



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE  
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIDADE ACADÊMICA DE ENGENHARIA QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

## **Tese de Doutorado**

**CULTIVO DE MICROALGAS EM SORO DE FÉCULA DE  
MANDIOCA**

***VIVIANE PEREIRA TIBÚRCIO HAMDAN***

*Campina Grande – PB - Brasil*

*Outubro / 2019*



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE  
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIDADE ACADÊMICA DE ENGENHARIA QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

## **Tese de Doutorado**

### **CULTIVO DE MICROALGAS EM SORO DE FÉCULA DE MANDIOCA**

*Viviane Pereira Tibúrcio Hamdan*

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Campina Grande.

**Orientadora: Prof. Dr. Gilmar Trindade de Araújo.**

*Campina Grande – PB - Brasil*

*Outubro / 2019*

H211c Hamdan, Viviane Pereira Tibúrcio.  
Cultivo de microalgas em soro de fécula de mandioca / Viviane Pereira Tibúrcio Hamdan. – Campina Grande, 2019.  
129 f. : il. color.

Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciências e Tecnologia, 2019. "Orientação: Prof. Dr. Gilmar Trindade de Araújo". Referências.

1. Microalgas – Cultivo. 2. Microorganismos Fotossintetizantes. 3. Meios Residuais. 4. Composição Bioquímica. 5. Goma de Tapioca. I. Araújo, Gilmar Trindade de. II. Título.

CDU 582.26/.27(043)

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECÁRIA  
SEVERINA SUELI DA SILVA OLIVEIRA CRB-15/225

**Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química da  
Universidade Federal de Campina Grande.**

**Tese aprovada em: 30/de outubro/2019**

**Banca Examinadora:**

---

**Prof. Dr. Gilmar Trindade de Araújo  
(Orientador - UFCG)**

---

**Prof. Dr. Darlan Azevedo Pereira  
(Examinador - UFPB)**

---

**Prof. Dra. Ana Paula Trindade Rocha.  
(Examinador - UFCG)**

---

**Prof. Dr. Wagner Brandão Ramos  
(Examinador - UFCG)**

---

**Prof. Dr. Howard William Pearson  
(Examinador - UFCG)**

**“Cultivo de microalgas em soro de fécula de mandioca”**

por

**Viviane Pereira Tibúrcio Hamdan  
Campina Grande-PB-Brasil  
Outubro de 2019**

“...DONO DE TODA CIÊNCIA, sabedoria e poder  
Oh dá-me de beber da água da fonte da vida  
Antes que o ar já houvesse. Ele já era Deus  
Se revelou ao seus do crente ao ateu  
Ninguém explica Deus...”

(Clóvis Pinho)

A Deus, aos meus amados pais, Jusilene e José Tibúrcio, meu esposo (Fernando) e o maior presente que a vida me deu dentro desse doutorado, o meu filho Pedro Mounir. Dedico!

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por sempre colocar pessoas do bem no meu caminho durante essa minha caminhada e todas as vezes que eu me perdia e fraquejava, me pegavas pela mão e me redirecionava para rota certa. Senhor, és caminho, verdade e vida! Te agradeço também meu Pai, pois foi dentro desse doutorado que conheci o verdadeiro AMOR ... Me presenteastes com o meu filho. Muito obrigada!!

Filho, te agradeço por ter me escolhido pra ser sua mãe, mesmo diante da vida profissional que escolhi para seguir (exige muita dedicação no trabalho e fora do trabalho). Saiba que você me dá forças para buscar o melhor para nossa família. TE AMO PARA SEMPRE.

Agradeço imensamente aos meus pais (José Tibúrcio e Jusilene) que durante toda vida lutaram tanto pelos meus estudos, fazendo tudo para me proporcionar a melhor educação. Saibam que essa conquista não é só minha, mas também é de vocês! OS AMO INCONDICIONALMENTRE!

Ao meu esposo, que aliás você preenche muito muito o significado dessa, você é um exemplo de companheirismo e rocha! Nas, maiores dificuldades você sempre chegava pra mim com uma solução, pronto! Ali eu já conseguir levantar e seguir mais segura. TE AMO

Ao professor Dr Roberto Sassi, por nem me conhecer, mas abriu as portas do seu laboratório resolvendo dá uma chance de mostrar meu trabalho e chegamos aos 8 anos de LARBIM. Obrigada principalmente por tanto ensinamento, por nos mostrar que a ciência ela é sem fronteiras e que devemos sim, disseminar conhecimento. De certa forma isso me conforta uma vez que esse mundo acadêmico muitas vezes se mostra tão competitivo e especialmente obrigada pela sua amizade (que seja por uma vida toda) e muitas vezes tendo um olhar de pai conosco.

Agradeço a professora Dr(a) Cristiane Sassi, sempre disponível a ajudar, agradeço também por compartilhar sempre o seu conhecimento.

Ao meu amado LARBIM! Que orgulho de ser uma larbinhense, agradeço imensamente a todos e não vou citar nomes por que todos, todos, de uma forma ou de outra se fizeram presente nesse trabalho. Afinal LARBIM deveria não ser só referência em microalgas ou corais mas, também de um laboratório que trabalha em conjunto e que não se exime em compartilhar conhecimento. Vocês são um capítulo importante desse trabalho e na minha vida.

A minha amiga e irmã que a vida me deu Anna Luiza! Você foi e é uma peça fundamental nesse caminhada acadêmica, afinal você compartilha de todos os sentimentos vividos. Como você mesma diz: “Somos momentos diferentes mas, fases iguais”. Amo você!!

Ao meu orientador, o professor Dr Gilmar Trindade, estamos nessa parceria há 7 anos, onde ele depositou muita confiança em mim. Obrigada por sempre está disponível todas as hora que gritei por socorro e por todos os ensinamentos proporcionados.

A professora Marta Maria, que disponibilizou o seu laboratório para que alguns ensaios fossem realizados em seu laboratório.

A minha querida Maricé (Secretária do programa) que durante toda essa jornada, sabendo da minha luta, não teve uma vez se quer, que não tenha me ajudados nos meus pedidos de socorro. Muito Obrigada!

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia química, pela oportunidade de realização deste curso.

Aos membros da banca examinadora por terem se disponibilizado a agregar valor ao meu trabalho, prestando participação na defesa deste trabalho.

E a todos que, de forma direta e indiretamente, contribuíram para a conclusão deste trabalho.

Ao MCTI/CNPq/FINEP pelos processos (441627/2017-0) e (407519/2013-0)

## **Título: Cultivo de microalgas em soro de fécula**

### **RESUMO**

Microalgas são micro-organismos que pode conter em sua composição altos valores proteína, lipídios e carboidratos, componente este de grande interesse para aplicações biotecnológicas e em especial na indústria de alimentos. Entretanto existem alguns entraves econômicos que inviabilizam esta produção em larga escala. Sendo assim esse trabalho teve como objetivo de cultivar microalgas dulcícolas em fotobiorreator, usando como meio de cultura soro de fécula de mandioca (SFM) visando a obtenção de biomassa seca em grande quantidade para formulação de produtos alimentícios. Para isso foram cultivadas 4 cepas de microalgas *Coelastrum sp.*, *Oocystis sp.*, *Scenedesmus quadricauda*, *Scenedesmus sp.* e realizar a primeira prospecção que foi da concentração ideal de SFM para o crescimento celular, esse cultivo foi acompanhado pela técnica de citometria de fluxo, PAM e fluorescência in vivo. A segunda etapa se deu a partir do cultivo em SFM na concentração ideal para obtenção da biomassa seca e a partir dela determinar o rendimento e produtividade de biomassa, dos componentes bioquímicos e análises térmicas das cepas *Oocystis sp.*, *Scenedesmus quadricauda*, *Scenedesmus sp.* A terceira etapa ocorreu a partir da resposta da segunda etapa focando para o conteúdo proteico sendo assim a cepa selecionada para ser cultivada em fotobiorreator *Scenedesmus sp* usando como meio de cultivo o SFM, foram determinada na biomassa análises de lipídio, proteína, carboidrato, ésteres metílicos, perfil dos ácidos graxos e análise termogravimétrica. Em seguida as diferentes concentrações da goma de tapioca foram formuladas e realizadas as determinações físico-químicas da mesma. Dentre as quatro cepas estudadas 3 apresentaram melhor desempenho de crescimento no soro de fécula em diferentes concentrações (25% e 50%) além de expressar uma melhor estimativa de lipídio a cepa *Scenedesmus sp.* cultivada em SFM à 50% foi a que apresentou uma melhor resposta de conteúdo proteico (68%), logo esta cepa na especifica concentração de SFM foi cultivada em fotobiorreator e a biomassa obtida foi usada na formulação da tapioca. De forma geral, espécies viáveis para produção em larga escala, capazes de crescer em meio residual foram propostas neste estudo na perspectiva de um novo produto.

**Palavras-chaves:** Microorganismos fotossintetizantes. Meios residuais. Composição bioquímica. Goma de Tapioca.

## **Title: Cultivation of microalgae in starch serum**

### **ABSTRACT**

Microalgae are microorganisms that may contain in their composition high protein values, lipids and carbohydrates, a component of great interest for biotechnological applications and especially in the food industry. However there are some economic barriers that make this large-scale production unfeasible. Thus, this work aimed at cultivate sweet microalgae in photobioreactor using starch serum as culture médium cassava (SFM) in order to obtain large amounts of dry biomass for formulation of food products. For this, 4 strains of microalgae were cultivated. *Coelastrum sp.*, *Oocystis sp.*, *Scenedesmus quadricauda*, *Scenedesmus sp.* and perform the first Prospecting the ideal FMS concentration for cell growth, this culture was followed by flow cytometry, MAP and fluorescence in vivo. The second stage was based on SFM cultivation at the ideal concentration to obtain dry biomass. and from it determine the yield and productivity of biomass, components Biochemical and thermal analysis of *Oocystis sp.*, *Scenedesmus quadricauda*, *Scenedesmus sp.* The third stage occurred from the response of the second stage focusing on the protein content and thus the strain selected to be grown in photobioreactor *Scenedesmus sp* using SFM as a culture médium of lipid, protein, carbohydrate, methyl esters, fatty acid profile and analysis thermogravimetric. Then the different concentrations of tapioca gum were formulated and made the physicochemical determinations of the same. Among the four strains studied 3 presented better growth performance in starch serum in different concentrations (25% and 50%) and express a better estimate of lipid to strain. *Scenedesmus sp.* cultivated in 50% SFM showed the best response of protein content (68%), so this strain in the specific concentration of SFM was grown in photobioreactor and the biomass obtained were used in the tapioca formulation. In general, species viable for large-scale production capable of growing in waste media have been proposed in this study from the perspective of a new product.

**Keywords:** Photosynthetic microorganisms. Residual means. Biochemical composition. Tapioca Gum.

## LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1.</b> Diferentes produtos derivados das microalgas, campos de aplicações e tamanho de mercado.   | 25 |
| <b>Figura 2.</b> Modelos de tanques abertos de cultivo em massa de microalgas do tipo “raceways”.   | 28 |
| <b>Figura 3.</b> Modelo de fotobiorreator tubular para cultivo em massa de microalgas. <b>A:</b> tubos inclinados, <b>B:</b> em espiral.  | 29 |
| <b>Figura 4.</b> Modelo de fotobiorreator de placas planas para cultivo em massa de microalgas.   | 30 |
| <b>Figura 5.</b> Principais produtos de microalgas nas patentes depositadas.  | 33 |
| <b>Figura 6.</b> Desenvolvimento dos depósitos de patentes relacionadas a microalgas no mundo.  | 34 |
| <b>Figura 7.</b> Distribuição geográfica do número de depósitos de patentes com microalgas.   | 34 |
| <b>Figura 8.</b> Desenho Experimental do Estudos Realizados.  | 35 |
| <b>Figura 9.</b> Cultivo das microalgas em balões de 6L no LARBIM/UFPB.   | 40 |
| <b>Figura 10.</b> Processo de centrifugação da biomassa das microalgas cultivadas. Centrífuga refrigerada (Nova TécnicaNT825); Tubos de 500 mL.   | 41 |
| <b>Figura 11.</b> Processo de liofilização da biomassa das microalgas cultivadas. Liofilizador Terroni (modelo LD1500); Bandeja de alumínio com a biomassa concentrada.   | 41 |
| <b>Figura 12.</b> Cultivo de microalga em frascos mariotes no LARBIM/UFPB.  | 44 |
| <b>Figura 13.</b> Cultivo de microalga em fotobiorreator no LARBIM/UFPB.  | 44 |
| <b>Figura 14</b> Cama de decantação utilizada para colheita de biomassa de microalgas utilizada no LARBIM/UFPB.   | 45 |
| <b>Figura 15.</b> Preparo da goma de tapioca em diferentes concentrações de g de biomassa/100 gramas de goma.   | 46 |
| <b>ARTIGO 1</b>   |    |
| <b>Figura 1.</b> Curvas de crescimento das quatro espécies estudadas diferentes nas concentrações de SFM e em meio WC. <b>A:</b> <i>Coelastrum sp</i> , <b>B:</b> <i>Oocystis sp</i> , <b>C:</b> <i>Scenedesmus quadricauda</i> e <b>D:</b> <i>Scenedesmus sp</i> . | 64 |

**Figura 2.** Eficiência da fotossíntese ( $QY=Fv/FM$ ) das microalgas estudadas nas diferentes condições de cultivo: A) D316WC, B) D545WC e C) D338WC. **68**

**Figura 3.** Curvas da fluorescência da clorofila a (OJIP) das microalgas estudadas nas diferentes condições de cultivo: A1,B1,C1,D1 = Fase LAG, 48 h; A2,B2,C2,D2 = Fase LOG, 3º dia; A3,B3,C3,D4= Fase LOG, 8º dia e A4,B4,C4,D4= Fase Estacionária, 10º dia. **71**

## ARTIGO 2

**Figura 1.** Curvas de crescimento das três clorofíceas estudadas, nas diferentes C-concentrações de SFM e no meio WC (A- *Oocystis*; B- *Scenedesmus quadricauda*; *Scenedesmus sp.*). **86**

**Figura 2.** Teores de Proteínas, Carboidratos e Lipídeos na biomassa seca das cepas *Oocystis sp.* (D338WC), *Scenedesmus quadricauda* (D447WC) e *Scenedesmus sp.* (D545WC) cultivadas em meio WC e SFM. **89**

**Figura 3.** Percentual de ácido fólico na biomassa seca das cepas *Oocystis sp.*, pela *Scenedesmus quadricauda* e *Scenedesmus sp.* cultivadas em meio WC e SFM. Valores expressos em média  $\pm$  erro padrão (barras verticais). Colunas seguidas mesma letra não diferem significativamente ( $p < 0,05$ ). **91**

**Figura 4.** Estrutura química do ácido fólico. **91**

**Figura 5.** Teor de ésteres metílicos de ácidos graxos das cepas *Oocystis sp.* (D338), *Scenedesmus quadricauda* (D477) e *Scenedesmus sp.* (D545) cultivadas em meio WC e em SFM. **93**

**Figura 6.** Curva da TG das cepas *Oocystis sp.* (A,B), *Scenedesmus quadricauda* (C,D) e *Scenedesmus sp.* (E,F) cultivadas em meio WC e misto. **96**

## ARTIGO 3

**Figura 1** Preparo da goma de tapioca em diferentes concentrações de g de biomassa/100 gramas de goma. **110**

**Figura 2** Composição bioquímica *Scenedesmus sp.* cultivada em fotobiorreator, em meio de cultura preparado com soro de fécula de mandioca. **111**

**Figura 3** Perfil de ácido graxo da espécie *Scenedesmus sp.* cultivada em meio de cultura preparado com soro de fécula da mandioca em fotobiorreator. **112**

**Figura 4** Curva de TG para cepa *Scenedesmus sp.* cultivada em SFM. **113**

**Figura 5** Teores de Umidade, Atividade de água (Aw) e Cinzas na biomassa seca de *Scenedesmus* sp. cultivada no fotobiorreator em soro de fécula de mandioca. Valores expressos em média  $\pm$  erro padrão (barras verticais). Colunas seguidas pela mesma letra não diferem significativamente ( $p < 0,05$ ).

**115**

**Figura 6** Teor de Proteínas na biomassa seca de *Scenedesmus* sp. cultivada em meio SFM. Valores expressos em média  $\pm$  erro padrão (barras verticais). Colunas seguidas pela mesma letra não diferem significativamente ( $p < 0,05$ ).

**117**

## LISTA DE TABELAS

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Tabela 1.</b> Produção de mandioca no Brasil de 2014 até 2018 (em mil toneladas).                               | <b>32</b> |
| <b>Tabela 2.</b> Microalgas isoladas de ambientes aquáticos da Região Nordeste do Brasil estudadas nesta pesquisa. | <b>36</b> |
| <b>Tabela 3.</b> Composição do meio WC usado nos experimentos (Guillard; Lorenzen, 1972).                          | <b>37</b> |

### ARTIGO 1

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Tabela 1.</b> Microalgas selecionadas para cultivo em soro de fécula de mandioca   | <b>61</b> |
| <b>Tabela 2.</b> Parâmetros celulares determinados por citometria de fluxo nas microalgas cultivadas em meio WC e em diferentes concentrações de soro de fécula de mandioca. *indicam diferenças estatísticas significativas (Kruskal-Wallis, $p \leq 0,05$ ) |           |
| <b>Tabela 3.</b> Concentrações de SFM onde os maiores aumentos na síntese de lipídios foram registrados.  | <b>66</b> |
| <b>Tabela 3.</b> Concentrações de SFM onde os maiores aumentos na síntese de lipídios foram registrados.  | <b>67</b> |

### ARTIGO 2

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Tabela 1.</b> Microalgas selecionadas para cultivo nas diferentes concentrações de soro de fécula de mandioca.  | <b>84</b> |
| <b>Tabela 2.</b> Parâmetros de rendimento e produtividade de biomassa das microalgas cultivadas em meio sintético e alternativo. B=Biomassa total, P=Produtividade relativa à biomassa e RP=Relação de produtividade entre SFM e WC. | <b>87</b> |
| <b>Tabela 3.</b> Perfil de ácidos graxos das microalgas cultivadas em meio sintético e alternativo.  | <b>94</b> |
| <b>Tabela 4.</b> Temperaturas iniciais e finais de cada evento térmico e a respectiva perda de massa em amostras de microalgas cultivadas em meio sintético e alternativo.   | <b>97</b> |

## LISTA DE ABREVIATURAS

|        |  |
|--------|--|
| ANVISA | Agência Nacional de Vigilância Sanitária |
| SFM    | Soro de Fécula de Mandioca               |
| FDA    | Food and Drug Administration             |
| ANOVA  | Análise de variância                     |
| PUFA   | Ácidos Graxos Poli-insaturados           |
| UASB   | Upflow Anaerobic Sludge Blanket          |
| TG     | Análise Termogravimétrica                |

## SUMÁRIO

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO</b>  | <b>16</b> |
| <b>2 OBJETIVOS</b>   | <b>18</b> |
| <b>2.1 Objetivo Geral</b>  | <b>18</b> |
| <b>2.2 Objetivo Específico</b>   | <b>18</b> |
| <b>3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b>   | <b>19</b> |
| <b>3.1 Microalgas</b>  | <b>19</b> |
| <b>3.2 Cultivo de Microalgas e Aplicações Biotecnológicas</b>  | <b>23</b> |
| <i>3.2.1 Sistemas de Cultivo das microalgas</i>  | <b>28</b> |
| <i>3.2.2 Meios alternativos para cultivo de microalgas</i>   | <b>30</b> |
| <b>3.3 Fécula de mandioca</b>  | <b>31</b> |
| <b>3.4 Patentes de processos e produtos com microalgas</b>   | <b>33</b> |
| <b>4 METODOLOGIA</b>   | <b>35</b> |
| <b>4.1 Obtenção das culturas: coletas, isolamento e manutenção dos cultivos</b>  | <b>35</b> |
| <i>4.1.1 Etapa 1: Seleção de Espécies e ensaios de crescimento em meio alternativo preparado com Soro de Fécula de Mandioca</i>                      | <b>36</b> |
| <b>4.1.1.1 Preparação dos meios de cultivo</b>   | <b>37</b> |
| <b>4.1.1.2 Cultivo das microalgas nos meios sintético e alternativo</b>  | <b>38</b> |
| <i>4.1.2 Etapa 2: Produção de biomassa e caracterização dos compostos bioativos no meio controle e em soro de fécula de mandioca</i>                 | <b>39</b> |
| <b>4.1.2.1 Análises dos componentes químicos na biomassa seca</b>  | <b>41</b> |
| <i>4.1.3 Etapa 3: Cultivo de Scenedesmus sp em fotobiorreator a aproveitamento da biomassa no enriquecimento da tapioca</i>                          | <b>43</b> |
| <b>4.1.3.1 Preparo da goma de tapioca</b>  | <b>45</b> |
| <b>4.1.3.2 Determinações físico-químicas da goma de tapioca enriquecida com biomassa seca de microalga</b>   | <b>46</b> |
| <b>4.2 Análise estatística</b>   | <b>46</b> |
| <b>REFERÊNCIAS</b>   | <b>47</b> |
| <b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO – ARTIGOS ORIGINAIS</b>  | <b>56</b> |
| <b>5.1 ARTIGO 1: UTILIZAÇÃO DO SORO DE FÉCULA DE MANDIOCA PARA O CULTIVO DE MICROALGAS POTENCIALMENTE IMPORTANTES PARA A INDÚSTRIA DE ALIMENTOS.</b> | <b>57</b> |

|  |            |
|--|------------|
| <b>5.2 ARTIGO 2: CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA BIOMASSA DE MICROALGAS CULTIVADAS EM MEIO DE CULTURA PREPARADO A PARTIR DE SORO DE FÉCULA DE MANDIOCA</b>   | <b>79</b>  |
| <b>5.3 ARTIGO 3: ENRIQUECIMENTO DA GOMA DA TAPIOCA COM BIOMASSA SECA DE <i>Scenedesmus</i> sp. CULTIVADA EM FOTOBIORREATOR EM MEIO ALTERNATIVO PREPARADO COM SORO DE FÉCULA DE MANDIOCA.</b> | <b>104</b> |
| <b>6 CONCLUSÃO GERAL</b>   | <b>122</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

As microalgas são organismos microscópicos, usualmente unicelulares e predominantemente fotoautotróficos, responsáveis por produzirem quase a metade do oxigênio da atmosfera terrestre e transformação do gás carbônico em compostos orgânicos com utilização de requerimentos nutricionais relativamente simples.

Ou seja pelo processo da fotossíntese elas metabolizam óleo, ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) incluindo os ômega  $\omega$ -3,  $\omega$ -6 e  $\omega$ -9, esteróis, pigmentos naturais, açúcares, antioxidantes, fenóis, aldeídos, vitaminas, aminoácidos, enzimas e compostos bioativos os quais são objetos de interesse por diversas indústrias a exemplo da indústria alimentar, química ou energética.

Logo o interesse pela comercialização dessa biomassa vem ganhando cada vez mais força assim como a otimização do processo do cultivo. Entretanto existem alguns entraves destacando o custo dos meios de cultura sintéticos, usualmente muito dispendiosos como um gargalo importante que precisa ser superado para tornar a tecnologia das microalgas mais competitiva com outros mercados.

É neste contexto que entram as pesquisas com meios alternativos de baixo custo para a produção de biomassa. Uma alternativa é o uso de efluentes agroindustriais para a formulação desses meios, que podem reduzir custos de produção, melhorar o balanço energético, e ainda, reduzir o impacto ambiental causado pelo descarte inapropriado desses resíduos.

Um dos resíduos que pode ser promissor no cultivo das microalgas é o soro da fécula da mandioca, um efluente ainda pobremente estudado a respeito, e muito presente nas áreas de produção de farinha e goma.

É nessa vertente que gera a motivação para o primeiro artigo desse trabalho apresentado no capítulo 3 onde utiliza o soro de fécula de mandioca, este o resíduo do processo de produção da goma de tapioca para o cultivo das cepas de microalgas realizando uma prospecção de melhor adaptação desses microrganismos e caracterização da biomassa.

Na literatura há diversos tipos de meios preparados a partir vários tipos de efluentes agroindustriais já foram testados na produção de biomassa de microalgas, incluindo: resíduos de suinocultura, produção industrial de papel e celulose, de fazendas leiteiras, da cana-de-açúcar, da produção de cerveja, da fabricação de carpetes, da

produção comercial de peixes em cativeiro, do processamento de óleo de palma, biocomposto de hortifrútiis, biocomposto derivado da cana-de-açúcar e vinhaça, esterco de galinha, e preparado com excrementos de frango e até mesmo esgoto doméstico.

