



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS

BIOPROSPECÇÃO DE MICROALGAS PARA APLICAÇÃO BIOTECNOLÓGICA

Autor (a): Mônica Ansilago
Orientadora: Profa. Dra. Silvia Maria Martelli
Co-orientadora: Profa. Dra. Daniele Menezes Albuquerque

Dourados
2021

MÔNICA ANSILAGO

**BIOPROSPECÇÃO DE MICROALGAS PARA APLICAÇÃO
BIOTECNOLÓGICA**

“Tese de doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, como um dos requisitos necessários para a obtenção do título de Doutora em Ciência e Tecnologia Ambiental.”

Orientadora: Profa. Dra. Silvia Maria Martelli

Co-orientadora: Profa. Dra. Daniele Menezes Albuquerque

Dourados
2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

A619b Ansilago, Monica
BIOPROSPECÇÃO DE MICROALGAS PARA APLICAÇÃO BIOTECNOLÓGICA [recurso eletrônico] / Monica Ansilago. -- 2021.
Arquivo em formato pdf.

Orientador: Silvia Maria Martelli.
Coorientador: Daniele Menezes Albuquerque.
Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia Ambiental)-Universidade Federal da Grande Dourados, 2021.
Disponível no Repositório Institucional da UFGD em:
<https://portal.ufgd.edu.br/setor/biblioteca/repositorio>

1. Chlorella sorokiniana. 2. Isolamento. 3. Recuperação de biomassa. 4. Atividade antioxidante.
I. Martelli, Silvia Maria. II. Albuquerque, Daniele Menezes. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

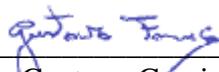
©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.

Termo de Aprovação

Após apresentação, arguição e apreciação pela banca examinadora, foi emitido o parecer APROVADO, para a tese intitulada: **“BIOPROSPECÇÃO DE MICROALGAS PARA APLICAÇÃO BIOTECNOLÓGICA”**, de autoria de **MÔNICA ANSILAGO**, apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Grande Dourados.



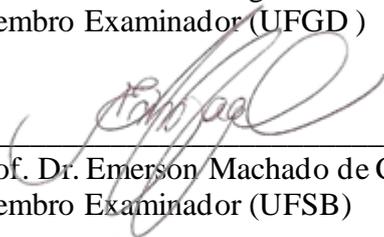
Prof.^a Dr.^a Silvia Maria Martelli - (Participação Remota Síncrona)
Presidente da banca examinadora



Prof. Dr. Gustavo Graciano Fonseca (participação remota)
Membro Examinador (UFGD)



Prof.^a Dr.^a Márcia Regina Russo - (Participação Remota Síncrona)
Membro Examinador (UFGD)



Prof. Dr. Emerson Machado de Carvalho - (Participação Remota Síncrona)
Membro Examinador (UFSB)



Prof. Dr. Alessandro Minillo - (Participação Remota Síncrona)
Membro Examinador (UEMS)

Dourados/MS, 23 de Julho de 2021.

Se não puder fazer tudo, faça tudo que puder...

DEDICATÓRIA

À Deus.

À minha mãe Rosineide da Conceição Ansilago.

Ao meu Pai Ladi Caetano Ansilago.

Ao meu amor Diogo Henrique Knoor.

AGRADECIMENTOS

À Deus, primeiramente, por estar presente em cada momento da minha vida, iluminando meu caminho, me dando forças para seguir sempre em frente e nunca deixando aquele que creê só. Obrigada meu senhor, toda honra e glória é tua!

Aos meus pais Ladi e Rosineide, que sempre estiveram e estão presentes em minha vida e na minha trajetória, sendo meu porto seguro, minha base em momentos difíceis, me incentivando e me motivando a cada passo do meu caminhar. Sem vocês eu não teria conseguido. Obrigada pelo amor incondicional e pelos valores e ensinamentos, ao qual terei o prazer de carregar por toda vida.

Ao meu amor Diogo Henrique Knor, que Deus enviou para ser meu companheiro de vida, que sempre está ao meu lado, sendo minha base e minha calma, agradeço pela paciência e apoio para a conclusão deste projeto.

À minha irmã Michelle, que acompanhou essa trajetória de perto e foi família em momentos difíceis. Obrigada por ser minha enfermeira particular nos momentos de estresse, que acabavam se refletindo na minha saúde (oi gastrite nervosa e demais ites...).

A minha companheira de luta Nathaskia, pela grande amizade, pelas risadas dentro e fora do laboratório e por ser ombro amigo quando eu precisei, amparando meu choro e me apoiando para conseguirmos terminar o Doutorado. Espero levar essa amizade para o resto da vida.

À minha prima Marina e minha grande amiga Michele BSP pelo companheirismo, irmandade, apoio nas horas difíceis e momentos de alegria que me fizeram aguentar firme até agora. Obrigada por terem me abraçado até mesmo quando não disse nada, já que só pelo olhar sabemos nos comunicar.

À minha orientadora Profa. Dra. Silvia Maria Martelli, pela orientação e confiança no desenvolvimento deste trabalho, por ter me acolhido quando necessitei e pelo conhecimento compartilhado. Obrigada.

Ao Prof. Dr. Emerson Machado de Carvalho, pela confiança, por todos os ensinamentos e pelo suporte nas horas difíceis. Obrigada por ter me recebido como orientada desde a graduação.

À minha co-orientadora Danielle Albuquerque de Menezes, por toda a estrutura fornecida e apoio para a execução da pesquisa.

Para o grupo de pesquisa LAPAM, em especial aos alunos Larissa Avelino e Fernanda Sotolani, que auxiliaram nos experimentos laboratoriais, e as técnicas do Multidisciplinar e da FACET, que se fizeram presentes quando alguma ajuda foi solicitada.

Ao Senhor Francisco José Rigatto, proprietário da Piscicultura no município de Glória de Dourados, que permitiu amostragem nos tanques.

Às empresas que forneceram alguns materiais utilizados neste projeto, como a empresa TANAC e SOLENIS; e ao Instituto André Tosello, que forneceu a cepa da microalga *C. sorokiniana*.

Ao programa de pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Grande Dourados, pela oportunidade de realizar um sonho.

A todos os professores do Doutorado, pela partilha do conhecimento, estendendo o agradecimento todos os funcionários do programa.

A todos meus familiares, pelos momentos de alegria e carinho.

A FUNDECT, pelo apoio financeiro concedido.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para que esse sonho fosse realizado.

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Ácido Ascórbico
ANOVA	Análise de Variância
BBM	Bold's Basal Medium
BHT	Hidroxitolueno Butilado
B.O.D.	Estufa Incubadora para Demanda Bioquímica de Oxigênio
CMC	Carboximetilcelulose
CO₂	Dióxido de Carbono
CPBio	Centro de Pesquisa em Biodiversidade
CS	<i>Chlorella sorokiniana</i>
DMS	Diferença Mínima Significativa
DOS	Disk Operating System
DPPH	2,2-Difenil-1-Picril-Hidrazil
F	F-statistic
FDA	Food and Drug Administration
GIFT	Genetic Improvement of Farmed Tilápia
IC₅₀	Concentração Inibitória
GRAS	Generally Recognized as Safe
NPK	Nitrogênio, Fosforo e Potássio
OD₆₈₅	Densidade Ótica Mensurada em 685 nm
P	Nível de Significância
PET	Polietileno Tereftalato

pH	Potencial Hidrogeniônico
pH_{PCZ}	Ponto de Carga Zero
PIE	Ponto Isoelétrico
SP	Espécie
UEMS	Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul
UFGD	Universidade Federal da Grande Dourados
UV	Radiação Ultravioleta
%SRL	Porcentagem de sequestro de radicais livres

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2. BIOPROSPECÇÃO DE MICROALGAS COLETADAS EM TANQUES DE PISCICULTURA

Tabela 2.1. Desdobramento da composição taxonômica da densidade (número de células x 10⁵ mL⁻¹) de microalgas autóctones de piscicultura cultivadas em laboratório31

CAPÍTULO 3. CULTIVO E CARACTERIZAÇÃO DA MICROALGA *Chlorella sorokiniana* E SUAS PROPRIEDADES NUTRICIONAIS

Tabela 3.1. Curva programada para digestão das amostras49

Tabela 3.2. Composição proximal (%) da microalga *Chlorella Sorokiniana* em composição com microalgas avaliadas em outros estudos. *n/i: não informado52

Tabela 3.3. Composição de micro e macronutrientes químicos presentes na vinhaça...53

Tabela 3.4. Composição de micro e macronutrientes químicos presentes na microalga *Chlorella sorokiniana*.....54

CAPÍTULO 4. AVALIAÇÃO DE POLÍMEROS ORGÂNICOS E SINTÉTICOS PARA RECUPERAÇÃO DE BIOMASSA ALGAL

Tabela 4.1. Tratamentos utilizados nos ensaios de desempenho de floculação da biomassa da microalga *Chlorella sorokiniana*.....67

Tabela 4.2. Eficiência de floculação (%) da biomassa algal no meio em suspensão com floclulantes orgânicos, sintéticos e combinações (média ± erro padrão) nos quatro tratamentos.....72

Tabela 4.3. Valor do potencial hidrogeniônico (pH) de cada tratamento após processo de floculação ± erro padrão com floclulantes orgânicos, sintéticos e combinações. Controle: Tratamento sem adição de polímeros floclulantes.74

CAPÍTULO 5. AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS POR *Chlorella sorokiniana* CULTIVADO EM MEIO ALTERNATIVO COM VINHAÇA

Tabela 5.1. Composição do Meio de Cultivo Sueoka. a) Composição dos micronutrientes. b) Composição dos Elementos Traços em 200x em 500 mL de água. *em 250 mL de água.....89

Tabela 5.2. Teor total de fenólicos e flavonoides encontrados nos extratos aquosos de <i>Chlorella sorokiniana</i>	92
Tabela 5.3. Sequestro dos radicais livres estáveis DPPH pelo extrato aquoso da biomassa de <i>Chlorella sorokiniana</i> e pelos antioxidantes padrões ácido ascórbico (AA) e BHT..	95

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO GERAL

Figura 1.1. Esquematização das diversas aplicações da biomassa algal e produtos gerados a partir da biorefinaria.20

CAPÍTULO 2. BIOPROSPECÇÃO DE MICROALGAS COLETADAS EM TANQUES DE PISCICULTURA

Figura 2.1. Microalgas provenientes de tanques de piscicultura identificadas durante 28 dias de produção em laboratório. A magnificação da microscopia óptica foi de 40 x ...34

Figura 2.2. Visão geral da evolução filogenética sistemática das microalgas encontradas nos tanques de piscicultura do Domínio Eukaryota. Legenda: 1) Domínio; 2) Reino; 3) Sub-reino; 4) Infrareino; 5) Filo; 6) Classe; 7) Ordem; 8) Família; 9) Gênero; 10) Espécie.35

Figura 2.3. Visão geral da evolução filogenética sistemática das microalgas encontradas nos tanques de piscicultura do Domínio Procariota. Legenda: 1) Domínio; 2) Reino; 3) Sub-reino; 4) Infrareino; 5) Filo; 6) Classe; 7) Ordem; 8) Família; 9) Gênero; 10) Espécie.36

Figura 2.4. Densidade relativa das microalgas de piscicultura no tempo sucessional de 28 dias e linha de tendência37

CAPÍTULO 3. CULTIVO E CARACTERIZAÇÃO DA MICROALGA *Chlorella sorokiniana* E SUAS PROPRIEDADES NUTRICIONAIS

Figura 3.1. Microscopia eletrônica da microalga *Chlorella sorokiniana* no aumento de 40 x.....50

Figura 3.2. Perfil de crescimento da microalga *Chlorella sorokiniana* e variação do pH.51

CAPÍTULO 4. AVALIAÇÃO DE POLÍMEROS ORGÂNICOS E SINTÉTICOS PARA RECUPERAÇÃO DE BIOMASSA ALGAL

Figura 4.1. Cultivo e manutenção em laboratório da microalga *Chlorella sorokiniana*65

Figura 4.2. Curva de determinação e valor (\pm desvio padrão) do ponto de carga zero para os diferentes flocculantes testados. A) Biomassa de *Chlorella sorokiniana*; B) Carboximetilcelulose; C) Extrato de *Cereus Jamacaru*; D) Extrato de *Stryphnodendron adstringens*; E) Polímero poliacrilamida Solenis; F) Polímero Tanfloc MT; G) Quitosana Técnica; H) Semente de *Moringa oleífera*69

Figura 4.3. Aspecto visual do meio de cultivo frente aos diferentes polímeros (controle + tratamentos 1, 2, 3 e 4, da esquerda para a direita respectivamente).....70

CAPÍTULO 5. AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS POR *Chlorella sorokiniana* CULTIVADO EM MEIO ALTERNATIVO COM VINHAÇA

Figura 5.1. Densidade média ($N = 5 \pm$ erro padrão) da microalga *Chlorella sorokiniana* ao longo de oito semanas de produção. k: taxa de crescimento exponencial.....91

BIOPROSPECÇÃO DE MICROALGAS PARA APLICAÇÃO BIOTECNOLÓGICA

RESUMO

As microalgas têm sido consideradas potenciais fontes de aplicações biotecnológicas, devido a sua biodiversidade, além de apresentarem em sua biomassa elevada concentração de carboidratos, lipídeos, proteínas e biomoléculas, como antioxidantes. Elas podem ser utilizadas na área da nutrição humana e animal, indústria farmacêutica, tratamento de águas residuais, produção de energia, entre outras. Neste estudo, os objetivos foram bioprospectar, selecionar, caracterizar e avaliar o desempenho de microalgas de tanques de piscicultura para aplicação biotecnológica. Posteriormente, foi realizado o cultivo da microalga *Chlorella sorokiniana* e caracterizadas as propriedades nutricionais da mesma em meio de cultivo N:P:K (20:05:20) enriquecido com vinhaça de cana-de-açúcar. Também foi realizada a avaliação de eficiência de floculação da biomassa algal por meio de polímeros orgânicos e sintéticos (polímeros) para recuperação da biomassa de *C. sorokiniana*. Em um último momento, comparou-se a produção de metabólitos secundários por *C. sorokiniana* cultivada em meio comercial (Sueoka) e com aqueles cultivados em meio preparado com vinhaça de cana (0,1%) suplementado com N:P:K (20-5-20 gL⁻¹). As microalgas clorófitas (Chlorophyta), entre elas a microalga *Chlorella* sp. apresentaram maior constância na densidade celular durante o período de 28 dias de cultivo. A biomassa de *C. sorokiniana* apresentou elevada concentração de proteína (58%), seguido por carboidratos (16,14%) e lipídeos (14,97%). Já na composição elementar, o macronutriente que apresentou elevada quantidade foi o ferro (Fe), com valor de 882,6 mg k⁻¹. No teste de recuperação da biomassa algal, o polímero que apresentou maior eficiência de floculação foi a semente de *Moringa oleífera* com 100% de recuperação. Os demais polímeros apresentaram 97,17% de recuperação para PraestoTM, 95,28% para Tanfloc MT, 80,38% para quitosana. Níveis médios de compostos fenólicos e conteúdo de flavonoides foram encontrados na biomassa da *C. sorokiniana* cultivada no meio NPK e vinhaça (15,28 ± 0,32 mg GAE.g⁻¹ e 72,30 ± 5,28 mg QE.g⁻¹, respectivamente) em comparação com o meio comercial (6,02 ± 0,13 mg GAE.g⁻¹ e 13,12 ± 1,33 mg QE.g⁻¹, respectivamente). Assim, podemos inferir que a *C. sorokiniana* apresenta alta densidade e fácil isolamento quando presente em ambientes com ampla diversidade algal e pode ser utilizada nas mais diversas áreas biotecnológicas, visto as suas propriedades nutricionais e fácil disponibilidade e baixo custo de obtenção e manutenção.

Palavras-Chave: *Chlorella sorokiniana*; Isolamento; Recuperação de biomassa; Atividade antioxidante.

MICROALGAE BIOPROSPECTING FOR BIOTECHNOLOGICAL APPLICATION

ABSTRACT

Microalgae have been considered potential sources of biotechnological applications, due to their biodiversity, in addition to having a high concentration of carbohydrates, lipids, proteins and biomolecules in their biomass, such as antioxidants. They can be used in the areas of human and animal nutrition, pharmaceutical industry, water treatment, energy production, among others. In this study, the main objective was to bioprospect, select, characterize and evaluate the performance of microalgae from fish ponds for biotechnological application. Subsequently, the microalgae *Chlorella sorokiniana* was cultivated and its nutritional properties were characterized in a N:P:K (20:05:20) culture medium enriched with sugarcane vinasse. The efficiency of algal biomass flocculation was also performed using organic and synthetic polymers (polymers) to recover the biomass of the microalgae *C. sorokiniana*. Finally, the biomass yield and production of secondary metabolites by *C. sorokiniana* cultivated in commercial medium (Sueoka) and those cultivated in medium prepared with sugarcane vinasse (0.1%) supplemented with N:P:K were evaluated (20-5-20 gL⁻¹). Chlorophyte microalgae (Chlorophyta), including the microalgae *Chlorella* sp. showed greater constancy in cell density during the 28-day period of culture. The biomass of the microalgae *C. sorokiniana* showed high protein concentration (58%), followed by carbohydrates (16.14%) and lipids (14.97%). In the elemental composition, the macronutrient that presented a high amount was iron (Fe), with a value of 882.6 mg k⁻¹. In the algal biomass recovery test, the polymer with the highest flocculation efficiency was the Moringa oleifera seed with 100% recovery. The other polymers showed 97.17% recovery for PraestoITM, 95.28% for Tanfloc MT, 80.38% for chitosan. Mean levels of phenolic compounds and flavonoid content were found in the biomass of the microalgae *C. sorokiniana* cultivated in NPK medium and vinasse (15.28 ± 0.32 mg GAE.g⁻¹ and 72.30 ± 5.28 mg QE.g⁻¹, respectively) compared to the commercial medium (6.02 ± 0.13 mg GAE.g⁻¹ and 13.12 ± 1.33 mg QE.g⁻¹, respectively). Thus, we can infer that the microalgae *C. sorokiniana* can be used in the most diverse biotechnological areas, given its nutritional properties, easy availability and low cost of obtaining and maintaining.

Keywords: *Chlorella sorokiniana*; Isolation; Biomass recovery; Antioxidant activity.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	xi
LISTA DE FIGURAS.....	xiii
RESUMO.....	xv
ABSTRACT.....	xvi
SUMÁRIO.....	xvii
CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO GERAL.....	20
OBJETIVO GERAL.....	23
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
REFERÊNCIAS.....	24
CAPÍTULO 2. BIOPROSPECÇÃO DE MICROALGAS COLETADAS EM TANQUES DE PISCICULTURA.....	25
Resumo:.....	25
1. INTRODUÇÃO.....	27
2. METODOLOGIA.....	29
2.1. Coleta e Identificação das Microalgas.....	29
2.2. Avaliação da Sucessão Ecológica das Microalgas.....	29
2.3. Isolamento das Microalgas.....	30
2.4. Manutenção das Microalgas.....	30
2.5. Análise de Dados.....	31
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
3.1. Coleta e Identificação de Microalgas.....	31
3.2. Avaliação da Sucessão Ecológica das Microalgas.....	35
3.3. Isolamento das Microalgas.....	37
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	38
5. REFERÊNCIAS.....	39
CAPÍTULO 3. CULTIVO E CARACTERIZAÇÃO DA MICROALGA <i>Chlorella sorokiniana</i> E SUAS PROPRIEDADES NUTRICIONAIS.....	43
1. INTRODUÇÃO.....	45
2. METODOLOGIA.....	46
2.1. Cultivo da Microalga <i>Chlorella Sorokiniana</i>	46
2.2. Análise Proximal.....	47

2.3.	Análise de Micronutrientes e Macronutrientes	48
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
3.1.	Cultivo da Microalga <i>Chlorella sorokiniana</i>	49
3.2.	Análise Proximal	50
3.3.	Análise de Micronutrientes e Macronutrientes	52
4.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	54
5.	REFERÊNCIAS	54
CAPÍTULO 4. AVALIAÇÃO DE POLÍMEROS ORGÂNICOS E SINTÉTICOS PARA RECUPERAÇÃO DE BIOMASSA ALGAL.....		
1.	INTRODUÇÃO	61
2.	METODOLOGIA	63
2.1.	Cultivo e Manutenção da Microalga.....	64
2.3.	Determinação do Ponto de Carga Zero ($pH_{p_{cz}}$).....	64
2.4.	Desempenho de Flocculação	65
2.5.	Análise dos Dados	66
3.	RESULTADOS.....	67
3.1.	Determinação do Ponto de Carga Zero ($pH_{p_{cz}}$).....	67
3.2.	Desempenho de Flocculação da Biomassa Algal	69
4.	DISCUSSÃO.....	74
5.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	76
6.	REFERÊNCIAS.....	76
CAPÍTULO 5. AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS POR <i>Chlorella sorokiniana</i> CULTIVADA EM MEIO ALTERNATIVO COM VINHAÇA.....		
1.	INTRODUÇÃO	85
2.	METODOLOGIA	87
2.1.	Cultivo da Microalga.....	87
2.2.	Extração dos Compostos Fenólicos e Flavonoides.....	88
2.3.	Determinação do Conteúdo de Compostos Fenólicos e Flavonoides Totais.....	88
2.4.	Ensaio de DPPH.....	89
2.5.	Análise dos Dados	90
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	90
3.1.	Performance de Crescimento	90
3.2.	Compostos Fenólicos e Flavonoides.....	91
3.3.	Atividade Antioxidante	93
4.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	95

5. REFERÊNCIAS.....	95
CAPÍTULO 6 – CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	103

CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO GERAL

As microalgas são organismos microscópicos e unicelulares, com pouca ou nenhuma diferenciação celular, capacidade de formação de colônias e a presença de pigmentos, que são responsáveis pelas diferentes colorações entre os diferentes táxons, além das microalgas apresentarem a característica de serem fotoautotróficas (OHSE et al., 2008).

As microalgas apresentam baixo custo de produção, consomem grandes quantidades de nutrientes disponíveis nas águas residuais, liberam oxigênio no meio em que estão presentes por meio da fotossíntese (presença de luz), realizam a manutenção da água (recuperação de nutrientes e remoção de patógenos) e adequação dos parâmetros físico-químicos e favorecem a reutilização da água de cultivo no processo produtivo (CARVALHO et al., 2012). As diferentes aplicações da biomassa das microalgas podem ser visualizadas na Figura 1.1.

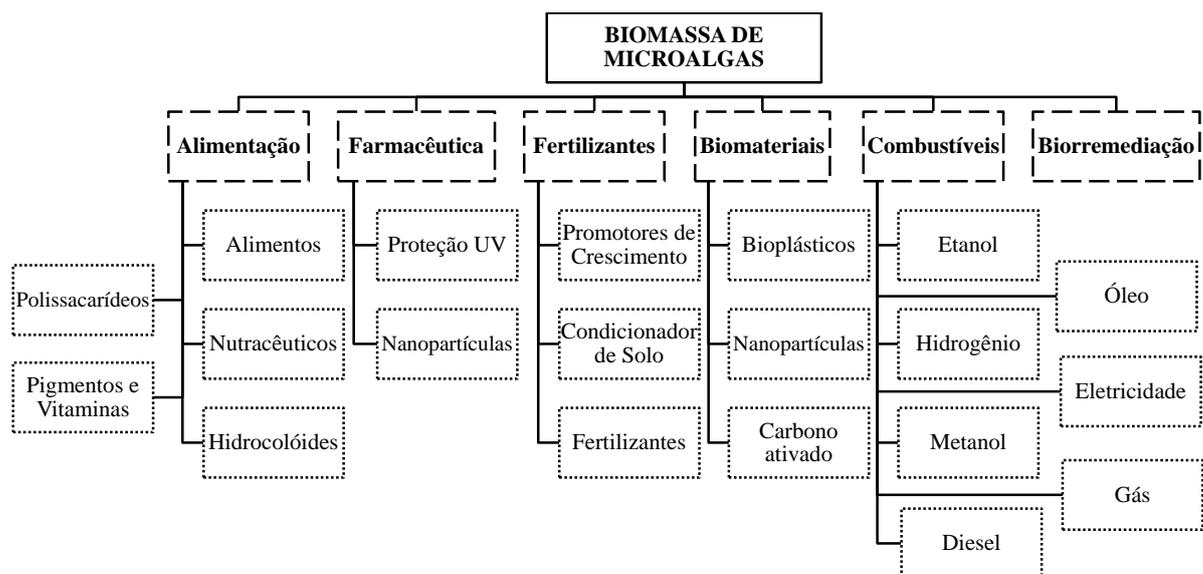


Figura 1.1. Esquemática das diversas aplicações da biomassa algal e produtos gerados a partir da biorefinaria (conversão de biomassa em bionergia e outros bens de consumo).

Fonte: Adaptado de Chandra et al. (2019).

A biomassa das microalgas pode ser utilizada em diversas aplicações biotecnológicas, na indústria alimentícia, farmacêutica e cosmética, através da bioprospecção de óleos essenciais, pigmentos, antioxidantes, entre outras (DERNER et al., 2006; SHIELDS et al., 2008). Esta biomassa também pode ser utilizada para

alimentação na aquicultura, em processos de biorremediação de efluentes, atividade de cultivo hidropônico e outras aplicações (SHIELDS et al., 2008).

As microalgas são consideráveis recursos ainda pouco explorados, que são ricas em compostos bioativos e, são adequadas para a produção de produtos industriais e especialidades químicas, como produtos bioativos, alimentos funcionais e outros produtos. Algumas microalgas podem ser utilizadas para a produção de biocombustíveis a partir de resíduos industriais (SPOLAORE, et al., 2006).

A utilização de microalgas em processos de biorremediação, por exemplo, apresenta um grande potencial, por meio da remoção de nutrientes de corpos hídricos, produção de biomassa, contribuindo para a diminuição de patógenos, purificação das águas residuais, fixação de carbono (CO₂), agregação de valor a biomassa e a atividade econômica (ANSILAGO et al., 2016), produção de biodiesel e outras aplicações (MATA et al., 2010).

Neste aspecto, para o uso racional da biomassa algal nos diversos campos já mencionados, pesquisas são necessárias para entender os benefícios, ações e mecanismos microalgais. O desenvolvimento de processos eficazes de cultivo em larga escala, que obtém uma alta densidade celular é a chave para a comercialização de produtos microalgais, que pode auxiliar na redução de impacto ambiental das atividades produtivas de alimentos de outras matérias-primas (PULZ; GROSS, 2004; BARCELLOS et al., 2012).

Mesmo as microalgas apresentando alto potencial em ensaios biotecnológicos, esta tecnologia ainda é limitada e pouco aplicada (ANSILAGO et al., 2016; CARVALHO et al., 2012). Para que esta tecnologia seja ampliada, é necessário estudar aspectos de monitoramento, avaliação de parâmetros cinéticos de crescimento e rendimento em biomassa, capacidade de crescimento em água residual e identificar aspectos de qualidade algal, qualidade da água tratada por meio de microalgas e principalmente a questão econômico-financeira.

