

PROGRAMA INSTITUCIONAL DE BOLSAS DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA – PIBIC

**AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO E DA PRODUÇÃO DE
LIPÍDIOS DA MICROALGA CHLORELLA VULGARIS
EMPREGANDO MEIO DE CULTIVO SINTÉTICO E
RESÍDUO AGROINDUSTRIAL**

Área do Conhecimento: Engenharia

Subárea do Conhecimento: Processos Bioquímicos

Especialidade do Conhecimento: Microalgas

Relatório Final

Período da bolsa: 08/2020 a 08/2021

Este Projeto é desenvolvido com bolsa de iniciação científica

PIBIC/CNPq

Orientador: Prof^a Dr^a Jacqueline Rêgo da Silva Rodrigues

Autor: Ramon da Silva Santos

SUMARIO

1. INTRODUÇÃO.....	3
2. OBJETIVOS.....	5
2.1. Objetivos Gerais	5
2.2. Objetivos Específicos.....	5
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	6
3.1. Microalgas	6
3.2. Tipos de Microalgas	7
3.3. Cultivo e Crescimento	8
3.4. Importância.....	12
3.5. <i>Chlorella</i>	15
3.6. Lipídios.....	15
3.7. Manipueira.....	17
4. METODOLOGIA.....	20
4.1. Cultivo das <i>Chlorella Vulgaris</i>	20
4.2. Cinética de Crescimento e Curva de Calibração	20
4.3. Ruptura Celular das Microalgas.....	23
4.4. Extração de Lipídios	22
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	24
5.1. Cultivo e crescimento das <i>Chlorella Vulgaris</i>	24
5.1.1. Cultivo no meio de cultura sintético convencional - BG11	24
5.1.2. Cultivo no BG11 com potencial de fósforo reduzido	27
5.1.3. Cultivo no BG11 com Manipueira	30
5.2. Curva de Calibração.....	31
5.2.1. No meio de cultura sintético BG11	32
5.2.2. No meio de cultura BG11 com potencial de fósforo reduzido	34
5.2.3. No meio de cultura com Manipueira	36
5.3. Concentração de biomassa nos diferentes meios de cultura	37
5.4. Ruptura celular das microalgas e extração de lipídios	40
6. CONCLUSÃO	44
7. PERSPECTIVAS DE FUTUROS TRABALHOS	45
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFIAS	46

1. INTRODUÇÃO

O termo “microalgas” está associado a microrganismos algais fotossintéticos. A composição química básica das microalgas é formada de proteínas, lipídeos e carboidratos. Esta composição advém do CO_2 da atmosfera após ser convertido em carbono orgânico. Este por sua vez, será responsável na biossíntese de cada composto da estrutura química destes microrganismos fotossintéticos. Essa facilidade de converter energia solar em energia química é devido à estrutura unicelular das microalgas (SCHMITZ et al., 2012).

As microalgas estão compreendidas na classe biológica das algas. Estas classificam-se segundo sua tonalidade e suas substâncias de reserva, e então dividem-se em cinco principais grupos: *Cyanophyceae* (Algas azul esverdeadas), *Chlorophyceae* (Algas verdes), *Phaeophyceae* (Algas marrons), *Rhodophyceae* (Algas vermelhas) e *Bacillariophyceae* (Diatomáceas) (CALVANCANTI, 2016).

A *Chlorella vulgaris* está contida no grupo *Chlorophyceae* e apresentando uma tonalidade esverdeada. Seu nome *Chlorella* deriva do grego chloro (verde) e do sufixo latino ella (pequeno) e suas características são: Domínio: Eukaryota, Reino: Protista, Divisão: *Chlorophyta*, Classe: *Trebouxiophyceae*, Ordem: *Chlorellales*, Família: *Chlorophyceae*, Gênero: *Chlorella*, Espécie: *Chlorella vulgaris*. Na natureza está amplamente distribuída em água doce, salgada e no solo (BAHADAR & KHAN, 2013).

O Protocolo de Kyoto, gerado entre os países integrantes da Organização das Nações Unidas (ONU), criou diretrizes para amenizar o impacto dos problemas ambientais causados pelos modelos de desenvolvimento industrial e de consumo vigentes no planeta. Com isso, as indústrias despertam-se por processos capazes de reduzir emissões de carbono através da biofixação de dióxido de carbono atmosférico (JACOB-LOPES et al., 2008).

Para a Biotecnologia, a obtenção de biomassa através da conversão bioquímica desenvolvida pelas microalgas faz com que cresça o interesse comercial em cultivá-las e em recuperar a biomassa do meio de cultura para diferentes aplicações na indústria (CARDOSO et al., 2011).

O uso das microalgas na Biotecnologia ganha destaque nas seguintes aplicações: tratamento de águas residuais, produção alimentícia (humana e animal), indústria de cosméticos, indústria farmacêutica e energética; sendo esta última aplicação, devido ao seu alto teor de lipídios em suas células favorecendo a produção de biocombustíveis e contribuindo com a redução efeito estufa - fixação do CO₂ (LV et al., 2016).

Este projeto visa avaliar o crescimento da microalga *Chlorella Vulgaris* e sua produção de lipídeos da empregando meio de cultivo sintético e resíduo agroindustrial.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos Gerais

Avaliar o crescimento da microalga *Chlorella Vulgaris* e sua produção de lipídios empregando meio de cultivo sintético e resíduo agroindustrial.

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a influência dos meios de cultivos: sintético – BG11 e com efluente industrial – manipueira, no crescimento da *Chlorella Vulgaris*.
- Determinar o tempo ideal para a ruptura celular das microalgas utilizando o banho de ultrassom.
- Determinar o tempo ideal para a ruptura celular das microalgas utilizando micro-ondas.
- Determinar a proporção ideal de mistura de solvente (clorofórmio, metanol, água) para a extração de lipídio da microalga *Chlorella Vulgaris*.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Microalgas

As microalgas por muitas décadas são cultivadas como base comercial para a produção de alimentos com alto valor nutricional. Elas, também, são utilizadas nas indústrias cosmética e farmacêutica. A carência por uma rota alternativa para a produção de energia que não concorra com a produção de alimento foi um dos fatores principais que atraiu a atenção para a pesquisa com microalgas. O proveito da microalga como fonte renovável, tem sido questionado extensivamente por apresentar altos rendimentos de produção, quando comparados às culturas terrestres. Além disso, a pouca ou nenhuma dependência de variações sazonais e, principalmente, sua composição celular com alto rendimento de óleo e a falta de compostos não fermentadores para a produção de biogás fazem das microalgas uma excelente fonte alternativa para a produção de biodiesel (PEREIRA et al, 2012).

As microalgas fazem parte de grupo muito heterogêneo de organismos. São predominantemente aquáticos e geralmente microscópicos unicelulares, podendo formar colônias, e apresentar pouca ou nenhuma diferenciação celular. Sua coloração variada é característica oportunizada pela presença de pigmentos e mecanismo fotoautotrófico. Filogeneticamente, as microalgas são compostas de espécies procarióticas ou eucarióticas, antigas ou mais recentes, conforme o período em que surgiram no planeta (SCHMITZ et al, 2012). O termo microalgas engloba microrganismos algais que apresentam clorofila a e outros pigmentos fotossintéticos, por isso são capazes de realizar a fotossíntese oxigênica (PCHARA et al, 2016).

Em sua diversidade, as microalgas, são organismos muito flexíveis quanto ao habitat, sendo encontradas tanto em ambientes úmidos terrestres, quanto em ambientes aquáticos de água doce, salobra e salgada. (FRANCO et al, 2013). As microalgas apresentam diferenças estruturais e morfológicas entre as suas divisões, porém fisiologicamente são similares e apresentam um metabolismo análogo ao das plantas (ABALDE et al., 1995). Podem ser encontradas no meio marinho, em água doce e no solo (DERNER et al, 2006).

3.2. Tipos de Microalgas

As microalgas são classificadas quanto a natureza química dos produtos de reserva, aos tipos de pigmentos e aos constituintes da parede celular (TOMASELLI, 2004). Os aspectos citológicos e morfológicos, também, são utilizados para ajudar na classificação das microalgas. Tais aspectos são a ocorrência de células flageladas, a estrutura dos flagelos, os processos de formação do núcleo e da divisão celular, a caracterização de envoltório do cloroplasto (HU, 2004).

Há um variado número de classes para esses seres vivos e são distinguidas, principalmente, pela sua pigmentação, ciclo de vida e estrutura celular. As principais linhagens de microalgas em termos de abundância podem ser descritas por:

a) Diatomáceas (Bacillariophyta), da qual existem aproximadamente 100.000 espécies, sendo considerada a espécie que domina o fitoplâncton dos oceanos, podendo ser encontrada em ambientes de água doce. Apresenta sílica como constituinte da parede celular e a reserva de carboidratos se dá mediante óleo ou polímeros de carboidrato, conhecido como crisolaminarina;

b) Algas Verdes (Chlorophyceae,) representadas por cerca de 17.000 espécies, são encontradas em sua grande maioria, em meio marinho ou em água doce. Sua produção energética dá principalmente, em forma de amido;

c) Algas azuis (Cyanophyta), conhecidas por desempenharem papel importante na atmosfera: a fixação de oxigênio. Compreende cerca de 2.000 espécies, podendo ser encontrados em diversos ambientes;

d) Algas Douradas (Chrysophyceae) que possuem cerca de 1.000 espécies, com habitat predominantemente doce, são semelhantes às diatomáceas (SCHMIT et al, 2012).

A coleta e o cultivo das microalgas vêm ganhando atenção e importância frente às pesquisas biotecnológicas; tendo em vista a sua aplicação em vários ramos da indústria.

A biomassa advinda de várias espécies de microalgas tem sido utilizada como fonte de produtos para aplicação na indústria de alimentos. Segundo PULZ

& GROSS (2004), esta biomassa é empregada para a produção de massas, pães, iogurtes e bebidas. Neste contexto pode-se destacar a biomassa de *Spirulina* sp. consumida pelos povos nativos do Chade, na África, e do lago Texcoco (Astecas), no México (DERNER et al, 2006).

As principais microalgas cultivadas para a produção de alimentos, cosméticos e suplementos alimentares são as espécies dos gêneros *Chlorella*, *Arthrospira*, *Dunaliella salina*, *Haematococcus* (BECKER, 2004; DERNER et al, 2006).

3.3. Cultivo e Crescimento

A composição bioquímica da biomassa das microalgas não é determinada somente pela natureza de cada espécie algal, dependendo de fatores como, intensidade de luz, temperatura, pH, nutrientes e agitação (BERTOLDI et al, 2008). Pesquisas relacionadas com a interação entre intensidade luminosa, temperatura, agitação e concentração de nutrientes podem contribuir para a otimização do cultivo, pois o crescimento de microalgas deriva de diversas reações bioquímicas e biológicas (BERTOLDI et al, 2008). O pH do meio também é importante no processo de cultivo, variando de neutro a alcalino para a maioria das espécies de microalgas (RAVEN, 1990).

Para que espécies de microalgas possam produzir satisfatoriamente várias formas de energia, são indispensáveis cuidados nos processos e nos sistemas de cultivo dos microrganismos, considerando as peculiaridades de cada espécie, adaptação ao ambiente, bem como a disponibilidade de nutrientes associados à viabilidade econômica (SCHMITZ et al, 2012).

As microalgas necessitam de uma fonte de energia, seja a energia luminosa para o crescimento autotrófico ou um composto orgânico para o crescimento heterotrófico. Entre estes dois extremos, existem rotas tróficas intermediárias (FRANCO et al, 2013).

Esses microrganismos podem ser cultivados nos modos autotrófico, heterotrófico e mixotrófico, sendo que a diferença entre estas modalidades de cultivo está na fonte de energia e de carbono (FRANCO et al, 2013). No cultivo autotrófico, mais especificamente, fotoautotrófico, as células obtêm energia da

luz e o carbono do CO₂ do ar, produzindo então, através da fotossíntese, suas biomoléculas: polissacarídeos, proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos. (FRANCO et al, 2013). Embora apresente eficiência com a incidência de luz sobre a cultura de microalgas, este tipo de cultivo pode ocasionar uma redução do crescimento das mesmas, por consequência da limitação da luz, pela alta densidade celular, ou o seu excesso (fotoinibição) (VIÊGAS, 2010).