Porém esses meios precisam passar por um tratamento que exigem diversas etapas diferente do soro da fécula de mandioca que só se faz necessário uma filtração e esterilização. Isso é um detalhe importante pensando em um cultivo em escala industrial que busca um processo eficaz e de forma rápida. Para a indústria da goma de tapioca que sempre quer inovar o usar o resíduo da sua produção para cultivo de microalga gera uma perspectiva de incremento nutricional para o produto de sua fabricação.

Sendo assim a oportunidade do estudo inédito está no desenvolvimento de um novo ciclo na indústria de goma de tapioca, cultivando microalgas em larga escala usando resíduo gerado na produção da goma de tapioca, obtendo biomassa para ser usada como formulação de um novo produto.

A tapioca é bastante consumida principalmente nas região Norte e Nordeste do Brasil de diversas maneiras e em várias refeições em um dia. Entretanto por mais que ela seja um alimento de alto valor energético, rico em amido, que possui fibras e alguns minerais como potássio, cálcio, fósforo, sódio e ferro, é pobre em proteína e lipídios o que se torna um problema sério nas regiões onde ela é muito consumida. Baseado nesse conceito o capítulo 4 foca no desenvolvimento do cultivo em fotobiorreator usando como meio alternativo o soro de fécula de mandioca no intuito de obter uma biomassa com alto capacidade nutricional para ser utilizada em novo conceito de goma de tapioca.

Um trabalho experimental que mostra rendimento de biomassa, formulação de novo produto e caracterização físico-química desse produto. Para o consumo da tapioca se faz necessário o seu cozimento em fogo convencional este, chegando até 100°C. Logo foi importante a realização dos ensaios térmicos.

As seguintes hipóteses embasaram esta pesquisa: a) microalgas que sintetizam altas taxas de proteína e lipídios podem ser cultivadas em meio alternativo formulado a partir de resíduos oriundos do processamento da mandioca; b) microalgas cultivadas nesse tipo de meio podem melhorar as condições proteicas, quando incorporadas aos alimento.

Por fim, no capítulo 5, encontram-se a conclusão geral que compara os resultados dos dois trabalhos e algumas recomendações para trabalhos futuros.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Testar a capacidade de crescimento de microalgas em meio de cultura preparado a partir de fécula de mandioca, e sua capacidade de produção de componentes bioativos, em ensaios laboratoriais de bancada e num fotobiorreator tubular em outdoor.

### **2.2 Objetivo Específico**

- Cultivar microalgas selecionadas junto ao banco de culturas do LARBIM/UFPB, isoladas de ambientes aquáticos do Nordeste brasileiro, em escala de bancada em meio sintético e em meio alternativo de baixo custo preparado a partir do soro da fécula da mandioca.
- Selecionar dentre as espécies cultivadas aquelas que apresentem maiores rendimentos proteicos e lipídicos;
- Testar o crescimento das espécies mais produtivas de proteínas e lipídios em meio de cultura preparado com diferentes percentuais de soro de fécula (100%; 75%; 50 e 25%) no intuito de estabelecer quais concentrações propiciam melhor desenvolvimento e avaliar a fisiologia e o metabolismo celular das espécies durante os cultivos.
- Determinar os componentes bioquímicos das microalgas cultivadas nas diferentes condições testadas e avaliar a estabilidade térmica das biomassas obtidas;
- Cultivar num fotobiorreator tubular a espécie com melhor desempenho no meio alternativo e com o melhor teor proteico e melhor estabilidade térmica, avaliando seu rendimento em biomassa, teor de lipídios, proteína, carboidrato e ácidos graxos.
- Enriquecer a goma de tapioca com biomassa de microalga de alto teor proteico.
- Realizar a caracterização físico-química da goma de tapioca.

### 3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

#### 3.1 Microalgas

Originalmente, o termo alga foi proposto como uma categoria taxonômica por Lineu em 1753, em seu livro *Species Plantarum*. Porém, este termo é considerado por incluir desde organismos unicelulares a gigantescas formas com talos multicelulares, que apresentam formação de tecido e divisão de trabalho (BICUDO, 2006). Portanto, a classificação proposta por Lineu não é natural, mas meramente ecológica visto que a única característica que os diferentes grupos referidos como algas possuem em comum é a autotrofia (CALIJURI, 2006).

Segundo Smith (1987), as algas distribuem em 14 classes de organismos separados entre si por caracteres fisiológicos das células vegetativas e morfologia das células reprodutoras, bem como composição dos pigmentos nas células vegetativas, substância de reserva, e posição dos flagelos. Tais elementos integram a base moderna da taxonomia das algas e permite dividir este grupo bastante heterogêneo em 14 classes de organismos: Chlorophyceae, Phaeophyceae, Rhodophyceae, Cyanophyceae, Euglenophyceae, Xanthophyceae, Chrysophyceae, Bacillariophyceae, Dynophyceae e Cryptophyceae.

Por incluírem seres procariontes e eucariontes, e estes apresentando diferentes tipos de cloroplastos, Lee (1999) considerou tais características e dividiu as algas em nove filos: Cyanophyta, Glaucophyta, Rodophyta, Chlorophyta, Euglenophyta, Dinophyta, Heterokontophyta, Prymnesiophyta (Haptophyta), e Cryptophyta. Porém, atualmente, as algas estão divididas de acordo com seu conteúdo pigmentar em três grandes grupos congregando 13 divisões, a saber: algas que possuem clorofila-*a*, incluídas nesta categoria as Cyanophyta e Rhodophyta; algas com clorofilas *a* e *b*, que englobam as Prochlorophyta, Chlorachniophyta, Chlorophyta e Euglenophyta; e algas com clorofilas *a* e *c*, que englobam as Chrysophyta, Xanthophyta, Bacillariophyta, Phaeophyta, Haptophyta, Dinophyta e Cryptophyta (BELL E HEMSLEY, 2000).

O termo microalga é, portanto, uma expressão sem importância taxonômica. Abrange diferentes grupos de organismos que não guardam entre si nenhuma similaridade quanto à origem, morfologia, e composição química, que congrega uma enorme diversidade de organismos microscópicos que são em sua maioria fotossintetizantes. Também existem formas heterótrofas facultativas ou mixotróficas, que absorvem diferentes formas de carbono orgânico do meio, e poucas heterotróficas

obrigatórias, que não possuem clorofila e, portanto, incapazes de sintetizar substância de reserva pela fotossíntese (BRENNAN e OWENDE, 2009).

São predominantemente aquáticos onde integram as comunidades fitoplanctônicas ou perifíticas, constituindo a base das cadeias tróficas servindo como alimento direto para diferentes tipos de organismos e responsáveis por nada menos que 60% da produção primária da Terra (ARREDONDO-VEGA, 1995; CHISTI, 2004; DERNER, 2006; LOURENÇO, 2006; SHEEHAN *et al.*, 1998; SHELEF; SOEDER, 1980; SASSI, 2016). Nesses ambientes, sua abundância e sazonalidade depende da disponibilidade dos nutrientes no meio, necessariamente de nitrogênio, fósforo, sílica e ferro, cuja presença ou escassez regula a produtividade primária em oceanos, lagos, reservatórios e ambientes estuarinos. No meio marinho os representantes do fitoplâncton em conjunto absorvem algo em torno de 50% de todo o CO<sub>2</sub> atmosférico resultante de atividades humanas, exercendo assim papel fundamental no ciclo global do carbono (RAVEN, 2007).

Apesar de serem predominantemente aquáticos microalgas colonizam diferentes tipos de ambiente e se adaptaram no decorrer da evolução biológica da Terra a diferentes condições. Assim, podemos encontrar microalgas em locais úmidos de altas e baixas temperaturas, diferentes pH, e hipersalinos, vivendo sobre outras macroalgas e vegetais aquáticos como epifíticas, associadas a substratos como perifíticas, muitas podem viver como epizóicas de vários animais ou endozóicas em associação simbiótica mutualística com líquens e vários tipos de animais, a exemplo de corais, anêmonas, foraminíferos e diversos protozoários, outras vivem como formas endofíticas, psamófilas, cavernícolas, sobre a neve, e em ambientes terrestres úmidos (HASLE *et al.*, 1996; LOURENÇO, 2006; REVIERS, 2006).

Todas as microalgas possuem clorofila-a, porém distinguem-se entre si pelos tipos de pigmentos que contém. As cianobactérias (Divisão Cyanophyta) são procariontes (não possuem núcleo organizado, mitocôndria e nem cloroplastos), possuem clorofila-a e alguns pigmentos acessórios, como ficocianina, ficoeritrina e aloficocianina que fornecem aos representantes do grupo a coloração verdeazulada característica do grupo (LORENZI, 2008). Também possuem  $\beta$ -caroteno, zeaxantina, mixoxantina e outros (BELL e HEMSLEY, 2000; RAVEN, 2007), e como produto de reserva armazenam o glicogênio (LEE, 1999).

As clorofíceas (Divisão Chlorophyta) são dotadas de clorofila-a e b, mas também possuem vários outros pigmentos como os carotenoides, enquanto que as

diatomáceas (Bacillariophyta) possuem clorofila-*a* e *c*, e carotenoides, enquanto que os dinoflagelados (Divisão Dinophyta) contém as clorofilas-*a* e *c*, além de caroteno e xantofilas, sendo a peridininina a mais abundante (BELLINGER; SIGEE, 2010).

Por serem procariotos e possuírem uma parede celular que contém polipeptideoglucano mureína as cianobactérias são classificadas juntamente com as bactérias (BELL e HEMSLEY, 2000) e seus representantes são identificados taxonomicamente usando caracteres morfológicos que seguem tanto o código internacional de nomenclatura botânica como o código de nomenclatura bacteriano utilizando, neste caso, as técnicas de biologia molecular com base no sequenciamento genético. O número total de espécies de cianobactérias é desconhecido, porém estima-se que existam cerca de 150 gêneros e 2.000 espécies (FRANCESCHINI, 2010; LOURENÇO, 2006), muito embora segundo o Algaebase há um total de 4.171 espécies e variações descritas atualmente (ALGAEBASE, 2014).

Muitos representantes de cianobactérias fixam o nitrogênio atmosférico através de células especializadas, os heterocistos, convertendo-o em amônia e tornando-o disponível para diversas reações biológicas. A exemplo citam-se as espécies marinhas *Trichodesmium. erythraeum* que ocorre em diferentes partes do globo e muito comum na região Nordeste do Brasil onde forma densas florações em águas superficiais pobres em nutrientes (SATÔ e PARANAGUA, 1966; CARVALHO *et al.*, 2008), e *Richelia intracellularis*, endofítica obrigatória de algumas diatomáceas a exemplo de *Rhizosolenia hebetata* (MADHU *et al.*, 2013), *Hemiaulus hauchi* e *Hemiaulus membranaceus* (HEINBOKEL, 1986; KIMOR *et al.*, 1978), *Rhizosolenia clevei* (SUNDSTRÖM, 1984), *Rhizosolenia styliformis* (OSTENFELD e SCHMIDT, 1898) e *Chaetoceros compressus* (GÓMEZ *et al.*, 2005).

Dentre os eucariotas destacam-se as diatomáceas (Bacillariophyta) como os principais representantes do fitoplâncton marinho, as quais estão representadas por cerca de 285 gêneros com 10.000 a 12.000 espécies conhecidas (REVIERS, 2006) muito embora estima-se que existam cerca de 200.000 espécies (ARMBRUST, 2009). Apresentam como característica principal o fato de possuírem uma parede celular de natureza silicosa, denominada frústula, que é geometricamente ornamentada e cujos caracteres tem grande valor taxonômico (ROUND *et al.*, 1990). A simetria das frústulas divide as diatomáceas em dois grupos, as penadas simetria bilateral, e as cêntricas com simetria radial.

As diatomáceas armazenam a crisolaminarina como produto de reserva da fotossíntese (BEATTIE *et al.*, 1961) e além da clorofila-*a* também possuem clorofila-*c*<sub>1</sub> e *c*<sub>2</sub>, fucoxantina e várias xantofilas como a diadinoxantina e diatoxantina responsáveis pela coloração marrom dourada típicas das células (REVIERS, 2006; LEE, 2004).

As clorofíceas, por sua vez, que foram um dos principais grupos de estudo nesta pesquisa, congregam as chamadas algas verdes e estão representadas por 17.000 espécies, das quais aproximadamente 10% são marinhas e 90% dulcícolas (LOURENÇO, 2006; SMITH, 1987), muito embora segundo o Agaabase (2014) são reconhecidas somente 5.681 espécies desse grupo. Muitas espécies são conhecidas por colonizarem lugares úmidos no ambiente terrestre, outras ocorrem em fitotelmos (SOPHIA, 1999), outras, como algumas espécies dos gêneros *Chlamydomonas* e *Chloromonas*, crescem sobre a neve (RAVEN, 2007), e outras, ainda, formam associações simbióticas com líquens e vários outros organismos, incluindo ciliados, heliozoa e invertebrados como *Hydra*, *Spongilla* e anêmonas-do-mar (PRÖSCHOLD *et al.*, 2011; LEWIS, 2004).

As clorofíceas estão representadas por formas flageladas, cocóides, filamentosas, ou raramente foliácea, e sua reprodução pode ser tanto assexual como sexual e se dá por isogamia, anisogamia ou oogamia (BELL e HEMSLEY, 2000). Se acham divididas em nove classes, sendo que a classe Chlorophyceae é a mais abundante, congregando as Ordens: Volvocales, Tetrasporales, Chlorococcales, Chaetophorales e Oedogoniales (BELL e HEMSLEY, 2000).

A cor verde típica das clorofíceas se deve ao fato de que as clorofilas *a* e *b* se sobressaem sobre os demais pigmentos. Alterações na coloração se deve à presença de carotenoides (SMITH, 1987; RAVEN, 2007), sendo que destes o  $\beta$ -caroteno, luteína, zeaxantina e neoxantina são os mais abundantes (LEE, 1999; BELL e HEMSLEY, 2000). Como produto de reserva da fotossíntese as clorofíceas armazenam o amido no interior dos pirenóides (SMITH, 1987; RAVEN, 2007).

As microalgas representam atualmente um dos grupos de topo da biotecnologia. Por serem facilmente cultiváveis e pela capacidade de sintetizarem diversos compostos de interesse possuem diversas aplicações, quer seja para a alimentação humana e animal e para as indústrias química e farmacêutica, e geração de energia, sendo que a evolução dos sistemas de cultivo tem permitido obter enormes quantidade de biomassa em áreas pequenas.

As microalgas têm sido consideradas como um importante alimento do futuro (SIMOLTON, 2018, <https://science.howstuffworks.com/innovation/edible-innovations/algae-food-future.htm>, acessado em 10/09/2019), e cada vez mais esse universo vem sendo explorado no âmbito de avaliar o seu potencial biológico, biotecnológico e nutricional, visando as algas como alimentos funcionais (AMBROSI *et al.*, 2009; DERNER *et al.*, 2006; SPOLAORE *et al.*, 2006), numa tendência de se incorporar microalgas em produtos alimentícios inovadores, com potenciais benefícios à saúde (CAPORGNO e MATHYS, 2018).

A exploração comercial de algas verdes microscópicas compreende relativamente poucos gêneros, entre os quais destacam-se: *Chlorella*, *Dunaliella*, *Haematococcus* e *Botryococcus braunii* (TOMASELLI, 2004). A espécie *Chlorella vulgaris* (Ordem Chlorococcales, família Oocystaceae) apresenta forma de vida celular ou colonial, e pode acumular pigmentos como clorofila *a* e *b*,  $\beta$ -caroteno e xantofilas, e sua principal fonte de reserva energética é o amido (WILSON & HUNER, 2000). O gênero é cosmopolita e se apresenta como pequenas células globulares (3–8  $\mu\text{m}$  de diâmetro) e inclui espécies com tolerância a altas temperaturas, já que algumas podem crescer entre 15°C e 40°C. *Chlorella* é utilizada como suplemento alimentar e alimento saudável e também na indústria de cosmético e farmacêutica. Contém em sua composição proteínas, carotenóides, imunostimuladores, polissacarídeos, vitaminas e minerais (MASOJÍDEK *et al.*, 2010). Apresenta alta produtividade em cultivo sendo um dos organismos mais comumente utilizados na produção de biomassa de algas (GÖRS *et al.*, 2009).

### 3.2 Cultivo de Microalgas e Aplicações Biotecnológicas

Do ponto de vista histórico o primeiro cultivo de microalga é atribuído ao alemão Ferdinand Cohn, que em 1850 conseguiu manter viva por algum tempo em seu laboratório uma alga verde flagelada de água doce do gênero *Haematococcus*, e os primeiros estudos experimentais com microalgas em cultivo foram efetuados por Famintzin, em 1871, que desenvolveu estudos relacionados à fisiologia de *Chlorococcum infusionum* e *Protococcus viridis* em cultivos, com soluções de sais inorgânicos, verificando que estes eram necessários para o desenvolvimento das espécies. Estes resultados entusiasmaram outros estudiosos e no período de 1890 a 1893 o pesquisador Beijerinck obteve sucesso no cultivo de *Chlorella* sp. e *Scenedesmus* sp.,

usadas por Warburg no começo do século XX em estudos no campo da fisiologia (SASSI, 2016).

Os primeiros trabalhos procuraram entender relações das microalgas com o meio e aprimoramento das técnicas de isolamento e purificação dos cultivos, formulações dos meios de cultura e fisiologia celular e a introdução de técnicas de diluição seriada e uso de micropipetas para obtenção de culturas monoespecíficas.

O avanço do conhecimento sobre as microalgas em cultura evoluiu logo na primeira metade do século XX, com a diversificação das pesquisas sobre bioquímica, fisiologia, ontogenia, ecologia e genética, levando inevitavelmente este conhecimento ao interesse por cultivos que propiciassem a obtenção de biomassa e possíveis aplicações comerciais, especialmente no que concerne à produção de alimento, com inúmeros trabalhos sobre cultivos em massa desenvolvidos na década de 1950. Burlew (1953) resumiu todo conhecimento da época em seu livro clássico “*Algal Culture From Laboratory to Plant Pilot*”.

Nos anos 60 já haviam sido implantadas fazendas de produção em massa de *Chlorella* no Japão, e na década seguinte foram estabelecidas fazendas de produção de *Spirulina* no México e na Tailândia, e em 1980 já existiam 46 fábricas de biomassa de microalgas em operação na Ásia (KAWAGUCHI, 1980).

Como consequência da crise energética internacional após 1970, aumentou o interesse pelas pesquisas voltadas para aplicações das microalgas em diversas áreas da biotecnologia (VONSHAK, 1990), ocasião em que se alertava sobre a necessidade de reduzir custos de produção a fim de tornar a biomassa de microalgas uma mercadoria comercializada em grandes quantidades, e acerca da necessidade de desenvolvimento de reatores adequados para atender com mais eficácia essa demanda.

Portanto, o interesse por este universo de pesquisa não é coisa recente. Há mais de 30 anos já apareciam trabalhos de revisão ressaltando a importância de diversos nichos de mercado de diferentes produtos derivados das microalgas (**Figura 1**), apontando também as baixas exigências ambientais de cultivos em massa como solos inadequados para a agricultura e águas salinas ou de baixa qualidade (BENEMANN, 1987).

*Products from microalgae*

| Products            | Uses                     | Approx. value  | Approx. <sup>a</sup> market | Algal genus or type                 | Current product content | Reactor system or concept | Current status      |
|---------------------|--------------------------|--|-----------------------------|-------------------------------------|-------------------------|---------------------------|---------------------|
| Isotopic compounds  | medicine research        | >\$1000/kg <sup>-1</sup>                             | small                       | many                                | >5%                     | tubular, indoors          | commercial          |
| Phycobili-proteins  | research                 | >\$10 000 kg <sup>-1</sup>                           | small                       | red                                 | 1–5%                    | tubular, indoors          | commercial          |
| Pharmaceuticals     | food color               | >\$100 kg <sup>-1</sup>                              | small                       | blue–greens                         |                         | indoors                   | commercial          |
|                     | anticancer               | Unknown  | unknown                     | blue–greens                         | 0.1–1%                  | tubular, fermentor        | research            |
|                     | antibiotics              | (very high)  | unknown                     | other                               |                         |                           |                     |
| β-Carotene          | food suppl.              | >\$500 kg <sup>-1</sup>                              | small                       | <i>Dunaliella</i>                   | 5%                      | lined pond                | commercial          |
|                     | food color               | \$300 kg <sup>-1</sup>                               | medium                      | <i>Dunaliella</i>                   |                         |                           |                     |
| Xanthophylls        | chicken feed             | \$200–500 kg <sup>-1</sup>                           | medium                      | greens, diatoms, etc.               | 0.5%                    | unlined pond              | research            |
| Vitamins C & E      | vitamins                 | C: >\$10 kg <sup>-1</sup><br>E: >50 kg <sup>-1</sup> | medium                      | greens                              | <1%                     | fermentor                 | research            |
| Health foods        | supplements              | \$10–20 kg <sup>-1</sup>                             | medium to large             | greens                              | 100%                    | fermentor lined pond      | research commercial |
| Polysaccharides     | viscosifiers             | \$5–10 kg <sup>-1</sup>                              | medium to large             | <i>Chlorella</i> , <i>Spirulina</i> |                         |                           |                     |
|                     | gums                     |  |                             | <i>Porphyridium</i>                 | 50%                     | lined pond                | research            |
| Bivalves feeds      | seed raising             | \$20–100 kg <sup>-1</sup>                            | small                       | others                              |                         |                           |                     |
|                     | aquaculture              | \$1–10 kg <sup>-1</sup>                              | large                       | diatoms                             | 100%                    | lined pond                | commercial          |
| Soil inoculum       | conditioner, fertilizers | >\$100 kg <sup>-1</sup>                              | unknown                     | <i>Chrysophytes</i>                 |                         |                           |                     |
|                     |                          |  | unknown                     | <i>Chlamydomona</i>                 | 100%                    | indoor lined pond         | commercial research |
| Amino acids         | proline                  | \$5–50 kg <sup>-1</sup>                              | small                       | N-fixing species                    |                         |                           |                     |
|                     | arginine                 | \$50–100 kg <sup>-1</sup>                            | small                       | <i>Chlorella</i>                    | 10%                     | lined pond                | research            |
|                     | aspartic acid            | \$2–5 kg <sup>-1</sup>                               | large                       | blue–greens                         | 10%                     | lined pond                | conceptual          |
| Single cell protein | animal feeds             | \$0.3–0.5 kg <sup>-1</sup>                           | very large                  | blue–greens                         | 10%                     |                           |                     |
|                     |                          |  |                             | green algae                         | 100%                    | unlined pond              | research            |
|                     |                          |  |                             | others                              |                         |                           |                     |
| Veg and marine oils | foods, feeds             | \$0.4–0.6 kg <sup>-1</sup>                           | very large                  | greens                              | 30%                     | unlined                   | research            |
|                     | supplements              | \$3–30 kg <sup>-1</sup>                              | small                       | diatoms                             |                         | lined pond                |                     |

<sup>a</sup> Market sizes: small, US\$1–10 million; medium, US\$10–100 million; large, more than US\$100 million

**Figura 1.** Diferentes produtos derivados das microalgas, campos de aplicações e tamanho de mercado.

**Fonte:** Benemann *et al.*, 1987.

No final do século XX e início do século XXI esses estudos se intensificaram diversificando-se em diversas áreas de interesse incluindo alimentos, energia, fármacos, química, nanotecnologia, biofertilizantes e tratamento de resíduos e efluentes (ANDERSEN, 2005; LOURENÇO, 2006; BERTOLDI *et al.*, 2008).

A evolução natural das pesquisas permitiu um vasto conhecimento sobre as técnicas de cultivo e produção de biomassa em larga escala, e as múltiplas aplicações e possibilidades de uso em várias áreas tornaram-se cada vez mais possível, razão pela qual a biotecnologia das microalgas deve continuar a ser uma área prioritária de pesquisa. Atualmente, este campo de investigação destaca-se entre os modernos processos microbiológicos com o desenvolvimento de grande quantidade de trabalhos e diversidade de assuntos, e inúmeras frentes de pesquisa (NAGARAJAN; MARUTHANAYAGAM; SUNDARARAMAN, 2012).

Dentre esses múltiplos interesses exemplifica-se a produção e aproveitamento de inúmeros compostos bioativos, como os antioxidantes, proteínas, polissacarídeos, vitaminas e antibióticos, importantes nas indústrias de alimentos e farmacêutica, e os

lipídios, produzidos em grande quantidade em muitas espécies, que tem reforçado o interesse na produção biocombustíveis.