No caso da água residual de produção de pescado é necessário que sejam realizados estudos de bioprospecção das microalgas presentes neste ambiente, identificação e seleção de microalgas que possuem maior resiliência, produtividade e rendimento para sua utilização na biorremediação das águas residuais.

A avaliação do desempenho algal, sua potencialidade de produção de biomassa e qualidade bromatológica, pode se tornar viável na questão econômica na piscicultura e

outras atividades, utilizando esta como insumo para produção de rações, incluindo qualidade no produto, visto alto teor proteico, presença de aminoácidos e metabolitos secundários, que podem substituir a utilização de outras farinhas, valorizando a atividade econômica da piscicultura.

Desta forma, este estudo foi dividido em 6 capítulos, sendo:

O capítulo 1, caracterizado por uma introdução geral, que aborda a diversidade das microalgas, meios comerciais e alternativos, propriedades nutricionais e aplicações biotecnológicas, oferecendo o suporte necessário para os demais capítulos deste estudo.

O capítulo 2 intitulado: “Bioprospecção de microalgas coletadas em tanques de piscicultura”, aborda algumas técnicas de bioprospecção e avaliação de sucessão ecológica de microalgas dulcícolas presentes em tanques de piscicultura e que possuem potencial biotecnológico.

O capítulo 3, intitulado em “Cultivo e caracterização da microalga *Chlorella sorokiniana* e suas propriedades nutricionais”, apresenta o cultivo de microalgas visando a exploração destas como fonte de nutrientes para a aplicação em subprodutos ou processos biotecnológicos.

O capítulo 4, intitulado em “Avaliação de polímeros orgânicos e sintéticos para recuperação de biomassa algal”, traz uma avaliação de tecnologias para a recuperação da biomassa algal, comparando diferentes agentes flocculantes e estabelecendo a melhor concentração do polímero utilizado.

O capítulo 5 intitulado “Avaliação da produção de metabólitos secundários por *Chlorella sorokiniana* usando meio alternativo com vinhaça” visou a aplicação biotecnológica da biomassa da microalga para produção de metabólitos secundários, comparando um meio comercial e um meio alternativo de baixo custo.

O capítulo 6, caracterizado pelas considerações finais deste estudo, abordando os principais resultados obtidos em todos capítulos.

OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste estudo foi bioprospectar microalgas de tanques de piscicultura para aplicação biotecnológica.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Identificar e isolar microalgas coletadas em tanques de piscicultura com potencial para aplicações biotecnológicas;
- b) Cultivar e avaliar as características nutricionais da microalga *Chlorella sorokiniana*;
- c) Avaliar a floculação da microalga *Chlorella sorokiniana* utilizando diferentes tecnologias;
- d) Avaliar a produção de metabólitos secundários pela microalga *Chlorella sorokiniana* em meios de cultivo diferentes.

REFERÊNCIAS

- ANSILAGO, M.; OTTONELLI, F.; CARVALHO, E. M. Cultivo da microalga *Pseudokirchneriella subcapitata* em escala de bancada utilizando meio contaminado com metais pesados. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v.21, n.3, p. 603-608, 2016.
- BARCELLOS, A. D.; BARRETO, A. G. da S. S.; MACHADO, B. A. S.; DRUZIAN, J. I. Microalgas e seu potencial de uso. **Prospect CT&I - Cadernos de Prospecção**, v. 5, n.4, p.178-184, 2012.
- CARVALHO, E.M.; OTTONELLI, F.; ANSILAGO, M.; GODOY, H.C.; NAKAGAKI, J.M.; RAMIRES, I. Growth kinetics of the microalga *Pseudokirchneriella subcapitata* (Korshikov) Hindak (Chlorophyceae) in natural water enriched with NPK fertilizer. **Biochemistry and Biotechnology Report**, v.1, n.2, p.14-18. 2012.
- CHANDRA, R.; IQBAL, H.M.N.; VISHAL, G.; LEE, H.-S.; NAGRA, S. Algal biorefinery: a sustainable approach to valorize algal-based biomass towards multiple product recovery. **Bioresource Technology**, v. 278, p. 346–359, 2019.
- DERNER, R. B.; OHSE, S.; VILLELA, M.; CARVALHO, S. M. de; FETT, R. Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural**, v.36, n.6, p.1959-1967, 2006.
- MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, vol. 14, i. 1, p. 217-232, 2010.
- OHSE, S.; DERNER, R. B.; OZÓRIO, R. Á.; BRAGA; M. V. da C.; CUNHA, P.; LAMARCA, C. P.; SANTOS, M. E. Crescimento de microalgas em sistema autotrófico estacionário. **Revista Biotemas**, Ponta Grossa, v. 21 n. 2, 2008.
- PULZ, O.; GROSS, W. Valuable products from biotechnology of microalgae. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 65, n. 6, p. 635–648, 2004.
- SHIELDS, R.; FLYNN, K.; LOVITT, B.; GREENWELL, C.; RATCLIFFE, I.; FACEY, P.; JARVIS, R.; A Technology review and roadmap for microalgal biotechnology in wales. **Centre for Sustainable Aquaculture Research (CSAR)**, 2008, 47 p.
- SPOLAORE, P.; JOANNIS-CASSAN, C.; DURAN, E.; ISAMBERT, A. Commercial applications of microalgae. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 101, n. 6, p. 201-211, 2006. ISSN 1389-1723.

CAPÍTULO 2. BIOPROSPECÇÃO DE MICROALGAS COLETADAS EM TANQUES DE PISCICULTURA

Resumo:

As microalgas representam um grupo não taxonômico de grande diversidade biológica e elevado potencial para aplicação biotecnológica, seja pela produção de bioativos ou pela sua plasticidade em ambientes inóspitos. O estudo das microalgas dulcícolas é importante, pois representa uma fonte de conhecimento para o desenvolvimento de tecnologias inovadoras no campo da biotecnologia ambiental. O objetivo deste estudo foi isolar e identificar microalgas presentes em tanques de piscicultura, avaliando técnicas de isolamento, analisando a composição taxonômica deste ambiente e realizando sucessão taxonômica das microalgas com maior potencial biotecnológico. A água para isolamento das microalgas foi coletada com garrafa do tipo Van Dorn em um sistema semi-intensivo de tanques lonados de criação de tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*), variedade GIFT, localizados no município de Glória de Dourados, MS. As amostras de água foram incubadas por 28 dias em laboratório, com aeração constante e temperatura ambiente ($22 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$) para o desenvolvimento da densidade algal, análise da composição taxonômica e sucessão ecológica. Após este período, foram utilizadas três técnicas para o isolamento microalgal: diluição seriada, inoculação em placa de Petri e seleção por envelhecimento. Foram identificadas 15 espécies de microalgas pertencentes as classes *Cyanobacteria*, *Dinophyceae* e *Chlorophyceae*. Após 28 dias de cultivo, observou-se que as espécies *Lacunastrum gracillimum*, *Scenedesmus quadricauda* e *Chlorella* sp. mantiveram constância na densidade celular durante o período sucessional. Estas pertencem a classe *Chlorophyta*, são comumente empregadas em estudos e atividades com potencial biotecnológico. As demais microalgas não apresentaram densidade celular significativa pelo teste de tukey. O método de inoculação em placas de petri se mostrou mais eficiente, com cinco espécies de microalgas isoladas, sendo estas: *Scenedesmus acuminatus*, *S. quadricauda*, *Chlorella* sp., *Monoraphidium contortum* e *Scenedesmus bernandii*. A metodologia de diluição seriada obteve resultado positivo apenas para o isolamento de *Chlorella* sp. e a técnica de envelhecimento obteve o isolamento das microalgas *Chlorella* sp. e *S. quadricauda*. Porém, se torna necessário a combinação destas técnicas pra para que haja um maior aproveitamento do tempo e diminuição de custos para isolamento algal.

Palavras-chave: Isolamento, sucessão ecológica, flora algal, piscicultura.

BIOPROSPECTING OF MICROALGAE COLLECTED IN FISH FARMS

Abstract:

Microalgae represent a non-taxonomic group of great biological diversity and high potential for biotechnological application, whether due to the production of bioactive substances or their plasticity in inhospitable environments. The study of freshwater algae is important, as it represents a source of knowledge for the development of innovative technologies in the field of environmental biotechnology. The objective of this study was to isolate and identify microalgae present in fish farms, evaluating isolation techniques, analyzing the taxonomic composition of this environment and performing taxonomic succession of microalgae with greater biotechnological potential. The water for the isolation of the microalgae was collected with a Van Dorn-type bottle in a semi-intensive system of long ponds for breeding Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), variety GIFT, located in the municipality of Glória de Dourados, MS. The water samples were incubated for 28 days in the laboratory, with constant aeration and room temperature for the development of algal density, analysis of taxonomic composition and ecological succession. After this period, the following techniques for microalgal isolation were used: serial dilution, inoculation in Petri dish and selection by aging. Fifteen microalgae species belonging to the classes Cyanobacteria, Dinophyceae and Chlorophyceae were identified. After 28 days of cultivation, it was observed that the species *Lacunastrum gracillimum*, *Scenedesmus quadricauda* and *Chlorella* sp. maintained constant cell density during the succession period. These belong to the Chlorophyta class and are commonly used in studies and activities with biotechnological potential. The other microalgae did not show significant cell density by the Tukey test. The method of inoculation in Petri dishes proved to be more efficient, since it isolated five species of microalgae in isolated colonies, namely: *Scenedesmus acuminatus*, *S. quadricauda*, *Chlorella* sp., *Monoraphidium contortum* and *Scenedesmus bernandii*. The serial dilution methodology obtained a positive result only for the isolation of *Chlorella* sp. and the aging technique obtained the isolation of the *Chlorella* sp. and *S. quadricauda*. However, it is necessary to combine these techniques to have a greater use of time and a reduction in costs for algal isolation.

Keywords: Isolation, ecological succession, algal flora, fish farming.

1. INTRODUÇÃO

O cultivo de microalgas coletadas em sistemas não axênicos tem como fase inicial e crucial a identificação de grupo ou grupos taxonômicos potenciais e o seu isolamento para obtenção de um cultivo puro. O isolamento destes microrganismos pode representar um desafio para muitos estudos, exigindo a combinação de diversas técnicas para o sucesso do isolamento de uma ou mais células algais (ANDERSEN; KAWACHI, 2015).

O isolamento de microalgas em ambientes continentais dulcícolas possui vasta riqueza biológica e taxonômica. Sua ocorrência depende muito da sua capacidade adaptativa em cada ambiente (WATANABE, 2005). Tais características intrínsecas as tornam também potencialmente aptas para utilização em diferentes atividades produtivas, como biorremediação de xenobióticos, bioprospecção de bioativos, extração lipídica para produção de biodiesel, suplementação alimentar, entre outras (SIRAKOV et al., 2015).

Para um isolamento bem sucedido é importante identificar as exigências ideais da espécie que se visa isolar, tais como: temperatura, exigência nutricional, pH, salinidade, demanda de oxigênio e CO₂. Tais características podem ser obtidas da literatura ou em experimentação controlada em laboratório. Tais conhecimentos tornam-se relevantes para o cultivo *in vitro* desses microrganismos pois simulam as condições adaptativas ótimas de cada grupo taxonômico (THOMPSON, 2006).

Diversas técnicas são utilizadas no isolamento microalgal, como por exemplo a separação de células por sucção em microcapilares, diluição seriada do meio líquido, semeadura em ágar, separação física por centrifugação, e a sua eficiência vai depender das características de cada microalga (ANDERSEN; KAWACHI, 2015). As microalgas produzem diversas substâncias bioquímicas de elevado valor agregado (bioativos), que podem ser utilizadas como matéria prima para combustíveis, alimentos, tratamento de resíduos, entre outros (MATA et al., 2010; ANSILAGO et al., 2016; RIZWAN et al., 2018).

Segundo Rizwan et al. (2018) existem vários processos até a obtenção da biomassa, tais como o isolamento, identificação, cultivo, recuperação da biomassa e extração do produto de interesse. O cultivo é uma das etapas fundamentais da produção de microalgas e quando se utilizam amostras selvagens, é comum a presença de zooplâncton e outros microrganismos que podem contaminar o meio e reduzir a produção das células por predação, ou competição por recursos. Assim, é necessária a adoção de

filtragem da água com o auxílio de redes de fitoplâncton ou filtros que diminuam a ocorrência de outros microrganismos e/ou a utilização de antimicrobianos seletivos (GRETHER-BECK, 2008). Mesmo as microalgas apresentando alto potencial em ensaios biotecnológicos, esta tecnologia ainda é limitada e pouco aplicada de modo que tecnologias de isolamento, produção e separação da biomassa destes microrganismos ainda são pouco difundidas na literatura (ANSILAGO et al., 2016; CARVALHO et al., 2012).

Neste aspecto, para que a tecnologia com microalgas seja ampliada é necessário estudar métodos de isolamento, identificação taxonômica, monitorar parâmetros do meio, avaliar a cinética de crescimento, rendimento e colheita da biomassa algal, bem como a capacidade de crescimento em ambientes residuais e contaminados. O desenvolvimento de processos eficazes de cultivo em larga escala com alta densidade celular é uma das chaves, além da recuperação da biomassa, para produção e a comercialização de produtos secundários, para o uso em processos de redução de impacto ambiental, utilização na aquicultura e em outras aplicações ecológicas (PULZ; GROSS, 2004; BARCELLOS et al., 2012).

No caso da produção aquícola, é necessário que sejam realizados estudos de bioprospecção das microalgas presentes nos diferentes ambientes aquícolas, seleção de microalgas que possuem maior resiliência, maior rendimento de biomassa, plasticidade a variações físicas e químicas. Este estudo pode trazer reduções nos custos de produção da piscicultura, incluindo a utilização da biomassa para valorização da atividade econômica, como na produção de ração, que é considerado um dos principais custos na atividade aquícola (BOROWITZKA, 1997; MENDES et al., 2012; MONTALVÃO et al., 2016).

As microalgas apresentam uma grande diversidade gênica, fisiológica, morfológica, além de possuírem diversas formas de reprodução, habitarem diferentes ambientes, podendo ainda compartilhar o mesmo ancestral de plantas terrestres, como é o caso das microalgas pertencentes ao reino Plantae, porém há ainda as pertencentes ao domínio Procariota (BICUDO; MENEZES, 2017; BRODIE et al., 2017).

No caso do Mato Grosso do Sul, a produção aquícola vem crescendo e adquirindo investimentos, visto principalmente como um meio de geração de renda em propriedades rurais e esta atividade é desenvolvida em sua maior parte em áreas que não possuem capacidade produtiva de outros alimentos, além de contar com condições climáticas e disponibilidade de recursos hídricos. Desta forma, o objetivo deste estudo foi isolar e

identificar microalgas presentes em tanques de piscicultura, analisando a composição taxonômica deste ambiente, realizando a sucessão taxonômica das microalgas com maior potencial biotecnológico para aplicação agroindustrial e avaliando técnicas de isolamento.

2. METODOLOGIA

2.1. Coleta e Identificação das Microalgas

A água para isolamento das microalgas foi coletada com garrafa do tipo Van Dorn (3 L) em tanques de piscicultura do tipo lonado, sistema semi-intensivo de criação de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) variedade GIFT, localizados no município de Glória de Dourados, MS. As coletas foram realizadas na parte inferior, superior e meio do tanque, que possui 540,00 m² de área, 1,65m de profundidade e densidade de 7,4 kg peixe/m³. A coleta foi realizada no mês de Julho, no inverno, onde foi mensurada uma temperatura média de 20 °C ao decorrer do mês, segundo CEMTEC (Centro de Monitoramento do Tempo e do Clima do MS).

As microalgas foram identificadas de acordo com chaves taxonômicas disponíveis: Bicudo e Menezes (2005), Ramos et al. (2015), Souza e Melo (2011) e Sant'anna et al. (2006). Para identificação e contagem foram preparadas amostras em câmara de Neubauer (hemocitômetro) e microscópio óptico.

2.2. Avaliação da Sucessão Ecológica das Microalgas

A água da produção da piscicultura foi incubada em laboratório para o desenvolvimento da densidade algal. Os cultivos foram mantidos em 3 frascos erlenmeyers de 1000 mL, com sistema de cultivo estático não axênico, aeração constante, temperatura ambiente ($22 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$) e fotoperíodo controlado (12 h luz/12 h escuro) 2500 LUX. Os ensaios ocorreram durante 28 dias, com triplicatas retiradas a cada sete dias e contadas em câmara de Neubauer para obtenção da densidade algal (SIPAUBA-TAVARES; ROCHA, 2003).

A sucessão ecológica dos táxons de microalgas foi estudada quantitativamente considerando as mudanças na abundância de microalgas ao longo do processo de colonização. Esta análise foi aplicada para as 6 (seis) espécies mais abundantes

encontradas, compreendendo uma representação gráfica da abundância relativa para cada dia de amostragem, calculada pela fórmula apresentada por Brower e Zar (1984): $RN_j = N_j/\Sigma N$, onde “ RN_j ” é a abundância relativa de uma espécie em um período sucessional “ j ” (dia de amostragem), “ N_j ” é a abundância da espécie no período “ j ” e “ ΣN ” é a soma da abundância da espécie em todos os dias de amostragem.

2.3. Isolamento das Microalgas

Os métodos utilizados para realizar o isolamento de microalgas e o seu emprego depende das condições do laboratório e da espécie que se quer isolar (ANDERSEN, 2005). Os métodos utilizados para o isolamento de microalgas foram os seguintes (OLIVEIRA, 2018):

1. O método de diluição seriada, realizado por meio de diluições sucessivas, com o objetivo de terminar com uma única célula ou pelo menos células da mesma espécie num tubo;
2. Semeadura em placa de ágar, visto a capacidade de formação de colônias e maior facilidade em coletar cada colônia separadamente;
3. O método de seleção por envelhecimento, através da indução da competitividade por meio do adensamento de microalgas por tempo prolongado (aproximadamente seis meses).

2.4. Manutenção das Microalgas

As microalgas isoladas foram cultivadas em meio líquido sintético NPK (CARVALHO et al., 2012) e meio sólido. Para a preparação do meio de cultivo líquido foi utilizado um meio sintético utilizando 1% de solução estoque de NPK. A solução estoque de NPK foi preparada com a adição de 70 g de adubo químico N:P:K (20-5-20 g L⁻¹) em 1000 mL de água destilada, autoclavados a 121°C durante 20 minutos (SIPAUBA-TAVARES; ROCHA, 2003). Para a preparação do meio de cultivo sólido foi adicionado 1% da solução estoque e 10 g de ágar bacteriológico em 1000 mL de água destilada, autoclavados a 121°C durante 20 minutos e posteriormente adicionado em placas de Petri. Por fim foi realizado o plaqueamento por semeadura das amostras contendo microalgas. As placas foram mantidas em B.O.D. com sistema de cultivo estático não axênico, aeração constante, com temperatura e fotoperíodo controlados (22

± 2,0°C e 12 h luz / 12 h escuro) 2.500 LUX durante 28 dias. A cada quinze dias foi realizado a repicagem das placas.

2.5. Análise de Dados

Para análise de dados foi aplicado o teste de Levene de homogeneidade e normalidade. Após este, foi aplicada a análise de variância (ANOVA) one-way, a fim de verificar diferença significativa por tratamento (5% de probabilidade) de densidade relativa e tempo de cultivo e densidade algal, seguido do teste de Tukey, no programa de estatística GENES versão DOS (Visual Basic 5.0).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Coleta e Identificação de Microalgas

Durante o período de 28 dias de inoculação da água de produção de piscicultura foram identificadas 15 espécies de microalgas. O desdobramento da composição taxonômica e da densidade algal média dos 28 dias de cultivo podem ser observados na Tabela 2.1. A cianobactéria *Aphanocapsa annulata* apresentou maior densidade no sistema de piscicultura, seguida pelas clorofíceas *Chlorella* sp. e *Lacunastrum gracillimum*.

Tabela 2.1. Desdobramento da composição taxonômica da densidade (número de células x 10⁵ mL⁻¹) de microalgas autóctones de piscicultura cultivadas em laboratório.

Táxon	Densidade
Eukaryota	
Plantae	
Viridiplantae	
Chlorophyta	
Chlorophytina	
Chlorophyceae	
Sphaeropleales	
Selenastraceae	
<i>Ankistrodesmus</i>	
<i>Ankistrodesmus falcatus</i> (Corda) Ralfs 1848	0,36 ± 0,09 ^E
<i>Kirchneriella</i>	
<i>Kirchneriella lunaris</i> (Kirchner) Möbius 1894	0,11 ± 0,07 ^E
<i>Monoraphidium</i>	
<i>Monoraphidium contortum</i> (Thuret) Komárková-Legnerová 1969	0,47 ± 0,15 ^E
Hydrodictyaceae	
<i>Lacunastrum</i>	
<i>Lacunastrum gracillimum</i> (West & G.S.West) H.McManus 2011	4,47 ± 1,99 ^{BC}

<i>Pediastrum</i>	
<i>Pediastrum duplex</i> var. <i>gracillimum</i> West & G.S.West 1895	3,64 ± 1,40 ^{CD}
Scenedesmaceae	
<i>Scenedesmus</i>	
<i>Scenedesmus bernardii</i> G.M.Smith 1916	0,36 ± 0,12 ^E
<i>Scenedesmus pectinatus</i> Meyen 1829	0,25 ± 0,15 ^E
<i>Scenedesmus quadricauda</i> (Turpin) Brébisson 1835	0,75 ± 0,09 ^{DE}
<i>Scenedesmus acuminatus</i> (Lagerheim) Chodat 1902	2,04 ± 0,31 ^{CDE}
Trebouxiophyceae	
Chlorellales	
Chlorellaceae	
<i>Chlorella</i> Beyerinck [Beijerinck], 1890, nom. cons.	7,06 ± 1,72 ^B
<i>Streptophyta</i>	
Charophyta	
Zygnematophyceae	
Zygnematophycidae	
Desmidiiales	
Closteriaceae	
<i>Closterium</i>	
<i>Closterium gracile</i> Brébisson ex Ralfs 1848	0,11 ± 0,07 ^E
Chromista	
Harosa (supergroup SAR)	
Halvaria	
Miozoa	
Myzozoa	
Dinozoa	
Dinoflagellata	
Dinophyceae	
Gonyaulacales	
Ceratiaceae	
<i>Ceratium</i> F.Schrank, 1793	0,03 ± 0,04 ^E
Prokaryota	
Eubacteria	
Negibacteria	
Cyanobacteria	
Cyanophyceae	
Synechococcophycidae	
Synechococcales	
Merismopediaceae	
<i>Aphanocapsa</i>	
<i>Aphanocapsa annulata</i> G.B.McGregor 2007	10,75 ± 2,81 ^A
<i>Merismopedia</i>	
<i>Merismopedia punctata</i> Meyen, nom. illeg. 1839	1,31 ± 0,74 ^{DE}
Oscillatoriophycidae	
Oscillatoriales	
Coleofasciculaceae	
<i>Geitlerinema</i>	
<i>Geitlerinema amphibium</i> (C.Agardh ex Gomont) Anagnostidis 1989	1,67 ± 0,73 ^{CDE}

Legenda: Médias seguidas por mesma letra na coluna, não diferiram estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. F: 29.4817; DMS: 2.96981; P: <0,05

As cianobactérias são organismos que possuem uma excelente capacidade adaptativa, devido as suas características morfológicas e fisiológicas, podendo colonizar diferentes ambientes, sobrevivendo até mesmo em solos e interior de rochas, porém são mais comuns em ambientes aquáticos (CALIJURI et al., 2006). O gênero cianofícea *Aphanocapsa*, pertencente à família Merismopediaceae, ocorre de forma colonial, microscópico ou macroscópica, com seu envelope mucilaginoso incolor e homogêneo e se divide por fissão binária (BICUDO; MENEZES, et al., 2017).

O gênero *Lacunastrum*, pertencente à família Hydrodictyaceae, é constituída geralmente por quatro, oito ou até mesmo dezesseis células, que possuem lobos com processos alongados, além e formarem colônias planas. Já as microalgas do gênero *Chlorella* são caracterizadas por possuírem células esféricas, habitando principalmente o plâncton de águas paradas (BICUDO; MENEZES, et al., 2017). As *Chlorella* possuem alta concentração de carotenoides, antioxidantes, vitaminas, proteínas, ácidos graxos, sendo amplamente aplicadas na produção de biocombustíveis ou como suplemento alimentar (MORAIS JUNIOR et al., 2020).

As microfotografias e espécies das microalgas identificadas no sistema podem ser visualizadas na Figura 2.1. Para a identificação destes organismos foram observadas características citomorfológicas, estruturais e morfométricas, sendo analisados: o tamanho, formato e agregação das células, presença de mucilagem, além da utilização de nanquim para evidenciação da bainha de mucilagem (CALIJURI et al., 2006).

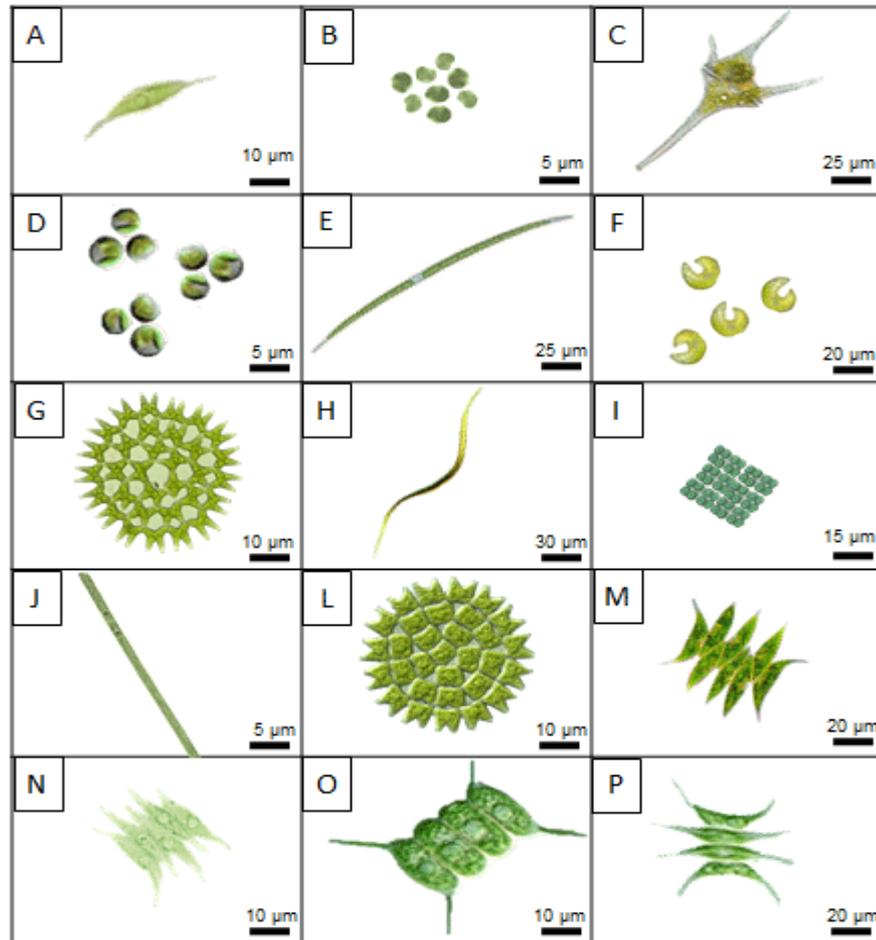


Figura 2.1. Microalgas provenientes de tanques de piscicultura identificadas durante 28 dias de produção em laboratório. Magnificação da microscopia óptica: 40 x. Legenda: a) *Ankistrodesmus falcatus* (Corda) Ralfs 1848; b) *Aphanocapsa annulata* G.B.McGregor 2007; c) *Ceratium* F.Schrank, 1793; d) *Chlorella* Beyerinck [Beijerinck], 1890, nom.cons.; e) *Closterium gracile* Brébisson ex Ralfs 1848; ; f) *Kirchneriella lunaris* (Kirchner) Möbius 1894; g) *Lacunastrum gracillimum* (West&G.S.West) H.McManus 2011; h) *Monoraphidium contortum* (Thuret) Komárková-Legnerová 1969; i) *Merismopedia punctata* Meyen, nom. illeg. 1839; j) *Geitlerinema amphibium* (C.Agardh ex Gomont) Anagnostidis 1989; l) *Pediastrum duplex* var. *gracillimum* West & G.S.West 1895; m) *Scenedesmus bernardii* G.M.Smith 1916; n) *Scenedesmus pectinatus* Meyen 1829; o) *Scenedesmus quadricauda* (Turpin) Brébisson 1835; p) *Scenedesmus acuminatus* (Lagerheim) Chodat 1902;

A evolução filogenética e sistemática das microalgas identificadas neste estudo podem ser visualizadas nas Figuras 2.2 e 2.3, onde foram separadas nos domínios Eukaryota e Procariota.