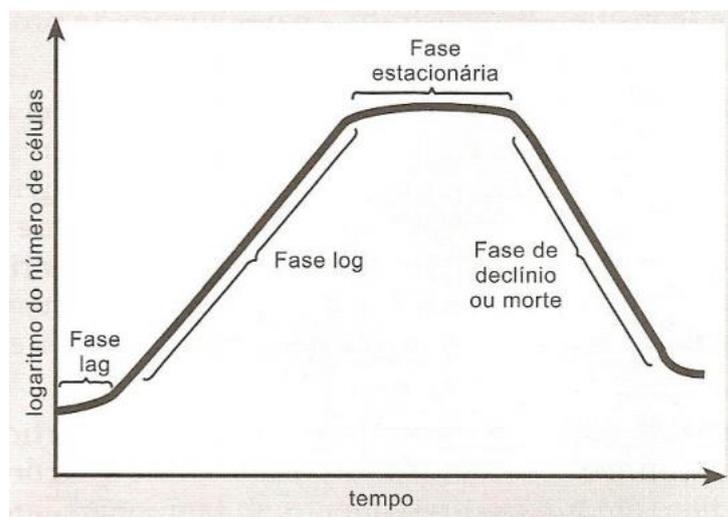
No cultivo heterotrófico, as células utilizam compostos orgânicos como fonte de energia e de carbono e, no mixotrófico, usam a luz, compostos orgânicos e inorgânicos como fonte de energia e CO₂ e compostos orgânicos como fonte de carbono (FRANCO et al, 2013). No cultivo mixotrófico atuam o metabolismo autotrófico e heterotrófico, fazendo com que microalga assimile de forma simultânea o CO₂ e a fonte de carbono fornecida a ela (FRANCO et al., 2013).

Relativamente, os aspectos construtivos são mais simples nos sistemas heterotróficos, que operam em ausência de energia luminosa, podendo-se utilizar materiais industriais convencionais na construção dos biorreatores, reduzindo assim significativamente os custos de implementação. Por outro lado, os sistemas fotossintéticos, baseados na conversão de CO₂, permitem a obtenção de créditos de carbono. Deve-se considerar que o elevado custo dos compostos orgânicos assimilados por microalgas são viabilizados em sistemas heterotróficos, quando são utilizados efluentes industriais. Em termos de produtividade, não existe um padrão único em relação à produção de biomassa nos sistemas heterotróficos e fotossintéticos. Normalmente observa-se que as células crescem mais rapidamente nos cultivos heterotróficos, embora os cultivos fotossintéticos apresentem maiores densidades celulares ao final dos cultivos. Neste sentido, a escolha deverá ser realizada com base na linhagem celular, no equilíbrio entre velocidade de crescimento e concentração celular, que resultará em elevada produtividade celular (PEREIRA et al, 2012).

A temperatura pode influenciar o crescimento celular e a composição química das microalgas. Quando as células de *Chlorella*, por exemplo, são cultivadas em temperatura entre 25 e 35°C, o teor de proteína diminui e o de carboidratos aumenta (BERTOLDI et al, 2008).

Considera-se como crescimento, em sistemas biológicos, o aumento de massa resultante de um acréscimo ordenado de todos os componentes de protoplasma. Em microbiologia, embora seja possível estudar o crescimento individual, geralmente o que se mede é o crescimento de uma população, exprimindo-se em termos de massa total ou em função do número de indivíduos. Construindo-se um gráfico global de crescimento microbiano em cultura descontínua em meio líquido, observa-se que a curva representativa desse crescimento apresenta várias fases (BORZANI et al, 2001) (Figura 1).

Figura 1: Fases da curva de crescimento microbiano.



Fonte: BORZANI, Walter et al. Biotecnologia industrial. São Paulo: Edgard Blücher, 2001.4 v. p.23

a) A fase “lag”. Essa fase só ocorre quando os microrganismos semeados provêm de uma cultura velha, não mais em crescimento exponencial. É a consequência de uma necessidade de renovação dos microrganismos que, em culturas velhas, já perderam certos sistemas enzimáticos por esgotamento do substrato, ou estão deficientes em ácidos nucleicos e outros componentes importantes do protoplasma. Ao serem colocados em um novo meio de cultura, antes de iniciarem sua multiplicação, passam por essa fase de renovação, aumentando de tamanho em consequência da síntese de material novo. A semeadura de microrganismos, mesmo velhos, em meio mais rico que o original, leva na maior parte das vezes a uma suspensão ou redução da fase lag.

b) Fase de crescimento exponencial (fase log). Nessa fase os microrganismos se encontram na plenitude de suas capacidades, num meio cujo

suprimento de nutrientes é superior às necessidades do organismo semeado. A velocidade do crescimento é em função da massa e a velocidade específica é constante. Essa é, sem dúvida alguma, a fase mais importante do crescimento microbiano fornecendo dados fundamentais para os estudos de fisiologia, de cinética, para os quais a velocidade específica é um parâmetro de máxima importância. Nessa fase é possível estudar a influência de uma série de fatores, analisando as modificações introduzidas na curva de crescimento e na composição do meio de cultura.

c) Fase estacionária. Ao fim de um certo tempo, varável com a natureza do microrganismo e condições de cultura a velocidade de crescimento vai diminuindo até atingir a fase em que o número de novos indivíduos é igual ao número de indivíduos que morrem. Sua duração varia consideravelmente. A causas dessa parada de crescimento podem ser o acúmulo de metabólicos tóxicos, o esgotamento de nutrientes e o esgotamento de O_2 .

d) Fase de declínio. Depois de um certo tempo, o número de organismos que morre torna-se progressivamente superior ao dos que surgem. Eventualmente a cultura se estabiliza. A duração dessa fase é, também, extremamente variável (BORZANI et al, 2001).

O comportamento da fase de crescimento será caracterizado pela equação 1, descrita abaixo:

$$C = \frac{C_0 \cdot C_{m\acute{a}x} \cdot e^{\mu_{m\acute{a}x} \cdot t}}{C_{m\acute{a}x} - C_0 + C_0 \cdot e^{\mu_{m\acute{a}x} \cdot t}} \quad [1]$$

Onde C é a concentração celular no tempo t, C_0 é a concentração celular no instante de início do crescimento, $C_{m\acute{a}x}$ concentração celular máxima atingida no período, t é o tempo e $\mu_{m\acute{a}x}$ é a velocidade máxima específica de crescimento.

A partir de $\mu_{m\acute{a}x}$, é possível calcular o tempo de geração (t) associado, ou seja, o tempo necessário para duplicação do número de células e, por conseguinte, da biomassa do cultivo. As equações 2 e 3 a seguir descrevem t_g e P (produtividade média de biomassa, $(g \cdot L^{-1} \cdot dia^{-1})$), respectivamente:

$$t_g = \frac{\ln(2)}{\mu_{max}} \quad [2]$$

$$P = \frac{C_f - C_0}{t} \quad [3]$$

Onde C_f é a concentração final de biomassa no cultivo ($g.L^{-1}$), C_0 é a concentração inicial de biomassa no cultivo ($g.L^{-1}$) e t é o tempo total da batelada (dias) (BORZANI et al, 2001).

3.4. Importância

As microalgas tem sido foco de inúmeras investigações biotecnológicas devido a sua importância econômica, nutricional e ecológica (ANTELO et al., 2010).

Sua eficácia no armazenamento de energia solar, através da produção de compostos orgânicos via processo fotossintético, seus elevados rendimentos em biomassa e em frações lipídicas obtidas em cultivo controlado, seu rápido crescimento, a utilização de terras e recursos de baixo custo de oportunidade, a não competição com alimentos, além do sequestro de CO_2 , todos estes fatores favoráveis despertaram uma onda de investimentos em pesquisa e desenvolvimento de tecnologias que buscam principalmente vencer as barreiras econômicas e ambientais desta nova oportunidade para o setor de energias renováveis (FRANCO et al, 2013).

As microalgas também são empregadas na aquicultura, para a alimentação direta ou indireta de moluscos, crustáceos, algumas espécies de peixes e de diversos organismos forrageiros de interesse econômico. São empregadas espécies de Bacillariophyceae (*Chaetoceros* spp. Ehrenberg, *Thalassiosira* spp. Cleve, *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin e *Skeletonema costatum* Greville), Haptophyceae (*Isochrysis* spp. Parke), Cryptophyceae (*Rhodomonas* spp. Karsten), Chrysophyceae (*Monochrysis* spp. Skuja), Prasinophyceae (*Tetraselmis* spp. Stein), Cyanophyceae (*Arthrospira* spp. e *Spirulina* spp.) e Chlorophyceae (*Chlorella* spp., *Dunaliella* spp. e *Scenedesmus* spp. Bourrely) (DERNER et al, 2006).

A biomassa de algas tem um amplo uso que vai desde o biofertilizante à produção de biocombustíveis, também para alimentação animal e humana, e para a obtenção de produtos biotecnológicos para uso em medicina, farmácia e / ou cosméticos (HERNÁNDEZ-PÉREZ & LABBÉ, 2014).

Algumas espécies de microalgas são utilizadas na indústria cosmética para o cuidado da pele, como *Arthrospira* e *Chlorella* (ou seja, cremes antienvelhecimento, produtos refrescantes ou regeneradores da pele, emolientes e anti-irritantes). Os extratos ricos em proteínas de *Arthrospira* reparam os sinais prematuros do envelhecimento da pele, exercem um efeito *tensor* e previnem a formação de estrias. Extratos de *C. vulgaris* estimulam a síntese de colágeno, apoiando a regeneração do tecido e a redução de rugas, enquanto *Nannochloropsis oculata* tem excelentes propriedades de aperto da pele (Spolaore *et al.* 2006).

Muitas microalgas são cultivadas por sua capacidade de sintetizar compostos considerados nutracêuticos, tais como os ácidos graxos poliinsaturados (ácido araquidônico - ARA, ácido eicosapentaenóico - EPA e ácido docosahexaenóico – DHA, por exemplo) e pigmentos carotenóides (astaxantina, betacaroteno, luteína, cantaxantina etc.) (TRIPATHI *et al.*, 1999). Como já comentado anteriormente, as microalgas são cultivadas para que sua biomassa possa ser comercializada como alimento natural ou suplemento alimentar e são encontradas formulações em pó, tabletes, cápsulas ou extratos. São também adicionadas em massas, petiscos, doces, bebidas etc., tanto como corantes naturais quanto suplemento nutricional (DERNER *et al.*, 2006).

O processo de colheita, ou seja, separação da biomassa microalgal do meio de cultura pode envolver uma ou mais etapas, como: coagulação, floculação, centrifugação e filtração. Se o emprego desta biomassa for para a produção de alimentos, por exemplo, a mesma precisa ser desidratada, seja pelas técnicas de secagem ao sol, o “spray-drying” e a liofilização. Para a extração dos compostos microalgais, primeiramente as células devem ser rompidas, com o uso de ultra-som, choque osmótico, solventes, enzimas entre outros. Após a extração dos compostos de interesse, os mesmos precisam

passar por processos de purificação, como ultrafiltração, cromatografia ou fracionamento (MOLINA GRIMA, 2004).