Na indústria farmacêutica, por exemplo, a busca moléculas bioativas oriundas das microalgas permitiu a extração de vitaminas, ácidos graxos polinsaturados como os ácidos eicosapentanóico (EPA) e decosaheptaenoico ácido (DHA), e clorofila (CHU, 2012), além de inúmeros outros metabólitos secundários, como alcaloides, nucleosídeos, aminoácidos, etc., que com inúmeras possibilidades de aplicação (SANTANA, 2019).

Na cosmetologia, extratos de microalgas são encontrados em produtos de cuidados para a pele e rosto (cremes antienvhecimento, produto regenerador ou refrescante), em formulações para cabelo e proteção solar. Um exemplo comercialmente disponível é um shampoo o Absolut Repair Pós-Química, formulado a partir de um complexo pró-*Spirulina*, composto de vitamina E, Ácido Glutâmico, fito-lipídios, Intra-ciclano, Ácido lactínico e Ceramida-R, produzido e comercializado pela L'OREAL-Paris. Cita-se ainda, o extrato de *Clorella vulgaris* que atua na síntese de colágeno na pele, na regeneração de tecidos, contribuindo para a redução do envelhecimento (Dermochlorella, Codif, St. Malo, França) (SPOLOARE *et al.*, 2006; BUONO *et al.*, 2012; ARIEDE, 2016).

No campo energético, as microalgas têm recebido muita atenção e hoje se admite que a principal energia para o futuro com possibilidades reais de atender a enorme demanda da sociedade será dependente do cultivo e processamento desses organismos (TEIXEIRA; MORALES, 2008; MENG *et al.*, 2009; MONTERO; ARISTIZÁBA; REINA, 2011; GONG; JIANG, 2011). Neste contexto, as inúmeras frentes investigativas sobre energias de microalgas têm apontado que elas poderão ser importantes fontes de biodiesel, bioetanol, biogás, bioquerosene e biohidrogênio (ZHU, 2015). As vantagens ambientais ligadas à mudança de fontes de energias não renováveis por renováveis seguramente se relacionam ao crescimento de uma nova indústria de produção de energia baseada nas bio-substâncias extraídas de biomassa produzida (ALMEIDA, 2017).

Aplicações das microalgas na indústria química incluem a produção de plásticos verdes, detergentes, produtos de limpeza verdes, e polímeros biodegradáveis, não-tóxicos, que podem ser comercializados a preços compatíveis aos produtos derivados do petróleo.

Na área de alimentos grande ênfase tem sido dada no sentido de formulação de nutracêuticos e alimentos funcionais. A aplicação de novas abordagens científicas e técnicas na transformação de alimentos, e a introdução de novos alimentos são consideradas de extrema importância, a fim de atender as demandas atuais dos consumidores. A procura cada vez maior por alimentos naturais tem gerado esforços no sentido de promover a sua utilização como um elevado suplemento de proteína na nutrição humana. (MATA *et al.*,2010). A exemplo, podemos citar alguns alimentos como macarrão, biscoitos, barra de cereais e outros produtos funcionais, que já foram desenvolvidos fazendo uso de microalgas (COSTA, 2006; FIGUEIRA *et al.*,2011; LEMES *et al.*,2012; RODRÍGUEZ *et al.*,2014; ALMEIDA *et al.*,2017).

Os pigmentos são bastante explorados pela indústria alimentícia devido às suas propriedades como a astaxantina, o qual foi estudado e analisado o seu potencial para prevenção do envelhecimento, por possuir uma excelente atividade antioxidante (RAJA & HEMAISWARYA, 2010).

Segundo Richmond (2004), *Spirulina*, *Chlorella*, *Dunaliella* e *Scenedesmus*, ao serem processadas de forma correta possuem um sabor atraente, podendo essas microalgas serem usadas como ingredientes para diversos tipos de alimentos humanos. *Spirulina* e *Chlorella* já são comercializadas podendo ser vistas em prateleiras em várias formas, como em pó, tabletes, cápsulas ou extratos, e possuem em sua composição proteínas, carotenoides, polissacarídeos, vitaminas e minerais (DERNER *et al.*,2006; MASOJÍDEK *et al.*,2010). Há relatos de que ainda hoje os nativos do Chade, em determinadas épocas do ano, fazem uso exclusivamente da biomassa de *Spirulina* na sua alimentação (JOURDAN, 1996). Entretanto, apesar das microalgas serem fontes viáveis de bioenergia, biofármacos, cosméticos, alimento, etc., ainda persistem várias limitações e desafios que precisam ser superados visando transferir a tecnologia da fase piloto para o nível industrial. Questões como melhoramento das taxas de crescimento e produtividade das microalgas em cultivo, estabilidade na síntese de produtos de interesse, técnicas de coleta e secagem da biomassa, engenharia de sistemas de produção voltados para o processamento da biomassa, melhoramento genético e engenharia metabólica das estirpes voltados para o aumento da síntese de lipídios, avaliação de custo-eficácia, avaliação do ciclo de vida, e implicações políticas (ZHU, 2015) representam hoje os principais focos e interesse. Portanto, não resta dúvidas de que o grande impacto da biotecnologia das microalgas na nossa sociedade futura será

uma consequência desejável (e indispensável) do progresso científico, conforme já alertava Vonshak (1990).

### 3.3.1 Sistemas de Cultivo das microalgas

Em grande escala, as algas podem ser cultivadas em tanques abertos e em sistemas fechados. Os sistemas abertos representam uma forma natural de cultivo visto que estes são desenvolvidos ao ar livre estando sujeitos, por conseguinte, às variações da temperatura, da luminosidade e de inúmeras intempéries do ambiente. Por tais motivos são muito susceptíveis à contaminação que dificulta a garantia de obtenção da qualidade da biomassa produzida e reduz a produtividade (AZEREDO, 2012; VIÊGAS, 2010; FRANCO *et al.*, 2013).

Também chamados de lagoas ou “raceways” (*raceway paddle wheel mixed open ponds*) esse sistema é a forma mais antiga de se obter biomassa microalgal em quantidade. Podem ser encontrados em várias configurações como os tanques circulares ou canais longos com agitação de forma bem artesanal até as mais sofisticadas. Usualmente são equipados com sistemas mecânicos de movimentação dos cultivos a fim de evitar a sedimentação das células e, por conseguinte, diminuição na produtividade (AZEREDO, 2012; FRANCO *et al.*, 2013) (**Figura 2**).



**Figura 2.** Modelos de tanques abertos de cultivo em massa de microalgas do tipo “raceways”.

**Fonte:** ADAPTADO de Santos, 2013.

Tanques abertos apresentam custo relativamente baixo de construção, instalação e manutenção, mas, pode existir grande gasto com energia elétrica para homogeneizar os meios de cultivo e movimentar as células. Apesar das dificuldade este sistema é

bastante utilizado em muitos países para obtenção de biomassa em escala comercial (GRESSLER, 2016).

Os sistemas fechados utilizados nos cultivos em massa de microalgas são genericamente denominados de fotobiorreatores e oferecem vantagens em relação aos cultivos abertos por viabilizarem a diminuição de contaminações e permitirem automação, facilitando o controle das condições de cultivo necessárias para a multiplicação celular. As limitações relacionadas aos fotobiorreatores incluem: alto preço de instalação, superaquecimento e entupimento, exigindo usualmente custos operacionais e de manutenção dos cultivos (ARAÚJO, 2018).

Usualmente são construídos com tubos transparentes de plástico, vidro ou acrílico (**Figura 3A e 3B**), ou placas planas (**Figura 4**), podendo exibir inúmeros formatos verticais ou horizontais e com alguma automação que permite o controle de condições do cultivo como temperatura, luz e pH, ajustados para obtenção de um maior rendimento em biomassa, e homogeneização dos meios de cultura. Os de placas planas possuem ampla área de superfície iluminada, apresentando, por conseguinte, o máximo de aproveitamento da incidência solar.



**Figura 3.** Modelo de fotobiorreator tubular para cultivo em massa de microalgas. **A:** tubos inclinados, **B:** em espiral.

**Fonte:** Greenwell *et al.*, 2010.



**Figura 4.** Modelo de fotobiorreator de placas planas para cultivo em massa de microalgas. **Fonte:** Fragoso, 2016.

### ***3.3.2 Meios alternativos para cultivo de microalgas***

Uma possibilidade é unir o tratamento de águas residuais que são ricas em nutrientes e metais tóxicos e usa-las como meios de crescimento para as microalgas uma vez que estas possuem a capacidade de remover fósforo, nitrogênio, metaloides e metais pesados sendo assim útil no processo da biorremediação (CALIXTO 2016). A remoção desses efluentes ajuda a preservar os corpos hídricos que serão receptores dessas águas onde os componentes fósforo e nitrogênio estimulam a eutrofização (VIDAL, 2016).

Como exemplo de efluentes mais produzidos no Brasil cita-se as águas residuais domésticas, vinhaça, e os da indústria de processamento de mandioca (MATA, 2010). Estes, por sua vez, podem ser usados como substratos para o crescimento de microalgas proporcionando um pré-tratamento dessas águas de forma barata e eficaz obtendo-se como produto uma biomassa rica em metabólitos de interesse (CARTAS, 2017).

Outros efluentes agroindustriais que já foram testados esse mostraram promissores na produção de biomassa de microalgas, incluem: resíduos de suinocultura (ZHU *et al.*,2013), da produção industrial de papel e celulose (GENTILI, 2014), de fazendas leiteiras (HENA *et al.*,2015), da cana-de-açúcar (RAMIREZ *et al.*,2014), da produção de cerveja (FAROOQ *et al.*,2013), da fabricação de carpetes (CHINNASAMY *et al.*,2010), da produção comercial de peixes em cativeiro (MANDAL e MALLICK, 2011), do processamento de óleo de palma (LAM e LEE, 2011), biocomposto de hortifrútis, biocomposto derivado da cana-de-açúcar e vinhaça, esterco de galinha, e preparado com excrementos de frango (CALIXTO *et al.*,2016), e até mesmo esgoto doméstico (KLIGERMAN e BOUWER, 2015, CALIXTO *et al.*,2016).

### 3.3 Fécula de mandioca

Pertencente à família Euphorbiaceae, a mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é uma planta arbustiva nativa da América do Sul que ocorre em todas as regiões do Brasil onde é produzida visando o consumo direto, bem como a indústria de transformação (DIAS, 2006). É um alimento de alto valor energético, rico em amido, vitaminas, fibras e alguns minerais como potássio, cálcio, fósforo, sódio e ferro (CARTAS 2018). É originária do sudoeste amazônico, onde já era consumida por nativos sul americanos muito antes da chegada dos colonizadores no Novo Mundo. Foi facilmente assimilada pelos colonizadores portugueses que a disseminaram na África. Pela sua rusticidade e capacidade de adaptação hoje ela é cultivada em mais de cem países tropicais e subtropicais, e em alguns deles, as folhas, que possuem até 25% de proteínas também são consumidas (COELHO, 2018).

São conhecidas cerca de sete mil variedades de mandiocas, algumas delas extremamente tóxicas necessitando de sua transformação em farinha ou fécula para ser consumidas, usualmente conhecidas como mandioca brava, e outras não tóxicas, conhecidas como mandiocas mansas, próprias para o consumo humano. No Brasil são cultivadas predominantemente por agricultores familiares e camponeses em todos os estados da federação, sendo utilizada tanto na alimentação humana como animal (COELHO, 2018).

As maiores produções nacionais de mandioca ocorrem nas regiões Norte e Nordeste **Tabela 1**, onde também é maior o consumo de farinha de mandioca e de fécula. Esta é dita como um dos principais produtos da mandioca, entrando na refeição diária de grande parte dos brasileiros. A fécula nada mais é do que o amido de mandioca, também conhecido como goma ou polvilho doce, e é caracterizada por um pó fino, branco, sem cheiro e sem sabor (ABAM, 2010).

**Tabela 1.** Produção de mandioca no Brasil de 2014 até 2018 (em mil toneladas).

| Brasil, Região e UF | Ano      |          |          |          |          | Variação Percentual |       |       |       |
|---------------------|----------|----------|----------|----------|----------|---------------------|-------|-------|-------|
|                     | 2014 (a) | 2015 (b) | 2016 (c) | 2017 (d) | 2018 (e) | (b/a)               | (c/b) | (d/c) | (e/d) |
| NORTE               | 8.043    | 7.787    | 7.371    | 7.435    | 6.858    | -3,2                | -5,3  | 0,9   | -7,8  |
| Pará                | 4.915    | 4.696    | 4.263    | 4.235    | 3.818    | -4,5                | -9,2  | -0,7  | -9,8  |
| Demais              | 3.128    | 3.092    | 3.108    | 3.200    | 3.041    | -1,2                | 0,5   | 3,0   | -5,0  |
| NORDESTE            | 5.668    | 5.544    | 4.807    | 5.172    | 4.993    | -2,2                | -13,3 | 7,6   | -3,5  |
| Maranhão            | 1.619    | 1.482    | 1.306    | 1.316    | 1.278    | -8,5                | -11,9 | 0,7   | -2,9  |
| Piauí               | 175      | 266      | 202      | 276      | 348      | 51,9                | -23,9 | 36,5  | 26,2  |
| Ceará               | 478      | 359      | 388      | 475      | 543      | -25,0               | 8,1   | 22,5  | 14,3  |
| Rio Grande do Norte | 160      | 146      | 97       | 140      | 226      | -8,9                | -33,9 | 45,2  | 61,0  |
| Paraíba             | 135      | 131      | 147      | 146      | 142      | -3,0                | 12,1  | -0,5  | -2,9  |
| Pernambuco          | 302      | 388      | 137      | 198      | 395      | 28,4                | -64,7 | 44,3  | 100,0 |
| Alagoas             | 250      | 293      | 279      | 304      | 334      | 17,1                | -4,8  | 8,9   | 9,8   |
| Sergipe             | 416      | 380      | 296      | 239      | 201      | -8,6                | -22,3 | -19,2 | -16,0 |
| Bahia               | 2.131    | 2.099    | 1.956    | 2.079    | 1.528    | -1,5                | -6,8  | 6,3   | -26,5 |
| SUDESTE             | 2.525    | 2.318    | 2.282    | 2.254    | 2.183    | -8,2                | -1,6  | -1,2  | -3,2  |
| Minas Gerais        | 852      | 852      | 844      | 841      | 819      | 0,0                 | -0,8  | -0,4  | -2,6  |
| São Paulo           | 1.317    | 1.172    | 1.159    | 1.143    | 1.104    | -11,0               | -1,1  | -1,4  | -3,4  |
| Demais              | 357      | 295      | 279      | 271      | 260      | -17,3               | -5,4  | -2,9  | -3,8  |
| SUL                 | 5.584    | 5.892    | 5.367    | 4.556    | 4.620    | 5,5                 | -8,9  | -15,1 | 1,4   |
| Paraná              | 3.959    | 4.313    | 3.888    | 3.047    | 3.220    | 8,9                 | -9,9  | -21,6 | 5,7   |
| Santa Catarina      | 443      | 424      | 386      | 443      | 421      | -4,5                | -8,9  | 14,8  | -5,0  |
| Rio Grande do Sul   | 1.181    | 1.155    | 1.093    | 1.067    | 980      | -2,2                | -5,4  | -2,4  | -8,1  |
| CENTRO-OESTE        | 1.434    | 1.518    | 1.256    | 1.188    | 1.227    | 5,9                 | -17,3 | -5,4  | 3,3   |
| Mato Grosso do Sul  | 873      | 1.004    | 739      | 696      | 732      | 15,0                | -26,4 | -5,9  | 5,2   |
| Demais              | 561      | 514      | 516      | 493      | 495      | -8,3                | 0,5   | -4,6  | 0,5   |
| BRASIL              | 23.254   | 23.060   | 21.083   | 20.606   | 19.883   | -0,8                | -8,6  | -2,3  | -3,5  |

**Fonte:** IBGE (2018).

A fécula de mandioca possui na sua composição 18% de amilose e 82% de amilopectina. (CEREDA, *et al.*,2001), além de um percentual alto de amilose. Ela também é bastante utilizada pela indústria alimentícia por apresentar algumas características como baixo intervalo de temperatura de gelatinização (65 a 70°C), boa estabilidade do gel, rápido aumento da viscosidade durante a gelatinização, alta claridade e textura coesa da pasta, e baixa tendência à retrogradação (KARAM *et al.*,2005).

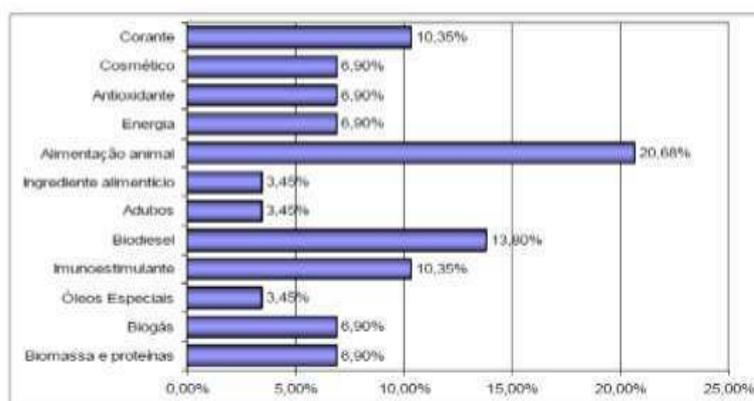
A eficácia na transformação da mandioca em fécula se dá de acordo com porte da empresa e da tecnologia usada, uma vez que pode acontecer em escala artesanal ou semi-industrial (CARDOSO, 2005). As etapas do processo consistem na lavagem das raízes, descascamento, ralação, adição de água, extração do amido da massa por agitação manual ou mecânica, separação da massa do leite de fécula por filtragem, separação do amido por decantação ou centrifugação, secagem do amido e armazenamento (SILVA, 2011; DIAS, 2006; COELHO, 2018).

Estima-se que durante o processamento para cada tonelada de raiz de mandioca com 40% de sólidos são gerados em média 200-300 litros de resíduo onde a produção da fécula pode gerar até 10 vezes mais de água residual ou soro de fécula que contém elevado conteúdo em matéria orgânica (CARVALHO *et al.*,2010). Esse resíduo, muitas vezes depositado em corpos hídricos causando enormes prejuízos para a vida aeróbica devido a diminuição da disponibilidade de oxigênio além de outros impactos (CARTAS,2018; BORGHETTI, 2009). Neste contexto, desperta-se o interesse em buscar técnicas de tratamento para esse resíduo no intuito de reduzir a poluição ambiental e agregar valor ao produto gerado a exemplo da goma de tapioca.

### 3.4 Patentes de processos e produtos com microalgas

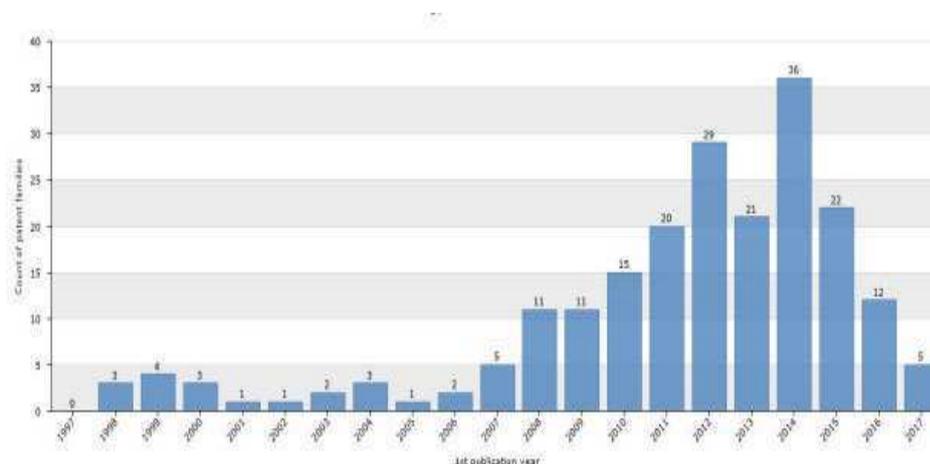
Estudos que possam ter interesses industriais podem gerar um produto de caráter inovador e com aplicações no comércio, porém, é necessário estar em conformidade com a lei para que possua um caráter de patente (WOLF, 2005). Na área biotecnológica as patentes são voltadas para processo e produção de produtos a partir de material biológico, como os métodos para produção de plantas transgênicas, e produtos resultantes de processos biológicos, a exemplo de alimentos enriquecidos com biomassa de microalgas (FIGUEIREDO *et al.*,2006).

O estilo de vida da sociedade moderna cada vez mais tem buscado por uma alimentação rápida e nutricionalmente rica. Dessa forma, a demanda por conhecimento acerca das múltiplas possibilidades de uso das microalgas vem aumentando, aumentando por conseguinte o número de patentes relacionadas a produtos oriundos das microalgas (**Figura 5**).



**Figura 5.** Principais produtos de microalgas nas patentes depositadas.  
**Fonte:** Barcellos *et al.*,2012.

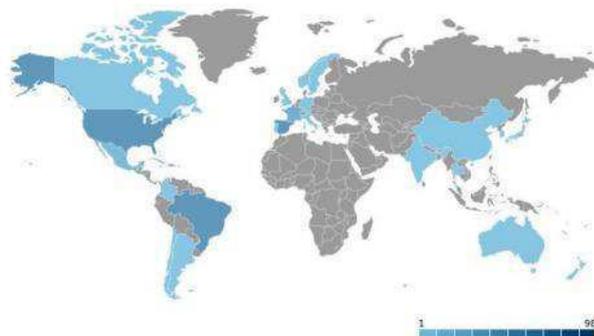
Santos *et al.*,(2018) ao pesquisar através do orbit patentes depositadas nos últimos 20 anos (1997 - 2017) encontraram 219 patentes relacionadas a temática em caráter mundial e que as quantidades se tornaram mais expressivas a partir de 2008, com o ápice em 2014 com 36 depósitos, diminuindo esses números nos anos seguintes (Figura 6).



**Figura 6.** Desenvolvimento dos depósitos de patentes relacionadas a microalgas no mundo.

**Fonte:** Santos *et al.*,2018.

Essas informações mostram que as microalgas ainda são vistas como algo recente que está em fase de desenvolvimento se comparado com os depósitos de patentes de outros assuntos. Entretanto, o Brasil se destaca em número de patentes publicadas sobre microalgas, mostrando que o país almeja avançar nas pesquisas com esse tipo de tecnologia e podendo desenvolver novas tecnologias ou melhorar as já existentes (LOURENÇO, 2006). A **Figura 7** sumariza as quantidades de patentes depositadas no mundo e permite observar que o Brasil, Estados Unidos, Canadá, Espanha e França são os que se destacam em depósitos de patentes depositadas com a temática (FIQUEIREDO *et al.*,2006; BARCELLOS *et al.*, 2012; SANTOS *et al.*,2018).