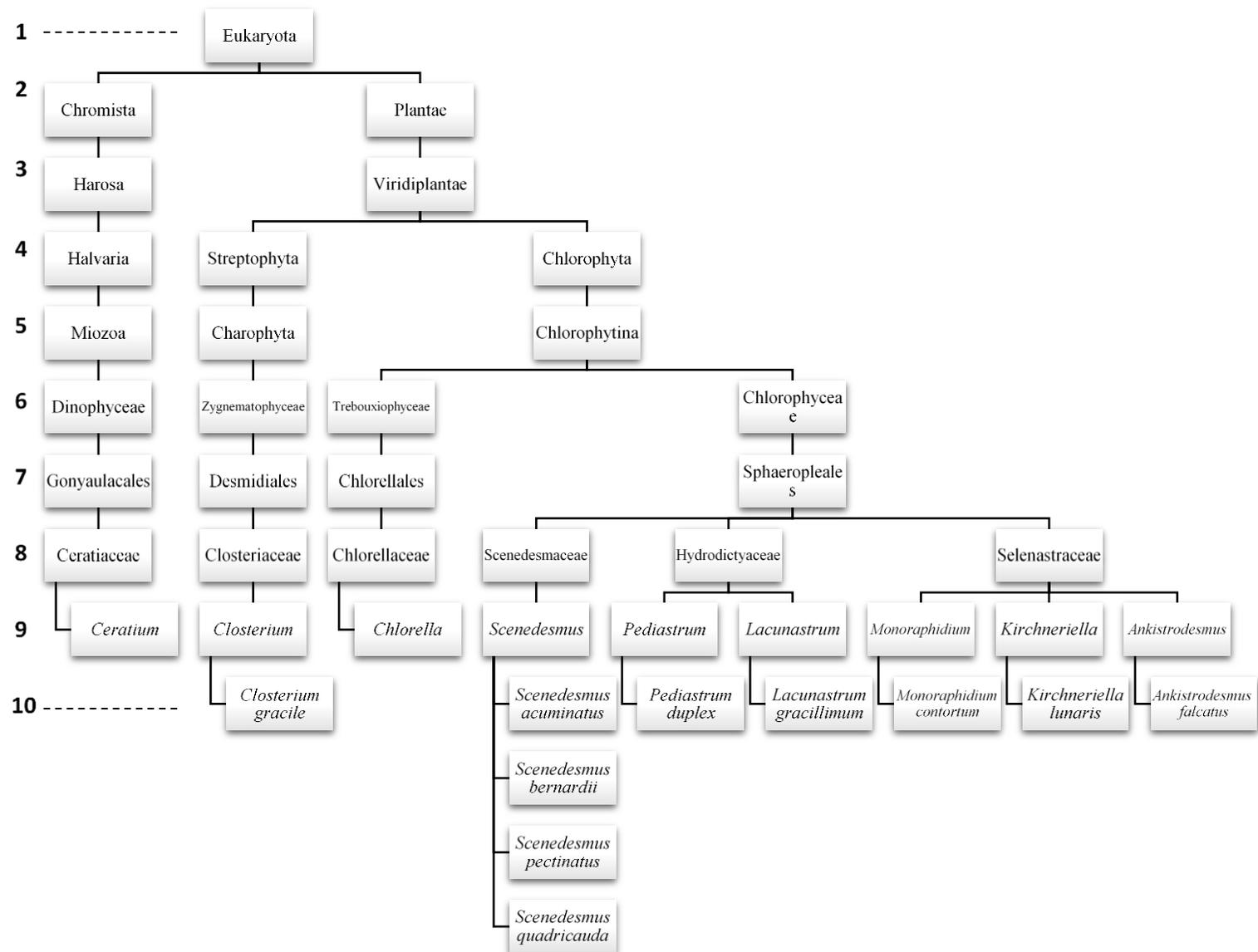


Figura 2.2. Visão geral da evolução filogenética sistemática das microalgas encontradas nos tanques de piscicultura do Domínio Eukaryota. Legenda: 1) Domínio; 2) Reino; 3) Sub-reino; 4) Infrareino; 5) Filo; 6) Classe; 7) Ordem; 8) Família; 9) Gênero; 10) Espécie.

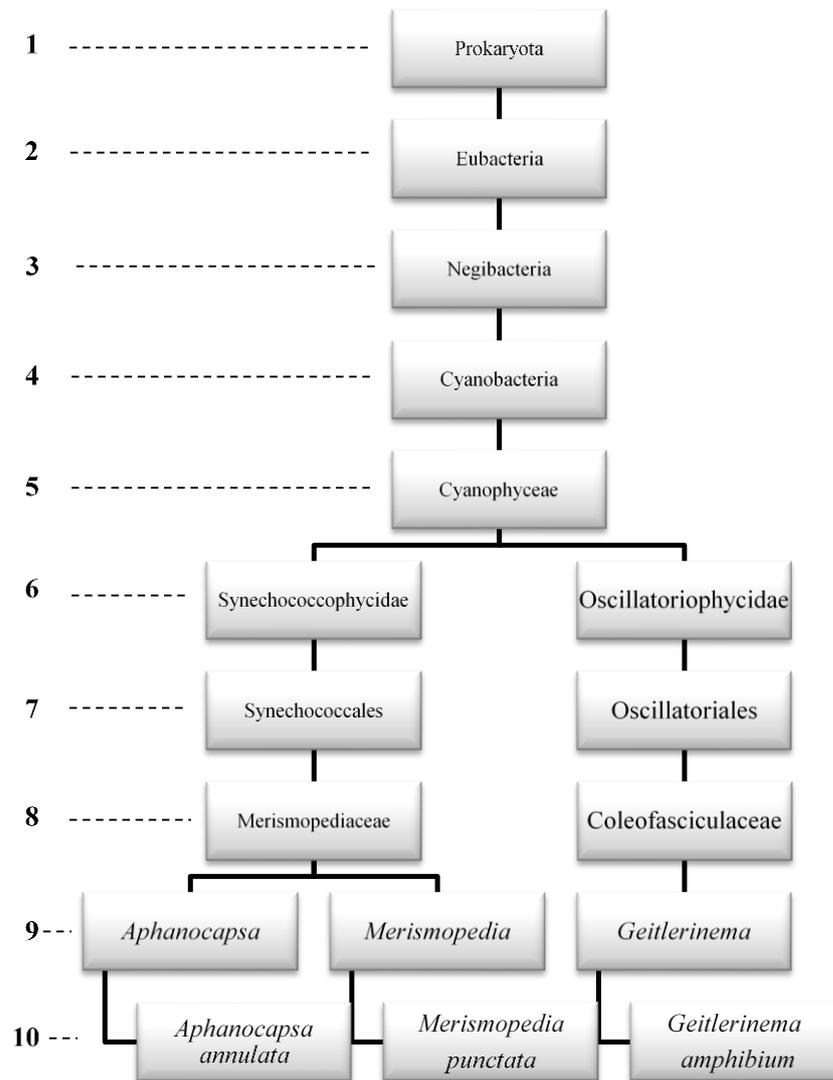


Figura 2.3. Visão geral da evolução filogenética sistemática das microalgas encontradas nos tanques de piscicultura do Domínio Procaríota. Legenda: 1) Domínio; 2) Reino; 3) Sub-reino; 4) Infrareino; 5) Filo; 6) Classe; 7) Ordem; 8) Família; 9) Gênero; 10) Espécie.

3.2. Avaliação da Sucessão Ecológica das Microalgas

As microalgas do filo *Chlorophytina* vêm sendo amplamente empregadas em ensaios de tratamento de águas residuais e demais estudos de cunho (bio)tecnológico (LEONG et al., 2018; SAAVEDRA et al., 2018; PENG et al., 2017). Por isso, buscou-se avaliar a sucessão deste grupo, com as microalgas de maior abundância durante o período de cultivo (Figura 2.4). A cianofíceia *A. annulata* apresentou a maior densidade durante o período de cultivo, seguido pelo gênero *Chlorella* e pela microalga *L. gracillimum* ($10,75$; $7,06$; $4,47 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ respectivamente).

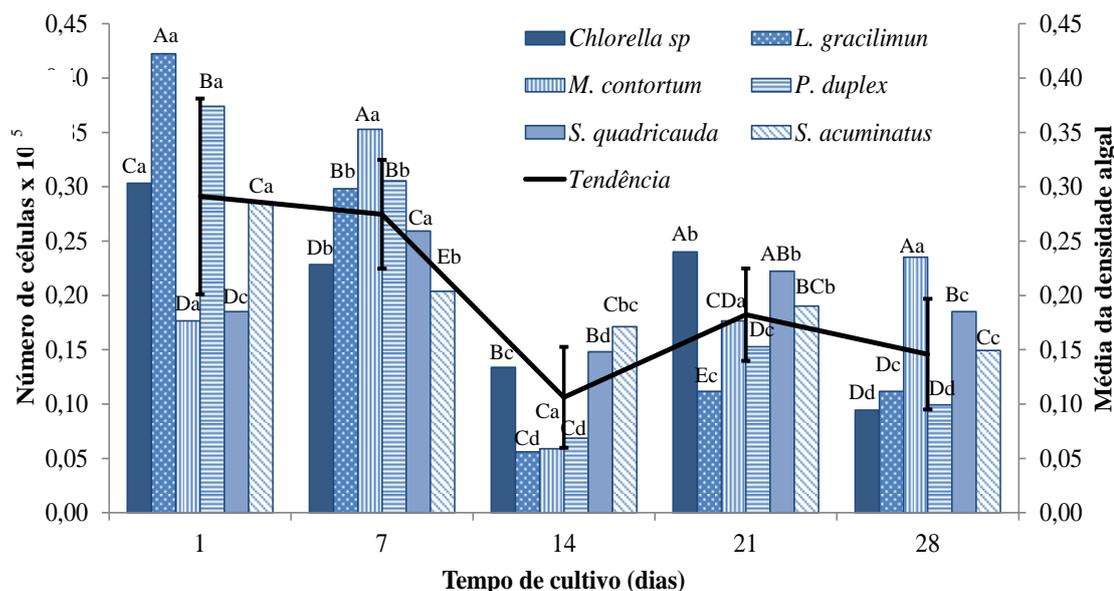


Figura 2.4. Densidade relativa das microalgas de piscicultura no tempo sucessional de 28 dias e linha de tendência. **Legenda:** Análise de variância ($p < 0,05$) seguida pelo teste Tukey em comparação entre as microalgas (letras maiúsculas) e em comparação entre os dias de cultivo (letras minúsculas), onde letras iguais indicam médias estatisticamente iguais e letras diferentes apresentam médias estatisticamente diferentes entre si. ^{ns}: não significativo.

Na análise de sucessão ecológica foi possível observar que as microalgas oscilaram na densidade relativa ao longo dos 28 dias de cultivo. No entanto, um padrão observado e que foi comum para todas as microalgas foi um decréscimo no 14º dia e uma recuperação no 21º dia de cultivo, visto provavelmente a um ajuste ao meio de cultivo (água da piscicultura) neste período. Esse ajuste pode ter ocorrido visto os nutrientes provenientes da água da piscicultura terem se exaurido e disponibilização de nutrientes pela lise celular do fito presente.

Segundo Macedo e Sipaúba-Tavares (2010) reportaram que as microalgas clorofíceas possuem abundância em sistemas de criação de peixes, enquanto as cianofíceas possuem maior dominância, visto que estes sistemas possuem tendência a eutrofização. Algumas espécies de microalgas, como a *M. contortum*, apresentaram um desempenho intrínseco, hora com sua densidade reduzida e hora com recuperação da densidade. Outras, como o gênero *Chlorella sp.* mantiveram-se constantes ao longo do período de 28 dias. Esse padrão segue a premissa da sucessão ecológica segundo

Townsend et al. (2010), onde as microalgas dominantes em densidade e com ocorrência durante todo período sucessional seriam mais indicadas para produção em larga escala, pois se adaptam com mais facilidade aos meios de cultivos naturais ou artificiais, além de serem mais resistentes às variações do meio e a presença de outras espécies de microalgas por competição. Isso se observa nos resultados encontrados, visto que as microalgas *Chlorella* sp. e *M. contortum*, que apresentaram dominância em densidade no início do cultivo e se mantiveram, apesar da fase de ajuste no 14º dia. Desta forma, as microalgas clorófitas possuem maior vantagem econômica na produção de biomassa, que pode ser aplicada de inúmeras maneiras, como já ilustrado anteriormente.

3.3. Isolamento das Microalgas

Por meio da técnica de diluição seriada foi possível isolar a microalga *Chlorella* sp., que também foi isolada por Cornélio (2012) por meio da técnica de diluição seriada, onde este observou uma maior abundância deste microrganismo no seu cultivo algal. Esta técnica também auxilia em metodologias de contagem celular, desde que seja feito o controle das diluições, possibilitando a quantificação de amostras com alta concentração destes microrganismos (HALLEGRAEFF, 1995).

A técnica de isolamento em meio sólido ágar consiste em inocular uma alíquota da amostra contendo microalgas em placa de Petri contendo o meio de cultivo sintético com adição de ágar. Nesta metodologia há formação de colônias monoalgais que facilitam o isolamento. Porém, a contaminação por fungos e bactérias pode atrapalhar o crescimento das microalgas além de formar colônias (CORNÉLIO, 2012). Além disso, esta técnica necessita de equipamentos e meios de cultivo com elevado custo, como incubadora do tipo B.O.D., meio ágar e em alguns casos antimicrobianos. A B.O.D. é muito importante no processo, pois diminui o grau de contaminação das amostras e as mantém em temperatura controlada.

Por meio desta técnica, foi possível isolar as espécies *Chlorella* sp., *S. acuminatus*, *S. quadricauda*, *S. bernardii* e *M. Contortum*. Contudo, a taxa de contaminação por fungos foi elevada, necessitando do descarte de algumas placas. É provável que os fungos estivessem em latência na água e se desenvolveram quando a alíquota contaminada foi inoculada em ágar e na presença de nutrientes e temperatura controlada, houve o favorecimento do crescimento de fungos. Uma das formas mais comuns para se livrar de contaminações fúngicas e também bacterianas é o uso de antimicrobianos, como o

antifúngico anfotericina b e antibióticos como a estreptomicina (GREYER-BECK, 2008). Porém os antibióticos acabam aumentando o custo de produção, além de não permitir que seja visualizado qual espécie de microalga possui maior competitividade e resistência em meios não axênicos.

A técnica de envelhecimento tem como principal fator a indução da seleção e competitividade entre espécies de microalgas durante um prolongado período de tempo. Inicialmente observa-se um aumento na densidade algal, devido a variada diversidade de microrganismos presentes na amostra. Após o período estipulado pode-se observar que determinados grupos e espécies se sobrepõe sobre as demais que estavam presentes inicialmente. A desvantagem desta técnica consiste no elevado período de tempo que é exigido para conseguir um resultado satisfatório. Também houve contaminação de algumas amostras por protozoários. Também pode-se observar a formação de biofilmes nas paredes dos recipientes utilizados nesta técnica (OLIVEIRA, 2018).

Através desta metodologia, foi possível observar a predominância do gênero *Chlorella* sp. e da espécie *S. quadricauda* ao final do período de envelhecimento, se mostrando microalgas extremamente competitivas com maior resistência a fatores físicos e químicos e com elevada competitividade quando comparada as demais espécies (CAZZANIGA et al., 2014).

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foi possível identificar 15 espécies de microalgas durante o processo de cultivo dos microrganismos presentes na piscicultura, dentre elas, representantes dos gêneros *Cyanobacteria* e *Dinophyceae* e ao filo *Chlorophytina*. Para a análise de sucessão ecológica, o filo *Chlorophytina* foi considerado o grupo com alto potencial de aplicação biotecnológica, com destaque as microalgas *L. gracillimum*, *S. quadricauda* e *Chlorella* sp. que mantiveram uma constância na densidade celular. Ambas espécies foram as mais resistentes as alterações de meios e presença as demais linhagens, sendo indicadas na produção de biomassa em larga escala para melhor aproveitamento. A técnica de isolamento de microalgas, por meio do método de inoculação em placas de petri foi mais eficiente, isolando as espécies *S. acuminatus*, *S. quadricauda*, *Chlorella* sp., *M. contortum* e *S. bernandii*. A técnica de envelhecimento apresentou resultados satisfatórios no isolamento de duas microalgas, a *S. quadricauda* e a *Chlorella* sp., contudo o tempo demandado foi maior para o isolamento. Seria prudente associar ambas as técnicas para

uma maior redução do tempo e dos custos dos processos empreendidos, assegurando técnicas mais econômicas.

5. REFERÊNCIAS

ANDERSEN, R.A.; KAWACHI, M. Traditional Microalgae Isolation Techniques, p. 83 – 100, 2005. In.: Andersen, R.A. **Algal Culturing Techniques**. Elsevier Academic Press, New York, 578 p, 2015.

ANSILAGO, M.; OTTONELLI, F.; CARVALHO, E.M. Cultivo da microalga *Pseudokirchneriella subcapitata* em escala de bancada utilizando meio contaminado com metais pesados. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v.21, n.3, p. 603-608, 2016.

BARCELLOS, A.D.; BARRETO, A.G.S.S.; MACHADO, B.A.S.; DRUZIAN, J.I. Microalgas e seu potencial de uso. **Prospect CT&I -Cadernos de Prospecção**, v. 5, n.4, p.178-184, 2012.

BICUDO, C.E.M.; MENEZES, M. **Gêneros de algas de águas continentais do Brasil**. Chave para identificação e descrições. São Carlos: Editora Rima, 489 p., 2017.

BOROWITZKA, M.A. Microalgae for aquaculture: Opportunities and constraints. **Journal of Applied Phycology**, v. 9, p. 393–401, 1997.

BRODIE, J.; BALL, S. G.; BOUGET, F.-Y.; CHAN, C. X.; DE CLERCK, O.; COCK, J. M.; ... BHATTACHARYA, D. Biotic interactions as drivers of algal origin and evolution. **New Phytologist**, v. 216, n. 3, p. 670–681, 2017. Doi:10.1111/nph.14760

BROWER, J.E.; ZAR, J.H. Field & laboratory methods for general ecology. **W.C. Brown Publishers**, Boston, 1984.

CALIJURI, M. C.; ALVES, M. S. A.; SANTOS, A. C. A. **Cianobactérias e cianotoxinas em águas continentais**. [S.l: s.n.], 2006.

CARVALHO, E.M.; OTTONELLI, F.; ANSILAGO, M.; GODOY, H.C.; NAKAGAKI, J.M.; RAMIRES, I. Growth kinetics of the microalga *Pseudokirchneriella subcapitata* (Korshikov) Hindak (Chlorophyceae) in

natural water enriched with NPK fertilizer. **Biochemistry and Biotechnology Report**, v.1, n.2, p.14-18, 2012. Doi: 10.5433/2316-5200.2012v1n2p14

CAZZANIGA, S.; DALL'OSTO, L.; SZAUB, J.; SCIBILIA, L.; BALLOTTARI, M.; PURTON, S. E.; BASSI, R. Domestication of the green alga *Chlorella sorokiniana*: reduction of antenna size improves light-use efficiency in a photobioreactor. **Biotechnology biofuels**, v. 7, n. 157, 2014. DOI:10.1186/s13068-014-0157-z

CORNÉLIO, J.P.S. **Isolamento e produção de *Chlorella* sp. (CHLOROPHYCEAE) e *Moina* sp. (CLADOCERA) para utilização na larvicultura de Matrinxã (*Brycon amazonicus*)**. Dissertação (Mestrado em Aquicultura)–Universidade Nilton Lins, Manaus, 2012.

GREYER-BECK, S., MÜHLBERG, K., BRENDEN, H., FELSNER, I., BRYNJÓLFSDÓTTIR, Á., EINARSSON, S., & KRUTMANN, J.; Bioactive molecules of the Blue Lagoon: in vitro and in vivo evaluation of silica mud extracts and microalgae for their effects on skin barrier function and prevention of aging skin. **Experimental Dermatology**, v. 17, n. 9, p. 771-779, 2008. Doi: 10.1111/j.1600-0625.2007.00693.x.

HALLEGRAEFF, G.M.; ANDERSON, D.M.; CEMBELLA, A. **Manual on harmful marine microalgae**, IOC Manuals and Guides, n. 33., 1995.

LEONG, W.H.; LIM, J.W.; LAM, M.K.; UEMURA, Y.; HO, C.D.; HO, Y.C. Co-cultivation of activated sludge and microalgae for the simultaneous enhancements of nitrogen-rich wastewater bioremediation and lipid production. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 87, p. 216-224, 2018. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2018.03.038>

MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, p. 217-232, 2010. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.07.020>

MENDES, M. C. Q.; GONZALEZ, A. A. C.; MENEZES, M.; NUNES, J. M. C.; PEREIRA, S.; NASCIMENTO, I. A. Coleção de microalgas de ambientes dulciaquícolas

naturais da Bahia, Brasil, como potencial fonte para a produção de biocombustíveis: uma abordagem taxonômica. **Acta Botanica Brasilica**, v. 26, n. 3, p. 691-696, 2012.

MONTALVÃO, S.; DEMIREL, Z.; DEVI, P.; LOMBARDI, V.; HONGISTO, V.; PERÄLÄ, M.; TAMMELA, P. Large-scale bioprospecting of cyanobacteria, micro- and macroalgae from the Aegean Sea. **New Biotechnology**, v. 33, n. 3, p. 399–406, 2016. Doi:10.1016/j.nbt.2016.02.002

MORAIS JUNIOR, W. G., GORGICH, M., CORRÊA, P. S., MARTINS, A. A., MATA, T. M., & CAETANO, N. S. Microalgae for biotechnological applications: Cultivation, harvesting and biomass processing. **Aquaculture**, v. 528, p. 735562, 2020. Doi:10.1016/j.aquaculture.2020.735562

OLIVEIRA, I. G. S. **Bioprospecção de microalgas dulcícolas para ensaios ecotoxicológicos**. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biotecnologia) – Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, 2018.

PENG, Y.; DENG, A.; GONG, X.; LI, X.; ZHANG, Y. Coupling process study of lipid production and mercury bioremediation by biomimetic mineralized microalgae. **Bioresource Technology**, v. 243, p. 628-633, 2017. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.165>

PULZ, O.; GROSS, W. Valuable products from biotechnology of microalgae. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 65, n. 6, p. 635–648, 2004.

RAMOS, G. J. P.; BICUDO, C. E. DE M.; MOURA, C. W. DO N. Scenedesmaceae (Chlorophyta, Chlorophyceae) de duas áreas do Pantanal dos Marimbus (Baiano e Remanso), Chapada Diamantina, Estado da Bahia, Brasil. **Hoehnea**, v. 42, n. 3, p. 549–566, 2015. Doi: <https://doi.org/10.1590/2236-8906-03/2015>

RIZWAN, M.; MUJTABA, G.; MEMON, S.A.; LEE, K.; RASHID, N. Exploring the potential of microalgae for new biotechnology applications and beyond: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 92, p. 394–404, 2018. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.04.034>

SAAVEDRA, R.; MUÑOZ, R.; TABOADA, M.E.; VEGA, M.; BOLADO, S. Comparative uptake study of arsenic, boron, copper, manganese and zinc from water by

different green microalgae. **Bioresource Technology**, v. 263, p. 49–57, 2018. Doi: <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.04.101>.

SANT'ANNA, C.L.; AZEVEDO, M.T.P.; AGUJARO, L.F.; CARVALHO, M. C.; CARVALHO, L.R.; SOUZA, R.C.R. **Manual Ilustrado para Identificação e contagem de Cianobactérias Planctônicas de águas continentais brasileiras**. Rio de Janeiro: Interciência, 57 p, 2006.

SIPAUBA-TAVARES, L. H.; ROCHA, O. **Produção de plâncton (fitoplâncton e zooplâncton) para alimentação de organismos aquáticos**. 2ª edição. São Carlos: Rima, 2003.

SOUZA, K. F.; MELO, S. Levantamento taxonômico de desmídias (*Chlorophyta*) do lago Novo (Amapá, Brasil): Gêneros *Staurastrum*, *Stauroidesmus* e *Xanthidium*. **Acta Amazonica** v. 41, n.03, p.335-346, 2011. Doi: <https://doi.org/10.1590/S0044-59672011000300002>

SIRAKOV, I.; VELICHKOVA, K.; STOYANOVA, S.; STAYKOV, Y. The importance of microalgae for aquaculture industry. Review. **IJFAS**, v. 2, n. 4, p. 81-84, 2015.

THOMPSON, Peter A. **Algal cell culture**. Biotechnology, Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS), v. I, p. 67-110, 2002.

TOWNSEND, C.R., BEGON, M., & HARPER, J.P. **Fundamentos em ecologia**. Ed. Artmed: Porto Alegre, p. 576, 2010.

WATANABE, M. M. Freshwater culture media, p. 13-20, 2005. In.: Andersen, R.A., Ed. (2005) **Algal Culturing Techniques**. Elsevier Academic Press, New York, 578 p, 2005.

