



## COMPOSIÇÃO DE LIPÍDIOS E ÁCIDOS GRAXOS DE *Spirulina* sp. (LEB18) PRODUZIDA EM ÁGUA RESIDUAL DA AQUICULTURA.

Isabella Borges dos Anjos da Silva<sup>1</sup>; Lucas Guimarães Cardoso<sup>2</sup>; Jessica Hartwig Duarte<sup>3</sup>; Jorge Alberto Vieira Costa<sup>3</sup>; Denilson de Jesus Assis<sup>4</sup>; Janice Izabel Druzian<sup>5</sup>; Fabio Alexandre Chinalia<sup>2</sup>; Karina Lizzeth Pedraza Galván<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia; Salvador/BA; isaanjos99@hotmail.com

<sup>2</sup>Instituto de Ciências da Saúde, Departamento de Biotecnologia, Universidade Federal da Bahia; Salvador/BA

<sup>3</sup>Laboratório de Engenharia Bioquímica, Faculdade de Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande; Rio Grande/RS

<sup>4</sup>Escola de Arquitetura, Engenharia e Tecnologia da Informação, Universidade de Salvador; Salvador/BA

<sup>5</sup>Programa de Graduação em Ciências dos Alimentos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia; Salvador/BA

**Resumo:** O objetivo foi avaliar a composição de lipídios e ácidos graxos de *Spirulina* sp. (LEB 18) cultivada em água residual de aquicultura. Os cultivos foram realizados em fotobiorreatores (1L) com 100% de água residual de aquicultura suplementada com T-25, T-50, T-75. Os maiores teores de ácidos graxos poliinsaturados (38,20% e 40,66%) e C18:3n6 (38,20% e 33,50%) foram encontrados em 25% e 50%, respectivamente. Assim, os tratamentos com 25% e 50% representam uma alternativa eficiente, barata e sustentável para o setor de aquicultura, reduzindo os impactos das descargas de efluentes, produzindo biomassa de baixo custo com características diferenciadas e alto valor agregado.

**Palavras-Chave:** *Spirulina*; biorremediação; aquicultura; tratamento de água residual.

## LIPID AND FATTY ACIDS COMPOSITION OF *Spirulina* sp. (LEB18) PRODUCED IN AQUACULTURE RESIDUAL WATER.

**Abstract:** The objective was to evaluate the lipid and fatty acids composition of *Spirulina* sp. (LEB 18) grown in aquaculture wastewater. Cultures were performed in photobioreactors (1L) with 100% residual aquaculture water supplemented with T-25, T-50, T-75. The highest content of polyunsaturated fatty acids (38,20% and 40,66%) and C18:3n6 (38,20% and 33,50%) were found in 25% and 50%, respectively. Thus, the with 25% and 50% treatments represent an efficient, cheap and sustainable alternative for the aquaculture sector, reducing the impacts of effluent discharges, producing low cost biomass with different characteristics and high added value.

**Keywords:** *Spirulina*; bioremediation; aquaculture; wastewater treatment.



## 1. INTRODUÇÃO

A aquicultura cresce a uma taxa constante de 4,5% ao ano. Em 2017, essa atividade industrial atingiu uma safra global total de 83,6 milhões de toneladas, representando 55% do total de peixes utilizados para consumo humano direto [1]. O Relatório do Banco Mundial estima que a aquicultura produza metade da oferta mundial de pescado até 2030 [2]. Segundo Wuang et al. [3], a aquicultura intensiva utiliza grandes quantidades de água doce limpa e gera fluxos de águas residuais ricas em nutrientes que podem causar a eutrofização das águas costeiras e impactar negativamente as comunidades biológicas a jusante.

A *Spirulina* sp. é fonte potencial de diversos compostos químicos. Dentre eles, os ácidos graxos que correspondem à maior fração lipídica, assim como representam os maiores teores de poliinsaturados (PUFA's) em 25% e 50% dos lipídios totais. Dessa forma, para Radmann et al. [4], os ácidos graxos quando extraídos podem ser utilizados como alimentos, fármacos ou transformados em bicompostíveis. Para isso, Moraes et al. [5] consideram que para a produção de biodiesel é preferível que os ácidos graxos obtidos da biomassa sejam saturados, possuam alto número de cetano e que tenham menor capacidade de ocorrer oxidação do que os compostos insaturados.

