHLOROPSIS OCULATA* – TRATAMENTO DO HORMÔNIO 17 α -ETINILESTRADIOL (EE2) E PRODUÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEIS

Alenne Prince Junqueira de Moraes^(1, 2)

Doutoranda em Engenharia Ambiental na Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ) em parceria com o Instituto Nacional de Tecnologia (INT). Bolsista FAPERJ. Grupo de Pesquisa BIOTEMA (@gpbiotema).

Carine Ferreira Marques⁽¹⁾

Graduada em Engenharia Ambiental e Sanitária pela Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ). Grupo de Pesquisa BIOTEMA (@gpbiotema).

Thaís Barros Matheus Pinho⁽¹⁾

Graduada em Engenharia Ambiental e Sanitária pela Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ). Grupo de Pesquisa BIOTEMA (@gpbiotema).

Cláudia Maria Luz Lapa Teixeira⁽²⁾

Pesquisadora do Instituto Nacional de Tecnologia (INT), Chefe do Laboratório de Biotecnologia de Microalgas (LABIM).

André Luis de Sá Salomão⁽¹⁾

Professor adjunto do Departamento de Engenharia Sanitária e do Meio Ambiente (DESMA), da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), Grupo de Pesquisa BIOTEMA (@gpbiotema).

Endereço⁽¹⁾: UERJ - Rua São Francisco Xavier, 524 - Maracanã – Rio de Janeiro - RJ - CEP: 20550-900 - Brasil - Tel: (21) 2334-0000.

Endereço⁽²⁾: INT - Av. Venezuela, 82 - Saúde – Rio de Janeiro - RJ - CEP: 20081-312 - Brasil - Tel: (21) 2123-1018 – e-mail: alenne.junqueira@int.gov.br

RESUMO

A presença de uma ampla variedade de poluentes nos corpos hídricos naturais é um importante desafio global para o aprimoramento do tratamento de esgotos e a manutenção da qualidade das águas. Os contaminantes emergentes são substâncias químicas que têm sido identificadas com frequência em ambientes naturais e que ainda não são bem regulamentadas em termos de limites de concentração em água, solo, ar ou alimentos. Essas substâncias são liberadas no meio ambiente principalmente através de descargas de esgoto e de resíduos industriais, e de escoamento agrícola. Nesse contexto, o tratamento terciário de águas residuárias utilizando microalgas tem atraindo o interesse por ser uma tecnologia com apelo econômico e sustentável; além de apresentar alta capacidade de mitigação de dióxido de carbono (CO₂), contribuindo para o desenvolvimento de tecnologias limpas. Outro ponto forte é o grande potencial de aplicação desses microrganismos para a produção de biocombustíveis. A biomassa de microalgas representa uma potencial matéria-prima de terceira geração que pode ser utilizada como fonte de lipídios visando a produção de biodiesel e de carboidratos para a produção fermentativa de bioetanol. A escolha de microalgas marinhas - cultivadas em água do mar - reduz a dependência por recursos de água doce e garante a sustentabilidade do processo. No presente estudo a microalga marinha *Nannochloropsis oculata*, reconhecida na literatura por apresentar rápido crescimento, grande resistência a condições adversas de cultivo e alta produtividade de óleo, foi selecionada para os ensaios. A microalga foi cultivada por 20 dias, atingindo concentração final em massa seca de $0,94 \pm 0,09 \text{ g.L}^{-1}$. Nas avaliações de bioadsorção do contaminante 17 α -etinilestradiol (EE2), foi obtida uma remoção na faixa de 52 a 74% e o processo foi melhor descrito pelo modelo de isoterma de Freundlich. O conteúdo intracelular da microalga foi analisado antes e após os ensaios de bioadsorção. Os resultados evidenciaram alto percentual de lipídios ($57.62 \pm 1.24\%$) e carboidratos ($16.89 \pm 0.45\%$) na biomassa mesmo após os ensaios de bioadsorção, e verificou-se que a espécie é uma boa fonte de ácidos graxos de significativo valor comercial. Dados que corroboram o alto potencial de aplicação de *N. oculata* para o tratamento terciário de efluentes associados à produção de biocombustíveis.