CAPÍTULO 3. CULTIVO E CARACTERIZAÇÃO DA MICROALGA *Chlorella sorokiniana* E SUAS PROPRIEDADES NUTRICIONAIS

Resumo:

Devido às diversas aplicabilidades da biomassa de microalgas, as mesmas vem sendo objeto de estudo em diferentes áreas de pesquisa. Uma das vantagens relacionadas as microalgas é a elevada produção de bioativos que podem ser utilizados na suplementação humana e animal. O objetivo deste estudo foi realizar o cultivo da microalga *Chlorella sorokiniana* e caracterizar as propriedades nutricionais da mesma em meio de cultivo N:P:K (20:05:20) enriquecido com vinhaça de cana-de-açúcar. A microalga foi cultivada no laboratório em garrafas de polietileno tereftalato com capacidade de 5 L⁻¹, temperatura ambiente (22 ± 2,0°C), iluminação controlada (2.500 LUX), sistemas de aeração constante não axênico. A biomassa da microalga foi centrifugada, seca em estufa e analisada a composição proximal e dos micro e macronutrientes. A biomassa da microalga *C. sorokiniana* apresentou elevada concentração de proteína, aproximadamente 58%, seguido por carboidratos (16,14%) e lipídeos (14,97%). Já na composição elementar, o macronutriente que apresentou maior quantidade foi o ferro (Fe), com valor de 882,6 mg k⁻¹. Estes resultados mostram que esta microalga pode ser utilizada como uma base para suplementação nutricional humana e animal, principalmente em dietas ricas em proteínas.

Palavras-chave: Chlorophyta; Biomassa algal; Composição proximal; Micro e macronutrientes.

CULTIVATION AND CHARACTERIZATION OF MICROALGA *Chlorella sorokiniana* AND ITS NUTRITIONAL PROPERTIES

Abstract:

Due to the diverse applicability of microalgae biomass, they have been the object of study in different research areas. One of the advantages related to microalgae is the high production capacity of bioactives that can be used in human and animal supplementation. The aim of this study was to cultivate the microalgae *Chlorella sorokiniana* and characterize its nutritional properties in N:P:K (20:05:20) culture medium enriched with sugar cane vinasse. The microalgae was grown in the laboratory in terephthalate polyethylene bottles with a capacity of 5 L⁻¹, room temperature (22 ± 2,0°C), controlled lighting (2.500 LUX), non-axenic constant aeration systems. The biomass of the microalgae was centrifuged, dried in an oven and the proximate composition of micro and macronutrients was analyzed. The biomass of *C. sorokiniana* microalgae showed a high concentration of protein, approximately 58%, followed by carbohydrates (16.14%) and lipids (14.97%). In the elemental composition, the macronutrient that showed amount was iron (Fe), with a value of 882.6 mg k⁻¹. These results show that this microalgae can be used as a basis for human and animal nutritional supplementation, especially in high protein diets.

Keywords: Chlorophyta; Algal biomass; Centesimal composition; Micro and macronutrients.

1. INTRODUÇÃO

As microalgas vêm sendo cultivadas em diferentes países, sendo aplicadas nos mais variados ramos da indústria devido as suas diversas propriedades biotecnológicas (DERNER et al. 2006). A sua biomassa pode ser utilizada na produção de alimentos naturais e funcionais, como aditivo alimentar, na alimentação humana, na aquicultura, no condicionamento de solos, na indústria de cosméticos, na indústria farmacêutica, na produção de biocombustíveis e no tratamento de águas residuais (RIZWAN et al. 2018).

Vários estudos estão relatando o potencial uso das microalgas em diversas aplicações biotecnológicas (ANSILAGO et al. 2016; CARVALHO et al. 2012). Porém, na produção de microalgas em escala de laboratório, há um controle das variáveis referentes ao cultivo, como luminosidade, pH, temperatura e controle de contaminação por outros microrganismos e favorecem uma maior velocidade de crescimento e produção de biomassa das microalgas.

Os cultivos de microalgas também podem ocorrer em tanques rasos à céu aberto, sob condições naturais, com baixo ou nenhum controle das variáveis de cultivo, com agitadores mecânicos. Alguns cultivos também podem ser realizados em fotobiorreatores, que são sistemas fechados, com controle de variáveis e são realizados em reatores de plástico, policarbonato ou vidro, aumentando assim o rendimento do cultivo e da produção de biomassa algal (DERNER et al. 2006).

Dentre as microalgas de destaque, o gênero *Chlorella* é reconhecido por englobar microalgas verdes, amplamente utilizadas para a suplementação e nutrição humana e animal (SATHASIVAM et al., 2019). A espécie *Chlorella sorokiniana* é uma microalga de tamanho pequeno (4,5 µm), que apresenta alta taxa de duplicação e consequente produção de biomassa, possui vantagem competitiva frente outras espécies, além de conseguir se reproduzir em sistemas de produção mixotróficos (LIZZUL et al., 2014).

Estes microrganismos podem ser cultivados com métodos simples e baixo controle de variáveis ambientais e, mesmo assim, apresentar alta produtividade, se comparada a uma planta oleaginosa; elas apresentam crescimento exponencial mesmo que cultivadas em áreas não agriculturáveis, empregando águas residuais para sua nutrição celular (WU et al., 2012). Dentre um dos resíduos que podem ser utilizados na biodigestão para obtenção de biomassa microalgal está a vinhaça, resíduo da produção de

etanol de cana-de-açúcar, que apresenta um potencial impacto poluente ao meio ambiente (FERREIRA et al., 2018; SANTANA et al., 2017; RAMIREZ et al., 2014).

Visto que as microalgas possuem uma alta plasticidade e uma variabilidade metabólica bem desenvolvida, elas conseguem se adaptar a diferentes condições e diferentes meios de cultivo, podendo assim ser classificadas em diferentes grupos de acordo com a forma que elas obtêm carbono e energia, entre elas: fotoautotrófico, heterotrófico e mixotrófico (FRANCO et al., 2013).

Uma característica de grande importância em relação à *C. sorokiniana* é o potencial de geração de biomassa (MORITA et al., 2000). Em um estudo realizado por Matsukawa et al. (2000), foi possível observar uma biomassa de *C. sorokiniana* constituída de: 68,5 % de proteína, 11,9% de carboidratos e 10% de lipídeos. Ainda de acordo com Matsukawa et al. (2000) a microalga *C. sorokiniana* apresentou teores elevados dos antioxidantes de luteína e β -caroteno, 4300 e 600 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente.

A partir do desenvolvimento de novas tecnologias para o reaproveitamento da biomassa de microalgas, tem havido avanços nos processos de purificação, obtenção de extratos e/ou produtos biotecnológicos, cosméticos, farmacêuticos e industriais como biodiesel, pigmentos, proteínas, lipídeos, carboidratos, vitaminas, antioxidantes, ácidos graxos poli-insaturados, carotenoides, ficobilinas, polissacarídeos, vitaminas, esteróis e diferentes compostos bioativos naturais que são produtos funcionais de alto valor alimentício e funcional (BRENNAN; OWENDE, 2009) e, até na produção de ração para alimentação de peixes e outros animais domésticos. Considerando este aspecto a, o presente estudo avaliou a cinética de crescimento e a composição da microalga *C. sorokiniana* cultivada em meio com fertilizante agrícola NPK enriquecido com vinhaça de cana-de-açúcar.

2. METODOLOGIA

2.1. Cultivo da Microalga *Chlorella Sorokiniana*

Foram utilizadas cepas da microalga *C. sorokiniana* (Trebouxiophyceae) adquirida da Fundação André Tosello (Ref. 211-32; CTT 7727; IBVF 211-32, University of Seville, Spain), cultivada *in vitro* no laboratório do Centro de Pesquisa em Biodiversidade (CPBio) na Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul (UEMS). A microalga foi cultivada em garrafas de polietileno tereftalato (PET) com capacidade de 5

litros, e suplementada com fertilizante químico NPK (SIPAUBA-TAVARES; ROCHA, 2003; CARVALHO et al., 2012) e vinhaça, mantida em sistema de cultivo estático não axênico, com aeração constante, temperatura ambiente ($22 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$) e fotoperíodo controlado (12 h luz/12 h escuro – 2.500 LUX) durante 13 dias.

A solução estoque NPK foi preparada com $0,70 \text{ g.L}^{-1}$ de adubo químico N:P:K (20-5-20) para cada 1000 mL (ANSILAGO et al., 2016; SIPAUBA-TAVARES; ROCHA, 2003). Para suplementação foram adicionados 1% de vinhaça de cana-de-açúcar concentrada e 1% da solução estoque de NPK, ambas sobre a alíquota total de 2000 mL. O NPK consiste em 20% de nitrogênio (N), 5% de pentóxido de fósforo (P_2O_5) e 20% de óxido de potássio (K_2O). O pH inicial do meio de cultura foi ajustado em 8,0. Na preparação da solução inicial utilizou-se uma proporção entre 80% e 20% (v/v) do meio de cultivo e o inóculo de microalga, respectivamente.

Foram monitorados também a cada dois dias os valores de pH. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias dos tratamentos comparadas pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade de erro, por meio do programa estatístico GENES.

O crescimento das microalgas foi monitorado a cada dois dias por espectrofotometria utilizando o espectrofotômetro UV-VIS Bel Photonics para aferir a densidade óptica por meio da absorbância (686 nm). Para a regressão da densidade ótica para densidade celular (número células $\times 10^5 \text{ mL}^{-1}$), foi utilizada a Equação 1 (NUNES et al., 2020):

$$DC = (15,602 \times NDO) + 5,1905$$

(Equação 1)

Onde: 15,602: constante de regressão;

NDO: variável independente (densidade óptica);

5,1905: coeficiente de regressão.

2.2. Análise Proximal

Inicialmente, foi realizada a coleta da biomassa algal por decantação térmica ($7,0 \pm 1,5^{\circ}\text{C}$) direto nos galões de cultivo. Posteriormente, a biomassa decantada passou por centrifugação à 3500 rpm (840 g) por 10 minutos. O pellet obtido na centrifugação foi submetido a secagem na estufa à 70°C até peso constante.

A análise de fibra bruta foi realizada seguindo a metodologia da portaria 108 do Ministério da Agricultura (BRASIL,1991). A análise de proteína, umidade e cinzas foi realizada seguindo metodologia do Instituto Adolfo Lutz – método 036/IV (2005). A análise de carboidratos foi realizada por diferença entre 100 (percentual total) e o somatório dos percentuais encontrados para umidade, cinzas, proteínas, fibras e lipídeos. A determinação de lipídeos foi realizada pelo método a frio, segundo Bligh e Dyer (1959).

2.3.Análise de Micronutrientes e Macronutrientes

As análises de micro e macronutrientes foram realizados por absorção atômica por meio da biomassa seca da microalga *C. sorokiniana* e de vinhaça (AOAC, 1995). Para análise de Micro e Macronutrientes foi adotada a seguinte metodologia: foi pesado aproximadamente 100 mg L⁻¹ da amostra (em duplicatas), colocadas no tubo digestor de micro-ondas e adicionado 5 mL L⁻¹ de ácido nítrico (HNO₃) e 3 mL L⁻¹ de peróxido de hidrogênio (H₂O₂). A mistura foi mantida em repouso por um período de 15 minutos para reação da amostra/mistura ácida. Após esse período, os tubos foram tapados e conduzidos ao digestor de micro-ondas para digestão completa da amostra conforme parâmetros descritos na Tabela 3.1.

Tabela 3.1. Curva programada para digestão das amostras.

Temp (°C)	P	Ramp (min)	Time (min)	Power (w)	Temp (°C)
1	170	35	5	5	60
2	190	35	2	10	80
3	210	35	2	15	90
4	50	35	0	0	0
5	50	35	0	0	0

Após a digestão completa da amostra, a mistura ácida foi transferida para balão volumétrico e completado o volume para 25 mL. As leituras foram feitas em ICP-OES usando curva padrão multielementar. Todas as análises foram realizadas em triplicata. Os resultados foram apresentados com valor ± desvio padrão. Todas as soluções usadas nas digestões foram de padrão analítico (PA).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Cultivo da Microalga *Chlorella sorokiniana*

Na Figura 3.1 pode-se observar a microscopia óptica da microalga *C. sorokiniana*.

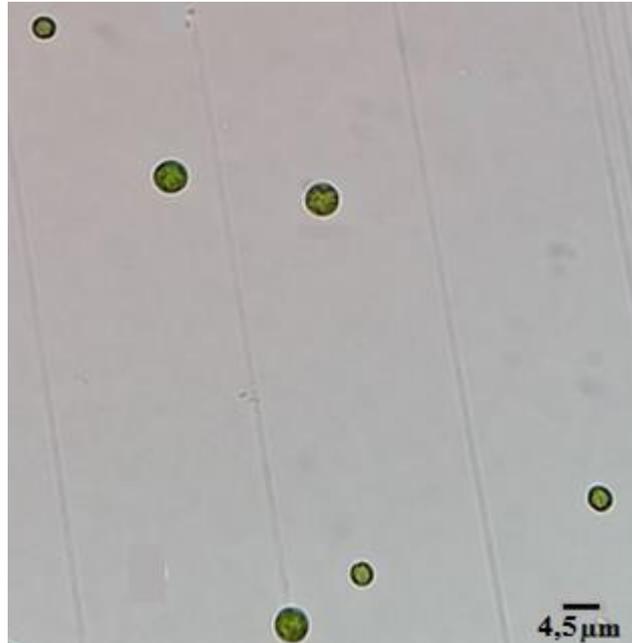


Figura 3.1. Microscopia óptica da microalga *Chlorella sorokiniana* no aumento de 40 x.

A microalga *C. sorokiniana* apresentou uma curva de crescimento ascendente discreta ao longo dos 13 dias de cultivo (Figura 3.2). Nos dias 11 e 13 de cultivo foi observado valores significativamente mais elevados que os demais. Por outro lado, o pH do meio de cultivo apresentou uma tendência oposta, com valores próximos a 9,0 nos primeiros dias de cultivos e acidificação próximo a 6,0 no último dia.

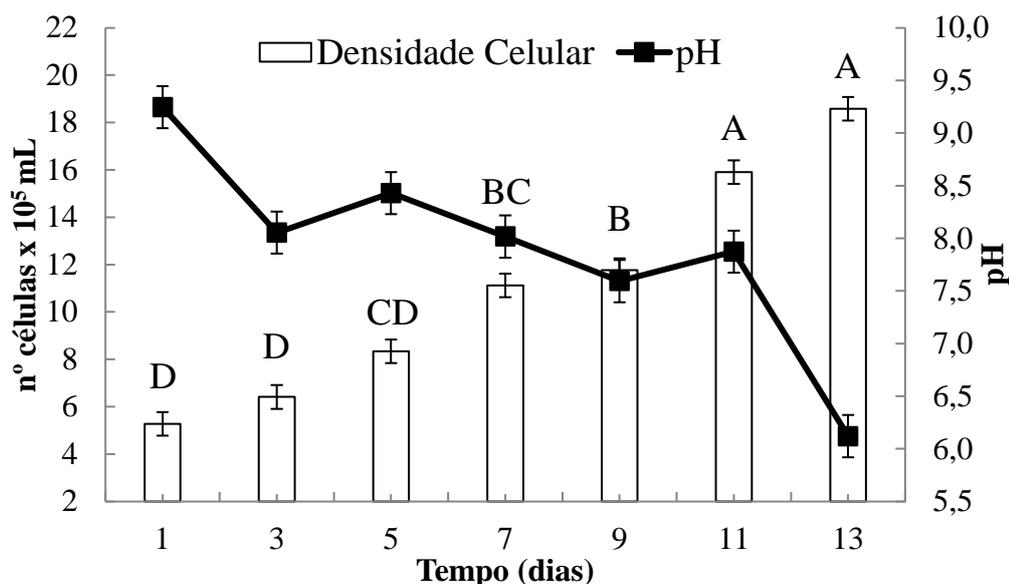


Figura 3.2. Perfil de crescimento da microalga *Chlorella sorokiniana* e variação do pH. **Legenda:** Foi realizada para a densidade celular a Análise de variância ($p < 0,05$) seguida pelo teste Tukey em comparação nas colunas (dias) onde letras iguais indicam médias estatisticamente iguais e letras diferentes apresentam médias estatisticamente diferentes entre si.

Uma característica das microalgas é a plasticidade, podendo se adaptar em diferentes ambientes ou ajustando algumas condições para o seu melhor desenvolvimento (JUNTILA et al. 2015; CARVALHO et al. 2012). O meio de cultivo é constituído de diversos elementos, dentre eles o Nitrogênio presente tanto no NPK quanto na vinhaça, que tem a característica de acidificar o meio, possibilitando uma vantagem a microalga, visto que a acidificação do meio pode ser utilizada como método de controle de possíveis competidores. Assim, pode-se deduzir que a microalga *C. sorokiniana* foi capaz de se adaptar as características do meio em seu próprio benefício.

3.2. Análise Proximal

A biomassa da microalga *C. sorokiniana* apresentou aproximadamente 58% de proteína, seguido por 16,14% de carboidratos e 14,97% de lipídeos (Tabela 3.2).

Tabela 3.2. Composição proximal (%) da microalga *Chlorella sorokiniana* em comparação com microalgas avaliadas em outros estudos. *n/i: não informado.

Composição (% w/w, biomassa seca)								
Microalgas	Carboidrato	Cinza	Fibra bruta	Lípido	Proteína	Umidade	Meio de Cultivo	Ref.
<i>Chlorella sorokiniana</i>	16,14 ±0,08	5,13 ± 0,09	0,73 ±0,07	14,98 ± 0,83	57,88 ±0,99	5,14 ± 0,11	NPK e vinhaça	Este estudo
<i>Chlorella sorokiniana</i> , <i>Chlorella minutíssima</i> , <i>Scenedesmus bijuga</i>	17	13,4	-	6	34,6	5,2	BG 11	Costanzo et al. 2016
<i>Spirulina platensis</i>	16	8,0	-	5,8	49,2	6,6	n/i*	Costanzo et al. 2016
<i>Chlorella sorokiniana</i>	6,8	-	-	-	61	4,8	n/i*	Diprat et al. 2020
<i>Nannochloropsis</i> sp.	12,4	8,9	-	19,05	36,4	3,1	n/i*	Tang et al. 2016

Uma série de estudos mostram que as diferenças apresentadas na composição proximal das biomassas algais estão associadas aos diversos meios de cultivo que são utilizados, que vão desde formulações químicas próprias para cada microalga até fertilizantes químicos utilizados na agricultura, como o NPK, resíduos agroindustriais, como a vinhaça e efluentes da suinocultura, algo que foi verificado no presente estudo.

As microalgas tendem a produzir dois grandes grupos de metabólitos, sendo o primeiro grupo conhecido como metabólitos primários ou macromoléculas, que incluem os lipídeos, proteínas e glicídios. O segundo grupo é caracterizado pelos compostos químicos, ou também conhecido como metabólitos secundários, e podem ser produzidos durante o crescimento celular ou em situações de estresse (SIMÕES et al., 2004). Nossos resultados, os níveis proteicos obtidos foram elevados, o que justificaria futuras investigações do uso dessa linhagem como potencial fonte de suprimento alimentar.

Microalgas do gênero *Chlorella* já vem sendo investigadas pelas suas propriedades nutricionais, desde 1940, visto que a sua biomassa se apresenta como uma

fonte de proteínas, lipídeos, carboidratos, compostos vitamínicos entre outros. Assim, o gênero *Chlorella* é classificado como GRAS (Generally Recognized as Safe) pelo FDA (Food and Drug Administration) que é uma agência federal do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos, o que significa que esta pode ser utilizada como alimento sem prejuízos à saúde humana (COSTA et al., 2006; ANDRADE; COSTA, 2008).

3.3.Análise de Micronutrientes e Macronutrientes

A composição de micro e macronutrientes da Vinhaça pode ser visualizada na Tabela 3.3.

Tabela 3.3. Composição de micro e macronutrientes químicos presentes na vinhaça.

Elemento	Vinhaça (mg/kg)
Cromo (Cr)	20,53 ± 1,20
Fósforo (P)	13 ± 1,00
Cálcio (Ca)	14,75 ± 0,050
Magnésio (Mg)	2,52 ± 0,80
Potássio (K)	8,88± 0,20
Ferro (Fe)	9.360 ± 2,80
Manganês (Mn)	141,7 ± 2,10
Cobalto (Co)	8,744 ±1,00
Cobre (Cu)	49,96 ± 2,20
Sódio (Na)	2,4 ± 0,10
Zinco (Zn)	57,17 ± 0,20
Nitrogênio (N)	20 ± 0,20

Como pode ser visualizado na Tabela 3.4, a composição elementar da biomassa de *C. sorokiniana* é majoritariamente composta por Ferro, o que pode ser amplamente aproveitado em formulações para suplementação alimentar. O ferro também possui elevada importância para a célula algal, visto que sua deficiência na célula pode limitar a atividade fotossintética, ocorrendo um declínio na presença de clorofila, inibindo assim o cultivo das microalgas (WANG et al., 2020). A recomendação diária de zinco na

alimentação humana está entre 8 e 11 mg/dia o que também ressalta a quantidade encontrada nesse estudo.

Tabela 3.4. Composição de micro e macronutrientes químicos presentes na microalga *Chlorella sorokiniana*.

Micro e macronutrientes	(mg kg⁻¹)
Cromo (Cr)	17,82 ± 17,82
Fósforo (P)	28,9 ± 0,90
Cálcio (Ca)	5,68 ± 0,80
Magnésio (Mg)	7,06 ± 0,30
Potássio (K)	18,72 ± 0,40
Ferro (Fe)	882,6 ± 1,50
Manganês (Mn)	34,01 ± 1,40
Cobalto (Co)	3,022 ± 1,10
Cobre (Cu)	6,157 ± 0,20
Sódio (Na)	10,48 ± 0,40
Zinco (Zn)	44,52 ± 0,80

As microalgas precisam de alguns nutrientes para seu desenvolvimento, sendo constituídas majoritariamente com os seguintes macronutrientes: C, N, O, H, P, Ca, Mg, S e K. Já na questão dos micronutrientes, geralmente requerem Fe, Mn, Cu, Mo e Co (GUILLARD, 1975).

Bertoldi et al. (2008) realizaram o cultivo da microalga *Chlorella vulgaris* em solução hidropônica residual e ao analisarem a composição elementar encontraram valores de 320 mg 100 g⁻¹ de ferro e 23,6 mg 100 g⁻¹ de zinco, valores superiores aos encontrados neste trabalho. Esta diferença pode estar relacionada ao elevado potencial das células de microalgas em adsorver e absorver nutrientes do meio, visto que a solução nutricional para cultivo hidropônico contém uma riqueza de nutrientes, entre eles 1,95 mg L⁻¹ de Fe, 0,11 mg L⁻¹ de Zn. Convém ressaltar as concentrações de ferro em relação às principais fontes convencionais, como as carnes vermelhas e as vísceras, sendo o fígado o mais importante, com valores entre 8 a 10mg 100g⁻¹ (MARTÍNEZ et al., 1999)

Com isso, as composições do meio de cultivo são muito importantes para definir a composição de bioativos para fins específicos na bioprospecção das microalgas. Os elementos traços são essenciais no funcionamento do metabolismo algal. A falta ou quantidades excessivas destes podem alterar a produção da biomassa algal, bem como alterar a produção de determinados bioativos. Cultivos que apresentem restrição na quantidade de fósforo e nitrogênio podem acarretar em um estresse celular, diminuindo o conteúdo proteico e acumulando lipídeos no conteúdo celular (STEPHENSON et al., 2010). O aumento do percentual lipídico da microalga a coloca como potencial candidata para extração de óleos essenciais e produção de biodiesel.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O cultivo da microalga *C. sorokiniana* nas condições de cultivo apresentadas utilizando um fertilizante agrícola (NPK) e um resíduo agroindustrial (Vinhaça) torna-se uma alternativa sustentável e viável para a produção de biomassa rica em propriedades nutricionais, com alto teor proteico e de ferro.

A busca por meios alternativos e que aproveitem resíduos industriais, reduz gastos na produção de biomassa algal, visto que geralmente meios químicos para produção são caros e algumas vezes de difícil acesso. Assim, além de otimizarem a presença de alguns componentes bioativos da célula algal, os meios alternativos podem ser utilizados para potencializar a produção de biomassa. Desta forma, a biomassa algal pode ser utilizada em diversas aplicações biotecnológicas, como na suplementação na alimentação humana e animal.

5. REFERÊNCIAS

ANDRADE, M. R.; COSTA, J. A. V. Cultivo da microalga *Spirulina platensis* em fontes alternativas de nutrientes. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 5, 2008. Doi: <https://doi.org/10.1590/S1413-70542008000500029>

ANDRADE, D. S.; FILHO, A. C. **Microalgas de Águas Continentais: Potencialidades e Desafios do Cultivo**. Instituto Agrônômico do Paraná, Londrina, 2014.

ANSILAGO, M.; OTTONELLI, F.; CARVALHO, E. M. Cultivo da microalga *Pseudokirchneriella subcapitata* em escala de bancada utilizando meio contaminado com

metais pesados. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 21, n. 3, 2016. Doi: <https://doi.org/10.1590/S1413-41522016124295>

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS INTERNATIONAL - AOAC. Official Methods of Analysis 16 ed. Arlington, 1995. v. 2, 474p.

BERTOLDI, F. C.; SANT'ANNA, E.; OLIVEIRA, J. L. B. Teor de clorofila e perfil de sais minerais de *Chlorella vulgaris* cultivada em solução hidropônica residual. **Ciência Rural**, v. 38, n.1, p.54-58, 2008. Doi: <https://doi.org/10.1590/S0103-84782008000100009>

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal Biochemistry Physiological**, v. 27, n. 8, p. 911-917, 1959. Doi: 10.1139/o59-099.

BRASIL. Ministério da Agricultura. **PORTARIA Nº 108**, DE 04 DE SETEMBRO DE 1991.

BRENNAN, L.; OWENDE, P. Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 2, p. 557-577, 2010. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.10.009>

CARVALHO, E. M.; OTTONELLI, F.; ANSILAGO, M.; GODOY, H. C.; NAKAGAKI, J. M.; RAMIRES, I. Growth kinetics of the microalga *Pseudokirchneriella subcapitata* (Korshikov) Hindak (Chlorophyceae) in natural water enriched with NPK fertilizer. **Biochemistry and Biotechnology Report**, v.1, n.2, p. 14-18, 2012. Doi: 10.5433/2316-5200.2012v1n2p14

COSTA, J. A. V.; RADMANN, E. M.; CERQUEIRA, V. S.; SANTOS, G. C.; CALHEIROS, M. N. Perfil dos ácidos graxos das microalgas *Chlorella vulgaris* e *Chlorella minutíssima* cultivadas em diferentes condições. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 17, n. 4, p. 429-436, 2006.

COSTANZO, W.; HILTEN, R.; JENA, U.; DAS, K.C.; KASTNER, J.R. Effect of low temperature hydrothermal liquefaction on catalytic hydrodenitrogenation of algae

biocrude and model macromolecules. **Algal Research**, v. 13, p. 53 – 68, 2016. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.11.009>

DERNER, R.B.; OHSE, S.; VILLELA, M.; CARVALHO, S.M.; FETT, R. Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural**, v. 36, n. 6, 2006. Doi: <https://doi.org/10.1590/S0103-84782006000600050>.