Há pesquisas em andamento em vários países, visando o desenvolvimento de sistemas de produção de biodiesel a partir de microalgas a custos viáveis. Pesquisadores chineses do Departamento de Ciências Biológicas e Biotecnologia da *Tsinghua University*, em Pequim, citados diversas vezes nesta revisão, têm estudado a produção de biodiesel a partir da espécie *Chlorella protothecoides*, em crescimento heterotrófico, utilizando fontes de carbono orgânico mais baratas em substituição à glicose, e em todos estes trabalhos os resultados se mostraram promissores. Na mesma linha de estudos, pesquisadores da *Virginia Polytechnic Institute and State University* (EUA) inovaram utilizando glicerol bruto derivado de usinas de biodiesel como fonte de carbono de baixo custo para o cultivo heterotrófico da espécie *Schizochytrium limacinum* e, produzindo biodiesel a partir desta microalga através de uma transesterificação direta (ou *in situ*) da biomassa algal.¹¹⁸ No processo de baixo custo, produziu-se biodiesel de qualidade, com bom rendimento e, ainda, fechando um ciclo ao possibilitar o uso do principal coproduto da indústria de biodiesel (FRANCO et al, 2013).

Os sistemas de tratamento com microalgas foram durante muitos anos utilizados apenas para águas residuais domésticas e agro-industriais em água doce. Atualmente, começam a surgir estudos em que microalgas marinhas são utilizadas para o tratamento de efluentes piscícolas, por exemplo, proporcionando a possibilidade de reutilização da água nas pisciculturas, de modo a funcionarem em sistema praticamente fechado, e simultaneamente a obtenção de biomassa algal que poderá ser utilizada em culturas integradas (SOARES, 2000)

As possibilidades de aplicação das microalgas, no tratamento de águas residuais, são fundamentalmente três: remoção de nutrientes, desinfecção e remoção de metais pesados. Mais recentemente, têm também sido efetuados alguns estudos sobre a utilização na remoção de compostos orgânicos tóxicos, como fenóis e clorofenóis (DENIS et al 2014).

3.5. *Chlorella*

Entre as microalgas mais importantes está a *Chlorella* por seu valor econômico e nutricional, tanto em nível animal quanto humano. Por exemplo, *Chlorella vulgaris* tem sido usada por sua qualidade proteica (28) e ainda tem propriedades antitumorais (30). Atualmente, representa um sistema biológico ideal para diferentes linhas de pesquisa e também apresenta alta eficiência devido à sua fácil adaptação em condições de laboratório (MORONTA et al, 2006).

A microalga *Chlorella* possui grande capacidade fotossintética, é rica em micronutrientes, possui alto teor de clorofila, proteínas, vitaminas, sais minerais e ácidos graxos. Além disso, *Chlorella* é considerada GRAS (Generally Recognized As Safe) pelo FDA (Food and Drug Administration) dos EUA, podendo ser utilizada como alimento sem causar risco à saúde humana. Segundo alguns autores, *Chlorella* apresenta efeito terapêutico, é utilizada como ração animal e como suplemento alimentar (COSTA et al, 2019).

3.6. Lipídios

Os lipídios são biomoléculas que exibem uma grande variedade estrutural. Moléculas como as gorduras e óleos, fosfolipídios, esteroides e carotenoides, que diferem grandemente, tanto em suas estruturas como em suas funções, são considerados lipídeos. São compostos orgânicos heterogêneos pouco solúveis em água, mas solúveis em solventes não polares. Alguns lipídeos estão combinados em outras classes de compostos, tais como: proteínas (lipoproteínas) e carboidratos (glicolipídios) (MOTTA, 2005).

Os lipídios participam como componentes não proteicos das membranas biológicas precursores de compostos essenciais agentes emulsificantes, isolantes, vitaminas (A, D, E, K), fonte e transporte de combustível metabólico, além de componentes de biossinalização intra e intermoleculares (MOTTA, 2005).

Devido a sua natureza hidrófoba, os lipídios são fundamentais para os seres vivos, sendo uma das suas principais funções o estabelecimento de uma interface entre o meio intracelular e o extracelular (hidrófilo). Além disso, os

lipídeos também servem como reserva de energia, combustível celular, isolante térmico (tecido adiposo), isolamento e proteção de órgãos, precursores de hormônios e vitaminas, entre outros (SCHLINDWEIN et al, 2008).

Uma maneira de classificação é baseada na presença ou ausência de ácidos graxos na composição dos lipídeos (SCHLINDWEIN et al, 2008).

Os lipídios que possuem ácidos graxos são chamados saponificáveis, pois, através da hidrólise alcalina, formam sabões. Dentro do metabolismo são biomoléculas mais energéticas (SCHLINDWEIN et al, 2008).

Os ácidos graxos são ácidos orgânicos que, em sua maioria, possuem cadeia alquila longa, com mais de 12 carbonos. Essa cadeia alquila pode ser insaturada ou saturada. A primeira pode conter uma ou mais duplas ligações, enquanto a segunda, não a contém. Os ácidos graxos saturados são geralmente sólidos à temperatura ambiente e estão presentes nas gorduras de origem animal, já os ácidos graxos insaturados são líquidos à temperatura ambiente e são encontrados nos óleos vegetais (SCHLINDWEIN et al, 2008).

Os lipídios são frequentemente classificados nos seguintes grupos: ácidos graxos e seus derivados, triacilgliceróis, ceras, fosfolipídios (glicerofosfolipídeos e esfingosinas), esfingolipídios (contém moléculas do amino álcool esfingosina) e isoprenoides (moléculas formadas por unidades repetidas de isopreno constituem os esteroides, vitaminas lipídicas e terpenos) (MOTTA, 2005).

O potencial das microalgas em comparação com as plantas para produção de biocombustíveis está relacionado com o alto teor de lipídios produzido por estes micro-organismos.⁹ Apesar da potencialidade das microalgas como matéria-prima para biocombustíveis, a coleta de algas continua a ser um grande obstáculo econômico, com um custo estimado em 18,5% dos custos totais de produção (MORIOKA et al, 2014).

Embora a extração lipídica nas microalgas seja relativamente fácil de ser executada, são usados vários processos para aumentar a eficiência e o rendimento, com baixos custos. O óleo pode ser extraído por processos químicos nos quais solventes como benzeno, éter ou hexano são usados para promover a extração de lipídios. O uso de enzimas é outro método de extração eficaz, que

torna o fracionamento do óleo mais fácil. Além destes métodos, o tradicional método de sonicação (ultrassom) também é utilizado para o rompimento da parede celular das algas. Um método bastante inovador é a extração por fluido supercrítico (EFS), onde o gás CO₂ sofre pressão e aquecimento, adquirindo ambas propriedades de líquido e gás. Este fluído liquefeito atua como solvente, extraíndo o óleo da matéria-prima. Neste processo é possível capturar mais energia da célula lipídica, favorecendo a conversão, sendo substancialmente melhor quando comparado ao processo convencional (MORIOKA et al, 2014).

3.7. Manipueira

A cultura da mandioca é matéria-prima para muitos produtos de uso geral, como alimentos diversos, produtos de higiene, tintas e colas, entre outros. Porém, como em qualquer atividade produtiva, também gera resíduos e subprodutos derivados de processos industriais, como a manipueira (SARAIVA et al, 2007).

A manipueira é um líquido de aspecto leitoso, de cor amarelo-claro oriunda das raízes da mandioca, por ocasião da prensagem da mesma, com vistas à obtenção da fécula ou farinha de mandioca que, fisicamente, se apresenta na forma de suspensão aquosa e, quimicamente, como miscelânea de compostos, como goma, açúcares, proteínas, linamarina, derivados cianogênicos, substâncias e sais minerais diversos. Esta característica da manipueira consiste em sério problema ambiental quando lançada diretamente em corpos hídricos, principalmente se considerados os pequenos cursos d'água, onde comumente acontecem os despejos dos efluentes líquidos de indústrias que utilizam raízes de mandioca como matéria-prima (CEREDA, 2001).

A disposição indiscriminada desse efluente, conhecido pelo poder poluidor e elevada toxidez no meio ambiente, traz graves danos ambientais: seu descarte em corpos aquáticos reduz a disponibilidade de oxigênio dissolvido no meio, causando a morte dos organismos aeróbios e seu lançamento no solo prejudica o equilíbrio entre nutrientes, aumenta a salinidade e diminui o pH (DUARTE et al, 2012).

Na composição da manipueira são encontrados macro e micronutrientes, além de glicosídeos cianogênicos, principalmente linamarina, que quando

hidrolisada libera o gás cianeto, tóxico às mais variadas formas de vida, incluindo os nematóides (NASU et al, 2010). Nela podem ser encontrados goma, glicose e outros açúcares, proteínas, macronutrientes (N, P, K), cálcio, micronutrientes (Mg, Fe, Zn, Cu, Mn, B), além de enxofre e compostos cianogênicos (FREIRE, 2001).

Segundo Leifeld (2019), a composição média da manipueira obtida da produção de farinha pode ser vista na Tabela 1, o autor ainda traz que é gerado volume mínimo de 0,23 m³ para cada tonelada de mandioca processada.

Tabela 1: Composição média da manipueira.

Componentes	Concentração (g/L)
Sólidos totais	62,00
Demanda Química de Oxigênio	60,00
Açúcares totais	58,18
Açúcares redutores	37,96
Açúcares não-redutores	20,22
Nitrogênio total	1,60
Nitrogênio amoniacal	0,06
Fósforo	0,083
Potássio	0,895
Cálcio	0,184
Magnésio	0,173
Enxofre	0,038
Ferro	0,008
Zinco	0,0045
Manganês	0,0015
Cobre	0,00075

Fonte: Leifeld (2019)

Devido a alguns fatores como as altas concentrações de matéria orgânica, e de ácido cianídrico, a caracterização química da manipueira mostra grande complexidade desse efluente (CORREIA et al, 2018).

4. METODOLOGIA

4.1. Cultivo das *Chlorella Vulgaris*

Os meios de cultivo utilizados no crescimento da microalga foram BG11, BG11 com potencial de fósforo reduzido e o meio alternativo com adição da manipueira. Inicialmente devem-se preparar todos os componentes do meio BG11, conforme definido por RIPPKA et al, (1979) como mostrado na tabela 2.

Tabela 2: Componentes do meio BG11 e suas respectivas concentrações

Componentes	Concentrações (mg/L)
NaNO ₃	1500
K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	40
MgSO ₄ .7H ₂ O	75
Na ₂ CO ₃	20
CaCl ₂	27
Ácido Cítrico Monoidratado	6
Citrato Férrico de Amônio	6
Na ₂ EDTA	1
Traços de Solução de Metal*	1

A solução de metal foi feita a partir de mais alguns componentes em determinadas concentrações, como mostrado na tabela 3.

Tabela 3: Componentes presentes na solução de metal e suas respectivas concentrações.

Componentes	Concentrações (mg/L)
H ₃ BO ₃	2,86
MnCl ₂ .4H ₂ O	1,81
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,222
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,079
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,050
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,39

Todos os meios de cultivo e demais materiais (vidrarias, sensores e filtros de ar) são esterilizados por 15min a 121°C em autoclave vertical antes do cultivo. O cultivo é mantido sob fluxo luminoso constante de $200\mu E.m^{-2}.s^{-1}$. As microalgas devem ser cultivadas em meio BG11 e depois em meio contendo BG11 e 2% (v/v) de manipueira.

4.2. Cinética de Crescimento e Curva de Calibração

A curva do crescimento da microalga representa a quantidade de células existentes no decorrer do tempo. Sendo que a quantidade de células da microalga por unidade de volume é determinada pela medida de densidade ótica da cultura ou pela concentração de sua biomassa. Desta forma, durante a fase de cultivo de 10 dias da *Chlorella Vulgaris* é analisado o crescimento de biomassa através da absorvância em comprimento de onda de 750nm (espectrofotômetro - SP 2000 UV, marca Bel Photonics).

A técnica de espectroscopia ou espectrofotometria no UV-Vis é uma das técnicas analíticas amplamente difundidas e com grande potencial para diversas aplicações. Dentre as aplicações mais conhecidas podemos citar a determinação da concentração de espécies químicas absorvedoras em solução. Embora esta técnica seja amplamente utilizada nos laboratórios de diferentes áreas de estudo, é comum ainda surgir dúvidas por parte de seus usuários em relação aos princípios envolvidos e a correta utilização da mesma (CANASSA et al, 2018).