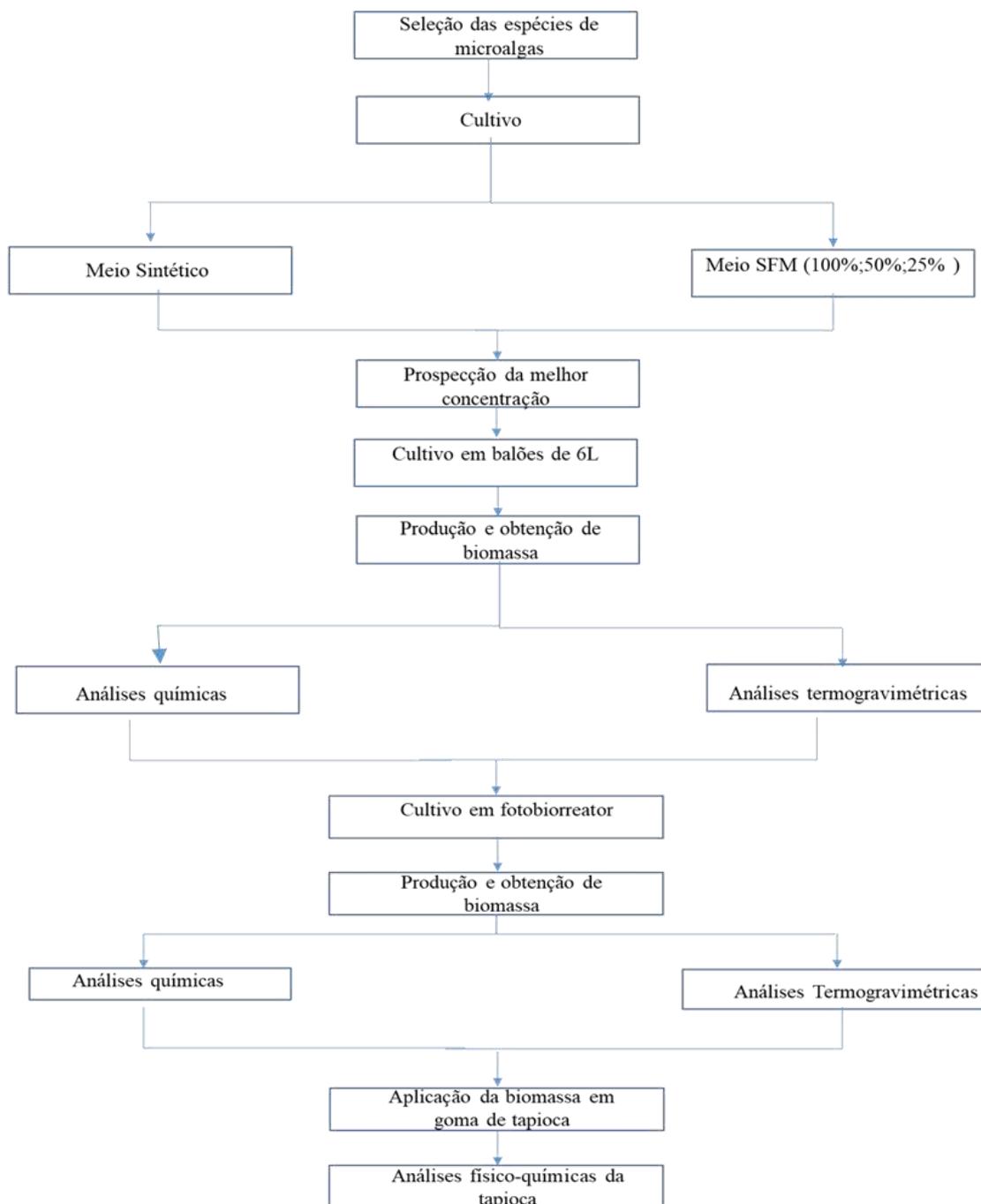
**Figura 7.** Distribuição geográfica do número de depósitos de patentes com microalgas.

**Fonte:** Santos *et al.*,2018.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Obtenção das culturas: coletas, isolamento e manutenção dos cultivos

Este trabalho foi desenvolvido nas dependências do Laboratório de Ambientes Recifais e Biotecnologia com Microalgas (LARBIM), da Universidade Federal da Paraíba, em João Pessoa, Campus 1, em três etapas conforme desenho experimental abaixo (**Figura 8**).



**Figura 8.** Desenho Experimental do Estudos Realizados  
**Fonte:** autor, 2019.

#### 4.1.1 Etapa 1: Seleção de Espécies e ensaios de crescimento em meio alternativo preparado com Soro de Fécula de Mandioca

Na primeira etapa foram estudadas 4 espécies de microalgas selecionadas junto ao banco de cultura de microalgas do Laboratório de Ambientes Recifais e Biotecnologia com Microalgas da Universidade Federal da Paraíba (LARBIM/UFPB), isoladas de diferentes tipos de ambientes aquáticos da região Nordeste do Brasil. Onde o critério de seleção foi a partir do teor de proteína presente na sua composição bioquímica (**Tabela 2**).

**Tabela 2.** Microalgas isoladas de ambientes aquáticos da Região Nordeste do Brasil estudadas nesta pesquisa.

| Código | Gênero ou espécie                        | Procedência  | Teor de Proteína (%) |
|--------|--|--|----------------------|
| D316WC | <i>Coelastrum</i> sp.                    | Riacho da Bica, Parque Arruda<br>Câmara, João Pessoa, PB | 44,01                |
| D338WC | <i>Oocystis</i> sp.                      | Bebedouro das galinhas, Bayeux,<br>PB                    | 41                   |
| D447WC | <i>Scenedesmus</i><br><i>quadricauda</i> | Açude Jardim do Seridó, PB                               | 40                   |
| D545WC | <i>Scenedesmus</i> sp.                   | Lagoa azul, Parque Nacional de<br>Jericoacara, CE        | 55,68                |

O isolamento das espécies foi efetuado a partir de coletas realizadas nos referidos mananciais com garrafas pet, sendo o material armazenado em caixas de isopor durante seu transporte ao Laboratório. As amostras coletadas foram inoculadas em frascos de 250 ml contendo 100 ml de meio de WC (GUILLARD; LORENZEN, 1972), as quais foram mantidas em câmara de cultura climatizada a  $24^{\circ} \pm 1^{\circ}$  C com sistema de iluminação fornecido por lâmpadas fluorescentes tipo luz-do-dia, e fotoperíodo ajustado para 12 horas.

Ao se constatar crescimento as espécies foram isoladas com auxílio de um microscópio bionocular LEICA, transferindo-as para tubos de ensaio com meio de cultura usando micro capilares. Reisolamentos sucessivos foram efetuados por esta técnica, até que cultivos monoespecíficos fossem obtidos. As cepas isoladas foram codificadas e incorporadas ao banco de microalgas do LARBIM/UFPB, sendo os cultivos mantidos mediante repicagens mensais. A identificação das espécies foi feita mediante o uso de bibliografias especializadas e buscas na internet, usando critérios morfológicos.

#### 4.1.1.1 Preparação dos meios de cultivo

##### a) Meio de cultivo sintético

Como meio básico para os cultivos e manutenção das microalgas usadas na pesquisa foi utilizado o meio sintético WC (GUILLARD; LORENZEN, 1972) (**Tabela 3**), preparado com água destilada autoclavada e deixada em repouso por 24 horas em temperatura constante para a reoxigenação. Após este tempo, foram adicionados à água todos os macronutrientes, micronutrientes e vitaminas presentes nos referidos meios de cultura.

**Tabela 3.** Composição do meio WC usado nos experimentos (Guillard; Lorenzen, 1972).

| <b>Solução estoque</b>   | <b>Fórmula</b>                                      | <b>Quantidade</b> |
|--|---|-------------------|
| Cloreto de cálcio 2.H <sub>2</sub> O   | CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O               | 36.8 g            |
| Sulfato de magnésio 7.H <sub>2</sub> O   | MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O               | 37 g              |
| Bicarbonato de sódio   | NaHCO <sub>3</sub>                                  | 12.6 g            |
| Fosfato de potássio 3.H <sub>2</sub> O   | K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .3H <sub>2</sub> O  | 11.4 g            |
| Nitrato de sódio   | NaNO <sub>3</sub>                                   | 85 g              |
| Água destilada   |   | 1 L               |
| <b>Solução de silicato</b>   | <b>Fórmula</b>                                      | <b>Quantidade</b> |
| Metasilicato de sódio 9.H <sub>2</sub> O   | Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> .9H <sub>2</sub> O | 21.2 g            |
| Água destilada   |   | 1 L               |
| <b>Solução de micronutrientes</b>  | <b>Fórmula</b>                                      | <b>Quantidade</b> |
| Sal dissódico  | Na <sub>2</sub> EDTA                                | 4.36 g            |
| Cloreto férrico 6.H <sub>2</sub> O   | FeCl <sub>3</sub> . 6H <sub>2</sub> O               | 3.15 g            |
| Sulfato de cobre 5.H <sub>2</sub> O  | CuSO <sub>4</sub> . 5H <sub>2</sub> O               | 0.01 g            |
| Sulfato de zinco 7.H <sub>2</sub> O  | ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O                | 0.022 g           |
| Cloreto de cobalto 6.H <sub>2</sub> O  | CoCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O               | 0.01 g            |
| Cloreto de manganês 4.H <sub>2</sub> O   | MnCl <sub>2</sub> . 4H <sub>2</sub> O               | 0.18 g            |
| Molibdato de sódio 2.H <sub>2</sub> O  | Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O | 0.006 g           |
| Ácido bórico   | H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                      | 1 g               |
| Água destilada   |   | 1 L               |
| <b>Solução de vitaminas</b>  | <b>Quantidade</b>                                   |                   |
| Tiamina HCl  | 0.1   |                   |
| Biotina  | 0.0005  |                   |
| Água destilada   | 1 L   |                   |
| <b>Composição do meio</b>  | <b>Quantidade</b>                                   |                   |
| Solução estoque, Solução de silicato, Solução de micronutrientes e Solução de vitaminas: usar 1 mL a cada litro de meio. |   |                   |
| Tri(hidroximetil)-amino metano   | 0.115 g a cada litro de meio                        |                   |

**Fonte:** (Guillard; Lorenzen, 1972).

### ***b) Preparo do meio alternativo a partir do soro de Fécula de Mandioca***

O soro da fécula de mandioca (SFM) foi gentilmente cedido pela indústria alimentícia Da terra, localizada na Rua José Ferreira Vaz,75- Alto do Eucalipto, Santa Rita-PB. O efluente foi transportado ao laboratório em galão de 10L onde foi filtrado em filtro de vidro Whatmann GF/C de 47 mm de diâmetro. O material filtrado foi conservado a temperatura de 4°C, durante um período máximo de uma semana. A caracterização química do soro de fécula de mandioca foi realizada na Central Analítica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

Os seguintes tratamentos desse resíduo foram utilizados como meio alternativo para cultura de microalgas: Sem diluição, contendo 100% de soro de fécula de mandioca, diluição de 50% de SFM + 50% de meio WC e diluição de 25% de SFM + 75% de meio WC. Os meios assim preparados foram autoclavados à 121°C por 15 minutos sendo o pH ajustado para 7 com solução de Hidróxido de sódio a 0,1N.

#### **4.1.1.2 Cultivo das microalgas nos meios sintético e alternativo**

Este experimento foi realizado visando determinar as respostas de crescimento das microalgas selecionadas e em quais seriam as melhores concentrações de SFM que promoveriam as melhores respostas de crescimento em termos de concentração celular, complexidade e tamanho da célula, além da estimativa de lipídio.

Os cultivos foram realizados em balões de vidro de 250 mL com 150 mL de meio de cultura preparado com SFM [concentrações de 100%, 50% e 25%], utilizando-se como controle o meio WC. Os experimentos foram conduzidos em triplicatas em câmara climatizada ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ), com iluminação fornecida por lâmpadas fluorescentes tipo luz-do-dia ( $150 \mu\text{mol.fótons.m}^2.\text{s}^{-1}$ ) e fotoperíodo de 12h. A concentração de partida para o cultivo de todas as quatro microalgas foi  $2 \times 10^4$  células  $\text{mL}^{-1}$ .

Os cultivos foram analisados a cada dois dias através de medidas da fluorescência “in vivo” em um fluorômetro Turner Design 10005R, usando 5 mL de cada amostra, e por citometria de fluxo (FASCcalibur BD Biosciences, San Jose, CA USA) usando amostras de 300  $\mu\text{L}$ . Neste caso, foram usados os detectores forward scatter (FSC), que determina o tamanho celular, o side scatter (SSC) que determinam a complexidade celular, assim como o detector vermelho (FL3, 670 nm), para a autofluorescência da clorofila (Hyka et al. 2013). A população celular foi quantificada num gráfico SSC vs FL3, sendo estimada levando em consideração o fluxo do citômetro

(60  $\mu\text{L} \pm 7 \mu\text{L}/\text{min}$ ) e o tempo (30s) de leitura. O software utilizado para a análises dos parâmetros foi o Flowing Software versão 2.5. O conteúdo lipídico das amostras foi determinado pela análise da fluorescência verde (FL1) utilizando BODIPY 493/503 (Difluoro{2-[1-(3,5-dimethyl-2Hpyrrol-2-ylidene-N)ethyl]-3,5-dimethyl-1H-pyrrolato-N}boronMolecular Probes, Invitrogen), na concentração de 10  $\mu\text{M}$  como marcador dos lipídios neutros e apolares. O tempo de marcação com BODIPY foi de 30 min (Lelong et al. 2011). Além da citometria e fluorescência também foram efetuadas medidas da eficiência da fotossíntese no nível fotossistema II (QY) e todos os transientes da fotossíntese da curva OJIP foram medidos usando um fluorômetro AquaPen AP100 (Photon Systems Instruments, República Tcheca). Antes de cada medição as células foram adaptadas a 10 min no escuro para permitir a abertura de todos os centros de reação do fotossistema II (Strasser et al., 2000). Todas as medidas foram feitas em triplicata. Os resultados foram processados usando o software FluorPen™ (Photon Systems Instruments, República Tcheca).

#### ***4.1.2 Etapa 2: Produção de biomassa e caracterização dos compostos bioativos no meio controle e em soro de fécula de mandioca***

Este experimento foi idealizado utilizando-se as formulações do meio alternativo que promoveram as melhores respostas no primeiro experimento (Etapa 1). Os ensaios foram desenvolvidos em triplicatas, em balões de 6L contendo 5 L dos meios de cultura, na câmara de cultivo climatizada do LARBIM (fotoperíodo de 12 horas, temperatura 25° C  $\pm$  1°C) (**Figura 9**), com aeração fornecida por um minicompressor de membrana Resun AOC3, sendo os inóculos iniciais da ordem de 5000 a 20000 células.mL<sup>-1</sup>



**Figura 9.** Cultivo das microalgas em balões de 6L no LARBIM/UFPB.

**Fonte:** autor, 2019.

O desenvolvimento dos cultivos foi acompanhado por análises da fluorescência “in vivo” em um Fluorômetro Turner Design, modelo 1005R em triplicata. As curvas de crescimento de cada espécie cultivada foram traçadas utilizando o parâmetro de crescimento acima referido, a partir da qual foi possível determinar o tempo de cultivo, a duração da fase exponencial, a velocidade de crescimento ( $k$ ), e o rendimento final em biomassa. A velocidade de crescimento ( $k$ ), a qual representa o número de divisões celulares da população em estudo por unidade de tempo (dia), foi determinada através da equação 1, citada em Stein (1973):

$$k = \frac{3,322}{T_2 - T_1} \times \log \frac{N_2}{N_1} \quad \text{Eq.1}$$

Onde: 3,322 corresponde ao fator de conversão do logaritmo base 2 a base 10;  $T_1$  e  $T_2$  compreendem o início e o final da fase exponencial de crescimento; e  $N_1$  e  $N_2$  referem-se à densidade celular inicial e final dessa fase, respectivamente.

Os experimentos foram interrompidos na fase estacionária. A biomassa produzida foi concentrada em centrífuga refrigerada (18° C) (**Figura 10**), congelada a -30° C num ultrafreezer (Terroni 90LT), liofilizadas num liofilizador Terroni (modelo LD1500) (**Figura 11**), pesada em balança analítica e armazenada em recipiente hermético sob refrigeração para análises posteriores.



**Figura 10.** Processo de centrifugação da biomassa das microalgas cultivadas. Centrífuga refrigerada (Nova Técnica NT825); Tubos de 500 mL.

**Fonte:** autor, 2019.



**Figura 11.** Processo de liofilização da biomassa das microalgas cultivadas. Liofilizador Terroni (modelo LD1500); Bandeja de alumínio com a biomassa concentrada.

**Fonte:** autor, 2019.

#### 4.1.2.1 Análises dos componentes químicos na biomassa seca

Todas as análises químicas das biomassas foram realizadas em triplicatas.

**a) Proteínas totais:** As análises de proteínas totais foram efetuadas pelo método de Kjeldahl utilizando-se 0,1 g da amostra e 0,5 g de uma mistura catalítica. Às amostras foram acrescentados 5 ml de ácido sulfúrico PA, realizando uma pré-digestão a frio seguindo-se por um aquecimento da placa digestora gradualmente até 350 °C. As amostras foram digeridas até que a solução alcançasse uma coloração “verde piscina”. Após digestão, os tubos foram retirados do digestor e resfriados. O conteúdo de cada tubo foi transferido para um balão volumétrico de 100 mL com 30 mL de água destilada. Do balão de 100 mL (extrato 1), retirou-se 1 mL e o transferiu para um balão volumétrico de 50 mL (com  $\pm 20$  mL), depois de resfriada, adicionou-se 1 mL de Hidróxido de sódio 10%, 1 mL de silicato de sódio 20% e 2 mL de Reagente de Nessler. Completou-se o volume do balão, este foi deixado em repouso durante 30 minutos e as amostras foram lidas em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 420nm

(SANTOS, 2007). Para calcular o teor de proteínas totais (%) utilizou-se uma curva padrão e o valor foi multiplicado por 5,95 (LÓPEZ et al., 2010).

**b) Carboidratos totais:** Esses metabólitos foram determinados pelo método adaptado de Kochert (1978). Para tal, utilizou-se 0,01 g de cada amostra. Adicionou-se 4,0 mL de NaOH 1,0N, e aqueceu-se a amostra em banho-maria por 1h a  $100 \pm 10$  °C. As amostras foram resfriadas a temperatura ambiente e, em seguida, centrifugadas a 3000rpm por 10min. Retirou-se 0,5 mL do extrato alcalino (sobrenadante) e adicionou-se 1,0 mL de NaOH 1,0N mais 0,5 mL de fenol 4,0% e agitou-se em vortex. Após 30 minutos em repouso, acrescentou-se 2,5 mL de H<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> concentrado e agitou-se em vortex. Deixou-se as amostras esfriarem e, por fim, estas foram lidas em espectrofotômetro a 485nm.

**c) Lipídios totais:** Determinados pelo método de Folch, Less e Stanley (1957). Para tal, 50 mg das biomassas, foram tratadas em homogeneizador turrax em velocidade média durante 5 minutos, com 10 mL de uma mistura de clorofórmio:metanol (2:1). As amostras foram centrifugadas em 4000 rpm por 8 minutos retirando-se em seguida o sobrenadante. Adicionou-se uma solução de KCl a 0,88%, correspondente a  $\frac{1}{4}$  do volume do sobrenadante. O sistema foi agitado manualmente e após 10 minutos de repouso formaram-se duas fases muito nítidas: a superior com água, metanol e outros compostos, e a inferior com os lipídios dissolvidos (Figura 9A). A fase superior foi removida e à solução de lipídios foi adicionada determinada mistura de metanol:água (1:1), correspondente a  $\frac{1}{4}$  do volume da solução. O sistema foi mantido em repouso e a separação e remoção da fase superior foi feita por aspiração. A fase inferior foi filtrada, em papel filtro, preenchidos com Na<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> em funis de 60 mm de diâmetro e a amostra filtrada em balões de vidro (Figura 9B), em seguida, as amostras foram secas em estufa de circulação forçada à 40 °C. As amostras secas no interior dos balões foram solubilizadas com 5 mL de clorofórmio. Uma alíquota de 1 mL desta solução foi tomada em frascos de vidros pré-pesados em balança analítica para determinação dos lipídios totais por gravimetria após a evaporação total do solvente em estufa.

**d) Ácido Fólico.** Determinado pelo método adaptado de Ribeiro, (2016).

**e) Ácidos graxos:** Os ésteres metílicos de ácidos graxos foram obtidos de acordo com o procedimento de transesterificação direta da biomassa microalgal liofilizada, segundo a metodologia descrita por Hartman e Lago (1973), adaptado para microescala

(MENEZES *et al*, 2013). Pesou-se 200,0 mg da biomassa de microalgas, adicionou-se 3,0 mL de solução 0,5 mol L<sup>-1</sup> de hidróxido de sódio em metanol seco e aqueceu-se por 10 min em banho-maria a 90 °C. Resfriou-se e adicionou-se 9,0 mL da mistura esterificante (2,0 g de cloreto de amônio a 60 mL de metanol seguido da adição de 3,0 mL de ácido sulfúrico concentrado). Realizou-se o aquecimento novamente por 10 min em banho-maria a 90 °C. Resfriou-se e adicionou-se 5,0 mL de n-heptano e 2,0 mL de água destilada. Os tubos foram agitados e colocados em repouso até a separação das fases. Para o cálculo do teor de ésteres totais da biomassa microalgal, retirou-se 1 mL da fase heptânica e transferiu-se para recipiente plástico, previamente pesado. As amostras foram colocadas em dessecador para evaporação do solvente até a massa de ácidos graxos atingir peso constante. Os ácidos graxos oriundos do processo de transesterificação foram identificados por Cromatografia Gasosa utilizando um cromatógrafo GCMS-QP2010 (Shimadzu, Kyoto, Japan) equipado com uma coluna Durabound DB-23 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm. A temperatura do injetor e do detector foram fixados em 230 °C e temperatura da coluna em 90 °C. O gradiente de eluição na coluna foi de 90 a 150 °C (10 °C/min), 150 a 200 °C (5 °C/min), 200 a 230 °C (3 °C/min) em um tempo total de corrida de 34 min, utilizando hélio como gás de arraste vazão de 187,2 mL/min

**f) Termogravimetria.** As curvas termogravimétricas (TG) foram obtidas em Analisador Térmico Shimadzu, massa de 10 mg, cadinho de alumina, razão de aquecimento de 10 °C/min., em atmosfera de nitrogênio, fluxo de 50 mL de temperatura ambiente até 700 °C.

#### ***4.1.3 Etapa 3: Cultivo de *Scenedesmus* sp em fotobiorreator a aproveitamento da biomassa no enriquecimento da tapioca***

A espécie selecionada para ser cultivada no fotobiorreator foi *Scenedesmus* sp em soro de fécula de mandioca (SFM) na 50% de diluição com meio WC. O critério usado na seleção desta espécie foi o fato dela apresentar as maiores concentrações de proteínas nessa concentração de SFM nos ensaios anteriores.

Para realização desse cultivo a microalga selecionada foi inoculada em SFM-50% em balões de 250 ml. Os inóculos foram mantidos a 25° C ± 1° C em câmara de cultivo climatizada com de sistema de iluminação [150 µmols.fótons.m<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup>] e fotoperíodo de 12 horas, sendo que após 10 dias aproximadamente, os balões já

apresentavam uma cultura densa. A partir de então a cultura foi transferida para balões de 6L de capacidade contendo o mesmo meio de cultura e após mais 10 dias, aproximadamente, para frascos mariotes de 20 litros mantidos mesmas condições de luz e temperatura referidas, e com aeração fornecida por um mini compressor de membrana RESUN AOC2. Após 10 dias os cultivos já se apresentavam bem concentrados, a notar pela intensa coloração verde (**Figura 12**), sendo nessa fase transferidos para o fotobiorreator (**Figura 13**).



**Figura 12.** Cultivo de microalga em frascos mariotes no LARBIM/UFPB.  
**Fonte:** autor, 2019.



**Figura 13.** Cultivo de microalga em fotobiorreator no LARBIM/UFPB.  
**Fonte:** autor, 2019.

Para que o fotobiorreator recebesse o cultivo otimizado ele precisou passar por um procedimento de higienização. Procedeu-se, inicialmente, a lavagem dos tubos de acrílico e dos containers utilizando detergente neutro e uma lavadora de alta pressão. Em seguida foram feitas lavagens com água sanitária (água com baixa concentração de hipoclorito) deixando-a circular entre os tubos e os containers durante dois dias com o auxílio de uma bomba centrífuga. Depois, procedeu-se uma lavagem com água salina por um dia e finalmente, lavagem com água corrente. Ao final desse procedimento foram preparados 400 litros do meio de cultura (WC+SFM) em uma proporção de 50% e adicionado 60L de inóculo otimizado, numa concentração inicial de células da ordem de  $20.000 \text{ células.ML}^{-1}$ , sendo nesse momento acionado o motor do soprador para garantir aeração do cultivo. Nesse ensaio, após 10 dias observou-se uma cultura densa e nesse momento o experimento foi interrompido, a biomassa produzida foi transferida para uma esteira de decantação (**Figura 14**). A biomassa concentrada foi congelada a  $-30^\circ \text{C}$  num ultrafreezer (Terroni 90LT), liofilizadas num liofilizador Terroni (modelo LD1500) e pesada em balança analítica para assim determinar o rendimento de biomassa. A biomassa assim obtida foi utilizada para a caracterização dos bioativo e enriquecimento da goma.



**Figura 14** Cama de decantação utilizada para colheita de biomassa de microalgas utilizada no LARBIM/UFPB.

**Fonte:** autor, 2019.

#### 4.1.3.1 Preparo da goma de tapioca

No Brasil a Spirulina é classificada como novo ingrediente e seu consumo diário não deve ultrapassar 1,6g/dia (BRASIL, 2009). No entanto o FDA (Food and Drug Administration), após classificar esta microalga como GRAS (Generally Recognized as Safe), sugere que a ingestão diária deva ser de acordo com o porte físico do consumidor, podendo variar de 0,1 a 6g e a estimativa média de consumo é 3g/dia (FDA, 2003). Porém Brasil, (2019) sugere que a ingestão diária não ultrapasse 1,6g/dia.

Sendo assim, foram preparadas diferentes concentrações da goma enriquecida com biomassa (0; 0,7g de biomassa/100 gramas de goma; 1g de biomassa/100 gramas de goma; 1,3g de biomassa/100 gramas de goma e 1,6 g de biomassa/100 gramas de goma) como pode ser verificado na figura 15. Posteriormente foram realizados os ensaios físico químicos do alimento assim preparados.