DIPRAT, A. B.; THYS, R. C. S.; RODRIGUES, E.; RECH, R. *Chlorella sorokiniana*: A new alternative source of carotenoids and proteins for gluten-free bread. *International Journal of Digital LWT*, v. 134, p. 109974, 2020. Doi: [10.1016/j.lwt.2020.109974](https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109974)

FERREIRA, G.F.; FERNANDES, D.S.; PINTO, L.F.R.; TASIC, M.B.; FILHO, R.M. investigation of *Desmodesmus* sp. growth in photobioreactor using vinasse as a carbon Source. **Chemical Engineering Transactions**, v. 65, 2018. Doi: <https://doi.org/10.3303/CET1865121>

FRANCO, A. L. C.; LÔBO, I. P.; CRUZ, R. S.; TEIXEIRA, C. M. L. L.; NETO, J. A.; MENEZES, R. S. Biodiesel de microalgas: avanços e desafios. **Química Nova**, v. 36, n. 3, 2013. Doi: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422013000300015>

GUILLARD, R. R. L. **Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates**. In: Smith, W. L.; Chanley, M. H. (eds.). **Culture of Marine Invertebrate Animals**. Plenum, p. 29-60, 1975.

INSTITUTO ADOLFOLUTZ. **Normas Analíticas Do Instituto Adolfo Lutz: Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. IV edição, Brasília 2005.

JUNTILA, D. J.; BAUTISTA, M. A.; MONOTILLA, W. Biomass and lipid production of a local isolate *Chlorella sorokiniana* under mixotrophic growth conditions. **Bioresource Technology**, v. 191, p. 395-398, 2015. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.03.098>.

LIZZUL, A. M.; HELLIER, P.; PURTON, S.; BAGANZ, F.; LADOMMATOS, N.; CAMPOS, L. Combined remediation and lipid production using *Chlorella sorokiniana* grown on wastewater and exhaust gases. **Bioresource Technology**, v. 151, p. 12–18, 2014. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.10.040>

MARTÍNEZ, C.; ROS, G.; PERIAGO, M. J.; LOPEZ, G. Biodisponibilidad del hierro de los alimentos. **Archivos Latino Americanos de Nutrición**, v. 49, n. 2, p. 106-113, 1999.

MATSUKAWA, R.; HOTTA, M.; MASUDA, Y.; CHIHARA, M.; KARUBE, I. Antioxidants from carbon dioxide fixing *Chlorella sorokiniana*. **Journal of Applied Phycology**, v. 12, n. 3-5, p. 263-267, 2000.

MORITA, M.; WATANABE, Y.; SAIKI, H. High photosynthetic productivity of green microalga *Chlorella sorokiniana*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 87, n. 3, p. 203-218, 2000. Doi: <https://doi.org/10.1385/ABAB:87:3:203>

NUNES, N. S. P.; OLIVEIRA, I. G. S.; ANSILAGO, M.; CARVALHO, E. M. Análise das relações funcionais entre as variáveis de quantificação celular na microalga *Chlorella sorokiniana*. **Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais**, v. 12 n. 1, 2021. Doi: <https://doi.org/10.6008/CBPC2179-6858.2021.001.0036>

NUNES, N. S. P. **Cultivo de *Chlorella sorokiniana* em vinhaça de cana-de-açúcar clarificada e suas aplicações biotecnológicas**. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia Ambiental) – Faculdade de Ciência Exatas e Tecnologia, Universidade Federal da Grande Dourados. Dourados. 2021.

RAMIREZ, N.N.V.; FARENZENA, M.; TRIERWEILER, J.O. Growth of Microalgae *Scenedesmus* sp in Ethanol Vinasse. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.57, n. 5, p. 630–635. 2014. Doi: <https://doi.org/10.1590/S1516-8913201401791>

RIZWAN, M.; MUJTABA, G.; MEMON, S. A.; LEE, K.; RASHID, N. Exploring the potential of microalgae for new biotechnology applications and beyond: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 92, p. 394-404, 2018. Doi: [10.1016/j.rser.2018.04.034](https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.04.034)

SANTANA, H.; CEREIJO, C.R.; TELES, V.C.; NASCIMNTO, R.C.; FERNANDES, M.S.; BRUNALE, P.; CAMPANHA, R.C.; SOARES, T.P.; SILVA, F.C.P.; SABAINI, P.S.; SIQUEIRA, F.G.; BRASIL, B.S.A.F. Microalgae cultivation in sugarcane vinasse: Selection, growth and biochemical characterization. **Bioresource Technology**, v. 228, p. 133–140, 2017. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.12.075>

SATHASIVAM, R.; RADHAKRISHNAN, R.; HASHEM, A.; ALLAH, E. F. A. Microalgae metabolites: A rich source for food and medicine. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 26, n. 4, 2019. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.11.003>

SIPAUBA-TAVARES, L. H.; ROCHA, O. **Produção de plâncton (fitoplâncton e zooplâncton) para alimentação de organismos aquáticos**. 2ª edição. São Carlos: Rima, 2003.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROCICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed. Editora UFSC/UFRGS, 2004.

STEPHENSON, A.L.; DENNIS, J.S.; HOWE, C.J. Influence of nitrogen limitation regime on the production by *Chlorella vulgaris* of lipids for biodiesel feedstocks. **Biofuels**, v. 1, 10 p., 2010. Doi: <https://doi.org/10.4155/bfs.09.1>

TANG, X. LI, Z.; ZHANG, C.; YANG, X. Element and chemical compounds transfer in bio-crude from hydrothermal liquefaction of microalgae. **Bioresource Technology**, v. 202, n. 8, 2016. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.11.076>

TOMASELLI, L. The microalgal cell. In: RICHMOND, A. (Ed). **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. Oxford: Blackwell Science, p.3-19, 2004.

WANG, X.-X.; ZHANG, T.-Y.; DAO, G.-H.; XU, Z.-B.; WU, Y.-H.; HU, H.-Y. Assessment and mechanisms of microalgae growth inhibition by phosphonates: Effects of intrinsic toxicity and complexation. **Water Research**, v. 186, p. 116333, (2020). Doi: [10.1016/j.watres.2020.116333](https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116333)

WU, Y. H. Yu, L.; Li, X.; HU, H.Y.; SU, Z.F. Biomass production of a *Scenedesmus* sp. under phosphorous- starvation cultivation condition. **Bioresource Technology**, v. 112, p. 193 – 198, 2012. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.02.037>

CAPÍTULO 4. AVALIAÇÃO DE POLÍMEROS ORGÂNICOS E SINTÉTICOS PARA RECUPERAÇÃO DE BIOMASSA ALGAL

Resumo:

A biomassa de microalgas vem ganhando destaque por sua gama de aplicabilidade biotecnológica. Porém, a recuperação da sua biomassa no meio líquido ainda é um desafio tecnológico e econômico. Assim, o presente estudo buscou avaliar a eficiência de floclulantes orgânicos e sintéticos (polímeros) para recuperação da biomassa da microalga *Chlorella sorokiniana*. Adotou-se os métodos do ponto de carga zero (pH_{PCZ}) e *Jar Test* para avaliar a floclulação de cada polímero adotado no estudo. O ensaio do pH_{PCZ} foi realizado por meio da metodologia dos onze pontos modificada em triplicata e mantidas em mesa agitadora do tipo shaker (100 rpm) por 24 horas à temperatura constante (25°C). Para avaliar a eficiência de floclulação foram adicionadas diferentes concentrações dos polímeros no cultivo de microalgas, seguido da metodologia de *Jar Test*. As amostras foram filtradas e a partir do sobrenadante foi medida a eficiência de floclulação por absorbância (OD_{685nm}). O valor do pH_{PCZ} da microalga *C. sorokiniana* foi de 5,33. O polímero que apresentou maior proximidade com o pH_{PCZ} da microalga foi 5,23 para *Moringa oleífera*. Para os demais foi observado 8,62 para *Cereus jamacaru*, 6,45 para carboximetilcelulose (CMC), 8,72 para Praestol, 4,97 para *Stryphnodendron adstringens*, 8,62 para quitosana e 4,05 para o TMT. O polímero com maior eficiência de floclulação também foi *M. oleífera* com 100% de recuperação. Os demais polímeros apresentaram 97,17% de recuperação para PraestolTM, 95,28% para Tanfloc MT, 80,38% para quitosana, 13,92% para *S. adstringens*, 4,42% para biomassa seca e 2,53% para extrato de *C. jamacaru*, e 0% para CMC. Assim foi possível inferir que estes métodos são complementares e que a semente de *M. oleífera*, floclulante natural, com potencial de uso na alimentação humana e animal, se mostrou o polímero mais indicado para ser utilizada como floclulante para recuperação da biomassa algal da *C. sorokiniana*.

Palavras-chave: Recuperação de biomassa; Microalgas; Química de superfície.

EVALUATION OF ORGANIC AND SYNTHETIC POLYMERS FOR ALGAL BIOMASS RECOVERY

Abstract:

The microalgae biomass has been gaining prominence due to its range of biotechnological applicability. However, the recovery of its biomass in the liquid medium is still a technological and economic challenge. Thus, the present study sought to evaluate the efficiency of organic and synthetic flocculants (polymers) for recovering the biomass of the microalgae *Chlorella sorokiniana*. The zero load point (pH_{PCZ}) and *Jar Test* methods were used to evaluate the flocculation of each polymer adopted in the study. The pH_{PCZ} test was performed using the eleven-point methodology modified in triplicate and maintained on a shaker-type shaking table (100 rpm) for 24 hours at constant temperature (25°C). To evaluate the flocculation efficiency, different concentrations of polymers were added in the microalgae culture, followed by the Jar Test methodology. The samples were filtered and from the supernatant the flocculation efficiency by absorbance (OD685nm) was measured. The pH_{PCZ} value of microalgae *C. sorokiniana* was 5.33. The polymer that showed greater proximity to the pH_{PCZ} of the microalgae was 5.23 for *Moringa oleifera*. For the others, 8.62 was observed for *Cereus jamacaru*, 6.45 for carboxymethylcellulose (CMC), 8.72 for Praestol, 4.97 for *Stryphnodendron adstringens*, 8.62 for chitosan and 4.05 for TMT. The polymer with the highest flocculation efficiency was also *Moringa oleifera* with 100% recovery. The other polymers showed 97.17% recovery for Praestol™, 95.28% for Tanfloc MT, 80.38% for chitosan, 13.92% for *S. adstringens*, 4.42% for dry biomass and 2.53% for extract of *Cereus jamacaru*, and 0% for CMC. Thus, it was possible to infer that these methods are complementary and that the seed of *M. oleifera*, a natural flocculant, with potential for use in human and animal nutrition, proved to be the most suitable polymer to be used as a flocculant for the recovery of algal biomass from *Chlorella sorokiniana*.

Keywords: Biomass Recovery; Microalgae; Surface chemistry.

1. INTRODUÇÃO

A produção de microalgas possui uma característica marcante, pois estes microrganismos apresentam produção de biomassa de 2 a 10 vezes mais rápida que qualquer sistema de cultivo terrestre, conferindo a estes microrganismos maior taxa de reposição (SAYRE, 2013). Porém, uma das dificuldades encontradas na produção das microalgas é a recuperação da biomassa, visto que as mesmas apresentam tamanho microscópico, baixa capacidade de sedimentação, além da maioria não possuir característica de agrupação celular (RAWAT et al., 2013). Dessa forma, os processos comumente empregados para separar a biomassa do meio líquido podem se tornar onerosos ou inadequados para os fins que se destinam.

Alguns métodos já são empregados para realizar a recuperação da biomassa algal, como separação física por centrifugação, sedimentação por gravidade, eletrofloculação, floculação química, entre outras (RAWAT et al., 2013; KIM et al. 2015; LI et al., 2020). A centrifugação é um método físico que por meio de uma força centrífuga permite a separação de partículas com base na diferença de densidade entre elas, o qual apresenta alta eficiência e viabilidade técnica, apesar de apresentar alto custo de operação (LI et al., 2020; NAJJAR; ABU-SHAMLEH, 2020). A sedimentação por gravidade ocorre por meio da diferença de densidade entre o meio e as células algais, sendo de fácil operação, porém há um longo tempo de operação (LI et al., 2020) onde a taxa de sedimentação é dada pela Lei de Stokes, sendo considerado o diâmetro e a velocidade da partícula, densidade do meio e da partícula e viscosidade do meio. Este método é aplicado para microalgas com alta densidade celular, porém o tempo gasto pode torná-lo pouco eficiente, sendo necessário a adição de flocculantes para acelerar o processo (KWIETNIEWSKA et al., 2012). A eletrofloculação se dá por meio de eletrodos carregados positivamente que são inseridos no meio líquido neutralizando as cargas negativas das microalgas e assim possibilitando a formação de agregados (ROY; MOHANTY, 2019).

Dentre os métodos de recuperação da biomassa algal, a floculação ainda é um dos métodos mais utilizados, visto o baixo custo econômico e energético, viabilidade da técnica e alta eficiência. Porém a contaminação residual dos elementos químicos utilizados na floculação pode comprometer a qualidade da biomassa (GERCHMAN et al., 2017). O processo de floculação é marcado pela ação de um flocculante, que provoca agregação de partículas em flocos (BALTAR, 2010). Este é um processo físico-químico

utilizado para unir coloides e partículas dissolvidas em flocos maiores, sendo posteriormente sedimentada pela gravidade (LICSKÓ, 1997; KAWAMURA, 1996; NUNES, 2004). Os polímeros inorgânicos, químicos e sintéticos vem sendo amplamente estudados visto a sua eficiência em facilitar o processo de floculação (CHRISTENSON; SIMS, 2011), porém, os mesmos acabam sendo residuais ao meio e a biomassa algal, o que pode inviabilizar posterior comercialização do material floculado para determinados fins (HANSEL; RIEFLER E STUART, 2014; LEE et al., 2009).

Os floculantes naturais apresentam características vantajosas quando comparados aos floculantes sintéticos no processo de recuperação da biomassa algal. Dentre as vantagens destaca-se o fato de serem atóxicos, apresentando baixa sensibilidade a diferentes pH do meio e a necessidade de uma dosagem inferior quando comparado com floculantes inorgânicos (GRIMA et al., 2003; UMMALYMA, 2017). Sendo assim, a utilização de polímeros orgânicos se torna uma alternativa eficiente no processo de separação da biomassa algal, em especial os provenientes de diferentes espécies vegetais que são facilmente encontrados e com preço geralmente mais acessíveis (UMMALYMA, 2017).

Apesar dos estudos disponíveis na literatura com o emprego de diferentes agentes floculantes, a escolha do método adequado de avaliação é muito importante. Alguns métodos são complementares ao estudo da floculação, como o potencial zeta, que determina o potencial no plano de deslizamento/cisalhamento de uma partícula coloidal se movendo sob o campo elétrico (BHATTACHARJEE, 2016). Quanto maior o potencial zeta, maior a probabilidade de se ter um meio estável, onde as partículas carregadas se repelem, diminuindo a eficiência do processo de floculação (BULATOVIC, 2007). Outro método utilizado é o ponto isoelétrico (PIE), que corresponde ao valor de pH onde o potencial zeta se apresenta nulo, assim quando o pH do meio está próximo ao PIE, há maior possibilidade de aglomeração, favorecendo a floculação. Este valor pode ser obtido utilizando valor do pH onde ocorre maior precipitação do meio, segundo Mastreoni e Gern (2008).

De modo complementar, o método do ponto de carga zero poderá auxiliar na avaliação da recuperação de biomassa da microalga, uma vez que investiga as cargas superficiais dos floculantes (GIACOMNI et al. 2017). Este parâmetro é um importante requisito para a floculação/precipitação da biomassa algal produzida a partir do controle da carga superficial da microalga e do floculante utilizado por ajuste do pH do meio para

sua floculação e precipitação. Assim, para realização dos ensaios de floculação de microalgas, se faz necessário um estudo prévio de química de superfície dos materiais que possuem potencial de floculação/coagulação, considerando que sejam de baixo custo e tecnologia simples a partir dos seus pontos de carga zero – pczs (pH_{pcz}) (FREITAS et al., 2015).

O principal problema a ser respondido no presente estudo é pode-se substituir os floculantes químicos sintéticos por floculantes naturais na recuperação da biomassa da microalga *C. sorokiniana*, devido sua menor toxicidade e baixo custo. Diante do exposto, o presente estudo buscou avaliar a eficiência de floculação da biomassa da microalga *Chlorella sorokiniana* por meio da adição de diferentes tipos de floculantes, orgânicos e sintéticos, e a combinação destes. Para tal, o estudo partiu da seguinte hipótese: os polímeros orgânicos apresentam eficiência superior ou igual aos sais metálicos comerciais comumente utilizados na recuperação de biomassa da microalga. As propriedades de alguns biopolímeros naturais, como da espécie vegetal *Moringa oleífera*, que possui propriedades coagulantes, devido a existência de uma proteína catiônica de alto peso molecular que desestrutura as partículas contidas na água e coagula os coloides, podem ser a resposta para a recuperação da biomassa algal com baixo risco ambiental e residual para o produto final.

2. METODOLOGIA

A presente pesquisa trata de um tratamento experimental do tipo exploratório onde o delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado composto por 11 ensaios de floculação da biomassa da microalga, cada um com quatro tratamentos realizados em triplicatas. O método utilizado foi o *Jar Test* sendo testados 05 floculantes químicos naturais e 03 floculantes químicos sintéticos. Também foi adotado o método do ponto de carga zero para determinar o valor de pH em que a adsorção de íons determinantes de potencial (H^+ e OH^-) é igual, comparando o meio de cultivo da microalga com os floculantes. Os floculantes foram selecionados por meio de uma pesquisa bibliográfica de dados disponíveis na literatura sobre recuperação de biomassa algal e tratamento de água residual.

2.1. Cultivo e Manutenção da Microalga

O ensaio para avaliação da eficiência de floculação da biomassa da microalga foi realizado com a espécie *C. sorokiniana* (cedida pela Fundação André Tosello). A microalga *C. sorokiniana* foi cultivada durante 40 dias em água destilada enriquecida com 1% de solução estoque de N:P:K (20-5-20 g/L⁻¹) (SIPAUBA-TAVARES; ROCHA, 2003; CARVALHO et al., 2012; ANSILAGO et al., 2016) e vinhaça. O cultivo foi realizado em garrafas de polietileno tereftalato com capacidade de 5 litros. O cultivo ocorreu em laboratório, com sistema de cultivo estático não axênico, aeração constante, temperatura ambiente (22 ± 2,0°C) e fotoperíodo (12 h luz/12 h escuro – 2.500 LUX), conforme Figura 4.1.



Figura 4.1. Cultivo (a) e manutenção (b) em laboratório da microalga *Chlorella sorokiniana*.

2.3. Determinação do Ponto de Carga Zero (pH_{pcz})

Para análise de eficiência de separação da biomassa algal realizou-se a determinação do ponto de carga zero. O pH_{pcz} foi determinado utilizando a metodologia dos 11 (onze) pontos modificados para pHs extremos (REGALBUTO; ROBLES, 2004). Foram preparadas soluções de Cloreto de sódio (NaCl) 0,1 mol L⁻¹ em 12 condições de pH diferentes (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12) previamente ajustados com ácido clorídrico (HCL) ou hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 mol L⁻¹. Após isso, foram adicionados 20 mL L⁻¹ desta solução em tubos do tipo Falcon, e posteriormente adicionados 20 mg L⁻¹ do material floculante e da biomassa algal (290,75 x 10⁵ cels, mL⁻¹) e levados em mesa agitadora/incubadora de piso (shaker), à temperatura constante de

25 °C e agitação de 100 rpm, por 24 horas e foram realizados em triplicata (FREITAS et al., 2015).

Após esta etapa foi realizada a medida do pH final das amostras. Para obtenção do ponto de carga zero (pH_{pcz}) foi realizada média aritmética dos valores de pH final, correspondendo assim ao intervalo onde o pH se mantém constante, pH_{pcz} . Para cada material flocculante utilizado foi construído um gráfico com pH inicial versus pH final. As amostras de precipitantes testados foram: quitosana grau técnico, carboximetilcelulose (CMC), polímero Tanfloc MT (tanino oriundo da acácia negra cedido pela TANAC), polímero Poliacrilamida Praestol Solenis (Cedido pela Solenis), extrato de *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão), extrato de *Cereus jamacaru* (cacto; mandacaru), semente de *Moringa oleífera*. Também foi realizado o teste para a biomassa da microalga *Chlorella sorokiniana*.

2.4. Desempenho de Flocculação

Nos experimentos para avaliar o desempenho da flocculação para recuperação da biomassa algal foi utilizada a metodologia de *Jar Test* (RASHID et al., 2013). Os experimentos foram conduzidos em frascos erlemeyers de 250 mL de volume útil, com 100 mL de meio algal ($290,75 \times 10^5$ cels, mL^{-1}) e submetidos a 10 segundos de Rotação de Mistura Rápida (RMR) a 200 rpm, seguido de 10 minutos de Rotação de Mistura Lenta (RML) a 50 rpm, e um período de 15 minutos de descanso para a sedimentação dos flocos de biomassa algal presente na amostra. Após os 15 minutos de descanso houve separação dos flocos que decantam e o sobrenadante. A amostra foi filtrada e a partir do sobrenadante foi realizado o monitoramento da absorbância OD685nm (NUNES et al., 2021). A eficiência da flocculação foi calculada conforme Equação 1 (PAPAZI et al., 2010):

$$EF\% = \left(1 - \frac{A - B}{C}\right) \times 100$$

onde:

(Equação 1)

A= amostra final filtrada;

B= branco (flocculante + água destilada);

C= água destilada.

Os tratamentos e as concentrações utilizados neste experimento podem ser visualizados na Tabela 4.1. Também foi adotado o tratamento controle, sem adição de floculantes, apenas com meio algal submetido ao *Jar Test*.

Tabela 4.1. Tratamentos utilizados nos ensaios de desempenho de flocação da biomassa da microalga *Chlorella sorokiniana*. O tratamento controle foi realizado sem adição de nenhum polímero.

	Polímero	Tratamento				Unidade	Ref.
		T1	T2	T3	T4		
1-	Carboximetilcelulose	0,5	1,0	1,5	2,0	g L ⁻¹	Nobrega; Amorim (2015)
2-	<i>Cereus jamacaru</i> (extrato)	2,5	5	7,5	10	mL L ⁻¹	Zara et al. (2012)
3-	<i>Cereus jamacaru</i> (seco triturado)	0,5	1,0	1,5	2,0	g L ⁻¹	Zara et al. (2012)
4-	Cloreto férrico (FeCl ₃)	0,5	0,75	1	1,25	g L ⁻¹	Papaziet al. (2010)
5-	Cloreto férrico (FeCl ₃) + Carboximetilcelulose	0,5	0,75	1,0	1,25	g L ⁻¹	Papaziet al. (2010)
		0,5	1,0	1,5	2,0	g L ⁻¹	Nobrega; Amorim (2015)
6-	Cloreto férrico (FeCl ₃) + Quitosana	0,5	0,75	1,0	1,25	g L ⁻¹	Papaziet al. (2010)
		2,5	5	7,5	10	mL L ⁻¹	Rashid et al. (2013)
7-	<i>Moringa oleifera</i> (semente descascada, seca e triturada)	0,5	1,0	1,5	2,0	g L ⁻¹	Muniz et al. (2015)
8-	Poliacrilamida Praesto TM Solenis	0,25	0,5	0,75	1	mL L ⁻¹	Liang et al. (2009)
9-	Quitosana (diluída em ácido acético a 1%)	2,5	5	7,5	10	mL L ⁻¹	Rashid et al. (2013)
10-	<i>Stryphnodendron adstringens</i> (extrato)	1	2	3	4	mL L ⁻¹	Paes et al. (2013)
11-	Tanino Tanfloc MT	0,5	0,75	1,0	1,25	g L ⁻¹	Roselet et al. (2016)

2.5. Análise dos Dados

A análise de variância (ANOVA) one-way foi aplicada a fim de verificar diferença significativa por tratamento (5% de probabilidade), seguido do teste de Tukey, para avaliar a eficiência de flocação e pH, sendo avaliado a diferença entre polímeros e entre tratamentos, no programa de estatística GENES versão DOS (Visual Basic 5.0). Os valores percentuais de eficiência de flocação foram transformados em Arco Seno Raiz para realização da ANOVA.

3. RESULTADOS

3.1. Determinação do Ponto de Carga Zero (pH_{pcz})

Foram testados diversos polímeros flocculantes, sintéticos e naturais, com eficácias conhecidas na literatura. Os polímeros flocculantes que apresentaram valores de pH_{pcz} próximos ao do cultivo de *C. sorokiniana* foi a semente de *M. oleífera*, extrato de *S. adstringens*, polímero Tanfloc e a quitosana técnica, respectivamente. No entanto, os dois primeiros polímeros são considerados naturais e apresentaram tecnicamente os melhores resultados de pH_{pcz} para a flocculação da biomassa da microalga (Figura 3).

Também foi observado que os quatro agentes flocculantes com melhores resultados também apresentaram um platô na curva próximo do pH final 5, geralmente nas faixas que vai do pH inicial 4 a 10, podendo sugerir que há anulação das cargas positivas e negativas nestes intervalos (Figura 4.2).