Por outro lado, o crescimento da indústria de biomassa da *Spirulina* sp. e a aquicultura dependem diretamente da implementação de novos sistemas de cultivo destinados a reduzir custos e minimizar os impactos ambientais. Esta pesquisa visa aliar a produção de biomassa de *Spirulina* sp. através da reutilização e tratamento de águas residuais de aquicultura, determinando o melhor desempenho de produção através da composição de biomassa. Para atingir tal objetivo, o efluente aquícola foi suplementado com diferentes quantidades de nutrientes para favorecer o melhor desempenho de produção.

## 2. METODOLOGIA

### 2.1. Água Residual da Aquicultura, Estirpe de Algas e Meio de Cultura

O efluente aquícola foi gentilmente cedido pela Bahia Pesca S/A, localizada na Fazenda Joanes II, em Camaçari - Bahia (Nordeste do Brasil, 12°41'51"S e longitude 38°19'27"O). A cepa de *Spirulina* foi isolada da Lagoa Mangueira, no sul do Brasil (latitude 32°32'05 "S e longitude 33°31'57"O) e mantida em meio de Zarrouk conforme a metodologia de Costa et al. [6]. As cianobactérias *Spirulina* sp. (LEB 18) foi obtida da Coleção de Cultura do Laboratório de Engenharia Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande (FURG).



## 2.2. Preparação do Inoculo

A água residual do cultivo de tilápia (*Oreochromis niloticus*) foi primeiramente suplementada com diferentes porcentagens do meio sintético de Zarrouk (ZM)  $\text{NaHCO}_3$  16.8 g/L;  $\text{NaNO}_3$  2.5 g/L;  $\text{NaCl}$  1.0 g/L;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.5 g/L;  $\text{K}_2\text{SO}_4$  1.0 g/L;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2 g/L;  $\text{CaCl}_2$  0.031 g/L;  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  0.08 g/L;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.01 g/L [6]. Devido ao seu reconhecido equilíbrio nutricional, este meio de alga é o comumente utilizado para o cultivo da *Spirulina* sp. Os experimentos foram realizados apenas com a água residual da aquicultura (T-0) e com os respectivos tratamentos 25, 50 e 75% dos nutrientes totais de Zarrouk (T-25, T-50 e T-75) seguindo proporções similares ao adotado por Kuo et al. [7] e Daneshvar et al. [8]. Após a suplementação, cada tratamento foi inoculado com *Spirulina* sp. (LEB 18) (no fim da fase exponencial). O crescimento foi monitorado por 7 dias, após o período a biomassa foi coletada para avaliar a produção, caracterização de biomassa (proteína, lipídios e carboidratos) e eficiência da remoção de nutrientes (utilizado para quantificar o efeito potencial do tratamento causado pelo crescimento de *Spirulina* sp. (LEB18)). O lipídeo extraído da biomassa foi caracterizado e a qualidade potencial do biodiesel a ser produzido foi estimada.

## 2.3. Procedimento Experimental

A biomassa da *Spirulina* sp. (LEB18) foi obtida a partir de um tanque de pista (210 L) em cultura contínua (0,1 biomassa g/L) mantido com o meio Zarrouk. Os diferentes ensaios foram preparados em Erlenmeyer com um volume de trabalho de 1 L por meio da utilização da água residual de aquicultura (800 ml) inoculada com a *Spirulina* sp. (LEB18) com concentração de 0,3 g/L de biomassa viva. Os experimentos seguiram a metodologia proposta por Kuo et al. [7] e Daneshvar et al. [8].

Os tratamentos experimentais (T-25, T-50 e T-75) foram preparados com o fornecimento de fotobiorreatores de 1 L (água de aquicultura/inóculo) com 25, 50 e 75% do total de nutrientes médios de Zarrouk individualmente. O T-0 corresponde ao efluente aquícola sem suplementação de nutrientes e o controle ao meio sintético Zarrouk. A incubação foi realizada durante 7 dias a 30°C com fotoperíodo de 12 horas claro/escuro. O ar foi fornecido a todas as culturas e lâmpadas tubulares fluorescentes com uma intensidade de luz de  $41,6 \mu\text{mol}_{\text{fótons}} \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$  foram usadas como fonte de energia.