**Figura 15.** Preparo da goma de tapioca em diferentes concentrações de g de biomassa/100 gramas de goma.

**Fonte:** autor, 2019.

#### **4.1.3.2 Determinações físico-químicas da goma de tapioca enriquecida com biomassa seca de microalga**

Essas determinações foram realizadas no laboratório de físico-química do CTDR/UFPB. Os teores de umidade, cinzas e proteínas foram determinados em triplicata utilizando a metodologia descrita pela AOAC (2005).

#### **4.2 Análise estatística**

Os dados sobre a cinética de crescimento das microalgas foram expressos como média  $\pm$  desvio-padrão, utilizando o software Excel. Os dados de citometria, da composição química das microalgas e da formulação da goma de tapioca foram analisados quanto à homocedasticidade pelo teste de Levene, utilizando programa Statgraphics centurion 17.1 e R Core Team (2018), respectivamente ao nível de

significância de 5%. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), em delineamento inteiramente casualizado (DIC), seguida de comparações múltiplas de Tukey ( $P < 0,05$ ) e o teste de Kruskal-Wallis (Teste H) quando os dados não foram paramétricos (SILVA; AZEVEDO, 2002).

## REFERÊNCIAS

ABAM – Associação Brasileira dos Produtores de Amido de Mandioca. Derivados. Servidor de arquivos. Disponível em: <www.abam.com.br>. Acesso: 10 jan. 2018.

ALMEIDA, L, M, R, SOUZA, C, O, RIBEIRO, P, L, L, DRUZIAN, J, I, MIRANDA M, S,. Estudo Prospectivo sobre Produtos Alimentares Incorporados de Biomassa de Microalgas. Salvador, v. 10, n. 4, p. 893-904 out/dez.2017

ANDERSEN, R. A. Algal Culturing Techniques, **Elsevier Science Publishing Co Inc.**2005.

AOAC (Association of Official Analytical Chemists), 2005. Official Methods of the AOAC International, 18th ed. Maryland, USA.

ARAÚJO, B,V,S,. Metabólitos de Interesse à Indústria Alimentícia, Produzidos por Microalgas Isoladas da Região Nordeste do Brasil. 143f. Tese (Doutorado) Ciência e Tecnologia de Alimentos – Universidade Federal da Paraíba, 2018

ARIEDE, M,A. Aplicação do extrato da microalga *Botryococcus braunii* em formulações cosméticas. 2016 94f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

ARMBRUST, E. V. The life of diatoms in the world's oceans. *Nature*, v. 459, p. 185–192, 2009

ARREDONDO-VEGA, B. O. Crecimiento autotrófico y mixotrófico de la microalga marina *Porphyridium cruentum*. 1995. 138 p. Tesis (Doctorado Microbiología) - Facultad de Farmacia, Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, 1995.

AZEREDO, V. B. S. Produção de Biodiesel a partir do cultivo de microalgas: estimativa de custos e perspectivas para o Brasil. 188 f. Dissertação de mestrado em Planejamento Energético. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012

BAICHA, Z. et al. A critical review on microalgae as an alternative source for bioenergy production: A promising low cost substrate for microbial fuel cells. **Fuel Processing Technology**, v. 154, p. 104–116, 2016a.

BARCELLOS, A. D.; BARRETO, A. G. S.; MACHADO, B. A. S.; DRUZIAN, J. I. Microalgas e seu potencial de uso. **Cadernos de Prospecção**, 5 (4), 178-184, 2012

BEATTIE ET AL., 1961 J BEATTIE, C BRICKER, D GARVIN Photolytic determination of trace amounts of organic material in water *Anal. Chem.*, 33 (1961), pp. 1890-1892

BELL, PETER R., AND ALAN R. HEMSLEY. 2000. Green plants. Their origin and diversity. 2d ed. Cambridge, UK: Cambridge Univ.

BELLINGER, E. G.; SIGEE, D. C. Algas de água doce: Identificação e uso como bioindicadores. **Journal of Applied Phycology**, v. 25, n. 4, p. 1265-1266, 2010

BENEMANN, J. R.; TILLET, D. M.; WEISSMAN, J. C. Microalgae biotechnology. *Trends in Biotechnology*, v. 5, n. 2, p. 47–53, 1987.

BERTOLDI, F.C.; SANT ANNA, E.; OLIVEIRA, J.L.B. Revisão: Biotecnologia de microalgas. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, Curitiba, v.26, n.1, p.9-20, 2008.

BICUDO, C. E. M.; MENEZES, M. Gêneros de algas de águas continentais do Brasil. 2º ed. São Carlos: RiMa, 2006.

BORGHETTI, A, I., AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DA MICROALGA *Chlorella minutissima* EM MEIO DE CULTURA COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE MANIPUEIRA. 103f. Dissertação (Engenharia de Bioprocessos) - Universidade Federal do Paraná, 2009.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos - Lista dos Novos Ingredientes aprovados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária, maio de 2009.

BRENNAN, L.; OWENDE, P. Biofuels from microalgae: a review of technologies from production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Kidlington, v. 14, n. 2, p. 557-577, 2009,

BUONO S, LANGELLOTTI AL, MARTELLO A, BIMONTE M, TITO A, CAROLA A, APONE F, COLUCCI G, FOGLIANO V. Arch Dermatol Res. Biological activities of dermatological interest by the water extract of the microalga *Botryococcus braunii*. 2012 Nov;304(9):755-64. Epub 2012 Jun 9.

BURLEW, J.S. Algal culture from laboratory to pilot plant. Carnegie Institution of Washington, Washington DC, p. 357, 1953.

CALIJURI M.C.; ALVES MSA; SANTOS A.A. Cianobactérias e Cianotoxinas em Águas Continentais, São Carlos, Ed. Rima, 2006, 109p

CALIXTO, C. D. et al. Biochemical compositions and fatty acid profiles in four species of microalgae cultivated on household sewage and agro-industrial residues. *Bioresource Technology*, v. 221, p. 438–446, 2016.

CALIXTO, C. D. Potencial de microalgas regionais cultivadas em meios alternativos para produção de biodiesel. 2016. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2016.

CAPORGNO MP, MATHYS A. Trends in Microalgae Incorporation Into Innovative Food Products with Potential Health Benefits. **Front Nutr**. 2018 Jul 31;5:58.

CARDOSO, E. Uso de manipueira como biofertilizante no cultivo do milho: avaliação do efeito no solo, nas águas subterrâneas e na produtividade do milho. 2005. 35 f. Dissertação (Ciências Ambientais) – Universidade do Extremo Sul Catarinense. Criciúma, 2005.

CARTAS, LILIANA CARRILLO . Isolamento e cultivo de microalgas em resíduo líquido do processamento da mandioca 81 f. Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade Federal do Tocantins – Câmpus Universitário de Gurupi - Curso de Pós-Graduação (Mestrado) em Biotecnologia, 2018.

CARVALHO, A.V. et al. Caracterização tecnológica de extrusado de terceira geração à base de farinhas de mandioca e pupunha. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v.34, n.4, p.995-1003, 2010. Disponível em: <[http://www.editora.ufla.br/\\_adm/upload/revista/34-42010\\_28.pdf](http://www.editora.ufla.br/_adm/upload/revista/34-42010_28.pdf)>. Acesso em: 23 SET. 2019.

CARVALHO, M; SÔNIA M. F. GIANESELLA; FLÁVIA M. P. SALDANHA-CORRÊA., *Trichodesmium erythraeum* Bloom on the Continental Shelf off Santos, Southeast Brazil, *Braz. j. oceanogr.* vol.56 no.4 São Paulo Oct./Dec. 2008

CEREDA, M. P. (Coord.). Manejo, uso e tratamento de subprodutos da industrialização da mandioca. v.4. São Paulo: Fundação Cargill, 2001, 340p. (Série Cultura de tuberosas amiláceas latino-americanas).

CEREDA, M. P.; CHUZEL, G. C.; VILPOUX, O. F.; NUNES, O. L. G. S. Biotecnologia industrial. In: Modificação de fécula por fermentação. São Paulo: Edgard Blücher, p. 413-460, 2003.

CHINNASAMY, S.; BHATNAGAR, A.; CLAXTON, R.; DAS, K.C. Biomass and energy production potential of microalgae consortium in open and closed bioreactors using untreated carpet industry effluent as growth medium. **Bioresource Technology**, v.101, n.17, p. 67516760, 2010

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 3, p. 294–306, 2007.

COÊLHO,D,J., Produção de Mandioca – Raiz, Farinha e Fécula Escritório Técnico de Estudos Econômicos do Nordeste – ETENE, Ano 3 N° 44 |Setembro, 2018.

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

DERNER, R. B. Efeito de fontes de carbono no crescimento e na composição bioquímica das microalgas *Chaetoceros muelleri* e *Thalassiosira fluviatilis*, com ênfase no teor de ácidos graxos poliinsaturados. 2006. 140 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006

DIAS, L. T.; LEONEL, M. Caracterização físico-química de farinhas de mandioca de diferentes localidades do Brasil. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v. 30, n. 4, p. 692-700, 2006.

EL GAMAL, A. A. Biological importance of marine algae. *Saudi Pharmaceutical Journal*, v. 18, n. 1, p. 1–25, 2010

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). FAOSTAT, Disponível em: <http://faostat.fao.org/faostat/collections?version=ext&hasbulk=0&subset=agriculture>. Acesso em: 26 jul. 2010

FAO. Renewable biological systems for alternative sustainable energy production. 1997.

FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Statistics Division: Browse Data, Production, Crops.

FAROOQ, W.; LEE, Y.C.; RYU, B. G.; KIM, B. H.; KIM, H. S.; CHOI, Y. E, YANG, J. W Two-stage cultivation of two *Chlorella* sp. strains by simultaneous treatment of brewery wastewater and maximizing lipid productivity. **Bioresource Technology**, v. 132, p. 230–238, 2013.

FDA - Food and Drug Administration (2003). Disponível em: <http://www.fda.gov/Food/FoodIngredientsPackaging/GenerallyRecognizedasSafeGRAS/GRASListings/ucm153674.htm>. Acesso: outubro de 2019.

FIGUEIRA, F. D. S.; CRIZEL, T. D. M.; SILVA, C. R.; SALAS, M. M. Pão sem glúten enriquecido com a microalga *Spirulina platensis*. **Brazilian Journal of Food Technology**, 14 (4), 308–316, 2011.

FIGUEIREDO, L. H. M.; PENTEADO, M. I. O.; MEDEIROS, P .T. Patentes em biotecnologia, patenteamento em biotecnologia agropecuária: cenário brasileiro. *Biologia, Ciência e Desenvolvimento*. v. 36, p. 32-39, 2006,

FOLCH, J.; LESS, M.; STANLEY, S. A simples method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **Journal Biological Chemistry**, v. 226, n.1, p. 497-5091, 1957

FRAGOSO, S, P,. Desenvolvimento de bolachas com incorporação de diferentes microalgas. 83f. Dissertação (Mestrado) Engenharia alimentar – Universidade de Lisboa, 2016

FRANCESCHINI, I.M.; BURLIGA, A.L.; REVIERS, B.; PRADO, J.F.; RÉZIG, S. . Algas: uma abordagem filogenética, taxonômica e ecológica. Porto Alegre: Artmed, 2010.

FRANCO, A.L.C.; LÔBO, I.P.; CRUZ, R.S. Biodiesel de microalgas: avanços e desafios. **Química Nova**, v.36, n.3, p.437-448, 2013.

GENTILI, F. G. Microalgal biomass and lipid production in mixed municipal, dairy, pulp and paper wastewater together with added flue gases. **Bioresource Technology**, v. 169, p. 27–32, 2014.

GÓMEZ ,F. GÓMEZ, FURUYA, K , TAKEDA, S. Distribution of the cyanobacterium *Richelia intracellularis* as an epiphyte of the diatom *Chaetoceros compressus* in the western Pacific *Ocean* *Journal of Plankton Research*, Volume 27, Issue 4, April 2005, Pages 323–330

GORS ET AL., 2009 M. GORS, R. SCHUMANN, D. HEPPELLE, U. KARSTEN. Quality analysis of commercial *Chlorella* products used as dietary supplement in human nutrition. **Appl. Phycol.**, 22 (2009), pp. 265-276

GREENWELL, H. C.; LAURENS, L. M. L.; SHIELDS, R. J.; LOVITT, R. W.; FLYNN, K. J. Placing microalgae on the biofuels priority list: a review of the technological challenges. **Journal of the American Oil Chemist's Society**, Berlin, v. 7, p. 703-26, 2010.

GRESSLER, P. D. Desenvolvimento de Sistema para Cultivo de Microalgas e Ensaio Ecofisiológico para Aplicação em Biotecnologia Ambiental. 155f. Tese (Doutorado) Biotecnologia e Biociências – Universidade Federal de Santa Catarina, 2016

GUILLARD, R. R. L.; LORENZEN, C. J. Yellow-green algae with chlorophyllide. **Journal of Phycology**, v. 8, p. 10-14, 1972.

HASLE, G. R. & SYVERTSEN, E. E. Marine diatoms. In: Tomas, C. R. (ed.), Identifying marine diatoms and dinoflagellates. Academic Press, Inc., pp. 5-385, 1996.

HENA, S.; FATIMAH, S.; TABASSUM, S. Cultivation of algae consortium in a dairy farm wastewater for biodiesel production. **Water Resources and Industry**, v. 10, p. 1-14, 2015.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção agrícola municipal: Quantidade e valor da produção, área plantada e colhida. Disponível em: <<http://sidra.ibge.gov.br>>. Acesso em 20 ago. 2019

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Sistema de Recuperação Automática de Dados (SIDRA). Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/home/lspa/brasil>. Acesso em: 13 ago. 2019.

JOURDAN, J. P. **Cultivez votre spiruline – manuel de culture artisanale**, 1996.

KAHN et al., The promising future of microalgae: current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products. *Microbial Cell Factories*, v. 17, v. 36, p. 1-21, 2018.

KARAM, L. B.; GROSSMANN, M. V. E.; SILVA, R. S. S. F.; FERRERO, C., ZARITZKY, N. E Gel textural characteristics of corn, cassava and yam starch blends: a mixture surface response methodology approach. *Starch/Stärke*, Weinheim, v. 57, n. 2, p. 62-70, 2005.

KAWAGUCHI, K. Microalgae production systems in Asia. p. 25-23. 1980. In: SHELEF, G.; SOEDER, C. J. *Algae Biomass*. Amsterdam: **Elsevier/ North-Holland biomedical Press**, 1980

KLIGERMAN, D. C.; BOUWER, E. J. Prospects for biodiesel production from algae-based wastewater treatment in Brazil: **A review Renewable and Sustainable Energy Reviews** 52:1834-1846, 2015

KOCHERT, G. Carbohydrate determination by the phenol-sulfuric method. In: HELLEMBUST, J. A., CRAIGIE, J. S. (eds.). *Handbook of Phycological Methods. Physiological and Biochemical Methods*. Cambridge: Cambridge University, p. 95-97. 1978.

LAM, M. K.; LEE, K. T. Renewable and sustainable bioenergies production from palm oil mill effluent (POME): win-win strategies toward better environmental protection. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 1, p. 124–141, 2011.

LEE, B.D.; APEL, W.A.; WALTON, M.R. Screening of cyanobacterial species for calcification. *Biotechnology Progress*.n.20.p.1345-1351, 2004.

LEE, R. E. *Phycology*. Cambridge University Press, 1999

LELONG, A.; HEGARET, H.; SOUDANT, P. Cell-based measurements to assess physiological status of Pseudo-nitzschia multiseriis, a toxic diatom. *Research in Microbiology*, v. 162, p. 969-981, 2011

LEMES, A. C.; TAKEUCHI, K. P.; DE CARVALHO, J. C. M.; DANESI, E. D. G. Fresh pasta production enriched with Spirulina platensis biomass. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 55 (5), 741-750, 2012.

Lewis, L. & McCourt, R. 2004. Green algae and the origin of land plants. *American Journal of Botany* 91: 1535-1556.

LÓPEZ, C.V.G.; GARCIA, M.C.G.; FERNANDÉZ, F.G.A.; BUSTOS, C.S.; CHISTI, Y.; SEVILLA, J.M.A. Protein measurements of microalgal and cyanobacterial biomass. **Bioresource Technology**, v.101, n.19, p.7587-91, 2010.

LORENZI, A. S. Implementação da técnica de PCR Quantitativa Em Tempo Real (qPCR) para o monitoramento Microcystis e genótipos potencialmente produtores de microcistina. 2008. 174 p. Dissertação (Doutorado em Ciência) - Centro de Energia Nuclear em Agricultura, Universidade Estadual de São Paulo, Piracicaba, 2008

LOURENÇO, S. O. *Cultivo de Microalgas Marinhas: Princípios e Aplicações*. 1 ed. São Paulo: Rima, 2006. 606 p

LOURENÇO, S. O. *Cultivo de microalgas marinhas: princípios e aplicações*. São Carlos: RiMa, 2006. 606 p.

MADHU, G.M.; SATYANARAYANA, S.V. Spirulina in combating Protein Energy Malnutrition (PEM) and Protein Energy Wasting (PEW)-A review.**Journal of Nutrition Research**, v. 3, n. 1, p. 62-79, 2015.

MANDAL, S.; MALLICK, N. Waste utilization and biodiesel production by the green microalga Scenedesmus obliquus. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 77, n. 1, p. 374–377, 2011

MARIANO,F,V. Análises dos parâmetros de cultivo da microalga *Chlorella Vulgaris*, 65p. Dissertação (Mestrado em Ciências – Programa de pós graduação em Engenharia Química na Área de Desenvolvimento de Produtos e Processos) Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, 2018.

MASOJÍDEK J., VONSHAK A., TORZILLO G. (2010) Chlorophyll Fluorescence Applications in Microalgal Mass Cultures. In: Suggett D., Prášil O., Borowitzka M. (eds) Chlorophyll a Fluorescence in Aquatic Sciences: **Methods and Applications. Developments in Applied Phycology, vol 4. Springer, Dordrecht**

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. 217–32, 2010

MENEZES, R. S.; LELES, M. I. G.; SOARES, A. T.; FRANCO, P. I. M.; ANTONIOSI FILHO, N. R.; SANT'ANNA, C. L.; VIEIRA, A. A. H. Avaliação da potencialidade de microalgas dulcícolas como fonte de matéria-prima graxa para a produção de biodiesel. *Química Nova*, v. 13, n. 1, p. 10-15, 2013

MENG, X. et al. Biodiesel production from oleaginous microorganisms, **Renewable Energy**, 34, 2009

MOBIN, S. ; ALAM, F. Some promising microalgal species for commercial applications: A review 1st International Conference on Energy and Power, ICEP2016, 14-16 December 2016, RMIT University, Melbourne, Australia. *Energy Procedia* 110 ( 2017 ) 510 – 517, 2017

MONTERO, M.F.; ARISTIZÁBAL, M.; REINA, G.G. Isolation of high-lipid content strains of the marine microalga *Tetraselmis suecica* for biodiesel production by flow cytometry and single-cell sorting. **Journal of applied phycology**, v. 23, n. 6, p. 1053-1057, 2011.

NAGARAJAN, M.; MARUTHANAYAGAM, V.; SUNDARARAMAN, M. A review of pharmacological and toxicological potentials of marine cyanobacterial metabolites. **Journal of Applied Toxicology**. V. 32, p. 153–185, 2012.

OLAIZOLA, M. Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. **Biomolecular Engineering**, v. 20, p. 459-466, 2003.

PATEL, A. et al. Microalgae: Antiquity to era of integrated technology. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2016.

PRÖSCHOLD, T., T. Darienko, P. C. Silva, W. Reisser & L. Krienitz, 2011. The systematics of “*Zoochlorella*” revisited employing an integrative approach. *Environmental Microbiology* 13: 350–364.

PULZ O, CROSS W (2004) Valuable products from biotechnology of microalgae. **J Appl Microbiol Biotechnol** 65:635–648

RAJA, R.; HEMAISWARYA, S. Microalgae and Immune Potential. In: WATSON R. R., ZIBADI S., PREEDY V. R. **Dietary Components and Immune Function**. Humana Press: London, 2010, p. 515-527.

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

RAVEN, P. H. ; EVERT, R. F. ; EICHHORN, S. E. *Biologia vegetal*. 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. 830p.

RAVEN, P.R., EVERT, R.F. E EICHHORN, S.E. *Biologia vegetal*, 5. Ed. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 1996

REVIERS, B. de. *Biologia e filogenia das algas*. Porto Alegre: Artmed, 2006.

RIBEIRO, M, V, M, MELO I, S, M, LOPES, F, C, DA C, MOITA G, C,. Development and validation of a method for the determination of folic acid in different pharmaceutical formulations using derivative spectrophotometry. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences** vol. 52, n. 4, oct./dec., 2016

RICHMOND, A. Handbook of Microalgal Culture: biotechnology and applied phycology. **Oxford: Blackwell Science**, 2004. 566 p.

RODRÍGUEZ DE MARCO, E.; STEFFOLANI, M. E.; MARTÍNEZ, C. S.; LEÓN, A. E. Effects of Spirulina biomass on the technological and nutritional quality of bread wheat pasta. **LWT - Food Science and Technology**, 58 (1), 102–108, 2014.

Round, F.E.; Crawford, R.M.; Mann, D.G. 1990. *The diatoms - Biology and morphology of the genera*. Cambridge University Press, Cambridge. 747 pp.

SANTANA, J. K. S. Bioprospecção de cianobactérias dulcícolas isoladas do semiárido. 2019. 243p. Tese (Doutorado em Farmacoquímica de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2019

SANTOS K, C, LOPES J, G, COSTA, A, A,\* Mapeamento Tecnológico de Pedidos de Patentes Relacionados à Utilização das Microalgas. *Cad. Prospec.*, Salvador, v. 11, Edição Especial, p.236-244, abr./jun. 2018

SANTOS, M,M,. Novas tecnologias de colheita de microalgas para a produção de biodiesel . 60f. Dissertação (Mestrado Integrado em Engenharia da Energia e do Ambiente). Universidade de Lisboa, Lisboa, 2013

SANTOS, S.F.M. Estudo da produção de pectinases por fermentação em estado sólido utilizando pedúnculo de caju como substrato. Tese de Doutorado em Engenharia química. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2007

SASSI, K., K., B. Bioprospecção de metabólitos de interesse à indústria de alimentos produzidos por cepas regionais de microalgas em cultivos monoespecíficos, 2016. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2016.

SATÔ S., PARANAGUÁ MN., ESKINAZI E. On the mechanism of red TIDE of *Trichodesmium* in Recife north eastern Brazil, with some considerations of the relation to the human disease Tamandaré Fever. *Trabhs Inst Oceanogr (Univ Recife)*. 1966;5(6):7-49.

SHEEHAN, J.; DUNAHAY, T.; BENEMANN, J.; ROESSLER, P. A Look Back at the US Department of Energy's Aquatic Species Program: biodiesel from algae. Department of Energy's, Office of Fuels development. Colorado, 1998. 328 p

SHELEF, G.; SOEDER, C. J. Algae Biomass: production and use. Amsterdam: **Elsevier/North Holland Biomedical**, 1980. 852 p.

SILVA, A, P., Estudo do Processamento e da Qualidade Física, Físico-química e Sensorial da Farinha de Tapioca. 92f. Dissertação ( Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Pará, 2011

SILVA, F. DE A. S. E. & AZEVEDO, C. A. V. de. Versão do programa computacional Assistat para o sistema operacional Windows. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.4, n.1, p.71-78, 2002

SIMOLTON, S. Algae: Pond Scum or Food of the Future? 2018, acessado em 10/09/2019)

SMITH RE, CLEMENT P, COTA GF, LI WKW (1987) Intracellular photosynthate allocation and the control of Arctic marine ice algal production. *J Phycol* 23:124–132

SOPHIA, M. G. Desmídias de ambientes fitotérmicos bromelícolas. **Rev. Bras. Biol.** [online]. 1999, vol.59, n.1, pp.141-150. ISSN 0034-7108.

SPOLAORE, P.; JOANNIS-CASSEN, C.; DURAN, E.; ISAMBERT, A. Comercial applications of microalgae: **Review. Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 101, n. 2, p. 87-96, 2006

STEIN, J.R. Handbook of phycological methods: culture methods and growth measurements. In: Handbook of Phycological Methods. Cambridge University Press; p. 448. 1973.