PALAVRAS-CHAVE: Microalgas, Bioadsorção, Contaminantes emergentes, Bioprodutos.

INTRODUÇÃO

Contaminantes emergentes (CE) são substâncias potencialmente tóxicas e seus efeitos ou presença no ambiente são ainda pouco conhecidos. Esses contaminantes podem ser de origem antrópica ou natural e englobam uma diversidade de compostos químicos, nos quais se incluem fármacos, cosméticos, produtos de higiene pessoal, hormônios, agrotóxicos, drogas ilícitas, entre outros [1]. Esses poluentes podem ser considerados persistentes ou pseudo-persistentes de acordo com o tempo de permanência nos ambientes ou devido ao seu aporte contínuo. Além disso, podem provocar diferentes desequilíbrios ecológicos nos ecossistemas, mesmo em baixas concentrações (ppt). A título de exemplificação, temos o lançamento do hormônio sintético 17 α -etinilestradiol (EE2), que possui ação desreguladora do sistema endócrino [2].

A constante detecção dos CE em águas residuais sugere que as técnicas de tratamento comumente utilizadas nas Estações de Tratamento de Efluentes (ETE) não os removem de forma eficiente. Tal fato pode ser explicado, pois as ETEs convencionais não foram originalmente dimensionadas para a remoção destes contaminantes [3]. Neste contexto, o uso de microalgas tem sido proposto como uma alternativa sustentável e de baixo custo para o tratamento terciário de efluentes. Isto se deve pela alta eficiência desses microrganismos na remoção/biotransformação e/ou adsorção de nutrientes, matéria orgânica, metais pesados, fármacos, entre outros poluentes de matrizes aquáticas [4].

Devido à sua diversidade metabólica e de constituição química, as microalgas apresentam um potencial de exploração em diferentes setores industriais. A biomassa obtida ao final do tratamento pode ser convertida em uma série de biocombustíveis por rotas termoquímicas, químicas e bioquímicas. Os processos químicos e bioquímicos compreendem a transesterificação de lipídios em biodiesel [5], a fermentação de carboidratos para produzir bioetanol [6] e a digestão anaeróbica para a geração de biogás [7]. Os processos termoquímicos compreendem a decomposição térmica da biomassa de algas em combustíveis líquidos e gasosos [8]. Outra vantagem significativa do cultivo de microalgas é o seu potencial de mitigação de gases do efeito estufa (CO₂), contribuindo para o desenvolvimento de tecnologias limpas [9]. Portanto, com a aplicação de microalgas é possível aliar o tratamento de efluentes com a geração de produtos de valor agregado, garantindo maior eficiência e sustentabilidade do processo e proporcionando benefícios econômicos e ambientais.

OBJETIVOS

O objetivo do presente estudo foi avaliar o potencial de remoção do hormônio sintético 17 α -etinilestradiol (EE2), geralmente encontrado em efluentes domésticos, pela microalga marinha *Nannochloropsis oculata*, aplicada como tratamento terciário de efluentes.

Além disso, este estudo ainda teve como objetivo avaliar a viabilidade de produção de biomassa da microalga marinha *N. oculata* visando a produção de biocombustíveis.

MATERIAIS E MÉTODOS

Os cultivos de *Nannochloropsis oculata* foram realizados em meio estéril F/2 [10] com salinidade de 35 e pH ajustado para 8,5; o meio teve como base água do mar obtida no Instituto de Ecodesenvolvimento da Baía da Ilha Grande (IED-BIG), localizado em Angra dos Reis, RJ.