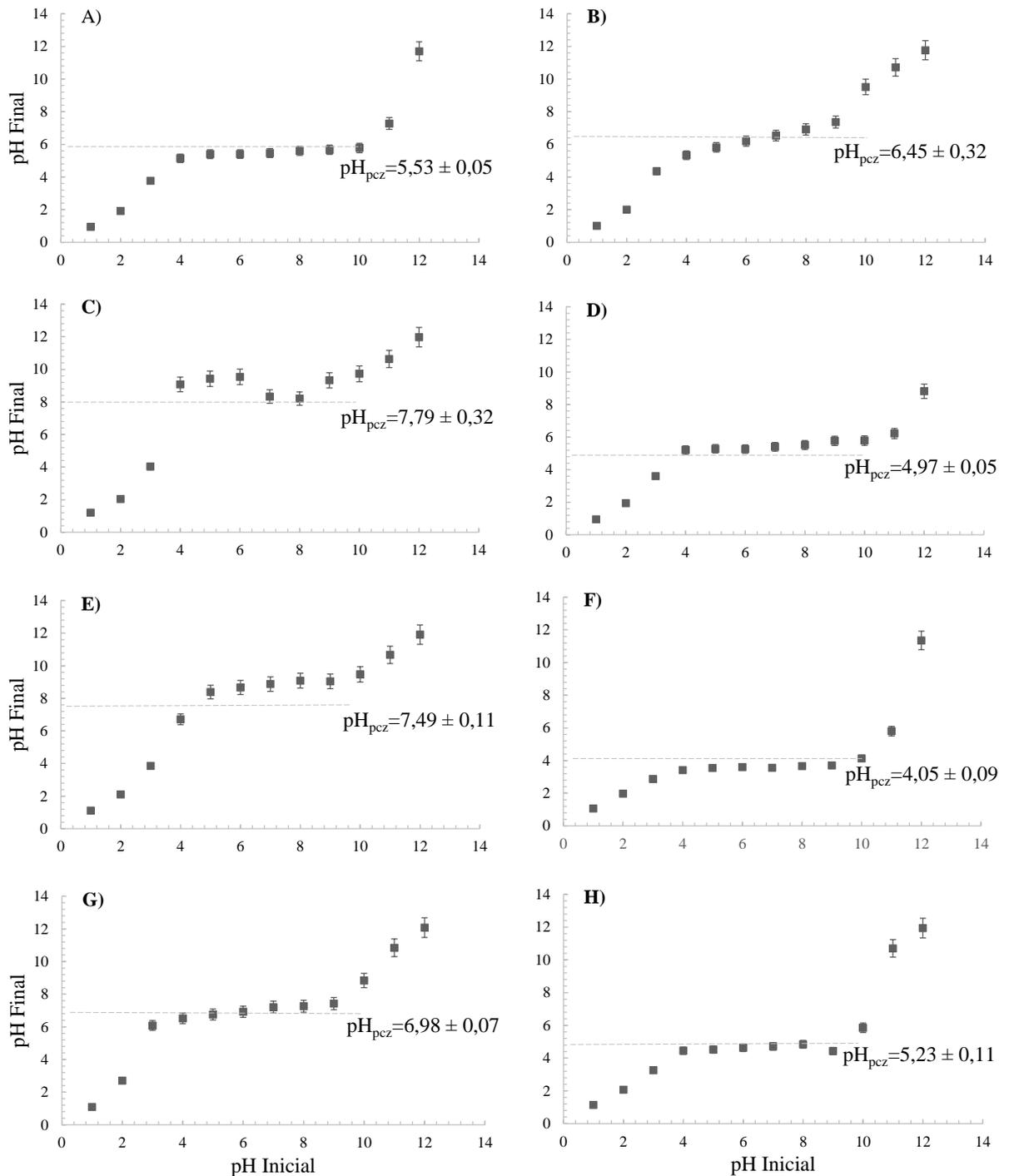


Figura 4.2. Curva de determinação e valor (\pm desvio padrão) do ponto de carga zero para os diferentes flocculantes testados. A) Biomassa de *Chlorella sorokiniana*; B) Carboximetilcelulose; C) Extrato de *Cereus Jamararu*; D) Extrato de *Stryphnodendron adstringens*; E) Polímero poliacrilamida Solenis; F) Polímero Tanfloc MT; G) Quitosana Técnica; H) Semente de *Moringa oleífera*.

3.2. Desempenho de Flocculação da Biomassa Algal

A representação visual do meio de cultivo da microalga *C. sorokiniana* após a adição dos flocculantes indica que *M. oleifera* (semente) e PraestoI™ apresentaram melhor desempenho na recuperação da biomassa. Os flocculantes Tanfloc MT e a combinação de ferro com carboximetilcelulose (FeCl_3 + CMC) também apresentaram um bom desempenho na recuperação da biomassa, porém deixaram resíduo no meio (Figura 4.3).

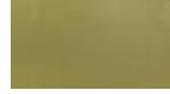
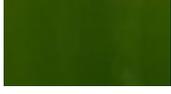
POLÍMEROS	CONTROLE	T1	T2	T3	T4
Carboximetilcelulose					
<i>Cereus jamacaru</i> (extrato)					
<i>Cereus jamacaru</i> (seco triturado)					
Cloreto Férrico (FeCl_3)					
Cloreto Férrico (FeCl_3) + Carboximetilcelulose					
Cloreto Férrico (FeCl_3) + Quitosana					
<i>Moringa oleifera</i> (semente descascada, seca e triturada)					
Poliacrilamida PraestoI™ Solenis					
Quitosana (diluída em ácido acético a 1%)					
<i>Stryphnodendron adstringens</i> (extrato)					
Tanino Tanfloc MT					

Figura 4.3. Aspecto visual do meio de cultivo frente aos diferentes polímeros (controle + tratamentos 1, 2, 3 e 4, da esquerda para a direita respectivamente).

Quando avaliada a eficiência de floculação dos polímeros testados em função da concentração utilizada (linhas), conforme demonstrado na Tabela 4.2, observa-se que os polímeros *Cereus jamacaru* (seco triturado), *Moringa oleífera* (semente), Praestol e *Stryphnodendron adstringens* (extrato) apresentaram desempenho significativo de floculação no tratamento com o dobro da concentração original (T2). O polímero quitosana apresentou um aumento significativo apenas a partir do tratamento T3. Já o polímero comercial Tanfloc apresentou valores elevados no tratamento com menor concentração (T1), com quedas significativas para as maiores concentrações (T2, T3 e T4). A combinação de cloreto férrico e carboximetilcelulose não diferiu estatisticamente entre os tratamentos, porém apresentou valores elevados de eficiência de floculação desde as concentrações mais baixas. Os demais polímeros não diferenciaram significativamente entre os tratamentos e apresentaram baixa eficiência de floculação (Tabela 4.2).

Na comparação entre as colunas observa-se que *M. oleífera* apresentou valores significativamente mais elevados de eficiência de floculação para os demais polímeros a partir das maiores concentrações (T3 e T4), demonstrando ser o agente floculante mais eficiente para a recuperação da biomassa da microalga em relação aos demais. Em suma, a semente de *M. oleífera*, Praestol™, Tanfloc MT e quitosana técnica apresentaram um máximo de eficiência de floculação de 100%; 97,17%; 95,28% e 80,38%, respectivamente.

Tabela 4.2. Eficiência de floculação (%) da biomassa algal no meio em suspensão com floculantes orgânicos, sintéticos e combinações (média \pm erro padrão) nos quatro tratamentos.

POLÍMEROS	T1	T2	T3	T4	p	F
Carboximetilcelulose	0,52 ^{ns D} $\pm 0,52$	0 ^{ns G} ± 0	0 ^{ns G} ± 0	2,46 ^{ns CD} $\pm 2,46$	1	0,75
<i>Cereus jamacaru</i> (extrato)	2,53 ^{ns CD} $\pm 1,46$	0 ^{ns G} ± 0	0,72 ^{ns FG} $\pm 0,41$	0 ^{ns D} ± 0	0,12	2,66
<i>Cereus jamacaru</i> (seco triturado)	0,18 ^{b D} $\pm 0,18$	4,42 ^{a FG} $\pm 0,10$	3,89 ^{a EF} $\pm 0,03$	4,31 ^{a BCD} $\pm 0,10$	<0,05	55,29
Cloreto férrico (FeCl ₃)	21,19 ^{ns B} $\pm 4,78$	20,38 ^{ns DE} $\pm 3,56$	17,35 ^{ns D} $\pm 0,99$	14,45 ^{ns BCD} $\pm 2,47$	100	0,61
Cloreto férrico (FeCl ₃) + Carboximetilcelulose	83,04 ^{ns A} $\pm 2,97$	84,46 ^{ns BC} $\pm 2,08$	87,81 ^{ns BC} $\pm 1,58$	88,96 ^{ns A} $\pm 2,73$	9,05	3,08
Cloreto férrico (FeCl ₃) + Quitosana	11,18 ^{ab BC} $\pm 2,84$	4,91 ^{b FG} $\pm 2,80$	10,85 ^{ab DE} $\pm 0,11$	11,46 ^{a B} $\pm 0,64$	<0,05	4,160
<i>Moringa oleifera</i> (semente descascada, seca e triturada)	3,56 ^{c CD} $\pm 1,80$	68,41 ^{b C} $\pm 9,61$	100 ^{a A} ± 0	92,91 ^{a A} $\pm 0,56$	<0,05	81,93
Poliacrilamida Praestol™ Solenis	17,63 ^{c B} $\pm 0,84$	97,17 ^{a A} $\pm 0,18$	95,73 ^{a B} $\pm 0,38$	89,77 ^{b A} $\pm 1,27$	<0,05	1190,62
Quitosana (diluída em ácido acético a 1%)	15,21 ^{b B} $\pm 1,62$	30,67 ^{b D} $\pm 1,12$	80,38 ^{a C} $\pm 7,97$	80,29 ^{a A} $\pm 2,16$	<0,05	47,82
<i>Stryphnodendron</i> <i>adstringens</i> (extrato)	0,23 ^{b D} $\pm 0,23$	9,35 ^{a EF} $\pm 2,01$	12,26 ^{a DE} $\pm 2,30$	13,92 ^{a BC} $\pm 6,45$	<0,05	13,14
Tanino Tanfloc MT	91,98 ^{b A} $\pm 0,56$	95,28 ^{a AB} $\pm 0,05$	79,88 ^{c C} $\pm 1,22$	79,34 ^{c A} $\pm 0,19$	<0,05	188,18
p	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	-	-
F	94,92	151,32	264,33	74,15	-	-

Legenda: Análise de variância ($p < 0,05$) seguida pelo teste Tukey em comparação nas linhas entre o mesmo polímero (letras minúsculas) e em comparação nas colunas entre os diferentes polímeros (letras maiúsculas), onde letras iguais indicam médias estatisticamente iguais e letras diferentes apresentam médias estatisticamente diferentes entre si. ^{ns}: não significativo.

Na Tabela 4.3 pode ser observado os valores de pH do controle e de cada polímero avaliado; com exceção do extrato de *S. adstringens*, todos os demais polímeros alteraram significativamente o pH em relação ao controle. Como era esperado o controle não apresentou diferença significativa na coluna, enquanto todos os tratamentos diferiram estatisticamente para algum polímero, que apresentaram variações do pH entre 1.84 e 8.20.

Tabela 4.3. Valor do potencial hidrogeniônico (pH) de cada tratamento após processo de floculação \pm erro padrão com flocculantes orgânicos, sintéticos e combinações. Controle: Tratamento sem adição de polímeros flocculantes.

POLÍMEROS	CONTROLE	T1	T2	T3	T4	<i>p</i>	<i>F</i>
Carboximetilcelulose	6,46 ^{a NS} $\pm 0,08$	4,15 ^{d F} $\pm 0,01$	4,29 ^{cd G} $\pm 0,03$	4,40 ^{bc F} $\pm 0,02$	4,55 ^{b D} $\pm 0,01$	<0,05	325,97
<i>Cereus jamacaru</i> (extrato)	6,46 ^{a NS} $\pm 0,02$	4,63 ^{c E} $\pm 0,01$	4,91 ^{b E} $\pm 0,02$	5,04 ^{b D} $\pm 0,01$	5,09 ^{b C} $\pm 0,01$	<0,05	194,91
<i>Cereus jamacaru</i> (seco triturado)	6,46 ^{a NS} $\pm 0,06$	4,32 ^{c F} $\pm 0,03$	4,64 ^{b F} $\pm 0,01$	4,77 ^{b E} $\pm 0,01$	4,83 ^{b CD} $\pm 0,0$	<0,05	249,99
Cloreto férrico (FeCl ₃)	6,80 ^{a NS} $\pm 0,05$	2,83 ^{b G} $\pm 0,12$	2,58 ^{bc H} $\pm 0,08$	2,54 ^{bc G} $\pm 0,02$	2,48 ^{c E} $\pm 0,03$	<0,05	743,46
Cloreto férrico (FeCl ₃) + Carboximetilcelulose	6,46 ^{a NS} $\pm 0,06$	2,43 ^{b H} $\pm 0,08$	2,31 ^{bc I} $\pm 0,06$	2,22 ^{bc H} $\pm 0,01$	2,19 ^{c EF} $\pm 0,04$	<0,05	1333,18
Cloreto férrico (FeCl ₃) + Quitosana	6,46 ^{a NS} $\pm 0,02$	2,23 ^{b H} $\pm 0,02$	2,04 ^{bc J} $\pm 0,06$	1,92 ^{c J} $\pm 0,12$	1,84 ^{c F} $\pm 0,03$	<0,05	1468,44
<i>Moringa oleifera</i> (semente descascada, seca e triturada)	6,64 ^{a NS} $\pm 0,09$	6,35 ^{b B} $\pm 0,04$	6,10 ^{bc B} $\pm 0,05$	5,92 ^{cd B} $\pm 0,05$	5,71 ^{d B} $\pm 0,03$	<0,05	44,46
Poliacrilamida Praestol TM Solenis	6,80 ^{e NS} $\pm 0,09$	8,20 ^{a A} $\pm 0,04$	8,01 ^{b A} $\pm 0,01$	7,82 ^{c A} $\pm 0,01$	7,60 ^{d A} $\pm 0,01$	<0,05	338,36
Quitosana (diluída em ácido acético a 1%)	5,91 ^{a NS} $\pm 0,09$	2,32 ^{b H} $\pm 0,01$	2,18 ^{b IJ} $\pm 0,01$	2,08 ^{c I} $\pm 0,01$	2,02 ^{c F} $\pm 0,01$	<0,05	1525,50
<i>Stryphnodendron</i> <i>adstringens</i> (extrato)	5,91 ^{ns NS} $\pm 0,03$	5,69 ^{ns C} $\pm 0,01$	5,75 ^{ns C} $\pm 0,02$	5,71 ^{ns C} $\pm 0,01$	5,75 ^{ns B} $\pm 0,01$	7,117478	3,02
Tanino Tanfloc MT	6,80 ^{a NS} $\pm 0,04$	5,44 ^{b D} $\pm 0,03$	5,26 ^{b D} $\pm 0,05$	4,82 ^{c E} $\pm 0,01$	5,13 ^{b C} $\pm 0,25$	<0,05	76,77
<i>p</i>	0,71	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	-	-
<i>F</i>	3,5338	1915,46	2981,76	10570,22	608,19	-	-

Legenda: Foi realizada a Análise de variância ($p < 0,05$) seguida pelo teste Tukey em comparação nas linhas entre diferentes tratamentos (letras minúsculas) e em comparação nas colunas entre os diferentes polímeros (letras maiúsculas), seguida pelo teste Tukey em comparação nas linhas, onde letras iguais indicam médias estatisticamente iguais e

letras diferentes apresentam médias estatisticamente diferentes entre si. ^{ns}: não significativo.

4. DISCUSSÃO

O meio de cultivo com a microalga (controle) apresentou carga eletrostática nula no pH 5,53, sugerindo que os polímeros mais adequados para floculação seria a semente triturada de *M. oleifera*, seguido em menor representatividade por extrato de *S. adstringens*, polímero comercial Tanfloc e a quitosana técnica. Foi observado para estes polímeros o momento em que as cargas positivas e negativas das superfícies foram iguais aos da microalga a partir dos grupos químicos superficiais (GIACOMNI et al. 2017; KOSMULSKI; MACSKA, 2019). Também foi observada uma similaridade no efeito tampão destes polímeros com a amostra de microalga, explicado pelo platô apresentado nas curvas de titulação. Os gráficos obtidos apresentam as curvas dos valores do pH final em comparação com o pH inicial (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12) da solução de NaCl 0,1 mol L⁻¹ em adição dos polímeros floculantes estudados, onde obtém-se os valores do pH_{pcz} (REGALBUTO; ROBLES, 2004; GUILARDUCI et al., 2016).

No pH_{pcz} não há cargas líquidas superficiais para repulsão eletrostática e as espécies podem interagir, flocular e precipitar. Pode-se também prever tipos de grupos superficiais ou a ionização desses grupos funcionais presentes e como estes grupos podem(rão) interagir com sólidos ou espécies em suspensão a partir da análise de pH do meio (PERILLI et al., 2014). Quando os polímeros estão em contato com meio algal em pH menor que o pH_{pcz} tendem a apresentar maior potencial de floculação, visto que ocorreria maior adsorção devido à formação de ligações iônicas e se o pH do meio for maior que o pH_{pcz} do polímero, há tendência de menor adsorção (GIACOMNI et al. 2017).

Quando os polímeros foram adicionados ao meio de cultivo da microalga observou-se que as sementes trituradas de *M. oleifera* apresentaram maior eficiência de floculação, conforme preconizado pelo teste do o pH_{pcz}. As formulações comerciais PraestoTM e Tanfloc MT e a quitosana técnica também apresentaram elevada eficiência de floculação da biomassa microalgal. As microalgas possuem em sua superfície química cargas negativas e para que a floculação ocorra de forma eficiente faz-se necessário a anulação destas cargas (VANDAMME et al., 2013). Os polímeros floculantes que o pH final tenderam a uma faixa semelhante ao pH_{pcz} da biomassa da microalga *C. sorokiniana*

obtiveram valores positivos para a recuperação algal, como o tanino Tanfloc MT, a semente da *M. oleifera* e a quitosana. O polímero poliacrilamida Praestol possui derivados catiônicos, o que resultada na formação de pontes de hidrogênio ou ligações iônicas, quando entram em contato com uma solução coloidal, onde se adsorvem a estes coloides e propiciam a formação de flocos (NASCIMENTO et al. 2017). Visto estas propriedades catiônicas da poliacrilamida, entende-se o porquê mesmo com o pH_{pzc} distante do apresentado pela biomassa da microalga *C. sorokiniana*, este polímero obteve resultados elevados para o processo de floculação. Porém, pela característica tóxica e carcinogênica, a poliacrilamida não é uma opção viável na recuperação da biomassa algal (GALEŠA et al., 2008).

Yunos et al. (2017) obtiveram 98% de eficiência de floculação de *Chlorella sp.* utilizando 30 mg L^{-1} de quitosana diluída a HCl 1%. A semente da *Moringa oleifera* também vem sendo empregada como (bio)floculante, atingindo uma taxa de floculação de até 95% com o gênero *Chlorella sp.* (HAMID et al., 2014). Roselet et al. (2016) obtiveram eficiência de floculação de até 98% utilizando 10 mg L^{-1} do polímero Tanfloc para a microalga *Nannochloropsis oculata*. Diversos estudos utilizam sais metálicos nos processos de floculação, como é o caso do cloreto férrico, que apresentou resultados satisfatório para Scherer (2016) obtendo 95% de recuperação da biomassa algal utilizando 150 mg L^{-1} do composto químico para a espécie de microalga *Scenedesmus sp.*

Os taninos são amplamente utilizados em sistemas de tratamento de águas residuais, visto que este atua em sistema de partículas coloidais, explicando os resultados positivos para o tanino Tanfloc MT utilizado neste estudo. Porém, o extrato de *S. adstringens* não apresentou resultado satisfatório para a floculação, mesmo com o pH_{pzc} próximo ao da biomassa da microalga *C. sorokiniana* e apresentando alta concentração de taninos, em torno de 30% de sua composição (MORI et al. 2003). Isto provavelmente decorre que os taninos naturalmente não apresentam estrutura catiônica, que favorece processos de formação de flocos (JUSTINA et al., 2018).

A respeito do tanino proveniente da empresa Tanac é submetido a um processo de reação de cationização, onde um nitrogênio quaternário é adicionado aos polifenóis presentes neste polímero, se tornando um centro catiônico passível de neutralização de cargas elétricas superfícies (BELTRÁN-HEREDIA et al., 2011; JUSTINA et al., 2018), promovendo a formação de flocos e eficiência na recuperação da biomassa algal. Desta forma, o tanino Tanfloc MT provavelmente promoveu a neutralização das cargas

superficiais da microalga *C. sorokiniana*, o que formou pontes eletrostáticas entre as células algais possibilitando a formação dos flocos.

Em relação às análises estatísticas para o pH, a resposta ao fato da quitosana ter diminuído o pH da microalga com relação ao controle, se dá porque na metodologia de preparo da quitosana foi utilizado o ácido acético 1% para a diluição da mesma (RASHID et al., 2013). Visto que compostos contendo ácido naturalmente tem um pH abaixo de 7, logo, quando em contato com a microalga diminuiu o pH desta. Alguns estudos mostram maior capacidade de coagulação/floculação quando o pH do meio se encontra entre 7 e 8 (MATOS et al., 2007), revelando assim a necessidade de correção do pH nestes ensaios. Novos estudos devem ser realizados com relação a essa variância de pH dentro das microalgas, para assim ter um melhor controle de pH das microalgas e melhor eficiência em futuras pesquisas. Apesar da eficiência de floculação demonstrada por alguns polímeros para a microalga *C. sorokiniana*, alguns estudos ainda são necessários, como a influência do pH e da densidade celular nos diferentes tratamentos avaliados.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir deste estudo, conclui-se que por meio do pH_{PCZ} pode ocorrer uma potencialização na recuperação da biomassa algal por meio de processos de floculação. Como os valores do pH_{PCZ} encontrados para a semente de *M. oleifera* e o Tanfloc MT são próximos ao pH_{PCZ} da microalga *C. sorokiniana*, não há necessidade do ajuste do pH da solução no processo de floculação para estes polímeros. Já quanto à floculantes como a quitosana deve ser feito o ajuste de pH para que tenha eficácia na função de floculante. Deste modo, estes resultados podem contribuir significativamente na otimização do processo de recuperação de biomassa algal.

Com relação à floculação, foi constatado um percentual de 100% de eficiência de floculação com a *M. oleifera*, mostrando ser um polímero com potencial floculante para recuperação da biomassa da microalga *C. sorokiniana*. Os outros polímeros que obtiveram sucesso de floculação foram o polímero Praestol, Tanfloc MT e a quitosana. Porém, a semente de *M. oleifera*, além de ser um polímero completamente orgânico, não necessitou do ajuste de pH, sendo ideal para recuperação da biomassa da microalga *C. sorokiniana*.

6. REFERÊNCIAS

ANSILAGO, M.; OTTONELLI, F.; CARVALHO, E. M. Cultivo da microalga *Pseudokirchneriella subcapitata* em escala de bancada utilizando meio contaminado com metais pesados. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 21, n. 3, 2016. Doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-41522016124295>.

BALTAR, C. A. M. **Processos de Agregação**. In: Tratamento de minérios, 5.ed. Rio de Janeiro: CETEM/MCT, 2010. Cap.13. p.559-594, 2010.

BHATTACHARJEE, S. DLS and zeta potential – What they are and what they are not? **Journal of Controlled Release**, v. 235, p. 337-351, 2016. Doi:10.1016/j.jconrel.2016.06.017

BELTRÁN-HEREDIA, J.; SÁNCHEZ-MARTÍN, J.; DÁVILA-ACEDO, M. A. Optimization of the synthesis of a new coagulant from a tannin extract. **Journal of Hazardous Materials**, v. 186, n. 2–3, p. 1704–1712, 2011.

BULATOVIC, S. M.. **Handbook of Flotation Reagents: Chemistry, Theory and Practice**. Flotation of sulfide ores: ed. 1, p. 53-78, 2007

CARVALHO, E. M.; OTTONELLI, F.; ANSILAGO, M.; GODOY, H. C.; NAKAGAKI, J. M.; RAMIRES, I. Growth kinetics of the microalga *Pseudokirchneriella subcapitata* (Korshikov) Hindak (Chlorophyceae) in natural water enriched with NPK fertilizer. **Biochemistry and Biotechnology Report**, v. 1, n. 2, 14-18, 2012. Doi: 10.5433/2316-5200.2012v1n2p14

CHRISTENSON, L.; SIMS, R. Production and harvesting of microalgae for wastewater treatment, biofuels, and bioproducts. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 6, p. 686–702, 2011. Doi: 10.1016/j.biotechadv.2011.05.015

FREITAS, F. B. A.; FREITAS CÂMARA, M. Y.; FREIRE, M. D. F. Determinação do PCZ de adsorventes naturais utilizados na remoção de contaminantes em soluções aquosas. **Blucher Chemistry Proceedings**, v. 3, n. 1, p. 610-618, 2015. Doi: 10.5151/chenpro-5erq-am1

GALEŠA, K.; BREN, U.; KRANJC, A.; MAVRI, J. Carcinogenicity of acrylamide: A computational study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n.18, p. 8720- 8727, 2008. Doi: <https://doi.org/10.1021/jf800965y>

GERCHMAN, Y.; VASKER, B.; TAVASI, M.; MISHAEL, Y.; KINEL-TAHAN, Y.; YEHOŠHUA, Y. Effective harvesting of microalgae: comparison of different polymeric flocculants. **Bioresource Technology**, v. 228, n. 141–6, 2017. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.12.040>

GIACOMNI, F.; MENEGAZZO, M. A. B. SILVA, M. G.; SILVA, A. B.; BARROS, M. A. S. D. Importância da determinação do ponto de carga zero como característica de tingimento de fibras proteicas. **Revista Matéria**, v. 22, n. 2, 2017. Doi: 10.1590/S1517-707620170002.0159

GRIMA, E. M.; BELARBI, E. H.; FERNÁNDEZ, F. A.; MEDINA, A. R.; CHISTI, Y. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. **Biotechnology Advances**, v. 20, n. 7-8, p. 491-515, 2003. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(02\)00050-2](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(02)00050-2)

GUILARDUCI, V.V.S.; MESQUITA, J.P.; MARTELLI, P.B.; et al. Adsorção de fenol sobre carvão ativado em meio alcalino. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1226-1232, 2006. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422006000600015>

HAMID, S. H. A.; FATHURRAHMANLANANAN, F.; DIN, W. N. S.; LAM, S. S.; KHATOON, H.; ENDUT, A.; JUSOH, A. Harvesting microalgae, *Chlorella* sp. by bio-flocculation of *Moringa oleifera* seed derivatives from aquaculture wastewater phytoremediation. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 95, p. 270-275, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.06.021>

HANSEL, P. A.; RIEFLER, R. G.; STUART, B. J. Efficient flocculation of microalgae for biomass production using cationic starch. **Algal Research**, v. 5, p. 133-139, 2014. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.algal.2014.07.002>

JUSTINA, M. D.; RODRIGUES BAGNOLIN MUNIZ, B.; MATTGE BRÖRING, M.; COSTA, V. J.; SKORONSKI, E. Using vegetable tannin and polyaluminium chloride as coagulants for dairy wastewater treatment: A comparative study. **Journal of Water Process Engineering**, v. 25, p. 173–181, 2018. Doi: 10.1016/j.jwpe.2018.08.001

KAWAMURA, S. Optimization of basic water-treatment processes design and operation: Coagulation and flocculation. **Aqua**, v. 45, n. 1, p. 35-47, 1996.

KOSMULSKI, M.; MAĆZKA, E. Surface charging and points of zero charge of less common oxides: Beryllium oxide. **Colloids and Surfaces**, v. 575, p. 140–143, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2019.05.024>

KWIETNIEWSKA, E.; TYS, J.; KRZEMINSKA, I.; KOZIEL, W. Microalgae – Cultivation and application of biomass as a source of energy: A review. **Acta Agrophysica Monographiae**, p. 1- 108, 2012. Doi: <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

KIM, D. Y.; OH, Y. K.; PARK, J. Y.; KIM, B.; CHOI, S. A.; HAN, J. I. An integrated process for microalgae harvesting and cell disruption by the use of ferric ions. **Bioresource Technology**, v. 191, p. 469-474, 2015. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.03.020>

LEE, A. K.; LEWIS, D. M.; ASHMAN, P. J. Microbial flocculation, a potentially low-cost harvesting technique for marine microalgae for the production of biodiesel. **Journal of Applied Phycology**, v. 21, n. 5, p. 559-567, 2009. Doi:10.1007/s10811-008-9391-8

LI, S.; HU, T.; XU, Y.; WANG, J.; CHU, R.; YIN, Z.; ZHU, L. A review on flocculation as an efficient method to harvest energy microalgae: Mechanisms, performances, influencing factors and perspectives. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 131, 2020. Doi: 110005. Doi:10.1016/j.rser.2020.110005

LIANG, Z.; WANG, Y.; ZHOU, Y.; LIU, H.; WU, Z. Variables affecting melanoidins removal from molasses wastewater by coagulation/flocculation. **Separation and Purification Technology**, v. 68, n. 3, p. 382–389, 2009. Doi:10.1016/j.seppur.2009.06.011

LICSKÓ, I. Realistic coagulation mechanisms in the use of aluminium and iron (III) salts. **Water Science Technology**, v. 40, n. 4-5, p. 103-111, 1997. [https://doi.org/10.1016/S0273-1223\(97\)00426-5](https://doi.org/10.1016/S0273-1223(97)00426-5)

MASTREONI, M.; GERN, R. M. M. **Bioquímica Práticas Adaptadas**. São Paulo, Atheneu, 2008.