**SUNDSTRÖM, B.G.** (1984). Observations on *Rhizosolenia clevei* Ostenfeld (Bacillariophyceae) and *Richelia intracellularis* Schmidt (Cyanophyceae). *Botanica Marina*, 27(8): 345-355

TEIXEIRA, C.M.; MORALES, E. Microalga como matéria-prima para a produção de biodiesel. *Biodiesel o novo combustível do Brasil*, p.91-96, Brasília. 2008

TOMASELLI, L. The microalgal Cell. In: RICHMOND, A. Handbook of Microalgal Culture: **Biotechnology and Applied Phycology**. Blackwell, Oxford, , 2004, p.3-19.

VARFOLOMEEV, S. D.; WASSERMAN, L. A.; Microalgae as source biofuel, food, fodder, and medicines, *Applied Biochemistry and Microbiology*, v. 47, n. 9, p. 789-807, 2011.

VIDAL, I,C,A,. Estudo da Potencialidade de Produção de Biocombustíveis entre as Microalgas *Chlorella* sp. E *Scenedesmus* sp. Cultivadas em Águas Residuárias. 103f. Trabalho de Conclusão de curso – Universidade Estadual da Paraíba, 2016

VIÊGAS, C. V. Extração e caracterização dos lipídeos da microalga *Chlorella pyrenoidosa* visando à produção de ésteres graxos. 73 f. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2010

VONSHAK, A. Laboratory techniques for the cultivation of microalgae. **Handbook of Microalgal Mass Culture**. Boca Raton: CRC, p. 117-145. 1990.

WILSON, K. E; HUNER, N. P A. The role of growth rate, redox-state of the plastoquinone pool and the trans-thylakoid Delta pH in photoacclimation of *Chlorella vulgaris* to growth irradiance and temperature. *Planta*, v. 212, p. 93–102, 2000

WOLF, M. T. A pesquisa científica e as patentes. *Biotechnology, Ciência e Desenvolvimento*, p. 16-17. 2005

ZHU, L. Biorefinery as a promising approach to promote microalgae industry: innovative framework. **Renewable and sustainable energy reviews**, v. 41, p. 1384, 2015.

ZHU, X.Z.; DAVIS, D.A.; ROY, L.A.; SAMOCHA, T.M.; LAZO, J.P. Response of Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, to Three Sources of Solvent Extracted 103 Soybean Meal. **Journal of the World Aquaculture Society**, v.44, n.3, p. 396404, 2013.

## **5 RESULTADOS E DISCUSSÃO – ARTIGOS ORIGINAIS**

**5.1 ARTIGO 1:** UTILIZAÇÃO DO SORO DE FÉCULA DE MANDIOCA PARA O CULTIVO DE MICROALGAS POTENCIALMENTE IMPORTANTES PARA A INDÚSTRIA DE ALIMENTOS.

**5.2 ARTIGO 2:** CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA BIOMASSA DE MICROALGAS CULTIVADAS EM MEIO DE CULTURA PREPARADO A PARTIR DE SORO DE FÉCULA DE MANDIOCA

**5.3 ARTIGO 3:** ENRIQUECIMENTO DA GOMA DA TAPIOCA COM BIOMASSA SECA DE *Scenedesmus* sp. CULTIVADA EM FOTOBIORREATOR EM MEIO ALTERNATIVO PREPARADO COM SORO DE FÉCULA DE MANDIOCA.

## ***5.1 ARTIGO 1***

---

## UTILIZAÇÃO DO SORO DE FÉCULA DE MANDIOCA PARA O CULTIVO DE MICROALGAS POTENCIALMENTE IMPORTANTES PARA A INDÚSTRIA DE ALIMENTOS.

### RESUMO

Microalgas são mini fábricas bioquímicas que mostram em sua biomassa enorme variabilidade de compostos, muitos deles de grande interesse econômico. A sua forma de cultivar influencia diretamente na sua rota metabólica. O uso de técnicas rápidas e eficazes para avaliar a fisiologia das células em cultivo, inclusive medidas de fotossíntese e avaliação lipídica. Tais abordagens possibilitam facilmente a triagem de novas espécies de interesse, sendo este aspecto outro ponto considerado neste trabalho. No entanto foram realizadas cultivos das cepas *Coelastrum* sp., *Oocystis* sp., *Scenedesmus quadricauda* e *Scenedesmus* sp. usando meio SFM em diferentes concentrações e como controle meio WC sendo acompanhado por dias através de citometria de fluxo, medidas da fluorescência “in vivo”, Medidas da eficiência da fotossíntese do fotossistema II (QY) bem como os transientes da fotossíntese da curva OJIP. Medidas da eficiência da fotossíntese do fotossistema II (QY) bem como os transientes da fotossíntese da curva OJIP. As espécies testadas *Coelastrum* sp e *Scenedesmus quadricauda* mostraram melhores resultados quando cultivadas na concentração de 25% de SFM e *Oocystis* e *Scenedesmus* sp. a 50% de SFM, quando analisadas por citometria. Os menores valores de Fv/Fm foram sempre registrados a 100% de SFM, indicando que essa concentração promove fotoinibição da fotossíntese, devido a turbidez do meio. Os maiores valores da atividade fotossintética foram registrados no controle, muito embora no 8ª dia de cultivo as medidas do QY superaram o controle a 50% de SFM em *Scenedesmus* sp. (D545WC) e no 12º dia em *Oocystis* sp. (D338WC). Com isso é possível constatar que o cultivo de microalgas com soro de fécula de mandioca é viável e apresenta grande perspectiva no tocante ao componente lipídico que apresentou sempre valores mais elevados do que aqueles registrados nos cultivos controle.

**Palavras-chave:** Citometria de fluxo; Eficiência fotossintética; Biorremediação; Meio alternativo.

## ABSTRACT

Microalgae are mini biochemical factories that show in their biomass huge variability of compounds, many of them of great economic interest. The way you cultivate directly influences your metabolic pathway. The use of rapid and effective techniques to evaluate the physiology of cultured cells, including photosynthesis and lipid measurements. Such approaches make it possible to easily screen new species of interest, and this aspect is another point considered in this paper. However, *Coelastrum* sp., *Oocystis* sp., *Scenedesmus quadricauda* and *Scenedesmus* sp. using SFM medium at different concentrations and as control WC medium being monitored for days by flow cytometry, in vivo fluorescence measurements, photosystem II (QY) photosynthesis efficiency measurements, and OJIP curve photosynthesis transients. Measurements of photosystem II (QY) photosynthesis efficiency as well as photosynthesis transients of the OJIP curve. The tested species *Coelastrum* sp and *Scenedesmus quadricauda* showed better results when cultivated at 25% concentration of SFM and *Oocystis* and *Scenedesmus* sp. 50% of FMS when analyzed by cytometry. The lowest values of  $F_v / F_m$  were always recorded at 100% of SFM, indicating that this concentration promotes photosynthesis photoinhibition due to medium turbidity. The highest values of photosynthetic activity were recorded in the control, although on the 8th day of cultivation the QY measurements exceeded the 50% control of SFM in *Scenedesmus* sp. (D545WC) and on the 12th day in *Oocystis* sp. (D338WC). Thus, it is possible to verify that the cultivation of microalgae with cassava starch serum is viable and presents a great perspective regarding the lipid component that always presented higher values than those registered in the control crops.

**Keywords:** Flow cytometry; Photosynthetic efficiency; Bioremediation; Alternative means.

## 1 INTRODUÇÃO

As microalgas possuem uma estrutura celular muito simples e uma alta relação superfície-volume que possibilita uma rápida metabolização dos nutrientes do meio, sendo ágeis na conversão de energia solar em energia química. Tais organismos são mini fábricas bioquímicas que mostram em sua biomassa enorme variabilidade de compostos, muitos deles de grande interesse econômico (ALMEIDA, 2017).

A síntese desses compostos está associada às condições de cultivo dentre as quais destacam-se fatores como temperatura, luz, e nutrientes, e a otimização daqueles de maior interesse pode ser feita mediante técnicas que aumentam a velocidade de crescimento ou que alteram o metabolismo celular. Desvios metabólicos podem ser obtidos por exemplo, pela aplicação de estresse nos cultivos, e por alterações nas formulações dos meios de cultura (MATA *et al.*, 2010).

Já é por demais conhecido que microalgas podem ser facilmente cultivadas em diversos tipos de meios alternativos. Existem trabalhos efetuados usando resíduos da suinocultura (ZHU *et al.*, 2013), da produção industrial de papel e celulose (GENTILI, 2014), de fazendas leiteiras (HENA *et al.*, 2015), da cana-de-açúcar (RAMIREZ *et al.*, 2014), da produção de cerveja (FAROOQ *et al.*, 2013), da fabricação de carpetes (CHINNASAMY *et al.*, 2010), da produção comercial de peixes em cativeiro (MANDAL e MALLICK, 2011), do processamento de óleo de palma (LAM e LEE, 2011), etc., e de vários tipos de meios preparados com biocompostos diversos - hortifrúteis, da cana-de-açúcar e vinhaça, de esterco de galinha etc, além de esgoto doméstico (KLIGERMAN e BOUWER, 2015, CALIXTO *et al.*, 2016).

A finalidade desses meios alternativos é, obviamente, a redução de custos de produção de biomassa, apesar de que os cultivos efetuados com esses efluentes permitem também que eles sejam eficazmente tratados pela tecnologia das microalgas, reduzindo os impactos causados ao ambiente pelo seu descarte inadequado. Um dos resíduos ainda não estudado neste contexto é o soro da fécula da mandioca, muito presente em áreas produtoras e processadoras da mandioca no Brasil, objeto de estudo deste trabalho.

Por outro lado, o mercado das microalgas ainda é bastante limitado, restringindo-se a poucas espécies. *Chlorella*, *Haematococcus*, *Dunaliella* e *Spirulina* são alguns exemplos que podem ser encontradas no mercado como suplemento nutricional (PRIYADARSHANI e RATH, 2012). O pequeno número de espécies incluídas na produção em escala industrial evidencia o baixo número de estudos com o

interesse de rastrear novas linhagens que também possam ter alto potencial para formulação de novos alimentos nutricionalmente ricos (GUZMÁN, 2012; BATISTA, 2013), a partir da enorme diversidade de microalgas existente, sendo este aspecto mais um propósito desta pesquisa.

A utilização de técnicas rápidas e eficazes para avaliar a fisiologia das células em cultivo, inclusive medidas de fotossíntese e avaliação lipídica, permite avaliar rapidamente, com eficácia, e utilizando pequeno volume de cultura, as mudanças que ocorrem no metabolismo celular nas diferentes etapas de crescimento e condições de cultivo. Tais abordagens possibilitam facilmente a triagem de novas espécies de interesse, sendo este aspecto outro ponto considerado neste trabalho.

## **2 METODOLOGIA**

### **2.1 Seleção das espécies de microalgas e cultivo em soro de fécula de mandioca**

Foram selecionadas quatro espécies de microalgas dulcícolas (clorofíceas) junto ao banco de cultura de microalgas do LARBIM/UFPB (Laboratório de Ambientes Recifais e Biotecnologia de Microalgas, Universidade Federal da Paraíba) (**Tabela 1**) para serem cultivadas em soro de fécula de mandioca, todas isoladas da região Nordeste do Brasil, tomando-se como critério de seleção o fato de apresentarem grande rendimento em biomassa quando cultivadas em meio sintético.

O soro da fécula de mandioca (SFM) foi cedido pela indústria alimentícia Da terra, localizada na Rua José Ferreira Vaz, 75- Alto do Eucalipto. Santa Rita-PB. Ao adquirir esse efluente ele foi imediatamente conservado a temperatura de 4°C, durante um período máximo de uma semana. A preparação desse resíduo para ser utilizado como meio alternativo de cultura de microalgas consistiu em filtração em filtros de fibra de vidro Whatmann GF/C de 47 mm de diâmetro, seguido de esterilização em autoclave e ajuste do pH para 7 com solução de Hidróxido de Sódio a 0,1N.

**Tabela 1.** Microalgas selecionadas para cultivo em soro de fécula de mandioca.

| Código | Gênero ou espécie              | Procedência   |
|--------|--------------------------------|---|
| D316WC | <i>Coelastrum</i> sp.          | Riacho da Bica, Parque Arruda Câmara, João Pessoa, PB |
| D338WC | <i>Oocystis</i> sp.            | Bebedouro das galinhas, Bayeux, PB                    |
| D447WC | <i>Scenedesmus quadricauda</i> | Açude Jardim do Seridó, PB                            |
| D545WC | <i>Scenedesmus</i> sp.         | Lagoa azul, Parque Nacional de Jericoacara, CE        |

As microalgas selecionadas foram cultivadas em balões de vidro de 250 mL com 150 mL de meio de cultura preparado com SFM nas concentrações de 100%, 50% e 25%. Como controle utilizou-se o meio WC (GUILLARD; LORENZEN, 1972) o qual também foi usado como diluente nas duas últimas concentrações de SFM. Os cultivos foram realizados em triplicatas em câmara climatizada ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ), com iluminação fornecida por lâmpadas fluorescentes tipo luz-do-dia ( $150 \mu\text{mol.fótons.m}^2.\text{s}^{-1}$ ) e fotoperíodo de 12 horas. A concentração de partida para o cultivo das microalgas selecionadas foi de  $2 \times 10^4$  células  $\text{mL}^{-1}$ .

O desenvolvimento dos cultivos foi avaliado a cada dois dias através de medidas da fluorescência “in vivo” usando um fluorômetro Turner Design 10005R em 5 mL de cada amostra, e por citometria de fluxo (FASCcalibur BD Biosciences, San Jose, CA USA) usando amostras de 300  $\mu\text{L}$ . Neste caso, foram usados os detectores forward scatter (FSC), que determina o tamanho celular, o side scatter (SSC) que determina a complexidade celular, assim como o detector vermelho (FL3, 670 nm), para a autofluorescência da clorofila (Hyka *et al.*, 2013), discriminando portanto a clorofila das células. A população celular foi quantificada num gráfico SSC vs FL3, sendo estimada levando em consideração o fluxo do citômetro ( $60 \mu\text{L} \pm 7 \mu\text{L}/\text{min}$ ) e o tempo (30s) de leitura. O software utilizado para a análises dos parâmetros foi o Flowing Software versão 2.5. O conteúdo lipídico das amostras foi determinado pela análise da fluorescência verde (FL1) utilizando BODIPY 493/503 (Difluoro{2-[1-(3,5-dimethyl-2Hpyrrol-2-ylidene-N)ethyl]-3,5-dimethyl-1H-pyrrolato-N}boronMolecular Probes, Invitrogen), na concentração de 10  $\mu\text{M}$  como marcador dos lipídios neutros e apolares. O tempo de marcação com BODIPY foi de 30 min (Lelong *et al.*, 2011).

Curvas de crescimento foram traçadas para as quatro microalgas para as condições testadas, obtendo-se a seguir a partir desses dados. A velocidade de

crescimento ( $k$ ) foi determinada conforme proposto por Stein (1973) e de acordo com Lourenço (2006).

Medidas da eficiência da fotossíntese do fotossistema II (QY) bem como os transientes da fotossíntese da curva OJIP foram efetuadas em diferentes momentos da curva de crescimento usando um fluorômetro AquaPen AP100 (Photon Systems Instruments, República Tcheca), com leituras em triplicata, sendo os resultados processados usando o software FluorPen™ (Photon Systems Instruments, República Tcheca). As medições foram efetuadas imediatamente após adaptação das células no escuro por 10 min, para permitir a abertura de todos os centros de reação do fotossistema II (Strasser et al., 2000) e uma rápida cinética de indução da fluorescência.

A partir da origem do sinal (O) as respostas evoluem rapidamente para um pico (P) que representa a fluorescência máxima ( $F_m$ ) da clorofila, e entre a origem e o pico ocorrem duas inflexões (J e I). A curva formada é conhecida como Curva de Kautsky (Kautsky e Hirsch, 1931), também denominada de teste OJIP (Strasser et al. 1995, 2004, Papageorgiou et al. 2007), e reflete mudanças no potencial redox do centro de reação do fotossistema II (Stirbet e Govindjee 2011). Fase O-J corresponde à fase fotoquímica, onde ocorre redução do processo de oxidação com gradual fechamento do fotossistema II, e a fase J-P corresponde à fase térmica, que é influenciada pela redução dos receptores de plastoquinoma. A diferença entre os valores da fluorescência inicial ( $F_o$ ) e final ( $F_m$ ) corresponde ao que se denomina fluorescência variável ( $F_v$ ), e a relação  $F_v/F_m$  se refere à Eficiência Fotossintética, ou Quantum Yield (QY) do fotossistema II (Malapascua et al., 2014).

Todos os cultivos foram interrompidos na fase estacionária. A biomassa obtida em cada frasco experimental foi concentrada em centrífuga refrigerada (Nova Técnica NT825), congelada a  $-30^\circ\text{C}$  num ultrafreezer (Terroni 90LT), liofilizada (liofilizador Terroni, modelo LD1500) e pesada em balança analítica.

## 2.2 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram efetuadas usando o programa Statgraphics centurion 17.1, ao nível de significância de 5%. A homocedasticidade das variâncias de todos os parâmetros analisados foi confirmada através do teste de Levene. As diferenças dos parâmetros celulares estudados nas diferentes condições testadas foram comparadas usando one-way ANOVA e o teste de Tukey HSD a posteriori. O teste Kruskal-Wallis foi

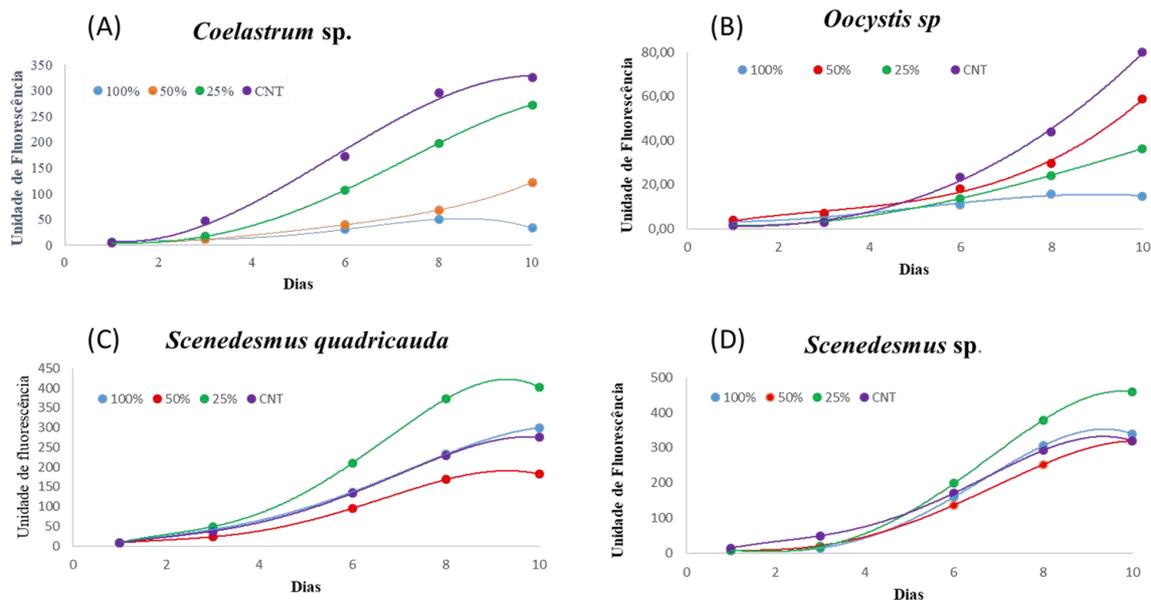
realizado para verificar as diferenças entre os tratamentos em diferentes concentrações do SFM. Os dados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão. Todas as análises estatísticas foram realizadas de acordo com Sokal e Rohlf (1983).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### **Desenvolvimento dos cultivos e parâmetros celulares determinados por citometria de fluxo**

Os resultados referentes às análises químicas do soro da fécula da tapioca para metais (Cd, Pb, Cr, Hg, Ni, Sb, Se, etc.) mostraram que os componentes analisados apresentaram valores abaixo do limite de detecção (**Anexo 1**), evidenciando que este efluente atende aos requisitos estabelecidos pela instrução normativa No. 46/2011 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2011), a qual estabelece os valores de referência utilizados como limites máximos de contaminantes admitidos em compostos orgânicos, resíduos de biodigestor, resíduos de lagoa de decantação e fermentação, e excrementos oriundos de sistema de criação com o uso intenso de alimentos e produtos obtidos de sistemas não-orgânicos, podendo portanto ser utilizado no preparo de meios alternativos para cultivos de microalgas no intuito de usar a biomassas em matrizes alimentares.

Os experimentos tiveram duração de 10 dias e mostraram diferenças nas respostas de crescimento entre as espécies estudadas. Os maiores crescimentos em SFM foram registrados nas espécies *Scenedesmus quadricauda* (D447WC) e *Scenedesmus* sp. (D545WC) na concentração de 25%, com valores superiores ao controle (**Figura 1**). O crescimento expressivo observado em diferentes diluições de SFM indica mixotrofia nas condições testadas, visto que o diluente desse resíduo foi o próprio meio WC.



**Figura 1.** Curvas de crescimento das quatro espécies estudadas nas diferentes concentrações de SFM e em meio WC controle (CNT). A: *Coelastrum* sp., B: *Oocystis* sp., C: *Scenedesmus quadricauda* e D: *Scenedesmus* sp.

As espécies testadas mostraram variações na cinética de crescimento nas concentrações de SFM. *S. quadricauda* (D447WC) e *Scenedesmus* sp. (D545WC) apresentaram os melhores desempenhos em SFM a 25%, superando o cultivo controle. O valor do  $k$  para essas espécies nos meios preparados com 100% e com 25% de SFM e no meio controle foi de  $5,94 \pm 0,16$ ,  $1,46 \pm 0,18$  e  $0,33 \pm 0,07$  divisões celulares. $\text{dia}^{-1}$ , respectivamente, evidenciando uma rápida resposta de crescimento, chegando à fase estacionária em 10 dias na maioria das espécies. Rápidas respostas de crescimento também foram observadas por Almeida, (2017) em *Scenedesmus obliquus* cultivada em efluentes domésticos e efluentes de vísceras como meios alternativos, que também apresentou duração de 10 dias até a fase estacionária.

O valor de  $k$  determinado para a espécie *Oocystis* sp. (D338WC) na concentração de 50% de SFM foi de  $0,43 \pm 0,09$ , muito similar ao registrado para o controle ( $0,45 \pm 0,11$ ). Alguns autores como Csavina *et al.*, 2011 mostraram que *Oocystis* sp. cultivada em meio ASW atingia crescimento máximo em 5 dias, com valores de  $k$  de  $0,48 \pm 0,01$ . As respostas de crescimento de *Coelastrum* sp. (D316WC) mostraram valores abaixo do controle em todas as diluições de SFM, evidenciando que esse meio alternativo não se mostra adequado ao cultivo dessa espécie. O maior crescimento dessa espécie em SFM foi registrado na diluição de 25% (**Figura 1**).

Alguns dos dados de fluorescência mostraram discrepâncias com os dados obtidos por citometria de fluxo para concentração celular, como se vê nas cepas

*Coelastrum* sp. (D316WC) e *Oocystis* sp. (D338WC). A análise de variância efetuada para este parâmetro demonstrou que os valores de concentração celular diferem estatisticamente das medidas de fluorescência, ao nível de 5% de significância ( $F=10,3846$ ;  $p= 0,015563$  e  $F= 9,40909$ ;  $p= 0,02431$ , respectivamente). Já os dados de fluorescência x concentração celular por citometria de fluxo (**Tabela 1**) corroboram para a cepas *Scenedesmus* sp. (D545WC) que mostraram melhor crescimento na concentração a 25%.

Tal fato pode estar associado com a turbidez do soro de fécula que promove maior dispersão e absorção da luz pelas partículas dissolvidas no meio, afetando a penetração de luz e diminuindo sua disponibilidade para as microalgas (SILVA e OLIVEIRA, 2001). Haixing *et al.*, 2017 também observaram esse fenômeno ao cultivar *Scenedesmus obliquos* em meio preparado com águas residuais municipais, tendo esses autores constatado aumento considerável da concentração celular no meio tratado em relação ao não tratado. Entretanto, para *S. quadricauda* (D447WC) a melhor resposta em termos de concentração celular foi encontrada em 100% de SFM.