As culturas foram mantidas em frascos de 5L sob condições controladas de aeração, a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e iluminação contínua a $300 \mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. A microalga foi cultivada por 20 dias, alcançando concentração final em massa seca de $0,94 \pm 0,09 \text{ g.L}^{-1}$. A suspensão celular foi centrifugada (3500 rpm/15 min) a 4°C e o pellet foi congelado e liofilizado (Terroni Enterprise II Benchtop lyophilizer series).

Para eliminar uma possível interferência salina nas análises, a biomassa seca de *N. oculata* foi ressuspensa em água Milli-Q®, novamente centrifugada (6000 rpm/10 min) a 25°C e liofilizada.

Os ensaios foram divididos em duas etapas, sendo a primeira, os ensaios de biossorção para a remoção do hormônio sintético EE2 e a segunda, avaliação da composição bioquímica da biomassa microalgácea, ambas descritas a seguir.

PRIMEIRA ETAPA: ENSAIOS DE BIOSSORÇÃO PARA A REMOÇÃO DO HORMÔNIO SINTÉTICO EE2

As variáveis previamente definidas foram: massa da microalga seca (30 mg); tempo de contato (20 horas); pH (7); velocidade de agitação (150 rpm); e temperatura ($25 \pm 2^\circ\text{C}$). Os ensaios foram realizados em erlenmeyers de 125 mL contendo um volume de 50 mL de solução, variando a concentração de EE2 de 5 a 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$, totalizando 10 pontos de análise. Após os ensaios, a biomassa foi removida da solução por centrifugação (6000 rpm/10 min) e o sobrenadante foi filtrado em filtro de seringa de 0,20 μm (Millex®-LG, Merck). A identificação e quantificação do EE2 foram realizadas por meio de cromatografia líquida de *ultra-performance* (Waters ACQUITY®), acoplada à espectrometria de massas *in tandem* (Xevo TQD®) e triplo quadrupolo (UPLCMS/MS Waters).

Os modelos isotérmicos Langmuir [11] e Freundlich [12] foram aplicados e avaliados para verificação da melhor descrição do equilíbrio de bioadsorção ocorrido no ensaio.

RESULTADOS DA PRIMEIRA ETAPA

A redução da concentração de EE2 nos testes de bioadsorção com a biomassa seca de *N. oculata* (Figura 1) evidenciou que a taxa de remoção do analito apresentou uma variação entre 52% e 74%, onde as menores concentrações (5-15 $\mu\text{g.L}^{-1}$) geraram os melhores resultados de remoção do hormônio (63-74%), sendo a maior verificada na concentração de 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$. No que se refere à degradação natural, foi verificada uma atenuação de 36%, ou seja, redução da concentração de 50 para 32 $\mu\text{g.L}^{-1}$.

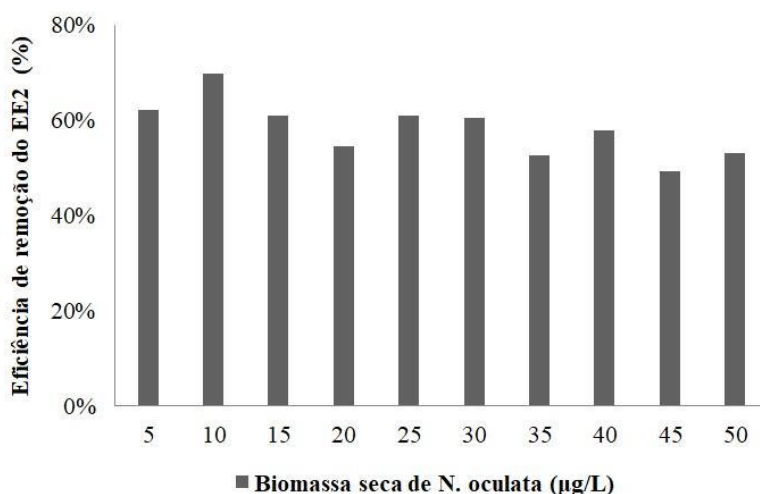


Figura 1: Gráfico percentual da eficiência de remoção de EE2 pela biomassa seca da microalga *Nannochloropsis oculata*.