MATOS, A.T.; CABANELLAS, C.F.G.; CECON, P.R.; BRASIL, M.S.; MUDADO, C.S. Efeito da concentração de coagulantes e do pH da solução na turbidez da água, em recirculação, utilizada no processamento dos frutos do cafeeiro. **Engenharia Agrícola**, Jaboticabal, v. 27, n. 2, p. 544-551, 2007. <https://doi.org/10.1590/S0100-69162007000300025>

NAJJAR, Y. S. H.; ABU-SHAMLEH, A. Harvesting of microalgae by centrifugation for biodiesel production: A review. **Algal Research**, v. 51, p. 102046. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.102046>

MORI, F. A. MORI, C. L. S. O.; MENDES, L. M.; SILVA, J. R. M.; MELO, V. M. Influência do sulfito e hidróxido de sódio na quantificação em taninos da casca de barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*). **Floresta e Ambiente, Seropédica**, v. 10, n. 1, p. 86-92, 2003.

MUNIZ, G. L.; DUARTE, F. V.; OLIVEIRA, S. B. Uso de sementes de *Moringa oleifera* na remoção da turbidez de água para abastecimento. **Revista Ambiente & Água**, v. 10, n. 2, 2015. Doi: <https://doi.org/10.4136/ambi-agua.1439>.

NASCIMENTO, L. A.; MARCIA MARIA LIMA DUARTE; BARROS NETO, E. L.; NUNES, A. F.; MELO, R. P. F. Removal of Cu²⁺ and Zn²⁺ from aqueous medium using ionic polyacrylamides. **Global Nest Journal**, v. 19, p. 211-216, 2017. Doi: <https://doi.org/10.30955/gnj.001741>

NUNES, J. A. **Tratamento físico-químico de águas residuárias industriais**. Gráfica Editora J. Andrade Ltda, 298 p, 2004.

NUNES, N. S. P.; OLIVEIRA, I. G. S.; ANSILAGO, M.; CARVALHO, E. M. Análise das relações funcionais entre as variáveis de quantificação celular na microalga *Chlorella sorokiniana*. **Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais**, v. 12, n. 1, 2021. Doi: <https://doi.org/10.6008/CBPC2179-6858.2021.001.0036>

NÓBREGA, K. C.; AMORIM, L. V. Influência da massa molar de CMC no comportamento reológico e de filtração de suspensões argilosas. **Cerâmica**, v. 61, p. 399-408, 2015. <https://doi.org/10.1590/0366-69132015613601904>

PAES, J. B.; DINIZ, C. E. F.; LIMA, C. R.; BASTOS, P. M.; NETO, P. N. M. Taninos condensados da casca de angico-vermelho (*Anadenanthera colubrina* var. *cebil*) extraídos com soluções de hidróxido e sulfito de sódio. **Revista Caatinga**, v. 26, n. 3, p. 22 – 27, 2013.

PAPAZI, A., MAKRIDIS, P., & DIVANACH, P. Harvesting *Chlorella minutissima* using cell coagulants. **Journal of Applied Phycology**, v. 22, n. 3, p. 349-355, 2010. Doi:10.1007/s10811-009-9465-2

PERILLI, T. A. G.; SICUPIRA, D. C.; MANSUR, M. B.; LADEIRA, C. Q. Avaliação da capacidade adsorptiva de carvão ativado para a remoção de manganês. **HOLOS**, v. 30, n. 3 - Edição Especial - XXV ENTMME / VII MSHNT, 2014. Doi: <http://dx.doi.org/10.15628/holos.2014.1777>

RASHID, N.; REHMAN, S. U.; HAN, J. I. Rapid harvesting of freshwater microalgae using chitosan. **Process Biochemistry**, v. 48, n. 7, p. 1107-1110, 2013.

RAWAT, I.; RANJITH KUMAR, R.; MUTANDA, T.; BUX, F. Biodiesel from microalgae: A critical evaluation from laboratory to large scale production. **Applied Energy**, v. 103, p. 444–467, 2013. Doi: 10.1016/j.apenergy.2012.10.004

REGALBUTO, J. R.; ROBLES, J. **The engineering of Pt/Carbon Catalyst Preparation**. University of Illinois, Chigago, 2004.

ROSELET, F.; BURKERT, J.; ABREU, P. C. Flocculation of *Nannochloropsis oculata* using a tannin-based polymer: bench scale optimization and pilot scale reproducibility. **Biomass and Bioenergy**, v. 87, p.55-60, 2016.

ROY, M.; MOHANTY, K. A comprehensive review on microalgal harvesting strategies: Current status and future prospects. **Algal Research**, v. 44, p. 101683, 2019. Doi:10.1016/j.algal.2019.101683

SAYRE, R. Using microalgae to produce biomass. **Mitigate Carbon Emissions and Recycle Nutrients**, Boston, USA. 2013.

SIPAUBA-TAVARES, L. H.; ROCHA, O. **Produção de plâncton (fitoplâncton e zooplâncton) para alimentação de organismos aquáticos**. 2ª. edição. São Carlos: Rima, 2003.

UMMALYMA, S. B.; GNANSOUNOU, E.; SUKUMARAN, R. K.; SINDHU, R.; PANDEY, A.; SAHOO, D. Bioflocculation: An alternative strategy for harvesting of microalgae– An overview. **Bioresource Technology**, v. 242, p. 227-235, 2017. Doi: 10.1016/j.biortech.2017.02.097.

VANDAMME, D.; FOUBERT, I.; MUYLAERT, K. Flocculation as a low-cost method for harvesting microalgae for bulk biomass production. **Trends in Biotechnology**, v. 31, n. 4, p. 233–239, 2013. Doi:10.1016/j.tibtech.2012.12.005

YUNOS, F. H. M.; NASIR, N. M.; JUSOH, H. H. W.; KHATOON, H.; LAM, S. S.; JUSOH, A. Harvesting of microalgae (*Chlorella* sp.) from aquaculture bioflocs using an environmental-friendly chitosan based bio-coagulant. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 124, p. 243-249, 2017.

ZARA, R. F.; THOMAZINI, M. h.; LENZ, G. F. Estudo da eficiência de polímero natural extraído do cacto Mandacaru (*Cereus jamacaru*) como auxiliar nos processos de coagulação e floculação no tratamento de água. **REA – Revista de estudos ambientais** (Online), v. 14, n. 2 esp, p. 75-83, 2012.

CAPÍTULO 5. AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS POR *Chlorella sorokiniana* CULTIVADA EM MEIO ALTERNATIVO COM VINHAÇA¹

Resumo:

A produção de microalgas é cara e requer grandes volumes de água e energia. O uso da vinhaça da cana-de-açúcar como meio alternativo, tem ganhado destaque para o cultivo de microalgas. Neste estudo, comparamos o rendimento de biomassa e a produção de metabólitos secundários por *Chlorella sorokiniana* cultivada em meio comercial (Sueoka) e com aqueles cultivados em meio preparado com vinhaça de cana (0,1%) suplementado com N:P:K (20-5-20 gL⁻¹). As microalgas atingiram o ponto máximo de crescimento 14 dias mais rápido no meio alternativo. Níveis médios de compostos fenólicos e conteúdo de flavonoides foram encontrados no meio de vinhaça (15,28 ± 0,32 mg GAE.g⁻¹ e 72,30 ± 5,28 mg QE.g⁻¹, respectivamente) em comparação com o meio comercial (6,02 ± 0,13 mg GAE.g⁻¹ e 13,12 ± 1,33 mg QE.g⁻¹, respectivamente). A atividade antioxidante máxima (AOA) de *C. sorokiniana* cultivada em meio de vinhaça foi de 88,05% com concentração de extrato de 1500 µg.mL⁻¹ e IC₅₀ de 357,7 ± 27,35 µg.mL⁻¹. Diferentes fatores, como estresse devido à demanda química de oxigênio (DQO) e íons adicionados da vinhaça, podem ter induzido variações na síntese de metabólitos secundários. Mais investigações são necessárias para explorar alternativas naturais e de baixo custo para aumentar a produção de flavonoides para a bioprospecção de microalgas.

Palavras-chave: Atividade antioxidante; Suplementos dietéticos; DPPH; Cultivo de microalgas.

¹ Este capítulo foi publicado na revista: Research, Society and Development, v. 10, n. 5, p. e49710515237, 2021. DOI: 10.33448/rsd-v10i5.15237. Qualis Capes: A3.

ENHANCING SECONDARY METABOLITE PRODUCTION BY *Chlorella sorokiniana* USING AN ALTERNATIVE MEDIUM WITH VINASSE

Abstract:

Microalgae production is expensive and requires high volumes of water and energy. The use of sugar cane vinasse as an alternative medium, has gained attention for microalgae cultivation. In this study, we compared the biomass yield and secondary metabolite production by *Chlorella sorokiniana* grown in a commercial medium (Sueoka) and versus those grown in a medium prepared with cane vinasse (0.1%) supplemented with N:P:K (20-5-20 g.L⁻¹). Microalgae reached the maximum growth point 14 days faster in the alternative medium. Increased average phenolic compound levels and flavonoid content were found in the vinasse medium (15.28 ± 0.32 mg GAE.g⁻¹ and 72.30 ± 5.28 mg QE.g⁻¹, respectively) compared to that of the commercial medium (6.02 ± 0.13 mg GAE.g⁻¹ and 13.12 ± 1.33 mg QE.g⁻¹, respectively). The maximum antioxidant activity (AOA) of *C. sorokiniana* grown in vinasse medium was 88.05% with an extract concentration of 1500 µg.mL⁻¹, and an IC₅₀ of 357.7 ± 27.35 µg.mL⁻¹. Different factors, such as stress due to chemical oxygen demand (COD), and vinasse-added ions, may have induced variances in secondary metabolite synthesis. Further investigations are needed to explore natural and low cost alternatives to increasing flavonoid yield for the bioprospection of microalgae.

Keywords: Antioxidant activity; Dietary supplements; DPPH; Microalgal cultivation.

1. INTRODUÇÃO

As microalgas são organismos microscópicos e unicelulares, com pouca ou nenhuma diferenciação celular e capacidade de formação de colônia (OHSE et al., 2008). As microalgas verdes (Chloropyta) vêm sendo exploradas comercialmente visto suas propriedades e potencial uso na suplementação e alimentação humana e animal, na produção de biocombustíveis, além de poderem ser utilizadas na produção de cosméticos, fármacos, entre outros, além da produção de metabólitos secundários, como antioxidantes (SKJANES et al., 2012, ZHANG et al., 2013).

A biomassa de microalga possui um amplo potencial biotecnológico, sendo aplicado em estudos na área nutricional, nutracêutica e farmacêutica (OLASEHINDE et al., 2019). Além disso, as microalgas possuem um rápido crescimento, elevada obtenção de biomassa e capacidade de produção de metabólitos secundários, o que pode ser favorecido dependendo do meio de cultivo deste microrganismo (PLAZA et al., 2009). Os compostos bioativos produzidos pelas microalgas são provenientes de seu metabolismo secundário, e podem variar de acordo com o meio em que é cultivada, apresentando uma diversa gama de atividades biológicas, como atividade anticancerígena, antioxidante e atividade antimicrobiana (KATHARIOS et al., 2005, PARISI et al., 2009, CHU, 2012). Estes compostos podem ser utilizados de forma isolada quando extraídos por determinados solventes e métodos de extração, dependendo de suas afinidades químicas (MARIUTTI; BRAGAGNOLO, 2007).

Os compostos fenólicos, por exemplo, são encontrados em extratos de microalgas de diferentes grupos taxonômicos (SCHOLZ; LIEBEZEIT, 2012). São importantes no metabolismo das plantas e vem se tornando também para a saúde dos humanos devido as suas características particularmente relacionadas às suas propriedades antioxidantes (VENDRAMINI, 2004, CHA et al., 2010) e farmacológicas, como atividades antivirais e antimicrobianas (ABD EL-BAKY et al., 2008).

As microalgas são conhecidas por serem uma importante fonte de carotenoides, carboidratos, vitaminas, ácidos graxos insaturados e outras substâncias bioativas (BOROWITZKA, 2013). Várias espécies de *Chlorella* foram estudadas por suas propriedades anticâncer; *Chlorella sorokiniana* está entre as mais estudadas/investigadas/pesquisadas, por suas conhecidas propriedades farmacológicas. Um estudo recente investigou a resposta imunológica aprimorada às células de câncer de

pulmão e encontrou uma redução significativa nos tumores subcutâneos após a ingestão dessas microalgas (LIN et al., 2017). Outro estudo publicou resultados importantes onde a membrana de *C. sorokiniana* foi usada para inibir o crescimento de carcinoma de cólon em camundongos (ISHIGURO et al., 2020). Propriedades antioxidantes de *C. sorokiniana* também são consideradas neuroprotetoras e são conhecidas por melhorar a memória de curto prazo (MORGESE et al., 2016), inibir a atividade da colinesterase e modular a desagregação das fibrilas β -amiloides, que são os mediadores da doença de Alzheimer (OLASEHINDE et al., 2019).

C. sorokiniana também foi testada para biorremediação de compostos xenobióticos e tratamentos de águas residuais (SHEN et al., 2018; SUTHERLAND; RALPH, 2019; CHEN et al., 2020). Além disso, há vários relatos sobre suas vantagens na produção de biocombustível (LI et al. 2013; CHOI et al., 2019; MENEGAZZO et al., 2020). As diversas aplicações desta espécie também podem ser atribuídas à sua facilidade de cultivo, exibindo alta produtividade e alto índice de duplicação. Por último, mas não menos importante, *C. sorokiniana* pode ser cultivada em áreas não agrícolas utilizando como meio de cultivo águas residuais. Assim, as microalgas possuem diversas vantagens quando comparada a sementes oleaginosas (WU et al., 2012).

O cultivo da microalga verde *Chlorella*, pode ocorrer de forma fotoautotrófica, heterotrófica e mixotrófica (ZHANG et al., 2013). No cultivo fotoautotrófico as microalgas obtêm energia a partir da energia luminosa e a carbono a partir do CO₂ presente no ar, ocorrendo assim a fotossíntese, e obtendo algumas biomoléculas, como polissacarídeos, proteínas e lipídeos (HUANG et al., 2010). Quando as microalgas utilizam compostos orgânicos tanto como fonte de energia e carbono, denomina-se cultivo heterotrófico, podendo também utilizar a energia luminosa como fonte de energia, tornando-se um cultivo heterotrófico. No cultivo mixotrófico as microalgas podem alternar sua fonte de energia, utilizando a energia luminosa, compostos orgânicos e compostos inorgânicos, e como fonte de carbono podem utilizar compostos orgânicos ou CO₂ (JIANG et al., 2013).

Apesar de poder ser cultivada em diversos sistemas, o cultivo de microalgas ainda é caro, com alta demanda de água e energia. Assim, cultivá-la utilizando um resíduo como complemento ao meio de cultura pode ser uma alternativa para redução dos impactos ambientais causados pelos resíduos (PIRES et al., 2013).

Neste estudo, foram investigados os benefícios do cultivo da microalga *C. sorokiniana* em meio enriquecido com nitrogênio, fósforo, potássio (NPK) e vinhaça em comparação com aqueles cultivados em meio comercial (Sueoka). Também foi verificada a presença de compostos fenólicos e flavonoides no extrato aquoso da microalga, além de avaliar sua potencial atividade antioxidante.

2. METODOLOGIA

2.1. Cultivo da Microalga

O experimento foi conduzido no laboratório CPBio da Universidade Estadual da Grande Dourados. A cepa da microalga *C. sorokiniana* (Trebouxiophyceae) foi cedida pela Fundação André Tosello (CTT 7727; IBVF 211-32, University of Seville, Spain).

A cepa foi cultivada em garrafas de polietileno tereftalato de 5 L⁻¹ durante 56 dias sobre condição de cultivo estático e não axênico, com aeração constante, temperatura (25⁰C) e fotoperíodo controlado (2.500 LUX) por meio de lâmpadas fluorescentes (12 h luz / 12 h escuro). Condutividade, pH e densidade celular foram mensuradas durante o período de cultivo.

Foram testados dois meios de cultivo para comparar a resposta da microalga *C. sorokiniana*, sendo o primeiro uma fórmula comercial, conhecida como SUEOKA (SUEOKA, 1960), onde sua formulação química pode ser visualizada na Tabela 1.

Tabela 5.1. Composição do Meio de Cultivo Sueoka. a) Composição dos macronutrientes. b) Composição dos Elementos Traços em 200x em 500 mL de água. *em 250 mL de água.

a) Macronutrientes	
KH ₂ PO ₄	8,3 mM
K ₂ HPO ₄	5,3 mM
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,25 mM
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,133 mM
Elementos Traços	1x
NH ₄ Cl	9,35 mM

b) Elementos Traços 200 x	
EDTA-Na·2H ₂ O *	12,7 g
H ₃ BO ₃	2,28 g
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	4,40 g
MnCl ₂ ·4H ₂ O	1,02 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	1,00 g
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,32 g
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,32 g
(NH ₄) ₆ MoO ₂₄ ·4H ₂ O	0,22 g

O segundo meio foi preparado com 0,07 g do fertilizante químico N:P:K (20-5-20 g/L), diluído em 2000mL de água destilada (SIPAUBA-TAVARES; ROCHA, 2003) e vinhaça (0,1 %) (SANTOS et al., 2014).

As biomassas provenientes de cada cultivo foram coletadas inicialmente por decantação térmica ($7,0 \pm 1,5^{\circ}\text{C}$) direto nas garrafas. Posteriormente, a biomassa decantada passou por centrifugação à 3500 rpm por 10 minutos. O pellet obtido na centrifugação foi submetido a liofilização em aparelho da marca Christ, sob pressão de 0,16mbar.

2.2.Extração dos Compostos Fenólicos e Flavonoides

A biomassa foi diluída em água (1:20 v:v) e foram aquecidos até as soluções atingirem a fase de fervura. As soluções foram então homogeneizadas com o auxílio de um misturador magnético por 1 hora. As soluções foram centrifugadas a 3500 rpm por 10 min e os sobrenadantes coletados e liofilizados a 0,16 mbar.

2.3. Determinação do Conteúdo de Compostos Fenólicos e Flavonoides Totais

O conteúdo fenólico total em cada extrato foi determinado usando o reagente Folin-Ciocalteu (MEDA et al. 2005). O ácido gálico (2–100 μL) foi a solução padrão utilizada para a curva de calibração. Os valores de absorvância das soluções foram medidos a 760 nm, e os níveis fenólicos nos extratos (100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) foram determinados em triplicata por interpolação de leituras de absorvância por interpolação de leituras de absorvância via regressão linear. Os dados foram expressos em miligramas (mg) de ácido gálico por grama de extrato seco (mg GAE g^{-1} de extrato).

A quantidade total de flavonoides de cada extrato foi determinada por interpolação da absorção das amostras extraídas (100 $\mu\text{m mL}^{-1}$) usando uma curva analítica adaptada de um estudo anterior (LIBERIO et al. 2011). O reagente utilizado foi uma solução de tricloreto de alumínio (AlCl_3) a 2% em metanol.

A quercetina foi escolhida como o padrão (2 - 100 μL) para produzir a curva de calibração. O conteúdo total de flavonoides foi determinado em triplicatas. A absorvância foi medida a 415 nm contra um branco de metanol (espectrofotômetro). Os dados foram expressos em mg equivalente de quercetina por grama de extrato seco (mg QE g^{-1} de extrato).

2.4. Ensaio de DPPH

A atividade antioxidante dos extratos foi estimada *in vitro* usando a capacidade de captura de radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) (% SRL). O extrato aquoso foi diluído em duas concentrações diferentes (50 a 2500 $\mu\text{m mL}^{-1}$), utilizando etanol. Além disso, alíquotas de DPPH foram adicionadas às amostras em cubetas de vidro. A absorção foi medida em espectrofotômetro a 517 nm usando 80% de etanol em branco. O ácido ascórbico (AA) e a solução de hidroxiltolueno butilado (BHT), antioxidantes naturais e sintéticos, foram utilizados como controles positivos. Os índices de inibição foram calculados com as leituras de absorção usando a Equação 1:

$$\% \text{ inibição } DPPH = (Abs_{controle} - Abs_{amostra}) / Abs_{controle} \times 100, \quad (1)$$

2.5. Análise dos Dados

A análise de variância (ANOVA) foi aplicada a fim de verificar diferença significativa (5% de probabilidade), seguido do teste de Tukey, no programa de estatística GENES versão DOS (Visual Basic 5.0).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Performance de Crescimento

A Figura 5.1 mostra a evolução da densidade da biomassa de *C. sorokiniana* ao longo de oito semanas, tanto no meio comercial Sueoka quanto no meio alternativo enriquecido com vinhaça e NPK. A biomassa de *C. sorokiniana* cultivada no meio alternativo atingiu o pico de produtividade aos 35 dias com $8,9 \text{ g.L}^{-1} (\pm 0,13)$ de massa seca. Já o maior rendimento de massa seca no meio comercial foi de $9,1 \text{ g.L}^{-1} (\pm 0,54)$, obtido no 49º dia de cultivo.

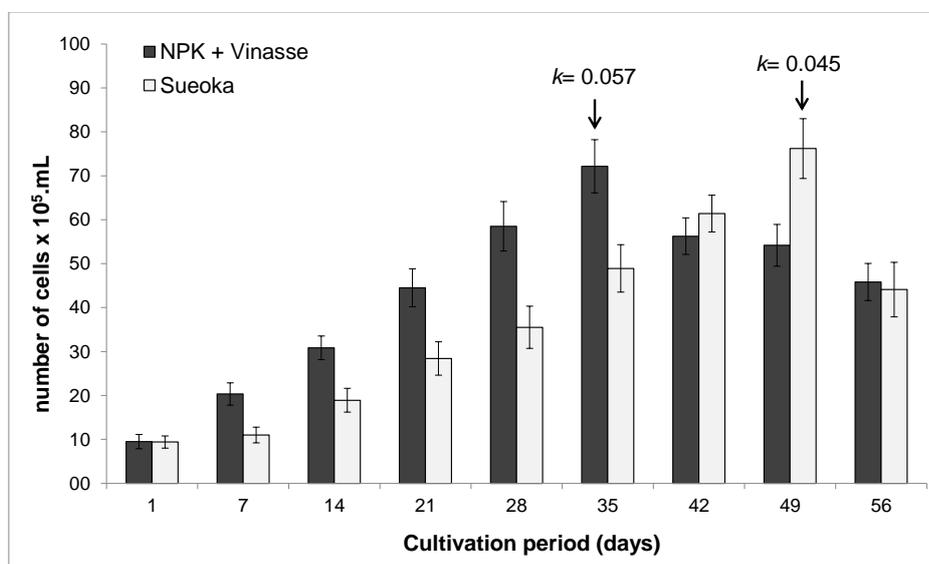


Figura 5.1. Densidade média ($N = 5 \pm$ erro padrão) da microalga *Chlorella sorokiniana* ao longo de oito semanas de produção. k: taxa de crescimento exponencial.

É importante ressaltar que apesar dos valores de biomassa seca de microalgas serem 2,2% menores no ambiente alternativo, o pico no meio de produção de biomassa algal foi observado 14 dias mais rápido do que no meio comercial (Figura 1). Alcançar maior produção de biomassa em um tempo relativamente menor indica menor gasto de

energia e menor quantidade de meios de cultura necessários, além do aumento da produção em escala industrial.

Em um estudo com *C. sorokiniana* cultivada em meio comercial Bold's Basal (BBM), a produção de biomassa foi estimada em $16,31 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ (KOBAYASHI et al., 2013). Em outro estudo semelhante com as mesmas espécies cultivadas no BBM, os autores estimaram a biomassa em $43,33 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ (MENEGAZZO et al., 2020). Ambos os estudos apresentaram valores consideravelmente inferiores aos obtidos neste estudo.

Outros estudos estimaram a densidade algal em $1,01 \times 10^{-5} \text{ mL}^{-1}$ no 23º dia de cultivo em meio conjunto (BBM e NPK) (RIBEIRO et al., 2019), considerando que foi obtida uma densidade de $45 \times 10^{-5} \text{ mL}^{-1}$ no 21º dia de cultivo em meio alternativo.

3.2. Compostos Fenólicos e Flavonoides

Fenóis e flavonoides são metabólitos secundários produzidos por microalgas quando expostos à luz ultravioleta ou quando submetidos a condições estressantes em meio de cultura. Esses compostos são utilizados principalmente para proteção celular, pois exibem papéis protetores especiais na presença de compostos prejudiciais (GOIRIS et al. 2015; SAFAFAR et al. 2015; AREMU et al. 2015). Os resultados do presente estudo (Tabela 5.2), corroboram com essas informações, visto que a microalga foi cultivada sob lâmpadas fluorescentes que emitem radiação UV usando meio de cultura enriquecido com vinhaça e NPK (AE-Cs2). É possível que a produção desses metabólitos tenha sido bastante aumentada em *C. sorokiniana* para preservação e multiplicação celular.

Tabela 5.2. Teor total de fenólicos e flavonoides encontrados nos extratos aquosos de *Chlorella sorokiniana*

	Compostos fenólicos totais (mg EAG/g)	Flavonoides (mg EQ/g)
EA-Cs1	6,02±0,13	13,12±1,33
EA-Cs2	15,28±0,32	72,30±5,28

Legenda: mg EAG/g: mg equivalentes de ácido gálico por g de amostra; mg EQ/g: mg equivalentes de quercetina por g de amostra. AA: Ácido Ascórbico. BHT: Hidroxitolueno Butilado. EA-Cs1: Extrato Aquoso da biomassa da microalga *Chlorella sorokiniana* cultivada em meio sintético Sueoka. EA-Cs2: Extrato Aquoso da biomassa da microalga *Chlorella sorokiniana* cultivada com NPK e Vinhaça.

O número total de compostos fenólicos presentes no meio de cultivo com meio alternativo é mais do que o dobro das microalgas cultivadas em meio comercial. Flavonoides totais também mostram uma quantidade significativamente maior na biomassa cultivada no meio alternativo do que cultivada no meio comercial.