## 2.4. Composição de Ácidos Graxos

Os ácidos graxos foram transesterificados com trifluoreto de boro hexano e os ácidos graxos individuais das biomassas foram identificados por cromatografia gasosa. Os ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME) foram separados e identificados em um cromatógrafo a gás (Clarus 680; Perkin Elmer®) com uma



coluna DB-FFAP (30 m × 0.32 mm × 0.25 mm) e equipados com um detector de ionização de chama. Os parâmetros de análise incluíram temperaturas do injetor e detector de 250°C e 280°C, respectivamente. Utilizou-se o programa de temperatura a seguir: 150°C por 16 min, aumentando em 2 °C/min até 180°C. Essa temperatura foi mantida por 25 min e em seguida foi feito um aumento de 5 °C/min até 210°C, mantido por 25 min. Foi utilizado hélio como gás de arraste a 1.0 mL min<sup>-1</sup>. Um fluxo de gás hidrogênio e de ar sintético foi fornecido em 30 e 300 mL min<sup>-1</sup>, respectivamente. As injeções foram realizadas em duplicata para cada extração em um volume de 1 µL. Os FAME foram identificados comparando os tempos de retenção com uma mistura de padrões conhecidos (C4-C24, 18, 919-AMP; Sigma-Aldrich®). A quantificação dos ácidos graxos, expressa em mg g<sup>-1</sup> de lipídeos foi realizada pela adição do padrão interno tricosanoato de metila (C23:0; Sigma Aldrich®). As áreas dos picos foram determinadas através da metodologia de Nascimento et al. [9] utilizando o software de estação de tratamento de cromatografia para normalizar a porcentagem de áreas de ácidos graxos totais.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados apresentados na Tabela 1 mostram que os principais ácidos graxos são C16:0, C18:3n6 e C18:1n9-9. Segundo Malibari et al. [10], o ácido oleico (C18:1n-9) foi encontrado em percentagens elevadas em MUFAs sintetizadas por *Chlorella* sp., *Dunaliella* sp. e *Tetraselmis* sp. cultivada em águas residuais de fazendas de camarão. De acordo com Matos et al. [11] e baseado na literatura, C16 e C18 são dois ácidos graxos principais que são produzidos por processos enzimáticos e alongamento da cadeia de carbono e reações de desnaturação. Sendo assim, Gao et al. [12] observaram que as composições de ácidos graxos de *Chlorella* sp. o G-9, cultivado em águas residuais foi obtido com diferentes proporções de carbono orgânico total / nitrogênio total, consistindo principalmente de (C16:0), (C18:2) e (C18:3), que foi de 20,5–23,5%, 25,4–29,4 % e 11,7-19,8%, respectivamente.

Tabela 1. Composição dos ácidos graxos da *Spirulina* sp. (LEB18) cultivada em 100% da água residual da aquicultura suplementada com diferentes concentrações de Zarrouk (Controle, T-25, T-50, T-75, T-0).

Ácidos Graxos	Nome comum	Tratamento				
		Controle	T-25	T-50	T-75	T-0
11:0	Hendecanóico	1.65 ± 0.08	2.96 ± 0.26	8.05 ± 0.12	2.77 ± 0.02	3.76 ± 0.08
		0.84 ± 0.02	3.56 ± 1.08	4.48 ± 0.89	ND	ND
14:0	Mirístico	31.43 ± 4.03	48.12 ± 0.51	44.79 ± 0.51	48.60 ± 0.79	49.65 ± 0.46
		ND	ND	2.08 ± 0.20	ND	ND
16:0	Palmitico	2.18 ± 0.97	ND	ND	ND	ND
18:0	Estearico	10.58 ±	12.66 ±	9.31 ±	10.43	10.52 ±
16:1n7	Palmitoleico					
18:1n9	Oleico					



		4.72	1.17	0.84	±0.56	0.53
18:2n6	Linoleico	9.16 ±	9.34 ±	11.92 ±	14.18 ±	13.10 ±
		4.08	0.73	0.70	0.26	0.57
18:3n6	γ-linolênico	15.67 ±	23.29 ±	21.94 ±	24.02 ±	18.91 ±
		6.99	1.79	0.59	0.51	0.12
<b>Saturados</b>		33.92 ±	54.64 ±	59.40 ±	51.43 ±	53.41 ±
		0.05 <sup>c</sup>	0.05 <sup>c</sup>	0.12 <sup>a</sup>	0.07 <sup>d</sup>	0.02 <sup>b</sup>
<b>Insaturados</b>		37.59 ±	45.29 ±	43.17 ±	48.63 ±	42.53 ±
		0.07 <sup>c</sup>	0.01 <sup>d</sup>	0.03 <sup>b</sup>	0.05 <sup>a</sup>	0.08 <sup>b</sup>
<b>Monosaturados</b>		12.76 ±	12.66 ±	9.31 ±	10.43 ±	10.52 ±
		0.06 <sup>d</sup>	0.01 <sup>a</sup>	0.02 <sup>c</sup>	0.01 <sup>b</sup>	0.01 <sup>b</sup>
<b>Poliinsaturados</b>		24.83 ±	32.63 ±	33.86 ±	38.20 ±	32.01 ±
		0.01 <sup>a</sup>	0.06 <sup>b</sup>	0.01 <sup>b</sup>	0.02 <sup>c</sup>	0.01 <sup>b</sup>

Média ± desvio padrão; Letras equivalentes sobrepostas (a-d) na mesma linha indicam que não houve diferença significativa entre os valores no nível de confiança de 95%. ND = Não identificado.