A absorvância (A) corresponde ao simétrico do logaritmo decimal do inverso [ou simétrico do logaritmo] da transmitância (T), que é o quociente entre a potência radiante de saída (após atravessar a amostra em estudo) e a de entrada, respectivamente P_{λ}^0 e P_{λ} . Ou seja, a absorvância é uma medida da “quantidade” de luz que é absorvida pela amostra.

$$T = \frac{P_{\lambda}}{P_{\lambda}^0} \quad [4]$$

$$A = \log\left(\frac{P_{\lambda}^0}{P_{\lambda}}\right) = -\log T = \log\left(\frac{1}{T}\right) \quad [5]$$

e a lei de Lambert-Beer é traduzida pela seguinte expressão matemática:

$$A = \epsilon lc \quad [6]$$

Nesta equação 6, “c” representa a concentração molar da espécie em solução ($\text{mol}\cdot\text{m}^{-3}$, no SI), “l” a distância percorrida pela radiação através da solução (m, no SI) e “ ϵ ” o *coeficiente de absorção molar* da espécie em estudo ($\text{m}^2 \text{mol}^{-1}$, no SI). O referido coeficiente é uma medida da capacidade que uma espécie química tem de absorver a radiação, para um determinado comprimento de onda (LIMA, 2013).

Dessa forma, através da Lei de Lambert Beer, pode-se gerar uma curva de calibração com os dados de absorbância a fim de descobrir informações quanto a concentração das soluções, utilizando a equação linear:

$$y = ax + b \quad [7]$$

onde y é a concentração e x o valor de absorbância da solução.

Para isso, após a biomassa da microalga *Chlorella Vulgaris* passar pela centrifugação a uma frequência de 3500 r.p.m. por 15min e secagem na estufa a 100°C por cerca de 24h, a mesma é pesada numa balança analítica e levada a um balão volumétrico de 250mL, completando o volume com água. Com os dados da biomassa das microalgas e o volume do balão, encontra-se a concentração da solução mãe em g/L através da equação 8.

$$C = \frac{m}{V} \quad [8]$$

A partir da solução mãe, são coletadas alíquotas de volumes diferentes para diluir em água em 15 pequenos balões volumétricos de 25mL, gerando 15 soluções de diferentes concentrações, para observar a leitura de absorbância pelo espectrofotômetro a 750nm em cada um e compará-los. Para isso, utilizou a equação:

$$C_1 \cdot X_1 = C_2 \cdot X_2 \quad [9]$$

Em que C são valores de concentração e X valores de volume. Os valores do lado esquerdo da igualdade se referem a solução mãe e os que estão do lado direito referem-se às soluções em cada um dos balões de 25mL.

Os valores de C_1 e X_2 já são conhecidos, restando duas incógnitas e apenas uma equação. Com isso, se faz necessário estipular valores de C_2 , concentração das soluções em cada um dos 15 balões de 25mL, e partir daí, obter valores de X_1 , volumes da solução mãe a serem diluídas nos balões pequenos.

Para cada uma das soluções é feita a leitura de absorvância e, com isso, é gerada uma curva de calibração linear Absorvância *versus* Concentração (C_2) com 15 pontos, na qual se extrai a equação linear particular.

4.3. Ruptura Celular das Microalgas

Após o período de crescimento das microalgas, o caldo contendo a biomassa é centrifugado a 3400rpm por 30min, filtrado e seco em estufa a 60°C até peso constante.

Ruptura de célula com ultrassom: cerca de 1,0g de biomassa seca é pesada em um tubo falcon de plástico e são adicionados 3mL de água destilada. A mistura é colocada em um banho de ultrassom durante 5, 10, 15min, a uma potência de 150W e frequência de ultrassom de 40kHz. O estudo da melhor eficiência de ruptura das células será analisado nos três tempos. (CHENG et al., 2013; ARAUJO et al., 2013).

Ruptura de célula com micro-ondas: cerca de 1,0g de biomassa seca é pesada em um tubo falcon de plástico e são adicionados 3mL de água destilada. A mistura é colocada em forno micro-ondas durante 5, 10, 15min, a uma potência de 100 W. O estudo da melhor eficiência de ruptura das células será analisado nos três tempos (CHENG et al., 2013; ARAUJO et al., 2013).

4.4. Extração de Lipídios

Após a ruptura das células pelos dois métodos será realizada a extração adicionado a mistura 20mL de solvente *clorofórmio:metanol:água* nas proporções 2:2:1. Adiciona-se inicialmente aos erlenmeyers 8mL de metanol e 4mL de clorofórmio, agita-se manualmente por 2 minutos; então as misturas são levadas ao ultrassom por 25 minutos.

Passado o tempo descrito, 4mL de clorofórmio e 4mL de água são acrescentados, agitando sob ação do banho de ultrassom (40 kHz) por mais 2 min a temperatura ambiente (20°C). O filtrado deve ser transferido para um funil de separação e após 24h em repouso a fase inferior (lipídeos) é coletada. (BLIGH & DYER, 1959 – adaptado).

O frasco contendo o filtrado será identificado e levado para evaporação do solvente em estufa a 55-60°C por um período de 24 horas. Finalizado esse tempo, o frasco será retirado da estufa e deixado em dessecador por 15 minutos, para resfriamento a temperatura ambiente. O frasco será novamente pesado e sua massa final registrada.

O cálculo dos lipídios em porcentagem, em relação a um grama de massa seca será obtido de acordo com a equação 10.

$$\%Lipídios = (m_2 - m_1) \times 100 \quad [10]$$

Onde: m_2 refere-se à massa do frasco contendo lipídios e m_1 refere-se à massa do frasco vazio, em gramas.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. Cultivo e crescimento das *Chlorella Vulgaris*

5.1.1. Cultivo no meio de cultura sintético convencional - BG11

As microalgas foram cultivadas conforme a metodologia, de forma que, para um litro de solução foi adicionado o volume apresentado na tabela 4 para cada um dos componentes.

Tabela 4: Componentes presentes na solução BG11 e seus respectivos volumes para um litro de solução.

Componentes	Volumes (mL)
NaNO ₃	2,792
K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	0,113
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,638
Na ₂ CO ₃	0,887
CaCl ₂	0,866
Ácido Cítrico Monoidratado	0,068
Citrato Férrico de Amônio	0,617
H ₃ BO ₃	0,961
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,398
Na ₂ EDTA	0,253
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,142
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,065
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,041
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,041

De início, com o intuito de analisar seu crescimento, foram cultivados 10 Erlenmeyers de 500mL a partir de uma matriz que já havia no Laboratório de Biotecnologia (LABAM) situado na Universidade Federal de Sergipe, *Campus*

São Cristóvão, de um projeto anterior. Em cada Erlenmeyer foi colocado 400mL do meio de cultura BG11 e 5mL da matriz e, sem seguida, foram levadas à bancada onde ficariam sob fluxo luminoso constante de $100\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, aeração forçada constante de $2L \cdot min^{-1}$ e temperatura de $26 \pm 4^{\circ}C$ durante seu crescimento.

A partir desses 10 recipientes com microalgas, foram selecionadas os 4 que mostraram melhores resultados para servirem como amostras na análise de absorvância e para gerar uma curva de crescimento em comprimento de onda de 750nm (espectrofotômetro - SP 2000 UV, marca Bel Photonics). As figuras 2 e 3 mostram visualmente o crescimento das microalgas.

Figura 2: Microalgas logo após serem cultivadas.



Figura 3: Microalgas crescendo.



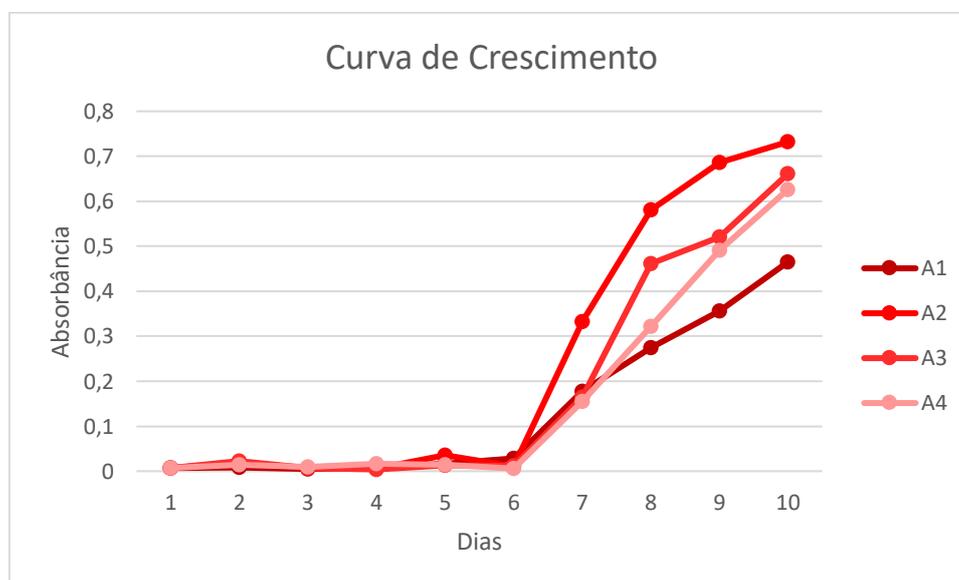
A partir dos dados recolhidos no espectrofotômetro, construiu-se a tabela 5, com a absorbância das 4 amostras durante os 10 dias.

Tabela 5: Absorbância das amostras das microalgas durante os 10 dias no meio de cultura BG11.

Absorbância	Amostra A1	Amostra A2	Amostra A3	Amostra A4
Dia 1	0,007	0,007	0,007	0,007
Dia 2	0,008	0,019	0,022	0,014
Dia 3	0,005	0,007	0,007	0,009
Dia 4	0,008	0,006	0,004	0,017
Dia 5	0,017	0,036	0,013	0,014
Dia 6	0,029	0,011	0,012	0,006
Dia 7	0,178	0,333	0,165	0,155
Dia 8	0,274	0,581	0,462	0,322
Dia 9	0,356	0,686	0,520	0,491
Dia 10	0,465	0,732	0,661	0,626

A partir dos dados da Tabela foi construído o Gráfico 1 comparando o crescimento das 4 amostras de microalgas.

Gráfico 1: Curva de Crescimento das 4 amostras de *Chlorella Vulgaris*.



O gráfico sofreu uma grande alteração dos dados, comparado ao que se esperava, já que o ideal seriam curvas em crescimento quase que constantes. Isso se deve principalmente a uma mudança no funcionamento da bomba de ar do laboratório que fornece oxigênio às microalgas, que funciona em intervalos de tempo, sendo 6 horas ligada e 6 horas desligada. Nos 6 primeiros dias a absorbância foi aferida no horário que a bomba estava desligada, então a biomassa das microalgas ficava acumulada somente no fundo do Erlenmeyer, ficando a solução límpida. A partir desse dia, sabendo o horário de funcionamento da bomba, os novos pontos de absorbância foram tirados enquanto a bomba estava ligada e fornecendo oxigênio para os meios, fazendo com que a mistura ali ficasse homogênea, tornando a leitura do espectrofotômetro realmente eficiente.

Além disso, observa-se também a diferença no crescimento da *Chlorella Vulgaris* entre as amostras diferentes. Isso já era esperado, já que são microrganismos e se seu desenvolvimento depende diretamente das condições que são submetidas. Nesse caso, entre os diferentes Erlenmeyers havia uma certa diferença no fornecimento de luz e também nas válvulas das mangueiras que forneciam oxigênio para cada um.

5.1.2. Cultivo no BG11 com potencial de fósforo reduzido

Segunda Roud (1983), o fósforo é tão importante que pequenas quantidades no meio de cultura podem limitar o crescimento de algumas espécies de microalgas. Com essa premissa, a fim de observar o comportamento das microalgas em um meio de cultura com uma menor quantidade de fósforo, as mesmas foram submetidas a meios semelhantes ao BG11, apresentado na tabela 4, porém com metade do potencial de $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, ou seja, foi adicionado somente 0,0565 mL da mesma para um litro de BG11.