**Tabela 1.** Parâmetros celulares determinados por citometria de fluxo nas microalgas cultivadas em meio WC e em diferentes concentrações de soro de fécula de mandioca. \*indicam diferenças estatísticas significativas (Kruskal-Walli,  $p \leq 0,05$ ).

| Parâmetros celulares                             | Tratamentos | <i>S. quadricauda</i> | <i>Scenedesmus</i> sp. | <i>Coelastrum</i> sp. | <i>Oocystis</i> sp. |
|--|-------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|---------------------|
| Concentração celular (células.mL <sup>-1</sup> ) | 100%*       | 1684,78±46,26         | 116,17±49,73           | 13,83±1,20            | 24,87±16,73         |
|  | 50%*        | 699,19 ±23,60         | 171,51±212,79          | 6,83±1,01             | 100,31±18,15        |
|  | 25%*        | 864,38±432,65         | 589,17±75,96           | 46,17±1,61            | 20,94±9,17          |
|  | WC*         | 1084,29 ± 68,51       | 4769,17±71,24          | 43,54±1,84            | 81,47±28,65         |
|  | <i>p</i>    |                       | 0,05466                | 0,02731               | 0,01556             |
| Tamanho (AU)                                     | 100%*       | 167,12± 5,48          | 127,33±16,85           | 99,03± 8,11           | 269,86±8,96         |
|  | 50%*        | 187,59± 3             | 86,7±8,14              | 136,66± 6,66          | 274,98±14,28        |
|  | 25%*        | 171,99± 1,51          | 30,16±2,23             | 91,26± 16,33          | 284,01±11,02        |
|  | WC*         | 171,26± 1,35          | 34,16±4,47             | 151,66± 0,88          | 261,53±0,99         |
|  | <i>p</i>    |                       | 0,10233                | 0,05563               | 0,02668             |
| Complexidade (AU)                                | 100%*       | 190,15± 3             | 76,93± 14,04           | 78,56± 16,03          | 211,8±33,16         |
|  | 50%*        | 406,12± 2,03          | 80,23± 11,51           | 152,66± 6,17          | 196,78±58,28        |
|  | 25%*        | 255,6± 23,31          | 20,33± 0,54            | 48,76± 0,73           | 247,89±48,17        |
|  | WC          | 185,24± 2,34          | 19,66±2,16             | 23,7± 1,5             | 154,46±1,11         |
|  | <i>p</i>    |                       | 0,02162                | 0,03781               | 0,01556             |
| Lípidios (AU)                                    | 100%        | 74,19±5,5             | 18,03± 0,84            | 95,83±7,8             | 640,18±57,75        |
|  | 50%         | 97,55± 6,74           | 41± 1,26               | 125,06± 17,7          | 811,72±51,72        |
|  | 25%         | 104,69± 18,26         | 12,3± 0,46             | 135±29,39             | 465,46±235,12       |
|  | WC          | 76,69± 5,02           | 12,5± 1,62             | 45,73± 6,29           | 773,17±170,6        |
|  | <i>p</i>    |                       | 0,1260                 | 0,02450               | 0,06901             |

Esses achados podem estar relacionados aos dados de complexidade e tamanho celular. Estes parâmetros mostraram respostas diferentes para cada cultivo (Tabela 1), provavelmente devido ao metabolismo das células nas diferentes concentrações de

SFM. Destaca-se, ainda, o fato das cepas *Coelastrum* sp. (D316WC) e *Scenedesmus* sp. (D545WC) apresentarem melhor resposta na concentração celular no meio preparado com 25% de SFM. No geral, o tamanho celular aumentou em algumas diluições para *S. quadricauda*, *Scenedesmus* sp., *Oocystis* sp. (D338WC) e diminuiu em *Coelastrum* sp. (D316WC) (**Tabela 1**).

Quanto à complexidade celular os dados evidenciaram aumento em relação ao controle em todas as concentrações de soro de fécula de mandioca (**Tabela 1**). Esses aumentos foram mais expressivos em *S. quadricauda* (D447WC) na concentração de 50% de SFM, bem como em *Scenedesmus* sp. (D545WC) e em *Coelastrum* sp. (D316WC) na mesma concentração, enquanto que para *Oocystis* sp. (D338WC) o maior valor para este parâmetro foi registrado na diluição de 25% de SFM.

As discrepâncias observadas entre as espécies no tocante aos parâmetros celulares avaliados demonstram que respostas fisiológicas podem variar de acordo com as condições de cultivo (SANTANA, 2014). A complexidade celular, por exemplo, pode estar relacionada com a agregação de diferentes moléculas de armazenamento como carboidratos e lipídios (FACHET *et al.*, 2016; SASSI, 2016) e pode também estar associada a uma maior aglomeração de clorofila e componentes bioquímicos como proteínas e carboidratos, conforme também observado por Semião, 2013, em cultivos de *Chlorella protothecoides* em condições autotrófica e heterotrófica. . As estimativas lipídicas determinadas por citometria de fluxo mostraram valores mais elevados do que o controle em praticamente todas as concentrações de SFM em *S. quadricauda*, *Scenedesmus* sp. e *Coelastrum* sp., e a 50% de SFM em *Oocystis* sp. (**Tabela 1**). Os maiores aumentos em relação ao controle foram observados em *Scenedesmus* sp. na concentração de 50% de SFM (3,28 vezes a mais) e em *Coelastrum* sp. a 25% de SFM (2,95 vezes a mais) (**Tabela 2**), porém, a diferença nos teores de lipídios entre os tratamentos para essas duas espécies não foi significativa ( $F = 5,719$ ;  $p = 0,1260$  e  $F = 7,090$ ;  $p = 0,06901$ , respectivamente). Para *Oocystis* sp. o maior valor foi registrado a 50% de SFM, mas a diferença entre os tratamentos também não foi significativa ( $F = 3,3076$ ;  $p = 0,3465$ ) (**Tabela 1**). As análises estatísticas para a estimativa de lipídios de *Scenedesmus* sp. mostraram diferença significativa entre as concentrações de cultivo com nível de confiança de 95% ( $F = 9,39181$ ;  $p = 0,02450$ ).

A observação de que *Scenedesmus* sp. e *Coelastrum* sp. acumulam grande quantidade de lipídio quando cultivada em soro da fécula de mandioca tem grande

relevância para indústria de alimentos e para diversos processos biotecnológicos por possibilitar redução nos custos na obtenção desse composto.

**Tabela 2.** Concentrações de SFM onde os maiores aumentos na síntese de lipídios foram registrados.

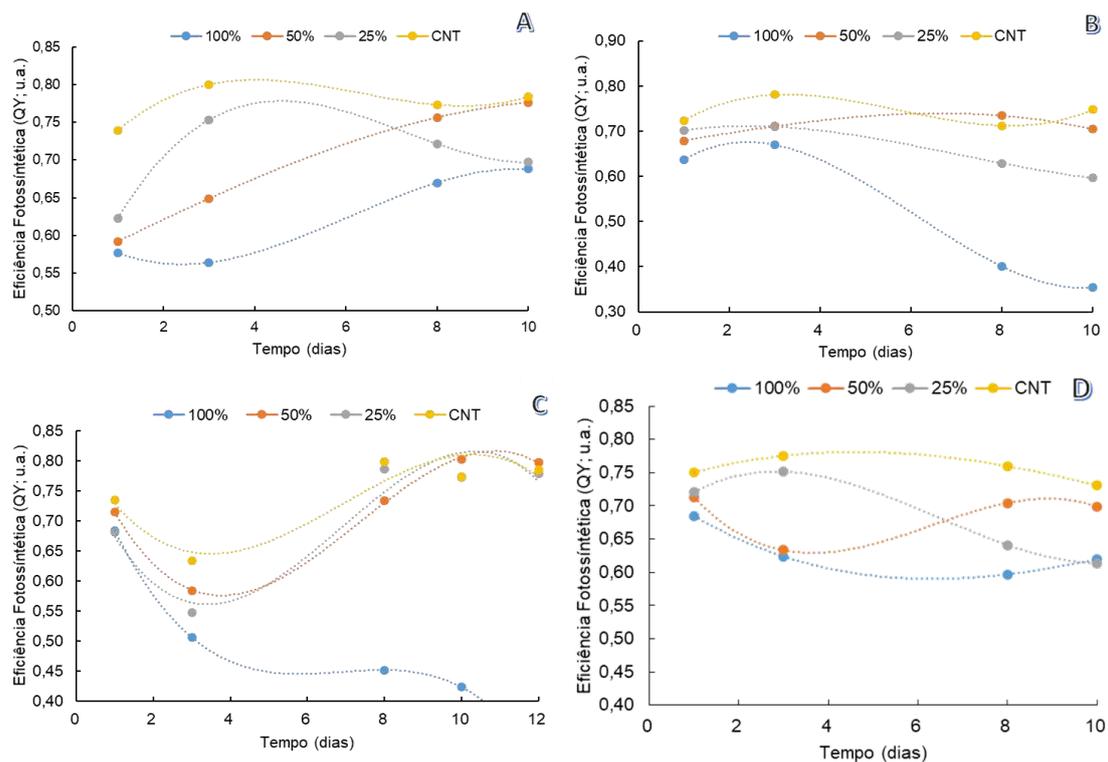
| Espécie                | Aumento de lipídios em relação ao controle | Concentração de SFM de referência |
|------------------------|--|-----------------------------------|
| <i>S. quadricauda</i>  | 1,36 x                                     | 25%                               |
| <i>Scenedesmus</i> sp. | 3,28 x                                     | 50%                               |
| <i>Coelastrum</i> sp., | 2,95 x                                     | 25%                               |
| <i>Oocystis</i> sp.    | 1,04 x                                     | 50%                               |

Comparando-se os dados de lipídios com os dados da complexidade celular evidencia-se que não há uma correspondência recíproca entre esses dois parâmetros em relação aos valores máximos registrados nas diluições adotadas, apesar de que a complexidade celular também possa estar diretamente ligada a vários componentes químicos como lipídios (DAVIS *et al.*, 2011; MARTIN e GROSSMANN, 2013).

Das espécies testadas evidencia-se que *Oocystis* sp. foi a que apresentou os menores incrementos na síntese lipídica em relação ao controle, evidenciando esses dados que esta espécie não apresentava potencial para matéria graxa. Dados similares foram registrados por Dunker *et al.*, (2013) em cultivos de *Oocystis marsonii*.

### **Eficiência da fotossíntese durante os cultivos**

O rendimento fotoquímico máximo do Fotossistema II ( $QY = FV/FM$ ) determinados para as diferentes espécies de microalgas cultivadas demonstraram uma excelente eficiência fotossintética no meio WC, com valores de  $Fv/Fm$  superior a 0,70 no final da fase exponencial, na fase estacionária a 50% de SFM para as espécies *Scenedesmus quadricauda* (D447WC) e *Scenedesmus* sp. (D545WC), e a 50% e 25% de SFM para *Oocystis* sp. (D338W). Os menores valores de  $Fv/Fm$  foram sempre registrados a 100% de SFM, indicando que essa concentração promove fotoinibição da fotossíntese, devido a turbidez do meio (**Figura 2**). Os maiores valores da atividade fotossintética foram registrados no controle, muito embora no 8<sup>a</sup> dia de cultivo as medidas do QY superaram o controle a 50% de SFM em *Scenedesmus* sp. (D545WC) e no 12<sup>o</sup> dia em *Oocystis* sp. (D338WC).



**Figura 2** – Eficiência da fotossíntese ( $QY = Fv/FM$ ) das microalgas estudadas nas diferentes condições de cultivo: A) D316WC, B) D545WC e C) D338WC.

A manutenção de um alto rendimento quântico é fundamental para manter o estado fisiológico das células e o metabolismo celular. Reduções na relação  $Fv/Fm$  como em algumas concentrações ao longo da curva de crescimento, particularmente a 100% de SFM, indica mudanças na atividade do PSII. A irreversibilidade dessas mudanças, como observado a 100% de SFM com substancial queda na eficiência da fotossíntese nas fases exponencial e estacionária indica danos fotossintéticos que reduzem a fotossíntese (HENLEY *et al.* 1991, OSMOND; GRACE, 1995; JONES; HOEGH-GULDBERG, 2001), diminuindo as condições fisiológicas da cultura. Evidencia-se, desse modo, que a rápida recuperação de  $Fv/Fm$  está associada ao rápido mecanismo reversível fotoprotetor de dissipação de energia ( $Q_e$ ) que relaxa em poucos minutos e está associado ao gradiente transtilacoidal de pH (QUICK; HORTON 1984, MÜLLER *et al.*, 2001).

A medição “in vivo” dos transientes de fluorescência da clorofila-a realizada com o intuito de avaliar o desempenho fotossintético das microalgas estudadas nas diferentes diluições de SFM e no meio controle permitiram observar a dinâmica do transporte dos elétrons através dos transientes de fluorescência O-J-I-P (**Figura 3**), evidenciando o mesmo padrão em todos os cultivos, com maior amplitude de Fm entre

100.000ms e 1.000.000ms, porém cada espécie apresentou respostas diferentes na fotossíntese ao longo do desenvolvimento dos cultivos no meio controle e nas diferentes concentrações de SFM.

Para a espécie D316WC (A1 a A4) os valores máximos da fluorescência da clorofila foram sempre mais elevados no controle, muito embora a fase LAG tenha mostrado valores expressivos em todas as diluições de SFM, porém com redução considerável nesses valores durante o desenvolvimento do cultivo. Os maiores valores dos transientes da fotossíntese no meio alternativo utilizado foram registrados a 25% de SFM.

Para a espécie D454WC (B1 a B4) os valores máximos da fluorescência da clorofila foram mais elevados no controle, muito embora as diluições de 25% e de 50% de SFM tenham sido muito próximas do controle, inclusive a 25% superando em alguns pontos da curva as respostas do controle na fase exponencial (curvas B3 e B4).

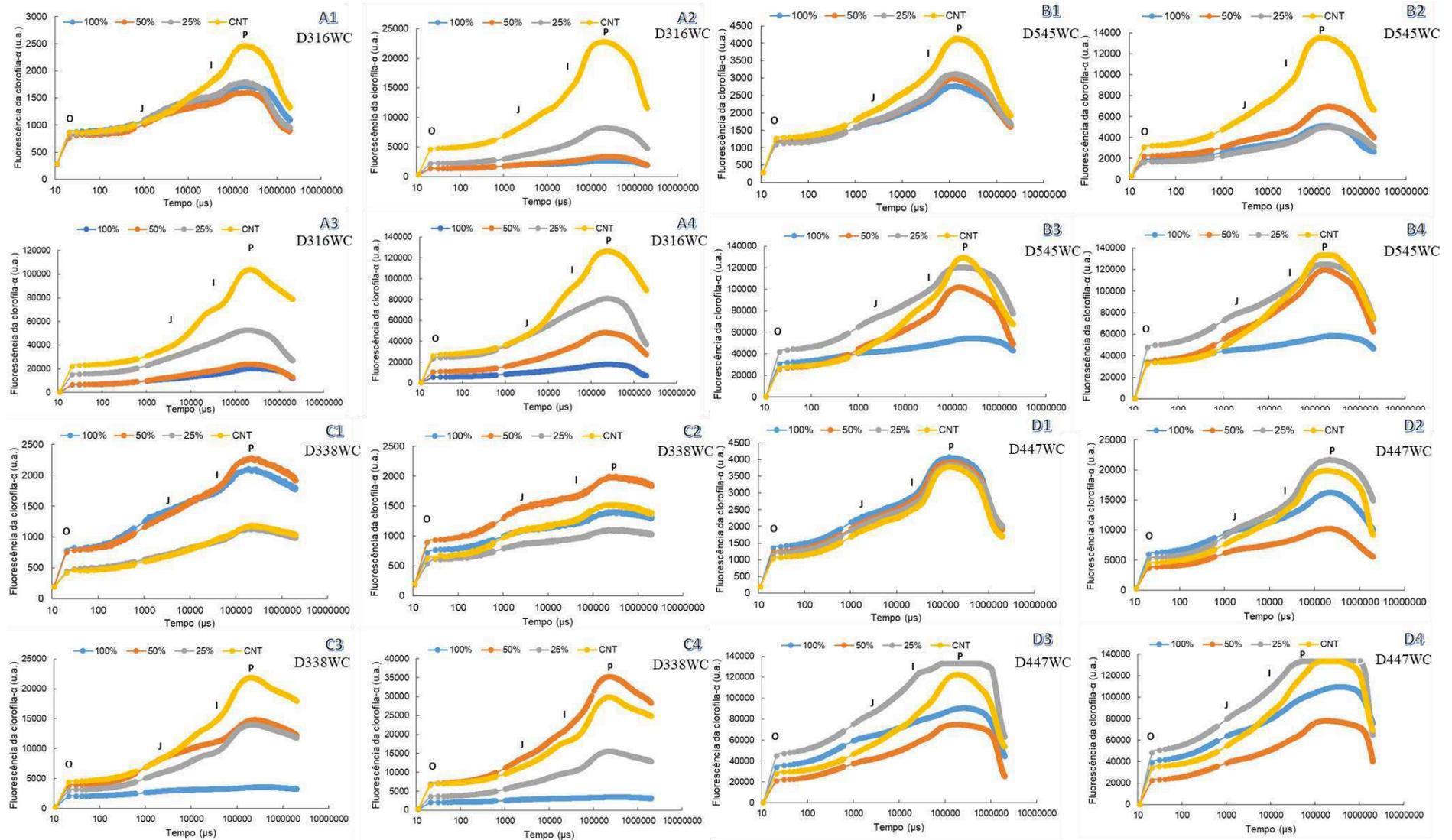
Na espécie D338WC (C1 a C4) os valores de  $F_m$  nas concentrações de 50% e 100% de SFM superaram o controle na fase lag (3º dia, C1); os valores de 100% continuaram sendo superiores ao demais no início da fase log (8ª dia, C2), porém no 8ª dia da fase LOG (C3) e na fase estacionária (C4, 10º dia) as respostas para o cultivo em 50% de SFM superaram as demais condições e o controle.

A espécie D447WC, por sua vez, mostrou respostas semelhantes na curva OJIP na fase LAG em todos os cultivos (D1, 3º dia), mas à medida em que os cultivos progrediam os valores para a concentração de 25% de SFM foram se sobressaindo, superando inclusive o controle na fase LOG e na fase estacionária.

Os dados dessas análises mostram que as espécies D454WC, D316WC e D447WC têm respostas similares às da amostra controle em algumas concentrações de SFM, enquanto que a espécie D316WC apresenta limitações fisiológicas para o desenvolvimento da fotossíntese relativa ao fotossistema II, devido a mudanças no estado redox do centro de reação do PSII (RCII) que afetam os processos primários da fotossíntese. Desde que o fotossistema II (PSII) é o componente mais sensível da cadeia de transporte de elétrons (CAJANEK et al., 1998) qualquer dano ao PSII é frequentemente a primeira manifestação de estresse (MALAPASCUA et al., 2014), permitindo-se deduzir, portanto, que nesta espécie e em algumas concentrações de SFM onde as respostas foram baixas nas demais espécies, tanto a composição desse meio como a sua diluição podem induzir algum tipo estresse. Particularmente, as baixas respostas a 100% de SFM podem refletir fotoinibição devido ao excesso de turbidez da

amostra.

O teste OJIP é uma importante ferramenta que permite avaliar modificações na fotoquímica do PSII tanto em plantas superiores como em algas e cianobactérias (MALAPASCUA et al., 2014) e tem sido usado em muitos estudos aplicados ao entendimento da estrutura e da função do aparato fotossintético, condições fisiológicas, e até mesmo na seleção de espécies que sejam tolerantes às condições de estresse (HERMANS et al., 2003, GONCALVES & SANTOS, 2005). A diminuição no rendimento da fluorescência observada em algumas situações nas microalgas estudadas indica inibição do fluxo de elétrons no local de oxidação do PSII (LU & VONSHAK, 2002). A redução da amplitude da Fm e na curva OJIP podem estar relacionadas com a inibição do transporte de elétrons no lado doador do PSII, o que resulta no acúmulo de P680 + (GOVINDJEE, 1995; NEUBAUER & SCHREIBER., 1987), ou ainda, com a diminuição no tamanho do pool de plastoquinona A (QA) (MALAPASCUA et al., 2014).



**Figura. 3.** Curvas da fluorescência da clorofila a (OJIP) das microalgas estudadas nas diferentes condições de cultivo: A1,B1,C1,D1 = Fase LAG, 48 h; A2,B2,C2,D2 = Fase LOG, 3º dia; A3,B3,C3,D4= Fase LOG, 8º dia e A4,B4,C4,D4= Fase Estacionária, 10º dia.

#### 4 CONCLUSÃO

Os dados permitiram constatar que o cultivo de microalgas com soro de fécula de mandioca é viável e apresenta grande perspectiva no tocante ao componente lipídico que apresentou sempre valores mais elevados do que aqueles registrados nos cultivos controle. A possibilidade de dar ao soro de fécula de mandioca um viés econômico utilizando-o na produção de biomassa de microalgas e extração de metabólitos de interesse comercial abre caminho para a biorremediação desse efluente com agregação de valor. Para as espécies testadas conclui-se que *Coelastrum* sp e *Scenedesmus quadricauda* mostraram melhores resultados quando cultivadas na concentração de 25% de SFM e *Oocystis* e *Scenedesmus* sp. a 50% de SFM.

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, L, M, R, SOUZA, C, O, RIBEIRO ,P, L, L , DRUZIAN, J, I , MIRANDA M, S,. Estudo Prospectivo sobre Produtos Alimentares Incorporados de Biomassa de Microalgas. Salvador, v. 10, n. 4, p. 893-904 out/dez.2017
- BATISTA, A. P.; GOUVEIA, L.; BANDARRA, N. M.; FRANCO, J. M.; RAYMUNDO, A. Comparison of microalgal biomass profiles as novel functional ingredient for food products. **Algal Research**, 2, 164-173, 2013.
- C.B. OSMOND, S.C. GRACE, Perspectives on photoinhibition and photorespiration in the field: quintessential inefficiencies of the light and dark reactions of photosynthesis?, *Journal of Experimental Botany*, Volume 46, Issue special\_issue, September 1995, Pages 1351–1362,
- ČAJÁNEK M, ŠTROCH M, LACHETOVÁ I, JIŘÍ K, SPUNDA V. Characterization of the photosystem II inactivation of heat-stressed barley leaves as monitored by the various parameters of chlorophyll a fluorescence and delayed fluorescence, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, Volume 47, Issue 1, 1998, Pages 39-45, ISSN 1011-1344, [https://doi.org/10.1016/S1011-1344\(98\)00197-3](https://doi.org/10.1016/S1011-1344(98)00197-3).
- CALIXTO, C. D. et al. Biochemical compositions and fatty acid profiles in four species of microalgae cultivated on household sewage and agro-industrial residues. **Bioresource Technology**, v. 221, p. 438–446, 2016.
- CHINNASAMY, S.; BHATNAGAR, A.; CLAXTON, R.; DAS, K.C. Biomass and energy production potential of microalgae consortium in open and closed bioreactors using untreated carpet industry effluent as growth medium. **Bioresource Technology**, v.101, n.17, p. 67516760, 2010
- CSAVINA J.L., STUART B.J., GUY R. RIEFFER AND M.L. VIS Growth optimization of algae for biodiesel production. *Journal of Applied Microbiology* ISSN 1364-5072, 2011.
- DAVIS, R.; ADEN, A.; PIENKOS, P. T. Techno-economic analysis of autotrophic microalgae for fuel production. **Applied Energy**, v. 88, n. 10, p. 3524-3531, 2011.
- DEVI, M.P.; SWAMY, Y.V.; VENKATA MOHAN, S., Nutritional mode influences lipid accumulation in microalgae with the function of carbon sequestration and nutrient supplementation. **Bioresour. Technol.** 142, 278–286. 2013.
- DOIG, L, D,. Lipid accumulation in mixed photoautotrophic cultures from municipal wastewater. MONTANA STATE UNIVERSITY. April 2016
- DUNKER, S, JAKOB, T AND WILHELM C,. Contrasting effects of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* on the growth and physiology of two green algae, *Oocystis marsonii* and *Scenedesmus obliquus*, revealed by flow cytometry. **Freshwater Biology** (2013) 58, 1573–1587
- FACHET, M.; HERMSDORF, D.; RIIKO-STRUCKMANN, L.; SUNDMACHER, K. Flow cytometry enables dynamic tracking of algal stress response: A case study using carotenogenesis in *Dunaliella salina*. **Algal Research**, v. 13, p. 227-234, 2016.
- FAROOQ, W.; LEE, Y.C.; RYU, B. G.; KIM, B. H.; KIM, H. S.; CHOI, Y. E, YANG, J. W Two-stage cultivation of two *Chlorella* sp. strains by simultaneous treatment of brewery

wastewater and maximizing lipid productivity. **Bioresource Technology**, v. 132, p. 230–238, 2013.