Conforme Kuo et al. [7], o efluente aquícola foi previamente reconhecido como meio adequado para o cultivo de *Chlorella* sp. com o objetivo de coleta do óleo. Os autores associaram boa qualidade do biodiesel obtido, à presença significativa de ácidos graxos C16:0, C18:0, C18:1 e C18:2. Entretanto, Nascimento et al. [9] inferem que essa combinação gera um biodiesel com atrasos de ignição curtos resultantes do alto nível de cetona. A Tabela 1 mostra que o T-25 e T-50 resultaram em altas concentrações de ácidos graxos saturados, denotando seu potencial para produzir um biodiesel de alta qualidade.

Os ácidos graxos saturados variaram entre 34 e 60% de todas as amostras, sendo assim Malibari et al. [10] evidenciou que os lipídios produzidos em efluentes de fazendas de camarão têm maior teor de ácidos graxos saturados, dentre eles os poliinsaturados e monoinsaturados variaram entre 24-38% e 9-12%, respectivamente. Ge et al. [13] observaram que os ácidos graxos insaturados, principalmente poli-insaturados, por possuírem ligações duplas podem sofrer degradação biológica e necessitar de uma posterior hidrogenação catalítica parcial, além de serem suscetíveis à oxidação durante o armazenamento. Ademais, para Freire et al. [14] e Zhang et al. [15] os ácidos graxos insaturados podem ser usados na alimentação de espécies marinhas fornecendo energia aos animais, formando componentes da membrana celular e substâncias altamente bioativas, regulando o metabolismo lipídico e apoiando a função imunológica.

Em estudo realizado por Santos et al. [16] abordou que a biomassa de *Spirulina* sp. produzida em escala piloto é rica em ácidos graxos poliinsaturados de valor comercial, como C18:3n6. No presente estudo, esse ácido graxo compreendeu 16% do total de lipídios produzidos no T-25. Em relação ao ácido gamalinolênico (C18:3n6), Perini et al. [17] relataram o papel importante deste ácido graxo na prevenção de doenças cardiovasculares e aterosclerose, doenças inflamatórias crônicas, inibição de vasoconstrição e agregação plaquetária, no crescimento fetal e desenvolvimento neural, ação anti-inflamatória e antitrombótica, ação sobre a prevenção do câncer e participação nas funções imunomoduladoras. Além disso, segundo Pokhrel et al. [18], o tratamento com T-25 também mostrou uma produção significativa de C16:0; que é essencial para o consumo humano e animal. Portanto,



o uso de águas residuais da aquicultura suplementada com 25% de nutrientes de Zarrouk é uma estratégia adequada para afetar positivamente o teor de ácidos graxos de *Spirulina* sp.

#### 4. CONCLUSÃO

O estudo demonstrou o desempenho de crescimento da *Spirulina* sp. (LEB18) em águas residuais de aquicultura suplementadas com quantidades distintas de nutrientes apresentou perfil de ácidos graxos com significativo valor nutricional humano e animal, juntamente com os constituintes certos para a produção de um biodiesel de alta qualidade. Assim, a *Spirulina* sp. (LEB18) cultivada em água residual do cultivo de *Oreochromis niloticus* suplementado com 25% e 50% de Zarrouk, representa uma alternativa sustentável para melhorar as condições ambientais da prática aquícola, reduzindo os impactos das descargas de águas residuais e obtendo biomassa com baixo custo, propriedades diferenciadas e de alto valor agregado.

#### Agradecimentos

Todos os autores agradecem o apoio da FAPESB – Fundação de Amparo à Pesquisa da Bahia no projeto CNPQ (400710 / 2014-5), MCTIC (Ministério da Ciência e Tecnologia da Informação e Comunicação) – Brasil e Bahia Pesca.

#### 5. REFERÊNCIAS

<sup>1</sup>FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. The State of World Fisheries and Aquaculture. **Meeting The Sustainable Development Goals**, Rome, 223 p., 2018.

<sup>2</sup>WORLD BANK REPORT. Fish to 2030: prospects for fisheries and aquaculture. **The World Bank**, Washington, DC, n. 83177, dez. 2013.