Após o preparo, as soluções foram autoclavadas, resfriadas e distribuídas em Erlenmeyers de 500mL, recebendo em seguida, 5mL da solução matriz para cada recipiente e sendo levadas a bancada onde receberiam o oxigênio e a luz necessária para seu crescimento, nas condições de fluxo luminoso de

$100\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ e aeração forçada constante de $2L \cdot min^{-1}$, temperatura de $26 \pm 4^{\circ}C$.

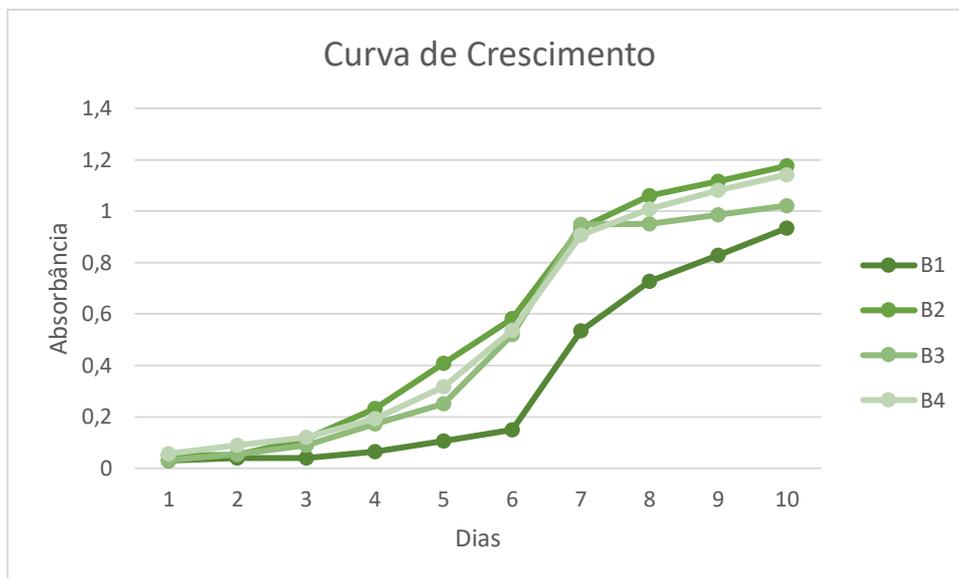
Para monitorar seu crescimento, foram coletados dados de absorvância por 10 dias em comprimento de onda de 750nm (espectrofotômetro - SP 2000 UV, marca Bel Photonics). Dentre os 10 Erlenmeyers com microalgas, foram selecionados os 4 com melhores resultados para servirem de amostra, como mostrado na tabela 6.

Tabela 6: Absorvância das amostras das microalgas durante os 10 dias no meio de cultura BG11 com potencial de fósforo reduzido.

Absorvância	Amostra B1	Amostra B2	Amostra B3	Amostra B4
Dia 1	0,030	0,050	0,032	0,057
Dia 2	0,040	0,052	0,054	0,089
Dia 3	0,040	0,115	0,089	0,121
Dia 4	0,064	0,233	0,173	0,194
Dia 5	0,106	0,408	0,251	0,318
Dia 6	0,150	0,582	0,521	0,536
Dia 7	0,534	0,934	0,948	0,908
Dia 8	0,728	1,060	0,950	1,009
Dia 9	0,828	1,117	0,985	1,081
Dia 10	0,934	1,176	1,022	1,142

A partir dos dados da tabela foi construído o gráfico 2, comparando o crescimento das 4 amostras de microalgas.

Gráfico 2: Curva de Crescimento das 4 amostras de *Chlorella Vulgaris* com potencial de fósforo reduzido pela metade.



Comparando os dados do gráfico 1, no qual foi colocado o meio de cultura BG11 no formato original proposto pela literatura, com o gráfico 2, em que as microalgas foram expostas ao estresse de redução de fósforo no seu meio de cultura, pode-se perceber que os valores de absorbância aumentaram bastante no segundo caso, o que já era esperado comparando com a literatura. Isso se deve ao fato que, o fósforo é o principal alimento das microalgas na solução BG11 e quando sua concentração foi reduzida fez com que as mesmas entrassem num estado de “estresse”, estimulando seu crescimento e maior produção de biomassa.

5.1.3. Cultivo no BG11 com Manipueira

Tendo como um dos objetivos deste trabalho avaliar a influência dos meios de cultivos sintético (BG11) e com efluente industrial no crescimento da microalga *Chlorella Vulgaris*, e já tendo os dados do crescimento da mesma no meio de cultura sintético, partiu-se então para o cultivo das microalgas no meio de cultura com a manipueira.

Para compor esse novo meio de cultura, comparou-se os dados da tabela 1, na qual se tem informações quanto a composição da manipueira, e das tabelas 2 e 3, referentes à composição do BG11. Com isso, para o novo cultivo de *Chlorella Vulgaris* foi adotado um meio de cultura parecido com o BG11, porém com algumas alterações. Em relação aos componentes da tabela 2 e 3 foram

retirados $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, o $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ e $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ e para suprir a retirada destes nutrientes, foi adicionada, para um litro de solução, 5mL de manipueira, sendo uma quantidade próxima da soma dos volumes dos nutrientes retirados do BG11.

Após o preparo, as soluções foram autoclavadas, resfriadas e distribuídas em Erlenmeyers de 500mL, recebendo em seguida, 5mL da solução matriz para cada recipiente e sendo levadas a bancada onde receberiam o oxigênio e a luz necessária para seu crescimento, nas condições de fluxo luminoso de $100\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ e aeração forçada constante de $2L \cdot min^{-1}$, temperatura de $26 \pm 4^\circ C$.

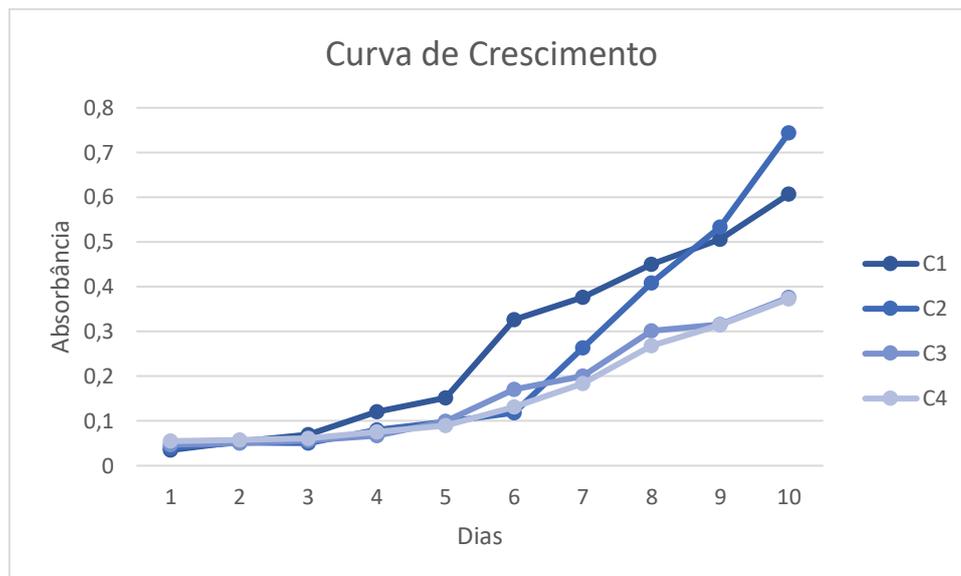
Da mesma forma que as situações anteriores, o crescimento das microalgas e suas respectivas biomassas foi monitorado durante 10 dias nos quais se extraía dados da absorbância das amostras em comprimento de onda de 750nm (espectrofotômetro - SP 2000 UV, marca Bel Photonics). Com os dados obtidos durante esses dias foi construído a tabela 7.

Tabela 7: Absorbância das amostras das microalgas durante os 10 dias no meio de cultura BG11 com adição da manipueira.

Absorbância	Amostra C1	Amostra C2	Amostra C3	Amostra C4
Dia 1	0,035	0,040	0,047	0,055
Dia 2	0,054	0,052	0,051	0,058
Dia 3	0,069	0,051	0,057	0,061
Dia 4	0,121	0,080	0,067	0,075
Dia 5	0,152	0,098	0,099	0,090
Dia 6	0,327	0,118	0,171	0,131
Dia 7	0,377	0,264	0,200	0,184
Dia 8	0,450	0,408	0,301	0,268
Dia 9	0,506	0,534	0,316	0,314
Dia 10	0,607	0,744	0,376	0,373

A partir dos dados da tabela foi construído o Gráfico 3 comparando o crescimento das 4 amostras de microalgas nesse meio de cultura.

Gráfico 3: Curva de Crescimento das 4 amostras de *Chlorella Vulgaris* com potencial de fósforo reduzido pela metade.



Este foi um experimento para avaliar se em condições de meio in natura haveria capacidade de adaptação, crescimento da microalga e produção de lipídios e, apesar de submetidas a um estado de “estresse”, assim como nas microalgas cultivadas no meio de cultura com fósforo reduzido, nota-se que as mesmas cresceram em um ritmo mais semelhante às que foram cultivadas no BG11. A explicação para isso é que, nesse caso, a *Chlorella Vulgaris* estava submetida ao “estresse” de um meio de cultura relativamente novo, mas não somente de restrição de fósforo, como no caso em que houve um maior crescimento e produção de biomassa. Nesse caso em particular, em seu meio de cultura havia um resíduo in natura que apresenta grande quantidade de açúcares e nitrogênio amoniacal, dificultando um pouco na adaptação das microalgas e, conseqüentemente, no seu desenvolvimento.

5.2. Curva de Calibração

Para fins de gerar a curva de calibração para cada um dos 3 casos monitorados, as amostras contendo as microalgas *Chlorella Vulgaris* em seus respectivos meios de cultura foram coletadas e centrifugadas, para separar a biomassa e a solução, sendo a parte líquida descartada e a biomassa reservada para ser pesada, centrifugada, seca, triturada, etiquetada e guardada. A figura 4

mostra visualmente como ficou a biomassa das microalgas já prontas para serem armazenados.

Figura 4: Microalgas já secas e trituradas.



Para haver uma melhor comparação entre os dados das curvas de calibração, nas três condições de cultivo da *Chlorella Vulgaris*, foi pesado exatamente a mesma massa para ambos, 0,394g. Com o auxílio da equação 8 e o volume do balão volumétrico de 250mL, foi obtida a concentração da solução mãe, sendo $C_1 = 1,576 \text{ g/L}$.

Para saber quais os volumes X_1 a serem pipetados da solução mãe para cada um dos 15 balões de 25mL, utilizou-se a equação 9, propondo valores de concentração C_2 que iam de 0,1 a 1,5 g/L, com intervalo de 0,1.

Os dados de cada valor de X_1 para seus respectivos pontos estão nas tabelas 8, 9 e 10, discriminados pelo meio de cultura de cultivo da *Chlorella Vulgaris*. Para facilitar a coleta de cada um dos volumes com a pipeta, os valores foram ajustados.