Os maiores teores de fenólicos e flavonoides totais encontrados em AE-Cs2 podem indicar que a adição de compostos orgânicos e minerais ao meio de cultura aumenta o metabolismo secundário de *C. sorokiniana* e pode ser uma prática vantajosa para produção em larga escala nas áreas de cosméticos, indústria farmacêutica e dietética. Normalmente, os meios comerciais apresentam restrições importantes no balanço de nutrientes para o desenvolvimento de microalgas.

Diversos estudos demonstram a relação entre presença/ausência de radiação UV, adição/redução de nutrientes com a produção desses metabolitos secundários. Aremu et al. (2015) apresenta a variação de alguns compostos bioativos cultivando a *Chlorella minutíssima* em diferentes níveis de nitrogênio e sistemas de cultivo, como mixotrófico e fotoautotrófico e conclui que a presença do nutriente, sobretudo em condições mixotróficas, aumentam a produção desses metabólitos, corroborando com o presente estudo sob condições semelhantes de adição de nutrientes em detrimento da presença de fontes de carbono, como os açúcares presentes na vinhaça, os compostos do NPK, através da assimilação desses nutrientes pela microalga *Chlorella sorokiniana* durante os períodos sem luz, caracterizando o cultivo mixotrófico.

Particularmente os compostos fenólicos são os constituintes mais numerosos e onipresentes no grupo dos fitoquímicos e exercem uma gama de atividades biológicas, incluindo atividade antioxidante e efeitos anti-inflamatórios e antimicrobianos (HAJIMAHMOODI et al. 2010; RAPOSO; MORAIS 2015). Todavia os valores de compostos fenólicos encontrados neste estudo foram menores que os valores de flavonoides, em ambos extratos analisados.

Uma possível explicação seria a alta polaridade da água, solvente utilizado no preparo do extrato, não ser um bom extrator de compostos fenólicos (VIZZOTO; PEREIRA 2011), no entanto a água tem a capacidade de extrair compostos glicosilados, que normalmente são açúcares complexados aos flavonoides e que também possuem atividade antioxidante (MARTÍNEZ-FLÓREZ et al. 2002; HAVSTEEN 2002).

Goiris et al. (2014) mostrou que as microalgas contêm uma ampla gama de flavonoides e que, portanto, devem possuir o pool de enzimas necessário para sua biossíntese. Além disso, algumas microalgas demonstraram ter um padrão de produção de flavonoides compatível com a via de produção de algumas plantas superiores. Klejdus et al. (2009) e Onofrejová et al. (2010), demonstraram a presença dos precursores no começo da rota metabólica: ácido cumárico e ácido p-cumárico e mais um grupo derivado de seus metabólitos em algas de água doce.

Entretanto ainda não se tem dados suficientes na literatura sobre o teor de flavonoides presentes nas microalgas e nem sua função específica. Sabe-se que são um grande grupo de metabólitos secundários encontrados nas plantas e que são envolvidos em processos celulares desde a proteção contra UV até sinalização e pigmentação, e suas aplicações como composto em alimentos funcionais e o uso na indústria farmacêutica, devido a sua atividade antioxidante e papéis semelhantes a hormônios (STAFFORD 1991; KOES et al. 2005; MARKHAM 2006; AGATI; TATTINI, 2010; BUER et al. 2010). Tem-se então uma necessidade em aprofundar os estudos de identificação desses compostos, bem como as subclasses em que eles podem apresentar nas microalgas, além de sua afinidade com os solventes utilizados nos processos de extração e suas reais funções.

3.3. Atividade Antioxidante

Uma vez detectado a presença dos metabólitos secundários, descritos por sua função principal como agentes antioxidantes de espécies reativas do oxigênio, a sua capacidade antioxidante, *in vitro*, foi avaliada através do método de sequestro de radicais livres estáveis DPPH que se baseia na capacidade de determinadas substâncias em doar um átomo de hidrogênio ao radical, reduzindo-o à hidrazina, provocando mudança de coloração, de violeta para amarelo pálido. Essa mudança de coloração é acompanhada pela queda de absorvância (ALVES et al. 2010). Os valores de IC₅₀ e atividade máxima estão representados pela Tabela 5.3.

Tabela 5.3. Sequestro dos radicais livres estáveis DPPH pelo extrato aquoso da biomassa de *Chlorella sorokiniana* e pelos antioxidantes padrões ácido ascórbico (AA) e Butilhidroxitolueno (BHT).

	IC ₅₀	µg/mL	%
AA	4,76 ± 0,29	10	88,79
BHT	49,71 ± 5,17	500	94,25
EA-Cs1	2062 ± 266,5	4000	89,14
EA-Cs2	357,7 ± 27,35	1500	88,05

Legenda: IC₅₀: capacidade necessária para capturar 50% dos radicais livres presentes na reação, concentração em µg/mL e percentagem de atividade máxima (%). AA: Ácido Ascórbico. BHT: Hidroxitolueno Butilado. EA-Cs1: Extrato Aquoso da biomassa da microalga *Chlorella sorokiniana* cultivada em meio sintético Sueoka. EA-Cs2: Extrato Aquoso da biomassa da microalga *Chlorella sorokiniana* cultivada com NPK e Vinhaça.

Considerando que o EA-Cs1 apresentou resultados exorbitantes em comparação aos controles pode-se inferir que o extrato aquoso proveniente da biomassa cultivada sob adição de vinhaça e NPK apresenta uma melhor atividade antioxidante do o BHT e o AA. Uma vez que o valor de IC₅₀ encontrado do EACs-1 (2062 µg/mL) é quase cinco vezes maior que o EA-Cs2 (2357,7 µg/mL) e que apesar de ambos demonstrarem uma atividade máxima bem próxima, a concentração de EA-Cs1 necessária para tal é 2,6 vezes superior ao EA-Cs2.

Vijayavel et al. (2007) estudando o efeito antioxidante da microalga marinha *Chlorella vulgaris*, encontraram um valor máximo de 85% de atividade de eliminação de radicais livres com a concentração mínima do extrato etanólico de 70 mg L⁻¹.

Uma possível explicação para isso seriam os baixos teores de metabólitos encontrados neste presente trabalho, uma vez que diversos autores demonstram correlação entre a quantidade de compostos fenólicos e a atividade antioxidante das microalgas, como Safafar et al. (2015), Goiris et al. (2012), que obtiveram uma alta correlação em suas respectivas pesquisas, com diferentes extratos e espécies de microalgas, entre elas marinhas e dulcícolas, e elucidaram que além dos compostos fenólicos, os carotenoides também são responsáveis por uma grande parte da atividade antioxidante microalgal. Em contrapartida Li et al. (2007), apresentaram em seu trabalho uma baixa correlação entre os compostos fenólicos e a atividade antioxidante, indagando

assim que esses compostos são importantes, porém não principais na atividade antioxidante das microalgas.

Apesar dos valores do IC₅₀ dos extratos serem consideravelmente altos em relação aos controles, ainda sim os mesmos possuem uma atividade antioxidante que dever ser mais investigada, devido à grande utilização desses compostos, principalmente pela indústria alimentícia, que visa manter a qualidade sensorial e nutricional e aumentar a vida-de-prateleira dos produtos, principalmente os de base lipídica, onde busca-se minimizar a rancificação e retardar a formação de produtos tóxicos (MAISUTHISAKUL et al. 2007), além disso a busca por novas fontes naturais de compostos antioxidantes é de grande valia, uma vez que uma grande parte substâncias sintéticas utilizadas possuem características tóxicas (LOBO et al. 2010; ZHANG et al. 2010).

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O cultivo da microalga *Chlorella sorokiniana*, utilizando como fonte de carbono e nutrientes a vinhaça e o NPK, respectivamente, demonstrou ser uma potencial fonte de produção de metabolitos secundários, além de ser uma fonte natural com baixo custo de produção, visto a utilização de um resíduo sucroalcooleiro como meio de cultivo. Além disso, a produção de compostos fenólicos e flavonoides, e a atividade antioxidante no extrato aquoso da *C. sorokiniana* produzida em meio enriquecido com NPK e vinhaça, se mostrou superior a outras fontes de antioxidantes, como o butilhidroxitolueno e o ácido ascórbico. Isso pode ser usado nas áreas de cosméticos, farmacêutica e na indústria dietética.

A bioprospecção da microalga *C. sorokiniana* pode gerar serviços de baixo custo e produtos de alto valor comercial. Para trabalhos futuros, recomenda-se estudar a aplicação da biomassa da microalga *C. sorokiniana* em produtos de valor agregado.

5. REFERÊNCIAS

Abd El-Baky, H.H.; El Baz, F.K. & El-Baroty, G.S. (2008). Evaluation of marine alga *Ulvalactuca* L. as a source of natural preservative ingredient. Am Eurasian J Agr Environ Sci 3(11), 434–444.

- Agati, G. & Tattini, M. (2010). Multiple functional roles of flavonoids in photoprotection. *New Phytol* 186, 786–793. Doi: 10.1111/j.1469-8137.2010.03269.x
- Alves, C.Q.; David, J.M.; David, J.P.; Bahia, M.V. & Aguiar, R.M. (2010). Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. *Quím Nova* 33, 2202-2210. Doi: 10.1590/S0100-40422010001000033
- Aremu, A.O.; Neményi, M.; Stirk, W.A.; Ördög, V. & Van Staden, J. (2015). Manipulation of nitrogen levels and mode of cultivation are viable methods to improve the lipid, fatty acids, phytochemical content, and bioactivities in *Chlorella minutissima*. *J Phycol* 51(1), 659–669. Doi: 10.1111/jpy.12308
- Borowitzka, M.A. (2013). High-value products from microalgae - their development and commercialization. *J Appl Phycol* 25, 743–756.
- Buer, C.S.; Imin, N. & Djordjevic, M.A. (2010). Flavonoids: new roles for old molecules. *J Integr Plant Biol* 52(1), 98–111. Doi: 10.1111/j.1744-7909.2010.00905.x
- Cha, K.H.; Kang, S.W.; Kim, C.Y.; Um, B.H.; Na, Y.R. & Pan, C. (2010). Effect of pressurized liquids on extraction of antioxidants from *Chlorella vulgaris*. *J Agr Food Chem* 58(8), 4756–4761. Doi: 10.1021/jf100062m
- Chen, Z.; Qiu, S.; Amadu, A.A.; Shen, Y.; Wang, L.; Wu, Z. & Ge, S. (2020). Simultaneous improvements on nutrient and Mg recoveries of microalgal bioremediation for municipal wastewater and nickel laterite ore wastewater. *Bioresour Technol* 297, 122517. Doi: 10.1016/j.biortech.2019.122517
- Choi, Y.Y.; Hong, M.E.; Chang, W.S. & Sim, S.J. (2019). Autotrophic biodiesel production from the thermotolerant microalga *Chlorella sorokiniana* by enhancing the carbon availability with temperature adjustment. *Biotechnol Bioprocess Eng* 24(1), 223-231. Doi: 10.1007/s12257-018-0375-5
- Chu, W.L. (2012). Biotechnological applications of microalgae. *IeJSME* 6 (Suppl 1), S24-S37.

- Goiris, K.; Collen, W.V.; Wilches, I.; León-Tamarez, F.; Cooman, L. & Muylaert, K. (2015). Impact of nutrient stress on antioxidant production in three species of microalgae. *Algal Res* 7, 51-57. Doi: 10.1016/j.algal.2014.12.002
- Goiris, K.; Muylaert, K. & Fraeye, I.J. (2012). Antioxidant potential of microalgae in relation to their phenolic and carotenoid content. *J Appl Phycol* 24(1), 1477-1486. Doi: 10.1007/s10811-012-9804-6
- Goiris, K.; Muylaert, K.; Voorspoels, S.; De Paepe, D.J.E.; Baart, G. & De Cooman, L. (2014). Detection of flavonoids in microalgae from different evolutionary lineages. *J Phycol* 50(1), 483–492. Doi: 10.1111/jpy.12180.
- Hajimahmoodi, M.; Faramarzi, M.A.; Mohammadi, N.; Soltani, N.; Oveisi, M.R. & Nafissi-Varcheh, N. (2010). Evaluation of antioxidant properties and total phenolic contents of some strains of microalgae. *J Appl Phycol* 22(1), 43-50. Doi: 10.1007/s10811-009-9424-y.
- Havsteen, B.H. (2012). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol Therapeut* 96(1), 67-202. Doi: 10.1016/s0163-7258(02)00298-x.
- Huang, G.; Wei, D.; Chen, F.; Zhang, W. (2010). Biodiesel production by microalgal biotechnology. *Appl Energy* 87(1), 38-46. Doi: 10.1016/j.apenergy.2009.06.016
- Ishiguro, S.; Robben, N.; Burghart, R.; Cote, P.; Greenway, S.; Thakkar, R. & Tamura, M. (2020). Cell wall membrane fraction of *Chlorella sorokiniana* enhances host antitumor immunity and inhibits colon carcinoma growth in mice. *Integr Cancer Ther* 19. Doi:10.1177/1534735419900555
- Jiang, L.; Luo, S.; Fan, X.; Yang, Z. & Guo, R. (2011). Biomass and lipid production of marine microalgae using municipal wastewater and high concentration of CO₂. *Appl Energy* 88(10), 3336-3341. Doi: 10.1016/j.apenergy.2011.03.043
- Katharios P.; Papadakis IE.; Prapas A (2005). Mortality control of viral encephalopathy and retinopathy in 0+ grouper *Epinephelus marginatus* after prolonged bath in dense *Chlorella minutissima* culture. *B Eur Assoc Fish Pat* 25(1), 28–31.

- Kledjus, B.; Kopeckýb, J.; Benesová, L. & Vaceka, J. (2009). Solid-phase/supercritical-fluid extraction for liquid chromatography of phenolic compounds in freshwater microalgae and selected cyanobacterial species. *J Chromatogr* 1216 (1), 763–771. Doi: 10.1016/j.chroma.2008.11.096
- Kobayashi, N.; Noel, E.A.; Barnes, A.; et al (2013). Characterization of three *Chlorella sorokiniana* strains in anaerobic digested effluent from cattle manure. *Bioresour Technol* 150(1), 377–386. Doi: 10.1016/j.biortech.2013.10.032
- Koes, R.; Verweij, W. & Quattrocchio, F. (2005). Flavonoids: a colorful model for the regulation and evolution of biochemical pathways. *Trends Plant Sci* 10(1), 236-242. Doi: 10.1016/j.tplants.2005.03.002
- Li, H.; Cheng, K.; Wong, C.; Fan, K.; Chen, F. & Jiang, Y. (2007). Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food Chem* 102, 771–776. Doi: 10.1016/j.foodchem.2006.06.022
- Li, T.; Zheng, Y.; Yu, L. & Chen, S. (2013). High productivity cultivation of a heat-resistant microalga *Chlorella sorokiniana* for biofuel production. *Bioresour Technol* 131, 60-67. Doi: 10.1016/j.biortech.2012.11.121
- Liberio, S.A.; Pereira, A.L.; Dutra, R.P.; Reis, A.S.; Araújo, M.J.; Mattar, N.S.; Silva, L.A.; Ribeiro, M.N.; Nascimento, F.R.; Guerra, R.N. & Monteiro-Neto, V. (2011). Antimicrobial activity against oral pathogens and immunomodulatory effects and toxicity of geopropolis produced by the stingless bee *Melipona fasciculata* Smith. *BMC Complement Altern Med* 11, 1-10. Doi: 10.1186/1472-6882-11-108.
- Lin, P.Y.; Tsai, C.T.; Chuang, W.L.; Chao, Y.H.; Pan, I.H.; Chen, Y.K.; Lin, C.C. & Wang, B.Y. (2017). *Chlorella sorokiniana* induces mitochondrial-mediated apoptosis in human non-small cell lung cancer cells and inhibits xenograft tumor growth in vivo. *BMC Complement Altern M* 17(1), 88. Doi: 10.1186/s12906-017-1611-9
- Lobo, V.; Patil, A.; Phatak, A. & Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn Rev.* 4, 118-126. Doi: 10.4103%2F0973-7847.70902

- Maisuthisakul, P.; Suttajit, M. & Pongsawatmanit, R. (2007). Assessment of phenolic content and free radical-scavenging capacity of some Thai indigenous plants. *Food Chem* 100 (1), 1409-1418. Doi: 10.1016/j.foodchem.2005.11.032
- Mariutti, L.R.B. & Bragagnolo, N. (2007). Revisão: antioxidantes naturais da família Lamiaceae - Aplicação em produtos alimentícios. *Braz J Food Technol* 10, 96-103.
- Markham, K.R. & Andersen, O.M. (2006). *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications*. CRC Press, Florida 1212p.
- Martínez-Flórez, S.; Gonzalez-Gallego, J.; Culebras, JM. & Tuñón, M.J. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutric Hospitalar* 17(1), 271-278.
- Meda, A.; Lamien, C.E.; Romito, M.; Millogo, J. & Nacoulma, O.G. (2005). Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Faso honeys as well as their radical scavenging activity. *Food Chem* 91(1), 571-577. Doi: 10.1016/j.foodchem.2004.10.006
- Menegazzo, M.L.; Nascimento, V.M.; Hestekin, C.N.; Hestekin, J.A. & Fonseca, G.G. (2020). Evaluation of *Chlorella sorokiniana* cultivated in outdoor photobioreactors for biodiesel production. *Biofuels* 1-6. Doi: 10.1080/17597269.2020.1763094
- Morgese, M.G.; Mhillaj, E.; Francavilla, M.; Bove, M.; Morgano, L.; Tucci, P. & Schiavone, S. (2016). *Chlorella sorokiniana* extract improves short-term memory in rats. *Molecules* 21(10), 1311. Doi: 10.3390/molecules21101311
- Ohse, S.; Derner, R.B.; Ozório, R.Á.; Braga, M.V.C.; Cunha, P.; Lamarca, C.P. & Santos, M.E. (2008). Crescimento de microalgas em sistema autotrófico estacionário. *Biotemas* 21(2), 7-14.
- Olasehinde ,T.A.; Odjadjare, E.C.; Mabinya, L.V.; Olaniran, A.O. & Okoh, A.I. (2019). *Chlorella sorokiniana* and *Chlorella minutissima* exhibit antioxidant potentials, inhibit cholinesterases and modulate disaggregation of β -amyloid fibrils. *Electron J Biotechnol* 40, 1–9. Doi: 10.1016/j.ejbt.2019.03.008
- Onofrejová, L.; Vasícková, J.; Klejdus, B.; Stratil, P.; Misurcová, L.; Krácmar, S.; Kopecký, J. & Vacek, J. (2010). Bioactive phenols in algae: The application of

pressurized-liquid and solid-phase extraction techniques. *J Pharmaceut Biomed* 51 (1), 464-470. Doi: 10.1016/j.jpba.2009.03.027

Parisi, A.S.; Younes, S. & Reinehr, C.O. (2009). Avaliação da atividade antibacteriana da microalga *Spirulina platensis*. *Ver Ciênc Farm Básica Apl* 30(3), 297-301.

Pires, J.C.M.; Alvim-Ferraz, M.C.M.; Martins, F.G. & Simões, M. (2013). Wastewater treatment to enhance the economic viability of microalgae culture. *Environ Sci Pollut Res Int* 20(1), 5096–5105. Doi: 10.1007/s11356-013-1791-x

Plaza, M.N.; Herrero, M.; Cifuentes, H. A. & Ibáñez, E. (2009). Innovative natural functional ingredients from microalgae. *J Agric Food Chem* 57(16), 7159–70. Doi: 10.1021/jf901070g.

Raposo, M.F.D.J. & Morais, A.M.M.B. (2015). Microalgae for the prevention of cardiovascular disease and stroke. *Life Sci* 125, 32–41. Doi: 10.1016/j.lfs.2014.09.018.

Ribeiro, D.M.; Zanetti, G.T.; Juliao, M.H.M.; Masetto, T.E.; Gelinski, J.M.L.N. & Fonseca, G.G. (2019). Effect of different culture media on growth of *Chlorella sorokiniana* and the influence of microalgal effluents on the germination of lettuce seeds. *J Appl Biol Biotechnol* 7(1), 6-10. Doi: 10.7324/JABB.2019.70102

Safafar, H.; Wagenen, J.; Moller, P. & Jacobsen, C. (2015). Carotenoids, phenolic compounds and tocopherols contribute to the antioxidative properties of some microalgae species grown on industrial wastewater. *Mar Drugs* 13, 7339–7356. Doi: 10.3390/md13127069

Scholz, B. & Liebezeit, G. (2012). Screening for biological activities and toxicological effects of 63 phytoplankton species isolated from freshwater, marine and brackish water habitats. *Harmful Algae* 20, 58–70. Doi: 10.1016/j.hal.2012.07.007

Shen, Y.; Zhu, W.; Li, H.; Ho, S.H.; Chen, J.; Xie, Y. & Shi, X. (2018). Enhancing cadmium bioremediation by a complex of water-hyacinth derived pellets immobilized with *Chlorella* sp. *Bioresour Technol* 257, 157-163. Doi: 10.1016/j.biortech.2018.02.060

- Sipaúba-Tavares, L.H. & Rocha, O. (2003). *Produção de plâncton (fitoplâncton e zooplâncton) para alimentação de organismos aquáticos*, 2 ed. São Carlos: RiMa 122p. 2p.
- Skjånes, K.; Rebours, C. & Lindblad, P. (2013). Potential for green microalgae to produce hydrogen, pharmaceuticals and other high value products in a combined process. *Crit Rev Biotechnol* 33(2), 172-215. Doi: 10.3109/07388551.2012.681625
- Stafford, H.A. (1991). Flavonoid evolution: an enzymic approach. *J Plant Physiol* 96, 680–685.
- Sueoka, N. (1960). Mitotic replication of deoxyribonucleic acid in *Chlamydomonas reinhardi*. *Proc Natl Acad Sci* 46 (1), 83-91. Doi: 10.1073/pnas.46.1.83.
- Sutherland, D.L. & Ralph, P.J. (2019). Microalgal bioremediation of emerging contaminants-opportunities and challenges. *Water Res* 164, 114921. Doi: 10.1016/j.watres.2019.114921
- Vendramini, A.L.A. & Trugo, L.C. (2004). Phenolic Compounds in Acerola Fruit (*Malpighia punicifolia*, L.). *J Brazil Chem Soc* 15, 664-668.
- Vijayavel, K.; Anbuselvam, C. & Balasubramanian, M.P. (2007). Antioxidant effect of the marine algae *Chlorella vulgaris* against naphthalene-induced oxidative stress in the albino rats. *Mol Cell Biochem* 303 (1-2), 39-44, 2007. Doi: 10.1007/s11010-007-9453-2.
- Vizzoto, M. & Pereira, M.C. (2011). Amora-preta (*rubus* sp.): otimização do processo de extração para determinação de compostos fenólicos antioxidantes. *Ver Bras Frutic* 33(4), 1209-1214. Doi: 10.1590/S0100-29452011000400020.
- Wu, Y.H.; Yu, L.; Li, X.; Hu, H.Y. & Su, Z.F. (2012). Biomass production of a *Scenedesmus* sp. under phosphorous- starvation cultivation condition. *Bioresour Technol* 112, 193–198. Doi: 10.1016/j.biortech.2012.02.037
- Zhang, Y.; Yang, L.; Zu, Y.; Chen, X.; Wang, F. & Liu, F. (2010). Oxidative stability of sunflower oil supplemented with carnosic acid compared with synthetic antioxidants during accelerated storage. *Food Chem* 118(3), 656–662. Doi: 10.1016/j.foodchem.2009.05.038

Zhang, Y-M.; Chen, H.; He, C-L. & Wang, Q. (2013). Nitrogen Starvation Induced Oxidative Stress in an Oil-Producing Green Alga *Chlorella sorokiniana* C3. PLoS ONE 8(7). Doi: 10.1371/journal.pone.0069225

CAPÍTULO 6 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

Do estudo de bioprospecção de microalgas do sistema de piscicultura, foi possível identificar 15 espécies de microalgas durante o processo de cultivo dos microrganismos presentes na piscicultura, dentre elas, representantes dos gêneros *Cyanobacteria* e *Dinophycean* e ao filo *Chlorophytina*. Para a análise de sucessão ecológica, o filo *Chlorophytina* foi considerado o grupo com alto potencial de aplicação biotecnológica, com destaque as microalgas *L. gracillimum*, *S. quadricauda* e *Chlorella* sp. que mantiveram uma constância na densidade celular. Ambas espécies foram as mais resistentes as alterações de meios e presença as demais linhagens, sendo indicadas na produção de biomassa em larga escala para melhor aproveitamento. A técnica de isolamento de microalgas, por meio do método de inoculação em placas de petri permitiu o isolamento das microalgas: *S. acuminatus*, *S. quadricauda*, *Chlorella* sp., *M. contortum* e *S. bernandii*. A técnica de envelhecimento também apresentou resultados positivos para isolar *S. quadricauda* e a *Chlorella* sp.

O cultivo da microalga *C. sorokiniana* em meio NPK e vinhaça (resíduo agroindustrial) apresentou elevada produção de biomassa, além de altos teores de proteína e carboidratos. A busca por meios alternativos e que aproveitem resíduos industriais, reduz gastos na produção de biomassa algal, visto que geralmente meios químicos para produção são caros e algumas vezes de difícil acesso. Assim, a biomassa algal pode ser utilizada em diversas aplicações biotecnológicas, como na suplementação na alimentação humana e animal.

Por meio do estudo do pH_{PCZ} dos polímeros orgânicos e químicos, considerou-se que pode ocorrer uma potencialização na recuperação da biomassa algal por meio de processos de floculação. Como os valores do pH_{PCZ} encontrados para a semente de *M. oleífera* e o Tanfloc MT são próximos ao pH_{PCZ} da microalga *C. sorokiniana*, não há necessidade do ajuste do pH da solução no processo de floculação para estes polímeros. Já quanto à flocculantes como a quitosana deve ser feito o ajuste de pH para que tenha eficácia na função de flocculante. Deste modo, estes resultados podem contribuir significativamente na otimização do processo de recuperação de biomassa algal. Com relação à floculação, foi constatado um percentual de 100% de eficiência de floculação com a *M. oleífera* (polímero completamente orgânico), sem a necessidade de ajuste de pH, sendo ideal para recuperação da biomassa da microalga *C. sorokiniana*. Os outros

polímeros que obtiveram sucesso de floculação foram o polímero Praestol, Tanfloc MT e a quitosana.

O cultivo da microalga *Chlorella sorokiniana*, utilizando como fonte de carbono e nutrientes a vinhaça e o NPK, demonstrou ser uma potencial fonte de produção de metabolitos secundários, além de ser uma fonte natural com baixo custo de produção, visto a utilização de um resíduo sucroalcooleiro como meio de cultivo. Além disso, a produção de compostos fenólicos e flavonoides, e a atividade antioxidante no extrato aquoso da *C. sorokiniana* produzida em meio enriquecido com NPK e vinhaça, se mostrou superior a outras fontes de antioxidantes, como o butilhidroxitolueno e o ácido ascórbico. Isso pode ser usado nas áreas de cosméticos, farmacêutica e na indústria dietética.