<sup>3</sup>WUANG, S. C. CHUA, P. Q. D. KHIN, M. C. LUO, Y. D. Use of *Spirulina* biomass produced from treatment of aquaculture wastewater as agricultural fertilizers. **Algal Research**, v. 15, p. 59–64, abr. 2016.

<sup>4</sup>RADMANN, E. M. COSTA, J. A. Conteúdo lipídico e composição de ácidos graxos de microalgas expostas aos gases CO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub> e NO. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1609-1612, set. 2018.

<sup>5</sup>MORAIS, M. G. COSTA, J. A. Perfil de ácidos graxos de microalgas cultivadas com dióxido de carbono. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 4, p. 1245-1251, jul/ago 2008.



- <sup>6</sup>COSTA, J. A. V. COLLA, L. M. FILHO, P. D. KABKE, K. et al. Modelling of *Spirulina platensis* growth in fresh water using response surface methodology. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 18, p. 603-607, 2004.
- <sup>7</sup>KUO, CM. CHEN, TY. LIN, TH. KAO, CY. et al. Cultivation of *Chlorella* sp., GD using piggery wastewater for biomass and lipid production. **Bioresource Technology**, v. 194, p. 326–333, out. 2015.
- <sup>8</sup>DANESHVAR, E. ANTIKAINEN, L. KOUTRA, E. KORAROS, M. et al. Investigation on the feasibility of *Chlorella vulgaris* cultivation in a mixture of pulp and aquaculture effluents: Treatment of wastewater and lipid extraction. **Bioresource Technology**, v. 255, p. 104–110, jan. 2018.
- <sup>9</sup>NASCIMENTO, I. A. MARQUES, S. TELES. I. CARVALHO, G. C. et al. Microalgae Versus Land Crops as Feedstock for Biodiesel: Productivity, Quality and Standard Compliance. **BioEnergy Research**, v. 7, p. 1002–1013, mar. 2014.
- <sup>10</sup>MALIBARI, R. SAYEGH, F. ELAZZAZY, A. M. BAESHEN. M. N. et al. Reuse of shrimp farm wastewater as growth medium for marine microalgae isolated from Red Sea e Jeddah. **Journal of Cleaner Production**, v. 198, p. 160-169, jul. 2018.
- <sup>11</sup>MATOS, Â. P. MOECKE. E. H. S. SANT'ANNA, E. S. The use of desalination concentrate as a potential substrate for microalgae cultivation in Brazil. **Algal Research**, v. 24, p. 505-508, jun. 2017.
- <sup>12</sup>GAO, F. YANG, HL. LI, C. PENG, YY. et al. Effect of organic carbon to nitrogen ratio in wastewater on growth, nutrient uptake and lipid accumulation of a mixotrophic microalgae *Chlorella* sp. **Bioresource Technology**, v. 282, p. 118-124, jun. 2019.
- <sup>13</sup>GE, S. CHAMPAGNE, P. Nutrient removal, microalgal biomass growth,harvesting and lipid yield in response to centrate wastewater loadings. **Water Research**, v. 88, p. 604–612, jan. 2016.
- <sup>14</sup>FREIRE, I. CORTINA, A. BARREIRO, P. LLAMAS, B. et al. *Nannochloropsis limnetica*: A freshwater microalga for marine aquaculture. **Aquaculture Research**, v. 459, p. 124-130, 2016.
- <sup>15</sup>ZHANG, L. PEI, H. YANG, Z. WANG, X. et al. Microalgae nourished by mariculture wastewater aids aquaculture self-reliance with desirable biochemical composition. **Bioresource Technology**, v. 278, p. 205-213, abr. 2019.
- <sup>16</sup>SANTOS, C. UEBEL, L. COSTA, S. MIRANDA, A. et al. Outdoor pilot-scale cultivation of *Spirulina* sp. LEB-18 in different geographic locations for evaluating its growth and chemical composition. **Bioresource Technology**, v. 256, p. 86–94, mai. 2018.
- <sup>17</sup>PERINI, J. STEVANATO, F. SARGI, S. VISENTAINER, J. et al. Ácidos graxos poli-insaturados n-3 e n-6: metabolismo em mamíferos e resposta imune. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 6, nov./dez. 2010. ISSN 1415-5273.
- <sup>18</sup>POKHREL, A. SONI, P. Performance analysis of different rice-based cropping systems in tropical region of Nepal. **Journal of Environmental Management**, v. 197, p. 70–79, jul. 2017.