5.2.1. No meio de cultura sintético BG11

A partir dos valores de absorvância coletados no procedimento de curva de calibração da *Chlorella Vulgaris* no meio de cultura sintético BG11, foi construído a tabela 8, na qual se tem os dados coletados para cada um dos

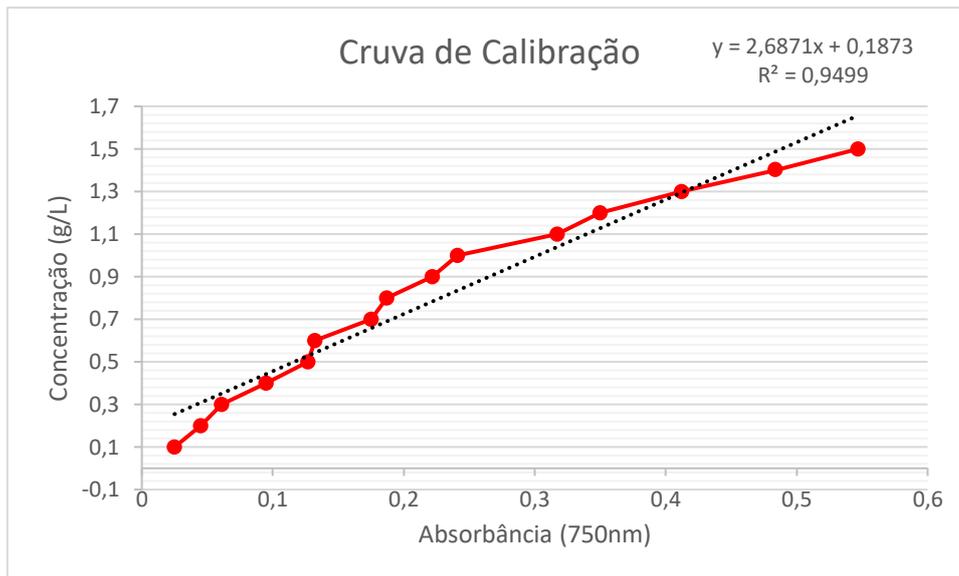
balões volumétricos de 25mL utilizados para a construção da curva para este caso em particular.

Tabela 8: Valores dos volumes e Absorbâncias para cada solução e sua respectiva concentração.

	C_2 (g/L)	X_1 (mL)	X_1 (mL) ajustados	Absorbância
Ponto 1	0,1	1,58	1,6	0,025
Ponto 2	0,2	3,17	3,2	0,045
Ponto 3	0,3	4,75	4,8	0,061
Ponto 4	0,4	6,33	6,5	0,095
Ponto 5	0,5	7,92	8,0	0,127
Ponto 6	0,6	9,50	9,5	0,132
Ponto 7	0,7	11,08	11,1	0,175
Ponto 8	0,8	12,67	12,7	0,187
Ponto 9	0,9	14,25	14,3	0,222
Ponto 10	1,0	15,83	15,8	0,241
Ponto 11	1,1	17,45	17,5	0,317
Ponto 12	1,2	19,00	19,0	0,350
Ponto 13	1,3	20,62	20,6	0,412
Ponto 14	1,4	22,21	22,2	0,484
Ponto 15	1,5	23,80	24,0	0,547

A partir dos dados coletados foi gerado o gráfico 4, relacionando os dados de Absorbância e Concentração de cada uma das soluções.

Gráfico 4: Curva de Calibração para o crescimento em BG11.



Com isso, percebe-se o crescimento da absorbância à medida que se aumenta a biomassa das microalgas nas soluções e, conseqüentemente, sua concentração. Com a equação 11, encontrada através dos dados plotados no gráfico também se torna possível encontrar um valor estimado de concentração a partir de qualquer absorbância entre 0,025 e 0,547.

$$y = 2,6871x + 0,1873 \quad [11]$$

onde y é o valor de concentração e x diz respeito a absorbância.

5.2.2. No meio de cultura BG11 com potencial de fósforo reduzido

Assim, como no caso anterior, os valores de absorbância coletadas na curva de calibração para o caso do crescimento da *Chlorella Vulgaris* no meio de cultura com potencial de fósforo reduzido foram plotados na tabela 9, na qual se tem os dados coletados para cada um dos balões volumétricos de 25mL utilizados para a construção da curva para este caso em particular.

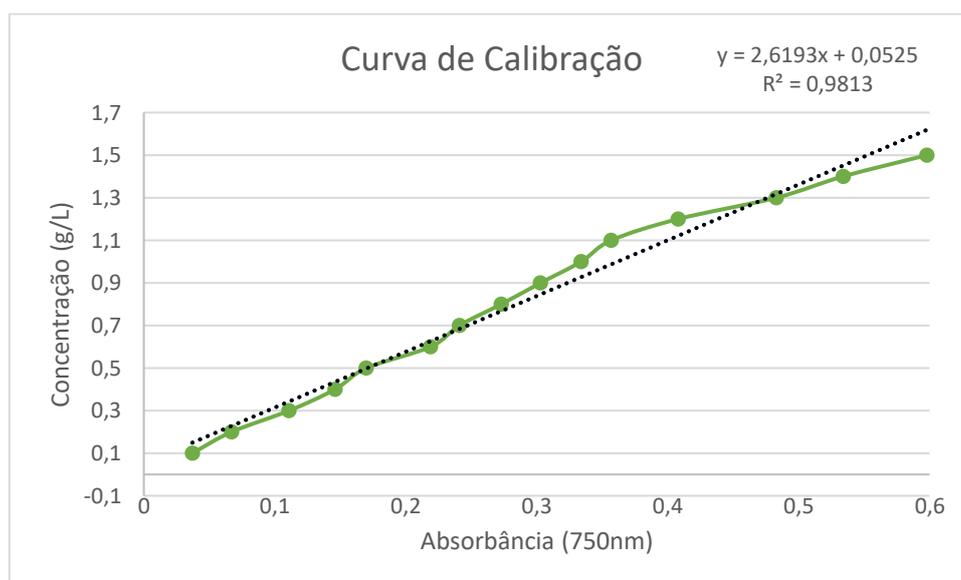
Tabela 9: Valores dos volumes e Absorbâncias para cada solução e sua respectiva concentração.

	C_2 (g/L)	X_1 (mL)	X_1 (mL) ajustados	Absorbância
Ponto 1	0,1	1,58	1,6	0,037
Ponto 2	0,2	3,17	3,2	0,067
Ponto 3	0,3	4,75	4,8	0,111

Ponto 4	0,4	6,33	6,5	0,146
Ponto 5	0,5	7,92	8,0	0,170
Ponto 6	0,6	9,50	9,5	0,219
Ponto 7	0,7	11,08	11,1	0,241
Ponto 8	0,8	12,67	12,7	0,273
Ponto 9	0,9	14,25	14,3	0,303
Ponto 10	1,0	15,83	15,8	0,334
Ponto 11	1,1	17,45	17,5	0,357
Ponto 12	1,2	19,00	19,0	0,408
Ponto 13	1,3	20,62	20,6	0,483
Ponto 14	1,4	22,21	22,2	0,534
Ponto 15	1,5	23,80	24,0	0,598

A partir dos dados coletados foi gerado o gráfico 5, relacionando os dados de Absorbância e Concentração de cada uma das soluções.

Gráfico 5: Curva de Calibração para o crescimento em BG11 com potencial de fósforo reduzido.



O crescimento dos valores de absorbância lineares às respectivas concentrações de biomassa das microalgas nas soluções foi dentro do esperado e, tendo esse formato gráfico, se fez possível a utilização da equação linear padrão para desenvolver, através dos dados plotados, a equação 12, com a qual

se torna possível encontrar o valor estimado de concentração de biomassa da *Chlorella Vulgaris* nesse meio de cultura específico, a partir dos valores de absorvância que estejam entre 0,037 e 0,598.

$$y = 2,6193x + 0,0525 \quad [12]$$

onde y é o valor de concentração e x diz respeito a absorvância.

5.2.3. No meio de cultura com Manipueira

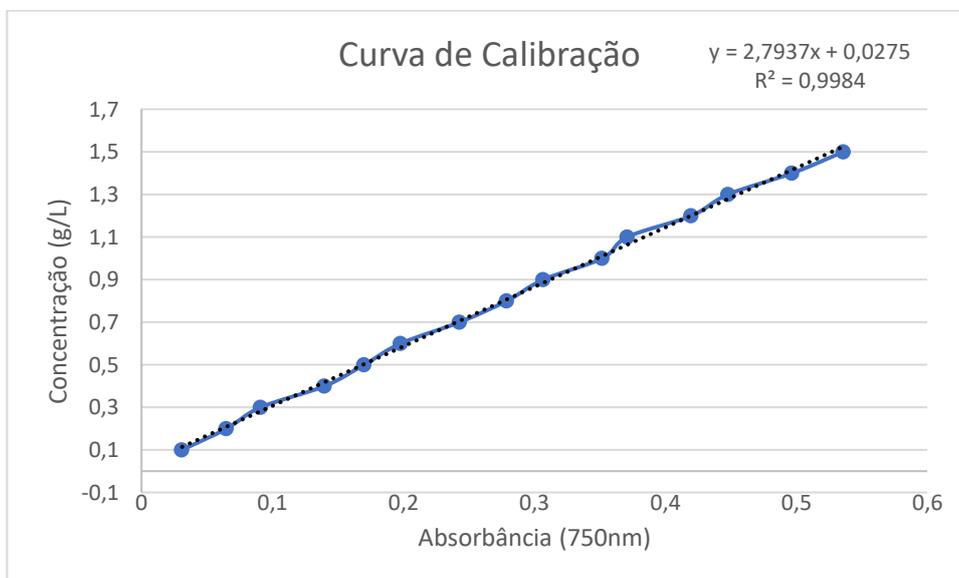
Seguindo o padrão, os valores de absorvância coletadas para cada uma das soluções nos balões volumétricos de 25mL utilizados para a construção desse caso, *Chlorella Vulgaris* cultivada no meio de cultura com adição da manipueira, foram plotados na tabela 10.

Tabela 10: Valores dos volumes e Absorvâncias para cada solução e sua respectiva concentração.

	C_2 (g/L)	X_1 (mL)	X_1 (mL) ajustados	Absorvância
Ponto 1	0,1	1,58	1,6	0,031
Ponto 2	0,2	3,17	3,2	0,065
Ponto 3	0,3	4,75	4,8	0,091
Ponto 4	0,4	6,33	6,5	0,140
Ponto 5	0,5	7,92	8,0	0,170
Ponto 6	0,6	9,50	9,5	0,198
Ponto 7	0,7	11,08	11,1	0,243
Ponto 8	0,8	12,67	12,7	0,279
Ponto 9	0,9	14,25	14,3	0,307
Ponto 10	1,0	15,83	15,8	0,352
Ponto 11	1,1	17,45	17,5	0,371
Ponto 12	1,2	19,00	19,0	0,420
Ponto 13	1,3	20,62	20,6	0,448
Ponto 14	1,4	22,21	22,2	0,497
Ponto 15	1,5	23,80	24,0	0,536

A partir desses dados foi gerado o gráfico 6, relacionando os dados de Absorbância e Concentração de cada uma das soluções.

Gráfico 6: Curva de Calibração para o crescimento em BG11 com manipueira.



Assim como nos casos anteriores, o comportamento da do gráfico foi dentro do esperado, tendo um crescimento linear, porém nesse caso em particular, observou-se um menor valor de erro analítico, tendo em vista que o valor de R^2 se aproximou mais de 1. Isso também pode ser observado pelo próprio comportamento da linha composta pelos valores experimentais e a linha de tendência traçada, estando as duas muito próximas.

Utilizando a equação linear padrão e os dados plotados no gráfico, foi feita então a equação 13, com a qual se torna possível encontrar o valor estimado de concentração de biomassa da *Chlorella Vulgaris* nesse meio de cultura composta pelo meio sintético com algumas alterações e a adição da manipueira, a partir dos valores de absorbância que estejam entre 0,031 e 0,536.

$$y = 2,7937x + 0,0275 \quad [13]$$

onde y é o valor de concentração e x diz respeito a absorbância.