Embora a atenuação natural impulsionada pela luz possa remover parcialmente o EE2 no nível $\mu\text{g.L}^{-1}$, a extensão da remoção é substancialmente aumentada com a adição do bioadsorvente.

As isotermas de equilíbrio foram importantes para melhor compreender o comportamento e o mecanismo da bioadsorção. A isoterma (Figura 2) apresentou um comportamento típico favorável, indicando uma clara tendência à estabilização devido à diminuição da disponibilidade de sítios ativos. No entanto, na representação gráfica não foi possível observar um platô que indique a saturação da camada adsorvente. Assim, mais estudos são necessários para a otimização e investigação da capacidade máxima de adsorção da biomassa.

O modelo isotérmico que melhor se ajustou aos dados experimentais foi o de Freundlich (Figura 3). Tal modelo sugeriu que a adsorção ocorreu em múltiplas camadas, o adsorvato teve uma distribuição heterogênea sobre a

superfície, a distribuição de energia da adsorção não foi uniforme e que houve uma variedade de interações entre o adsorvente e o adsorvato [12].

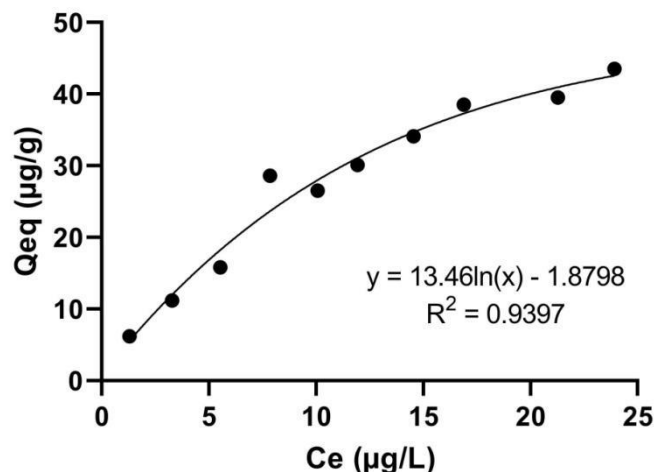


Figura 2: Isoterma de equilíbrio de adsorção da biomassa seca da microalga *Nannochloropsis oculata*.

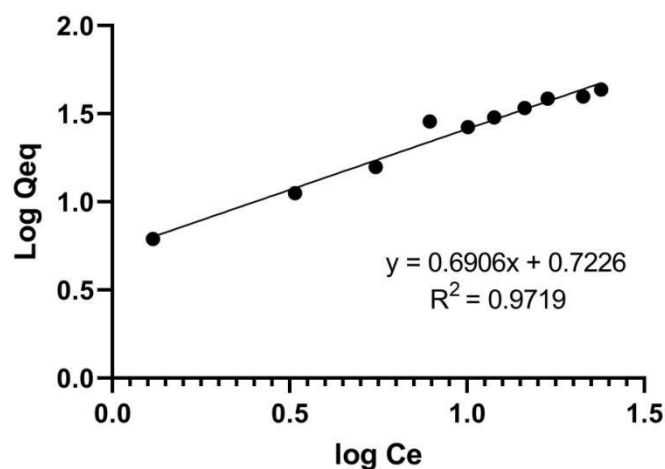


Figura 3: Isoterma de equilíbrio de adsorção da biomassa seca da microalga *Nannochloropsis oculata*, conforme modelo de Freundlich.

SEGUNDA ETAPA: AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA DA BIOMASSA MICROALGÁCEA

As avaliações da composição bioquímica da biomassa foram realizadas antes e após os ensaios de biossorção para a remoção do EE2 da matriz aquosa. A quantificação dos carboidratos foi estimada segundo protocolo adaptado de Dubois *et al.* [13]. Os lipídios totais foram quantificados segundo Folch modificado [14]. Após a transesterificação dos lipídios, os frascos foram transferidos para o injetor automático do cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas Shimadzu GCMS-QP-2010. A identificação dos FAME's (ésteres metílicos de ácidos graxos) foi realizada por similaridade espectral através da comparação com a biblioteca de espectros de ionização de elétrons (EI – 70 eV) do NIST.