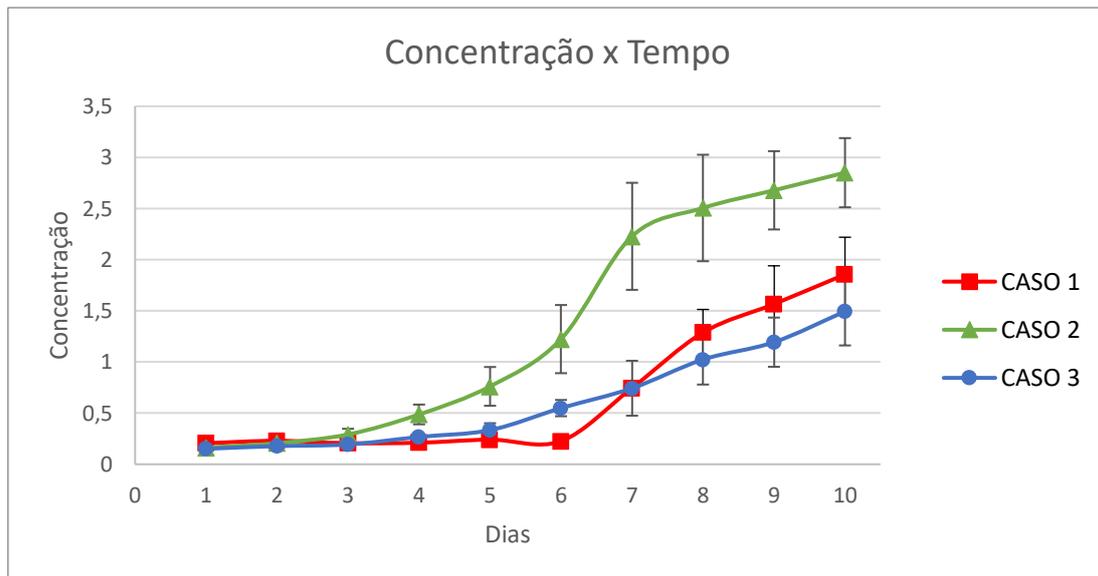
5.3. Concentração de biomassa nos diferentes meios de cultura

Para observar a diferença de concentração de biomassa das microalgas *Chlorella Vulgaris* nos meios de cultura diferentes durante os seus primeiros 10 dias de crescimento, foi feito um gráfico Concentração *versus* Tempo com os dados da média de concentração entre as 4 amostras para cada um dos 3 casos analisados.

Para gerar os valores de concentração do Caso 1, em que o cultivo das microalgas foi feito inteiramente no meio de cultura sintético BG11, foram utilizados os valores de absorvância da tabela 5, plotados na equação 11, encontrada através da curva de calibração e, a partir daí, foi tirado a média entre as concentrações das 4 amostras A1, A2, A3 e A4, juntamente com seu desvio padrão. Já para o Caso 2, em que foram cultivadas as microalgas *Chlorella Vulgaris* no meio de cultura BG11 com o potencial de fósforo reduzido pela metade para gerar um estresse nas mesmas, utilizou-se os valores de absorvância da tabela 6, que foram plotados na equação 12, encontrada também por uma curva de calibração e, com isso, tirou-se a média entre os valores das concentrações das 4 amostras B1, B2, B3 e B4, junto com seu respectivo desvio padrão. Por fim, no último caso, o Caso 3, no qual as matrizes das microalgas *Chlorella Vulgaris* foram cultivadas em um meio de cultura alternativo, composto pelo BG11 com algumas adaptações e a manipueira, utilizou-se os valores de absorvância obtidos na tabela 7 e plotados na equação 13, encontrada também por uma curva de calibração, gerando assim, os valores de concentração para cada uma das amostras C1, C2, C3 e C4, durante os dias em observação. Assim como nos casos anteriores, encontrou-se a média da concentração entre as 4 amostras juntamente com o desvio padrão.

Tendo então os valores de concentração média de biomassa nas soluções das amostras para cada caso, durante os 10 primeiros dias de crescimento, elaborou-se o gráfico 7, a fim de facilitar a visualização da diferença de concentração entre os casos observados.

Gráfico 7: Curvas de Concentração *versus* Tempo para cada um dos casos analisados, com seus respectivos desvios padrões.



É interessante salientar que as equações 11, 12 e 13 foram obtidas utilizando valores de concentração entre 0,1 a 1,5g/L. Logo, esse é o intervalo de confiança para o cálculo de concentração nessas equações e, como pode ser observado no gráfico 7, a partir do dia 7 há pontos com valor de concentração fora dessa margem, acima da concentração máxima. Logo, a equação gerada é garantida somente para valores dentro do intervalo.

Tomando a curva do caso 1 como comparativo, já que é referente ao crescimento das microalgas no meio de cultura sintético, nota-se um grande destaque para a curva no caso 2, onde as microalgas estavam sob o estresse alimentar da diminuição de potássio em seu meio, estimulando-as no seu crescimento e produção de biomassa.

A quantidade de K_2HPO_4 em carência no meio produz aumento no teor de lipídios na composição da biomassa seca. O fósforo também atua como transportador de substratos ou energia química, pois faz parte dos ácidos nucleicos e das membranas (BERTOLDI et al, 2018).

Já se tratando da curva do caso 3, observa-se menores valores de concentração, se comparada a curva do caso 1, mas considerando que o cultivo nessa situação foi feito de uma forma alternativa com vantagem econômica e de impacto ambiental, ainda se viável o seu cultivo nesse formato.

Cartas (2017) fez um estudo do crescimento de microalgas 4 espécies de microalgas distintas em diferentes condições de meio de cultura, alterando a

porcentagem de manipueira entre eles. Nesse estudo, foi visto que entre as 4 microalgas analisadas, a *Chlorella Vulgaris* foi a que apresentou uma menor adaptabilidade, algo novo, já que essa ganha destaque na sua adaptação em meios de cultura para sobrevivência. Visto isso, a curva encontrada nesse trabalho para o crescimento dessa espécie de microalga em questão no meio de cultura com resíduo de manipueira encontra-se dentro da expectativa de crescimento, ainda demonstrando viabilidade.

5.4. Ruptura celular das microalgas e extração de lipídios

Para esse procedimento em questão, as microalgas *Chlorella Vulgaris* tratadas nos 3 casos estudados foram tratadas da mesma forma, conforme a metodologia.

As paredes celulares de várias composições estão presentes na maioria das microalgas, essas paredes celulares são tipicamente estruturas de três camadas que incluem; polissacarídeos como celulose, ácido urônico, proteína, manose, xilano ou camadas trilaminares de algenano; glicoproteínas; e minerais como cálcio ou silicatos (LEE et al, 2012).

A ruptura de células foi realizada com dois procedimentos distintos, conforme a metodologia de CHENG et al. (2013) e ARAUJO et al. (2013). A primeira foi realizada utilizando o aparelho de ultrassom com potência de 150W e frequência de 40kHz. Nesse procedimento, foram feitas 3 extrações diferentes para cada caso, em 5, 10 e 15 minutos, sendo diferenciadas pelo tempo de extração no banho de ultrassom, com intuito de avaliar a melhor condição de extração e eficiência na ruptura celular.

Para o segundo procedimento da extração foi utilizado micro-ondas com potência de 100W, por cerca de 1 minuto.

Para esse estudo de ruptura celular utilizando o micro-ondas, autores de trabalhos semelhantes, como Pérez-Mora et al. (2016), Bresaola et al. (2019) e Oliveira (2021), utilizaram o tempo de permanência no aparelho por um tempo entre 5 a 15 minutos, porém na prática, a biomassa estava sendo queimada e,

com isso, foi analisado qual seriam o melhor tempo necessário para uma boa extração e o tempo de melhor resultado foi o de 1 minuto.

Após a ruptura das células pelos dois métodos, foi realizada a extração dos lipídios com a adição de uma mistura de 20mL de solvente *clorofórmio:metanol:água* nas proporções 2:2:1 e o o auxílio do banho de ultrassom a 40kHz. A porcentagem de lipídios em relação a 1,0g de massa seca de biomassa foi obtida utilizando a equação 8, e com os dados coletados foi criada a tabela 11, na qual se tem os dados das massas e porcentagens de lipídios para as extrações realizadas.

Tabela 11: Valores das massas coletadas na extração de lipídios e suas respectivas porcentagens para 1,0g de biomassa.

	Método de Extração	$m_1(g)$	$m_2(g)$	Percentual de lipídios (%)
Caso 1	Ultrassom 5min	34,4809	34,5255	4,46
	Ultrassom 10min	52,4253	52,6029	17,76
	Ultrassom 15min	60,4467	60,4563	01,96
	Micro-ondas	48,0047	48,1274	12,27
Caso 2	Ultrassom 5min	33,9960	34,0490	05,30
	Ultrassom 10min	34,0460	34,0991	05,31
	Ultrassom 15min	34,2303	34,2302	05,30
	Micro-ondas	34,8480	34,8919	04,39
Caso 3	Ultrassom 5min	33,9789	34,0111	03,22
	Ultrassom 10min	33,9413	33,9607	05,76
	Ultrassom 15min	34,1532	34,2108	01,94
	Micro-ondas	35,8565	35,8906	03,41

Analisando os dados da tabela 11, pode-se extrair pontos importantes. Ao comparar a ruptura celular utilizando o banho de ultrassom e micro-ondas, percebe-se que as amostras de microalgas em que as paredes celulares de suas células foram rompidas com o banho de ultrassom alcançaram melhores resultados, isso pode se dar por conta da influência da temperatura no micro-ondas e o menor tempo exposto na irradiação. Para romper a parede celular

utilizando esse aparelho, o tempo foi reduzido devido ao comportamento da solução com a biomassa da microalga entrar em processo de expansão, com isso, pelo pouco tempo a ruptura pode não ter sido tão efetiva quanto se esperava. Essa ressalva é feita visto que em outros trabalhos é comum a ruptura feita pelo micro-ondas se sobressair em resultados, como no estudo realizado por Cheng et al. (2013).

Em relação a potência e frequência necessária para uma efetiva ruptura da parede celular das microalgas, em ambos os equipamentos foram adotados somente um, no caso do banho de ultrassom sua potência foi de 150W e frequência 40kHz, já o micro-ondas tinha potência de 1200 W e frequência 60Hz.

Em relação ao tempo necessário para romper a parede celular das microalgas e obter maior quantidade de lipídios, essa comparação só pôde ser feita no banho de ultrassom, já que no micro-ondas o tempo precisou ser reduzido. No banho de ultrassom, como pode ser visto em destaque na tabela 11, o melhor tempo de ruptura foi o de 10 minutos, isso se dá pois no tempo de 5 minutos a ruptura não feita de forma tão efetiva, já com o tempo estendido para 15 minutos pode ter acontecido a degradação das células, afetando na extração dos lipídios.

Na extração, a proporção de solução clorofórmio: metanol: água 2:2:1 se mostrou efetiva, visto que foi suficiente para uma extrair os lipídeos contidos nas células das microalgas *Chlorella Vulgaris*.

Somando todos os fatores e analisando os resultados de extração de lipídios da biomassa de microalgas *Chlorella Vulgaris* (1,94 ~17,76%), observa-se valores abaixo do esperado, quando comparados aos de outros trabalhos semelhantes na literatura com dados obtidos com a biomassa de *Botryococcus braunii* (32,6 ~ 36,9%) (Pérez-Mora et al., 2016), com biomassa de *Ankistrodesmus braunii* (38 ~ 39%) (Bresaola et al., 2019) e com biomassa de *Chlorella Vulgaris* 38,45 ~43,85%) (Oliveira, 2021).

Comparando a porcentagem de lipídios na biomassa entre os 3 casos aqui estudados, nota-se que os valores não são muito distantes entre si, havendo maior diferença entre extrações isoladas, como o caso da extração com a ruptura feita no banho de ultrassom em 10 minutos, que mostrou um potencial de lipídios

maior do que todos os casos em todos os tratamentos diferentes. Com isso, o a ideia do cultivo das microalgas *Chlorella Vulgaris* no meio de cultura alternativo, com uso da manipueira, ainda se mostra viável.

6. CONCLUSÃO

As microalgas apresentam um grande potencial a ser investido, considerando o vasto campo de utilidades que apresenta. Em um outro cenário, tem-se os resíduos industriais, rejeitos de atividades da indústria que são essenciais aos humanos, mas muitas vezes tóxicas ao meio ambiente. Com isso, a ideia desse trabalho foi unir esses dois aspectos e explorar uma forma viável de utilização dos resíduos que seriam descartados no meio ambiente, tendo em vista vantagens econômicas e socioambientais.