RESULTADOS DA SEGUNDA ETAPA

A composição química das microalgas pode apresentar variações quantitativas dependendo da cepa e das condições de cultivo. Portanto, é possível manipular seu conteúdo intracelular, otimizando as condições e/ou as características do meio de cultivo.

Dentre as várias espécies de microalgas estudadas, a microalga marinha *N. oculata* tem se destacado por apresentar rápido crescimento, grande resistência a condições adversas de cultivo, alta produtividade de óleo e alta taxa de fixação de carbono [15], o que a torna uma matéria-prima promissora para a produção de biocombustíveis e outros produtos de alto valor agregado.

Além disso, em seu cultivo foi utilizada água do mar, reduzindo substancialmente o uso de água potável para a obtenção da biomassa. Tal fato, torna o processo mais sustentável e permite o cultivo em larga escala de microalgas marinhas, inclusive, em lagoas abertas, uma vez que a contaminação pode ser reduzida pelo cultivo de alta salinidade [16].

Na tabela 1 estão contidas informações sobre o percentual em carboidratos e lipídios na biomassa de *N. oculata*, antes e após os ensaios de bio sorção para a remoção do contaminante analisado.

Tabela 1: Resultados do percentual de carboidratos e lipídios totais na biomassa seca da microalga *Nannochloropsis oculata*, antes e após os ensaios de bio sorção para a remoção do hormônio EE2.

	Lipídios na biomassa – pré tratamento EE2 (%)	Carboidratos na biomassa - pré tratamento (%)	Lipídios na biomassa – pós tratamento EE2 (%)	Carboidratos na biomassa – pós tratamento EE2 (%)
Biomassa seca de <i>N. oculata</i>	58.79 ± 1.44	13.77 ± 0.18	57.62 ± 1.24	16.89 ± 0.45

O percentual de carboidratos e lipídios totais encontrados no presente estudo, corroborou os resultados geralmente encontrados na literatura, para as determinadas condições de cultivo [17, 18]. As análises do perfil em ácidos graxos, evidenciaram a predominância dos ácidos graxos: C16:0 (29,2%), C18:1 (23,2%), C18:2 (16,3%) e C18:3 (13,6%), representando 82,3% em relação ao total de ácidos graxos identificados. O alto percentual de lipídios na biomassa e o perfil de ácidos graxos obtidos no presente estudo, permitiram a demonstração do potencial de aplicação de *N. oculata* em diversos setores industriais.

Além do alto potencial dos lipídios, as microalgas podem também acumular conteúdo considerável de carboidratos com potencial para ser utilizado na produção de bioetanol [6], sendo possível, inclusive, a produção de bioetanol e de biodiesel de modo simultâneo [19]. Uma vez que o biodiesel é produzido a partir da fração lipídica das microalgas e após a extração desta, os carboidratos permanecem na biomassa, os quais podem posteriormente passar pelo processo de fermentação para a produção de bioetanol. Além disso, a fermentação de bioetanol à base de microalgas apresenta maiores vantagens sustentáveis e comerciais sobre a biomassa lignocelulósica.

Portanto, a produção de microalgas em água do mar visando a aplicação dos lipídios e carboidratos da biomassa como matéria-prima para a produção conjunta de biodiesel e bioetanol, após a remoção de contaminantes emergentes de efluentes, configura uma proposta sustentável. Reduzindo, dessa forma, o alto custo associado à produção de biocombustíveis a partir de microalgas, com os benefícios adicionais do tratamento terciário de efluentes de forma mais eficiente.

CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo demonstram a eficiência da microalga marinha *Nannochloropsis oculata* como bio sorvente para a remoção do hormônio 17 α - etinilestradiol (EE2) de solução aquosa, bem como o grande potencial para a produção de biocombustíveis, visto o alto percentual de lipídios na biomassa.

A proposta do presente estudo seguiu os princípios da economia circular, apresentando uma possibilidade viável, atraente e sustentável de integrar o tratamento terciário de compostos emergentes geralmente presentes no efluente final das ETEs convencionais com a produção de produtos de valor agregado - fornecendo, após o tratamento, a matéria prima para a produção de biocombustíveis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. MONTAGNER, C.C. et al. (2017). Contaminantes emergentes em matrizes aquáticas do Brasil: cenário atual e aspectos analíticos, ecotoxicológicos e regulatórios. *Quim. Nova*, 40(9), 1094-1110.
2. SALOMÃO, A.L.S., MARQUES, M. (2015). *Estrogenicity and genotoxicity detection in different contaminated waters. Hum. Ecol. Risk Assess*, 21(7), 1793-1809.
3. MOLINA, M.C. et al. (2020). *From Laboratory Tests to the Ecoremedial System: The Importance of Microorganisms in the Recovery of PPCPs-Disturbed Ecosystems. Appl. Sci*, 10, 3391.
4. VASSALLE, L. et al. (2020). *Bioremediation of emerging micropollutants in irrigation water. The alternative of microalgae-based treatments. J. Environ. Manage.* 274, 111081.
5. PARK, J. et al. (2014). *Advances in direct transesterification of algal oils from wet biomass. Bioresour. Technol.*
6. HO, S. et al. (2013). *Bioethanol production using carbohydrate-rich microalgae biomass as feedstock. Bioresour. Technol.* 135, 191-198.
7. BATISTA, A.P. et al. (2014). *Combining urban wastewater treatment with biohydrogen production – an integrated microalgae-based approach, Bioresour. Technol.*
8. CHIARAMONTI, D. et al. (2016). *Review and experimental study on pyrolysis and hydrothermal liquefaction of microalgae for biofuel production. Appl. Energy*, 1-10.
9. ALMOMANI, F. et al. (2019). *Impact of CO2 concentration and ambient conditions on microalgal growth and nutrient removal from wastewater by a photobioreactor. Sci. Total Environ*, 662, 662-671.
10. GUILLARD, R.R. (1975). *Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In Culture of marine invertebrate animals. Springer*, 29-60.
11. LANGMUIR, I. (1918). *The adsorption of gases on plane surface of glass, mica and platinum. J. Am. Chem. Soc.* 40, 1361-1403.
12. FREUNDLICH, H.M.F. (1906). *Over the Adsorption in Solution. Open J. Phys. Chem*, 57, 385-471.
13. DUBOIS et al. (1956). *Colorimetric Method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem.* 28(3), 350-356.
14. FOLCH, J. et al. (1956). *A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. J. Biol. Chem.* 226 (1), 497-509.
15. ZANELLA, L., VIANELLO, F. (2020). *Microalgae of the genus Nannochloropsis: Chemical composition and functional implications for human nutrition. J. Funct. Foods.*
16. MA, X. N. et al. (2016). *Lipid production from Nannochloropsis. Mar. Drugs*, 14 (4), p. 61.
17. KATHOON, H. et al. (2014). *Effects of different salinities and pH on the growth and proximate composition of Nannochloropsis sp. and Tetraselmis sp. isolated from South China Sea cultured under control and natural condition. Int. Biodeterior. Biodegradation.* 95(A), p.11-18.
18. MA, Y. B. et al. (2014). *Evaluation of the potential of 9 Nannochloropsis strains for biodiesel production. Bioresour. Technol.* 167:503-509. doi: 10.1016/j.biortech.2014.06.047.
19. WANG, H. et al. (2014). *Joint production of biodiesel and bioethanol from filamentous oleaginous microalgae Tribonema sp. Bioresour. Technol.* 172:169-173.