A manipueira foi adotada como o resíduo industrial utilizado no meio de cultura para o desenvolvimento das microalgas *Chlorella Vulgaris* e, para avaliar sua eficiência, fez-se uma comparação com o meio de cultura sintético BG11 e o meio de cultura com diminuição do principal alimento desses microrganismos, o fósforo. O que se pôde perceber foi o crescimento das microalgas no meio de cultura alternativo semelhante ao do meio sintético, porém abaixo do que foi feito em meio com fósforo reduzido. Isso se deve ao estresse causado, que propicia um maior crescimento e produção de biomassa. No caso do meio com adição de manipueira haviam outros fatores que acabaram compensando esse ganho, como a presença em grande quantidade de açúcares e nitrogênio amoniacal.

Em relação a viabilidade dos métodos ruptura celular, foram utilizados dois métodos diferentes: microondas e ultrassom. Entre os dois aparelhos, o banho de ultrassom se mostrou mais interessante, mais especificamente no tempo de 10 minutos de ruptura. Para fazer a ruptura com microondas, não foi possível avaliar tempos diferentes, pois estava havendo uma expansão instantânea do líquido, fazendo o mesmo se espalhar por espaço, por isso só foi possível ser feito em um tempo curto de 1 minuto.

No procedimento de extração de lipídios das microalgas *Chlorella Vulgaris*, foi utilizado uma solução clorofórmio:metanol:água na proporção 2:2:1, se mostrando um método simples e bem efetivo.

Em linhas gerais, levando-se em conta os fatores de viabilidade econômica e socioambiental, o cultivo de microalgas *Chlorella Vulgaris* no meio de cultura alternativo com adição da manipueira se mostra vantajoso, mostrando um grande potencial para ser investido e explorado.

7. PERSPECTIVAS DE FUTUROS TRABALHOS

As sugestões e perspectivas para futuros trabalhos são:

- Determinação e quantificação dos ácidos graxos obtidos via análise cromatográficas;
- Análise de extração de lipídios das microalgas em potências e frequências diferentes no microondas e no banho de ultrassom.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFIAS

ABALDE, Julio et al. *Microalgas: cultivo y aplicaciones*. 1995.

ANTELO, Francine S. et al. Extraction and purification of C-phycoerythrin from *Spirulina platensis* in conventional and integrated aqueous two-phase systems. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 5, p. 921-926, 2010.

ARAUJO, Glacio [et al.]. **Extraction of lipids from microalgae by ultrasound application: Prospection of the optimal extraction method**. *Ultrasonics Sonochemistry*, n. 20, p. 95-98, 2013.

BAHADAR, A.; KHAN, M. B. **Progress in energy from microalgae: A review**. *Renewable and Sustainable Reviews*, v. 27, p. 128-148, 2013.

BARROS, H. [et al.]. **Extração do material lipídico presente na espuma e no lodo de esgoto sanitário através de diferentes métodos**. *Holos*, vol.06, p. 137-145, 2015.

BECKER, W. Microalgae in human and animal nutrition. In: RICHMOND, A. (Ed). **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. London: Blackwell Science, p.312-351, 2004.

BERTOLDI, FABIANO CLEBER; SANT'ANNA, ERNANI; OLIVEIRA, Jorge Luiz Barcelos. Revisão: Biotecnologia de microalgas. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 26, n. 1, p. 9-20, 2008.

BLIGH, E. & DYER, W.J. **Rapid method of total lipid extraction and purification**. *Can. J. Biochem. Physiol.* (1959).

BORZANI, Walter et al. **Biotecnologia industrial-vol. 1: fundamentos**. Editora Blucher, 2001.

CANASSA, Thalita A.; LAMONATO, Anna Luisa; RIBEIRO, Allan Victor. Utilização da lei de Lambert-Beer para determinação da concentração de soluções. **Journal of Experimental Techniques and Instrumentation**, v. 1, n. 2, 2018.

CARDOSO, Aderlânio [et al.]. **O uso de microalgas para a obtenção de biocombustíveis**. Brazilian Journal of Biosciences, n. 4, v. 9, p. 542-549, 2011.

CARTAS, Liliana Carrillo. Isolamento e cultivo de microalgas em resíduo líquido do processamento da mandioca: manipueira. 2017.

CAVALCANTI, Davi de Lima. **Potencial biotecnológico de Chlorella Vulgaris: aplicação em biocelulas a combustível fotossintética, produção de energia e sequestro de CO₂**. Dissertação de Mestrado. Recife, 2016.

CEREDA, M. P. Manejo, uso e tratamento de subprodutos da industrialização da mandioca. 1.ed. São Paulo: Fundação Cargill, 2001. 320p.

CHENG, Jun [et al.]. **Dynamic microstructures and fractal characterization of cell wall disruption for microwave irradiation-assisted lipid extraction from wet microalgae**. Bioresource Technology, n. 150, p.67-72, 2013.

CORREIA, Igor Aparecido dos Santos; SILVA, Nadine Caroline Bento; SOUZA, Alexandre Teixeira de; SCANDELAI, Ana Paula Jambers. CARACTERIZAÇÃO DA MANIPUEIRA E POSSIBILIDADES DE TRATAMENTO. **Colloquium Exactarum**, Maringá, v. 1, n. 10, p. 180-185, 2018.

COSTA, Jorge Alberto Vieira et al. Perfil de ácidos graxos das microalgas Chlorella vulgaris e Chlorella minutissima cultivadas em diferentes condições. **Alimentos e nutrição Araraquara**, v. 17, n. 4, p. 429-436, 2009.

COUGO, Cecília Dutra Garcia. **Utilização da Técnica Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) para Estimativa das Concentrações de Carboidratos e de Lipídeos em Scenedesmus** sp. 99f. Dissertação (Mestrado em Engenharia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS. 2017.

DE OLIVEIRA NUNES, Ivan Venâncio et al. Tertiary treatment of dairy industry wastewater with production of *Chlorella vulgaris* biomass: evaluation of effluent dilution. **Brazilian Journal of Environmental Sciences (Online)**, v. 56, n. 2, p. 365-373, 2021.

DINIS, Maria Alzira Pimenta; MONTEIRO, Álvaro; BOAVENTURA, Rui. Tratamento de águas residuais: o papel das microalgas. 2004.

DERNER, Roberto Bianchini et al. Microalgas, produtos e aplicações. *Ciência Rural*, v. 36, n. 6, p. 1959-1967, 2006.

DUARTE, Anamaria de S. et al. Uso de diferentes doses de manipueira na cultura da alface em substituição à adubação mineral. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 16, n. 3, p. 262-267, 2012.

FERNANDES, M. S. M.; FRANÇA, K. B.; ALVES, R. V.; PEARSON, H. W.; LIMA, S. A.; COSTA, T. S.; SILVEIRA, B. **Avaliação do crescimento da microalga *Scenedesmus sp.* em diferentes concentrações de NaCl**. *Engevista*, v. 19, n. 1, p. 185-193, 2017.

FRANCO, André Luiz Custódio et al. Biodiesel de microalgas: avanços e desafios. *Química Nova*, v. 36, n. 3, p. 437-448, 2013.

FREIRE, F. das. Uso da manipueira no controle do oídio da cirigueleira: resultados preliminares. **Embrapa Agroindústria Tropical-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, 2001.

HERNÁNDEZ-PÉREZ, Alexis; LABBÉ, José I. Microalgas, cultivo y beneficios. **Revista de biología marina y oceanografía**, v. 49, n. 2, p. 157-173, 2014.

HU, Q. Industrial production of microalgal cell-mass and secondary products – major industrial species: ***Arthrospira (Spirulina) platensis***. In: RICHMOND, A. (Ed). **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. Oxford: Blackwell Science, . p.264-272, 2004.

JACOB-LOPES, E.; LACERDA, L. M. C. F.; FRANCO, T. T. **Biomass production and carbon dioxide fixation by *Aphanothece microscopica* Nägeli in a bubble column photobioreactor.** *Biochemical Engineering Journal*, v. 40, n. 1, p. 27-34, 2008. ISSN 1369-703X.

LEE, Andrew K.; LEWIS, David M.; ASHMAN, Peter J. Disruption of microalgal cells for the extraction of lipids for biofuels: Processes and specific energy requirements. ***Biomass and bioenergy***, v. 46, p. 89-101, 2012.

LIMA, Luís Spencer. Lei de Lambert–Beer. ***Revista de Ciência Elementar***, v. 1, n. 1, 2013.

LV, Junping [et al.]. **A comparative study on flocculating ability and growth potential of two microalgae in simulated secondary effluent.** *Bioresource Technology*, n. 205, p.111–117, 2016.

MOLINA GRIMA, E. et al. Downstream processing of cell-mass and products. In: RICHMOND, A. (Ed). **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology.** Oxford: Blackwell Science, p.215-251, 2004.

MORIOKA, Luiz Rodrigo Ito et al. Flocculação de *Chlorella* sp. produzida em concentrado de dessalinização e estudo de método de extração de lipídeos intracelulares. ***Química Nova***, v. 37, n. 1, p. 44-49, 2014.

MORONTA, R.; MORA, R.; MORALES¹, E. Respuesta de la microalga *Chlorella sorokiniana* al pH, salinidad y temperatura en condiciones axénicas y no axénicas. ***Revista de la Facultad de Agronomía***, v. 23, n. 1, p. 28-43, 2006.

MOTTA, Valter. *Bioquímica*. Editora EDUCS, 2005.

NASU, Érica GC et al. Efeito de manipueira sobre *Meloidogyne incognita* em ensaios in vitro e em tomateiros em casa de vegetação. ***Tropical Plant Pathology***, v. 35, n. 1, p. 032-036, 2010.

PCHARA, Francisco Rodrigues da Fonseca et al. Estudo da transferência de CO₂ por borbulhamento para o cultivo de microalgas em laboratório. 2016.

PEREIRA, Claudio MP et al. Biodiesel renovável derivado de microalgas: avanços e perspectivas tecnológicas. *Química Nova*, v. 35, n. 10, p. 2013-2018, 2012.

PULZ, O.; GROSS, W. Valuable products from biotechnology of microalgae. ***Applied Microbiology Biotechnology***, v.65, p.635-648, 2004.

RAVEN, J. A. Sensing pH Plant, Cell and Environment, v.13, p.721-729, 1990.

RICHMOND, A. Spirulina. In: BOROWITZKA, M.A.; BOROWITZKA, L.J. (Eds). **Micro-algal biotechnology**. Cambridge: Cambridge University, p.85-121, 1988.

RIPPKA, R.; DERUELLES, J.; WATERBURY, J. B.; HERDMAN, M.; STANIER, R. **Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria**. *Journal of General Microbiology*, v. 111, p. 1-61, 1979.

ROUND, F. E. *Biologia das algas*. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 1983.

SARAIVA, Fernanda Z. et al. Uso de manipueira no desenvolvimento vegetativo do milho em ambiente protegido. ***Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental***, v. 11, n. 1, p. 30-36, 2007.

SCHLINDWEIN, Adriana et al. *Bioquímica: Manual Prático*. Editora Edifurb, 2008.

SCHMITZ, Roberta; MAGRO, Clinei D.; COLLA, Luciane Maria. Aplicações ambientais de microalgas. *Revista CIATEC–UPF*, v. 4, n. 1, p. 48-60, 2012.

SOARES, Rosa de Jesus Bento. Avaliação das possibilidades de tratamento de um efluente piscícola marinho por microalgas. 2000.

SPOLAORE, Pauline et al. Commercial applications of microalgae. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 101, n. 2, p. 87-96, 2006.

TOMASELLI, Luisa et al. The microalgal cell. **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**, v. 1, p. 3-19, 2004.

TRIPATHI, Usha et al. Production of astaxanthin in *Haematococcus pluvialis* cultured in various media. **Bioresource Technology**, v. 68, n. 2, p. 197-199, 1999.

VIÊGAS, Carolina Vieira. Extração e caracterização dos lipídeos da microalga *Chlorella pyrenoidosa* visando à produção de ésteres graxos. 2010. Dissertação de Mestrado.