FIELDS, M. W., HISE, A., LOHMAN, E. J., BELL, T., GARDNER, R. D., CORREDOR, L., ... GERLACH, R. (2014). Sources and resources: Importance of nutrients, resource allocation, and ecology in microalgal cultivation for lipid accumulation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 98(11), 4805–4816

GARDNER, R., PETERS, P., PEYTON, B., & COOKSEY, K. E. (2011). Medium pH and nitrate concentration effects on accumulation of triacylglycerol in two members of the chlorophyta. **Journal of Applied Phycology**, 23(6), 1005–1016.

GENTILI, F. G. Microalgal biomass and lipid production in mixed municipal, dairy, pulp and paper wastewater together with added flue gases. **Bioresource Technology**, v. 169, p. 27–32, 2014.

GUILLARD, R.R.L.; LORENZEN, C.J. Yellow-green algae with chlorophyllidc. **Journal of Phycology**, v.8, p.10-14, 1972.

Guzmán, H. M.; Valido, A. de La J.; Duarte, L. C.; Presmanes, K. F.; J. Appl. Phycol. 2012, 23, 7.

HAIXING C, QIAN, F, YUN, H, XIA, A, QIANG, L, XUN, Z,. Improvement of microalgae lipid productivity and quality in an ion-exchange-membrane photobioreactor using real municipal wastewater. *Int J Agric & Biol Eng*, 10 No.1 January, 2017

HENA, S.; FATIMAH, S.; TABASSUM, S. Cultivation of algae consortium in a dairy farm wastewater for biodiesel production. **Water Resources and Industry**, v, 10, p. 1–14, 2015.

HUNTLEY, M., REDALJE, D. CO<sub>2</sub> mitigation and renewable oil from photosynthetic microbes: a new appraisal. *Mitig. Adapt. Strategies Glob. Change* 12, 573–608, 2007

KLIGERMAN, D.C.; BOUWER, E.J. Prospects for biodiesel production from algae-based wastewater treatment in Brazil: A review **Renewable and Sustainable Energy Reviews** 52:1834-1846, 2015

LAM, M. K.; LEE, K. T. Renewable and sustainable bioenergies production from palm oil mill effluent (POME): win–win strategies toward better environmental protection. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 1, p. 124–141, 2011.

LU, C. AND VONSHAK, A. (2002), Effects of salinity stress on photosystem II function in cyanobacterial *Spirulina platensis* cells. *Physiologia Plantarum*, 114: 405-413. doi:10.1034/j.1399-3054.2002.1140310.x

MALAPASCUA JRF, JEREZ CG, SERGEJEVOVÁ M, FIGUEROA FL, MASOJÍDEK J (2014). Photosynthesis monitoring to optimize growth of microalgal mass cultures: application of chlorophyll fluorescence techniques. *Aquat Biol* 22:123-140. <https://doi.org/10.3354/ab00597>

MANDAL, S.; MALLICK, N. Waste utilization and biodiesel production by the green microalga *Scenedesmus obliquus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 1, p. 374–377, 2011

MARTINS, M, GROSSMANN I, E. Optimal Engineered Algae Composition for the Integrated Simultaneous Production of Bioethanol and Biodiesel. April 2, 2013 in Wiley Online Library

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. 217–32, 2010

MONTERO, M.F.; ARISTIZÁBAL, M.; REINA, G.G. Isolation of high-lipid content strains of the marine microalga *Tetraselmis suecica* for biodiesel production by flow cytometry and single-cell sorting. **Journal of applied phycology**, v. 23, n. 6, p. 1053-1057, 2011.

MÜLLER, P., LI, X-P., NIYOGI, K. K. 2001. Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. *Plant Physiol.* 125:1558-1566

NEUBAUER, C. & SCHREIBER, U. (1987). The Polyphasic Rise of Chlorophyll Fluorescence upon Onset of Strong Continuous Illumination: I. Saturation Characteristics and Partial Control by the Photosystem II Acceptor Side. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 42(11-12), pp. 1246-1254.

PRIYADARSHANI, I.; RATH, B. Commercial and industrial applications of micro algae – a review. **J. Algal Biomass Utiln**, v.3, n.4, p.89–100, 2012.

QUICK W. P. HORTON PETER AND WALKER DAVID ALAN Studies on the induction of chlorophyll fluorescence in barley protoplasts. II. Resolution of fluorescence quenching by redox state and the transthylakoid pH gradient **220Proc. R. Soc. Lond.** [Bhttp://doi.org/10.1098/rspb.1984.0007](http://doi.org/10.1098/rspb.1984.0007)

SANTANA,S.K.J. Microalgas sob a ótica da biotecnologia e do uso popular em comunidades rurais com ênfase em espécies isoladas do bioma caatinga. 141 P. Dissertação (Mestrado Desenvolvimento e Meio Ambiente).PRODEMA. Unversidade Federal da Paraíba,João Pessoa, 2014.

SASSI, K., K., B. Bioprospecção de metabólitos de interesse à indústria de alimentos produzidos por cepas regionais de microalgas em cultivos monoespecíficos, 2016. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2016.

SEMIÃO,F.J. (2013). Produção de single cell oil para biodiesel a partir da microalga *Chlorella protothecoides* em cultivo autotrófico e heterotrófico em simultâneo com troca simbiótica de correntes gasosas em circuito fechado. Dissertação de Mestrado em Engenharia Biológica, Instituto Superior Tecnico , Lisboa .

SILVA SA, OLIVEIRA R de O (2001) Manual de análises físico-químicas de águas de abastecimento e residuárias. Campina Grande: Paraíba.

SOKAL RR, ROHLF FJ (1995) Biometry. The principles and practice of statistics in biological research. Freeman, New York

STEIN, J.R. Handbook of phycological methods: culture methods and growth measurements. In: Handbook of Phycological Methods. Cambridge University Press; p. 448. 1973.

ZHU, X.Z.; DAVIS, D.A.; ROY, L.A.; SAMOCHA, T.M.; LAZO, J.P. Response of Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, to Three Sources of Solvent Extracted 103 Soybean Meal. **Journal of th.**

## ANEXO 1



## RELATÓRIO DE ENSAIO

Controle de impressão | ddy5YZ | 14/07/2017 - 09:31

RELATÓRIO COD: ARG.2017.05-78-A26

Data envio 11/07/2017

## INFORMAÇÕES ADICIONAIS/RECOMENDAÇÕES

Nitrogênio amoniacal não realizado, pois não foi recebida amostra sem acidificação.

## RESPONSÁVEIS

|                                    |                              |
|------------------------------------|------------------------------|
| TARCILA MARIA PINHEIRO FROTA       | CREA/RN 2100583999           |
| EMILY CINTIA TOSSI DE ARAÚJO COSTA | CRQ/RN 15.100.217            |
| DJALMA RIBEIRO DA SILVA            | CRQ/RN 151.001.065 XV Regiao |
| RAONI BATISTA DOS ANJOS            | Raoni Batista dos Anjos      |

## ANEXO 1 (Continuação)



## RELATÓRIO DE ENSAIO

Controle de impressão | 2c77ZA | 14/07/2017 - 09:31

RELATÓRIO COD: ARG.2017.05-78-A26

Data envio 11/07/2017

## DADOS DO CLIENTE

PROJETO: RELATÓRIO DE ANÁLISES DO RIO GRAMAME  
 CLIENTE: FUNDAÇÃO PARQUE TECNOLÓGICO DA PARAÍBA  
 SOLICITANTE: FUNDAÇÃO PARQUE TECNOLÓGICO DA PARAÍBA  
 RAZÃO SOCIAL: FUNDAÇÃO PARQUE TECNOLÓGICO DA PARAÍBA - PAOTCPB  
 ENDEREÇO: RUA EMILIANO ROSENDO SILVA - 115. BODOCONGÓ - CAMPINA GRANDE - PB, CEP: 58431-000  
 FISCAL: PROFA. DRA. MÁRCIA HELENA PONTIERI  
 CONTRATO:

## DADOS DA AMOSTRA

NOME: VIVIANE - SORO DE FÉCULA DE MANDIOCA  
 LOCAL: VIVIANE - ÁGUA DE LAVAGEM DE MANDIOCA  
 RESPONSÁVEL PELA COLETA: ILDA TOSCANO - UFPB  
 TEMP. RECEBIMENTO:  
 DATA ENTRADA: 25/05/2017  
 DATA DA COLETA:  
 HORA DA COLETA:  
 PROJETO EXTERNO:  
 CUSTODIA: ARG.2017\_05\_78

TIPO DE AMOSTRA: LIQUIDA  
 RELATÓRIO VERSÃO: 1.0  
 ID:  
 NOTA FISCAL:  
 POÇO:

## RESULTADOS

## RESULTADOS CATIONS

| PARÂMETRO                                 | UNIDADE | LD     | LQ     | VMP    | MÉTODO    | BRANCO | RESULT. |
|---|---------|--------|--------|--------|-----------|--------|---------|
| Zinco total                               | mg/L    | 0,0005 | 0,0015 | 0,18   | PLIE01R00 | < LD   | 0,293   |
| Antimônio                                 | mg/L    | 0,0030 | 0,0090 | 0,005  | PLIE01R00 | < LD   | < LD    |
| Bário total                               | mg/L    | 0,0001 | 0,0003 | 0,7    | PLIE01R00 | < LD   | 0,132   |
| Berílio total                             | mg/L    | 0,0001 | 0,0003 | 0,04   | PLIE01R00 | < LD   | < LD    |
| Boro total                                | mg/L    | 0,0004 | 0,0012 | 0,5    | PLIE01R00 | < LD   | 0,093   |
| Cádmio total                              | mg/L    | 0,0001 | 0,0003 | 0,001  | PLIE01R00 | < LD   | < LD    |
| Chumbo total                              | mg/L    | 0,0016 | 0,0048 | 0,01   | PLIE01R00 | < LD   | < LD    |
| Cobalto total                             | mg/L    | 0,0004 | 0,0012 | 0,05   | PLIE01R00 | < LD   | < LD    |
| Cromo total                               | mg/L    | 0,0007 | 0,0021 | 0,05   | PLIE01R00 | < LD   | < LD    |
| Fósforo total (ambiente intermediário)    | mg/L    | 0,0032 | 0,0096 | 0,050  | PLIE01R00 | < LD   | 17,400  |
| Lítio total                               | mg/L    | 0,0001 | 0,0003 | 2,5    | PLIE01R00 | < LD   | < LD    |
| Manganês total                            | mg/L    | 0,0001 | 0,0003 | 0,1    | PLIE01R00 | < LD   | 0,153   |
| Mercurio total                            | mg/L    | 0,0002 | 0,0006 | 0,0002 | PLIE01R00 | < LD   | < LD    |
| Níquel total                              | mg/L    | 0,0003 | 0,0009 | 0,025  | PLIE01R00 | < LD   | < LD    |
| Nitrogênio Amoniacal total pH< 7,5-pH 8,0 | mg/L    | 0,025  | 0,077  | 2,0    |           | < LD   | NA      |
| Prata total                               | mg/L    | 0,0006 | 0,0018 | 0,01   | PLIE01R00 | < LD   | < LD    |
| Selênio total                             | mg/L    | 0,0048 | 0,0144 | 0,01   | PLIE01R00 | < LD   | < LD    |
| Urânio Total                              | mg/L    | 0,0057 | 0,0171 | 0,02   | PLIE01R00 | < LD   | < LD    |
| Vanádio Total                             | mg/L    | 0,0002 | 0,0006 | 0,1    | PLIE01R00 | < LD   | < LD    |

## LEGENDAS

LD: Limite de Detecção

LQ: Limite de Quantificação

ND: Não Detectável

\*\*: Ensaio realizado em campo

VMP: Valor Máximo Permitido ( 357 - II - Águas Doces, 430 - Efluentes, )

DAE: Dados de Análise Externo

NO: Não Objetável

NA: Não Analisado

## PROCEDIMENTOS E NORMAS

Procedimento Interno PLIE01R00 Segundo norma oficial USEPA 6010

## ***5.2 ARTIGO 2***

---

# CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA BIOMASSA DE MICROALGAS CULTIVADAS EM MEIO DE CULTURA PREPARADO A PARTIR DE SORO DE FÉCULA DE MANDIOCA

## RESUMO

No geral os resíduos agroindustriais acabam por se tornar problemas ao se realizar um descarte ao ambiente forma inapropriada e sem tratamento. É neste propósito que entram as microalgas visto que elas são eficientes biorremediadores as quais podem transformar diversos tipos de efluentes em biomassa útil. E é nessa vertente que este trabalho objetivou estudar o soro da fécula da mandioca como um possível meio alternativo para o cultivo microalgas, avaliar sua eficácia de produção de biomassa e caracterizar as espécies cultivada quanto algumas características físicas e químicas. Para isso foram selecionadas 3 cepas *Oocystis sp.*, *Scenedesmus quadricauda*, *Scenedesmus sp.* e foram cultivadas usando como meio de cultura o SFM e em balões de 6L, onde o cultivo foi acompanhado por fluorescência in vivo, ao obter a biomassa seca foi realizada a caracterização físico química e análise térmica. A resposta desse estudo foi expressa a partir dos rendimentos de biomassa, nos teores de lipídio, proteína e carboidrato dentre esses o destaque é para os resultados de proteína onde mostra que a cepa *Scenedesmus sp.* ao ser cultivada em SFM mostra um valor bem expressivo de 68,01% outro dados que merece atenção é o do teor de ésteres metílicos dos ácidos graxos mostrando maiores valores para as 3 cepas em SFM quando relacionado com o meio controle e o perfil dos ácidos graxos identificaram ácidos como o EPA e o DHA que são ácidos graxos essenciais de grande valor para a indústria de alimentos. As curvas térmicas apresentaram três eventos mostrando a degradação do componente de interesse só passa por degradação a uma temperatura maior que 120°C. Dessa forma conclui-se que a cepa *Scenedesmus sp.* apresentou melhor resposta em rendimento nos parâmetros físico-químicos ao ser cultivada em SFM mostrando um grande potencial para cultivo em larga escala.

**Palavras-chaves:** *Scenedesmus sp.*; Meio alternativo; Biorremediação; Composição bioquímica.

## ABSTRACT

In general, agro-industrial waste becomes a problem when disposing of the environment improperly and without treatment. It is for this purpose that microalgae come in as they are efficient bioremediators which can transform various types of effluents into useful biomass. And it is in this aspect that this work aimed to study the cassava starch serum as a possible alternative microalgae cultivation, evaluate its efficiency of biomass production and characterize the cultivated species as some physical and chemical characteristics. For this, 3 *Oocystis* sp., *Scenedesmus quadricauda*, *Scenedesmus* sp. and were using SFM and 6L flasks as culture accompanied by fluorescence in vivo, to obtain the dry biomass was performed the physical chemical characterization and thermal analysis. The answer of this study was expressed from biomass yields, lipid, protein and carbohydrate contents among these the highlight is for protein results where it shows that the *scenedesmus* sp. strain when grown in SFM shows a very expressive value of 68.01% other data that deserves attention is the fatty acid methyl ester content showing higher values for the 3 strains in FMS when related to the control medium and the profile of fatty acids have identified acids like EPA and DHA which are fatty acids of great value to the food industry. The thermal curves presented Three events showing the degradation of the component of interest only undergo degradation at a temperature greater than 120 ° C. Thus, it is concluded that the *Scenedesmus* sp. showed better yield response in the physicochemical parameters when cultivated in SFM showing great potential for large scale cultivation.

**Keywords:** *Scenedesmus* sp.; Alternative medium; Bioremediation; Biochemical composition.

## 1 INTRODUÇÃO

Os cultivos de microalgas representam uma importante área das pesquisas em biotecnologia devido aos diversos compostos que elas sintetizam e o grande interesse do mercado. As facilidades de cultivo e obtenção de biomassa tornam tais organismos muito importantes, seja para exploração direta da biomassa ou extração de compostos bioativos de interesse químico, farmacêutico ou para a área de alimentos, ou ainda, em projetos de aquicultura ou de biorremediação.

O barateamento de custos de produção relacionado aos meios de cultura tem sido um campo relativamente muito pesquisado no intuito de tornar os cultivos menos dependentes de insumos químicos, destacando-se, neste contexto, o uso de efluentes agroindustriais para a produção de microalgas.

Muitos desses resíduos acabam por se tornar problemas quando seu descarte ao ambiente é feito de forma inapropriada e sem tratamento. É neste propósito que entram as microalgas visto que elas são eficientes biorremediadores podendo transformar diversos tipos de efluentes em biomassa útil.

Vários tipos de meios de cultura alternativos preparados a partir de resíduos da atividade agroindustrial tem sido pesquisado: de suinocultura (ZHU et al., 2013), da produção industrial de papel e celulose (GENTILI, 2014), de fazendas leiteiras (HENA et al., 2015), da cana-de-açúcar (RAMIREZ et al., 2014), da produção de cerveja (FAROOQ et al., 2013), da fabricação de carpetes (CHINNASAMY et al., 2010), da produção comercial de peixes em cativeiro (MANDAL E MALLICK, 2011), do processamento de óleo de palma (LAM E LEE, 2011), da comercialização de frutas e verduras (CALIXTO et al., 2016), seja em cultivos fotoautotróficos ou mixotróficos. Entretanto, os resíduos oriundos da produção e processamento da mandioca tem sido pouco estudados.

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é um dos vegetais mais conhecidos no mundo e muito cultivado nos trópicos, sendo o Brasil um dos principais países produtores (NIBA et al., 2001; BELEIA; BUTARELO; SILVA, 2006; NWOKOCHA et al., 2009). Seu cultivo usualmente ocorre em solos bem drenados visto que ela não tolera alagamentos, e ela se desenvolve de forma eficiente sob exposição direta ao sol,

com grande capacidade de adaptação a diversos tipos de solos. Ela representa uma grande fonte de carboidrato e betacaroteno a baixo custo, fazendo com que a cultura tenha importância social significativa, ganhando destaque tanto no cenário nacional como no internacional (NIBA et al., 2001; BELEIA; BUTARELO; SILVA, 2006; NWOKOCHA et al., 2009; APLEVICZ; DEMIATE, 2007; SILVA, 2011; COELHO 2018).

Os resíduos oriundos do processamento da mandioca incluem a manipueira e o soro da goma da tapioca (fécua). O primeiro tem sido utilizado para o cultivo de alface em substituição da adubação mineral (DUARTE et al., 2012) e fertirrigação (CARDOSO et al., 2005), e existem vários estudos que tem focado sua utilização para o cultivo de microalgas (BORGHETTI, 2009; FOGAÇA et al., 2016). Poucos estudos, entretanto, têm sido realizados com esta abordagem, no que concerne ao soro da fécua da mandioca.

A manipueira é um líquido esbranquiçado, que pode conter entre 5% e 7% de fécua, além de outros componentes, como glicose, celulose, proteínas, ácido cianídrico, matéria orgânica e nutrientes minerais essenciais (BORGHETTI, 2009), e é o principal resíduo do processamento da mandioca na fabricação da fariola e da goma (fécua) e a quantidade gerada nesse processo pode ser da ordem de 500 litros residual por tonelada de raiz processada, e se descartada ao ambiente de forma inapropriada pode provocar graves alterações na qualidade ambiental, especialmente no que concerne à poluição aquática, caso os descartes ocorrerem em pequenos cursos d' água (FIORETTO 2001).

A fécua de mandioca possui diferentes denominações, variando de acordo com as regiões brasileiras, podendo ser conhecida como polvilho doce ou goma, caracterizada como um pó fino, branco, inodoro, insípido. É o componente mais nobre das raízes da mandioca, e sua utilização se dá em inúmeros segmentos, destacando as indústrias: alimentícia, de plásticos, e na siderurgia (CEPEA, 2005).

A farinha de tapioca ou a goma da tapioca, como é comumente chamada na Paraíba, é um alimento produzido a partir da fécua de mandioca purificada mediante processo artesanal e industrial (CEREDA; VILPOUX, 2003). No preparo da goma também é gerado um resíduo de descarte que é o soro da fécua. Antes da fécua ser embalada para comercialização ela passa por um processo de hidratação e é após essa etapa que esse líquido é descartado sem passar por algum tratamento.

Diante do exposto esse trabalho teve o propósito de avaliar o rendimento de diferentes microalgas dulcícolas em concentrações estabelecidas de soro de fécua,

determinar componentes bioativos na biomassa produzida, e selecionar a espécie de maior produtividade e concentrações proteica para fins de enriquecimento da goma de tapioca. Procurou-se, dessa forma, estudar o soro da fécula da mandioca como um possível meio alternativo para o cultivo microalgas.

## 2 METODOLOGIA

### 2.1 Microalgas cultivadas em soro de fécula de mandioca e parâmetros analisados

Três espécies de microalgas dulcícolas, selecionadas junto ao banco de cultura do LARBIM/UFPB (Laboratório de Ambientes Recifais e Biotecnologia de Microalgas/ Universidade Federal da Paraíba) (**Tabela 1**) foram cultivadas em soro de fécula de mandioca (SFM) em diferentes concentrações. Este efluente foi obtido junto a empresa alimentícia Da Terra, localizada na cidade de Santa Rita-PB, que processa a goma da tapioca, sendo transportado em galões de 5 litros. Os constituintes químicos presentes no soro de fécula da goma de tapioca foram determinados na Central Analítica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

**Tabela 1.** Microalgas selecionadas para cultivo nas diferentes concentrações de soro de fécula de mandioca

| Código | Espécie                        | Procedência                                    | % SFM |
|--------|--------------------------------|--|-------|
| D338WC | <i>Oocystis</i> sp.            | Bebedouro das galinhas, Bayeux, PB             | 50    |
| D447WC | <i>Scenedesmus quadricauda</i> | Açude Jardim do Seridó, PB                     | 25    |
| D545WC | <i>Scenedesmus</i> sp.         | Lagoa azul, Parque Nacional de Jericoacara, CE | 50    |

Em laboratório o material foi filtrado (filtros de fibra de vidro Whatmann, GF/C, de 47 mm de diâmetro) e armazenado em freezer à 4°C até o momento de sua utilização, que em geral não ultrapassou uma semana. Como controle utilizou-se o meio WC (GUILLARD; LORENZEN, 1972), preparado com água destilada autoclavada.

A preparação desse meio alternativo foi feita diluindo-se o soro de fécula da tapioca com 50% de meio sintético (SFM-50%) e com 75% de meio sintético (SFM-25%). Os meios assim preparados foram autoclavados à 121°C por 15 minutos.

Cultivos das espécies selecionadas foram efetuados em triplicatas nos referidos meios em câmara de cultivo climatizada (25° C± 1°C) dotada de sistema de iluminação fornecido por lâmpadas fluorescente tipo luz-do-dia (150µmol.fótons/cm<sup>2</sup>) e fotoperíodo de 12 horas, em balões de 6 litros, com aeração a pressão ambiente fornecida por um minicompressor de membrana Resun AOC3.

Os cultivos foram por análises da fluorescência “in vivo” num Fluorômetro Turner Design, modelo 1005R. Os experimentos foram interrompidos na fase estacionária; a biomassa produzida foi concentrada em centrífuga refrigerada (18° C), congelada a -30° C num ultrafreezer, liofilizadas e pesada em balança analítica. E em seguida foram determinados o rendimento máximo em biomassa (g.L-1), após liofilização.

Na biomassa obtida foram realizadas análises de proteínas totais pelo método de Kjeldahl usando reagente de Nessler e leituras espectrofotométricas a 420nm (SANTOS, 2007), carboidratos totais, pelo método adaptado de Kochert (1978), lipídios totais, de acordo com o método de Folch, Less e Stanley (1957), ácido fólico, segundo Ribeiro (2016) adaptado para microalgas, e ésteres metílicos de ácidos graxos pela técnica da transesterificação direta da biomassa microalgal liofilizada, segundo a metodologia descrita por Hartman e Lago (1973), adaptado para microescala (MENEZES, 2013). Os ácidos graxos oriundos do processo de transesterificação foram identificados por Cromatografia Gasosa utilizando um cromatógrafo GCMS-QP2010 (Shimadzu, Kyoto, Japan) equipado com uma coluna Durabound DB-23 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm. A temperatura do injetor e do detector foram fixados em 230 °C e temperatura da coluna em 90 °C. O gradiente de eluição na coluna foi de 90 a 150 °C (10 °C/min), 150 a 200 °C (5 °C/min), 200 a 230 °C (3 °C/min) em um tempo total de corrida de 34 min, utilizando hélio como gás de arraste vazão de 187,2 mL/min.

Análise termogravimétrica das biomassas obtidas nas diferentes condições de cultivo foram efetuadas em Analisador Térmico Shimadzu, massa de 10 mg, cadinho de alumina, razão de aquecimento de 10 °C/min., em atmosfera de nitrogênio, fluxo de 50 mL de temperatura ambiente até 700 °C.

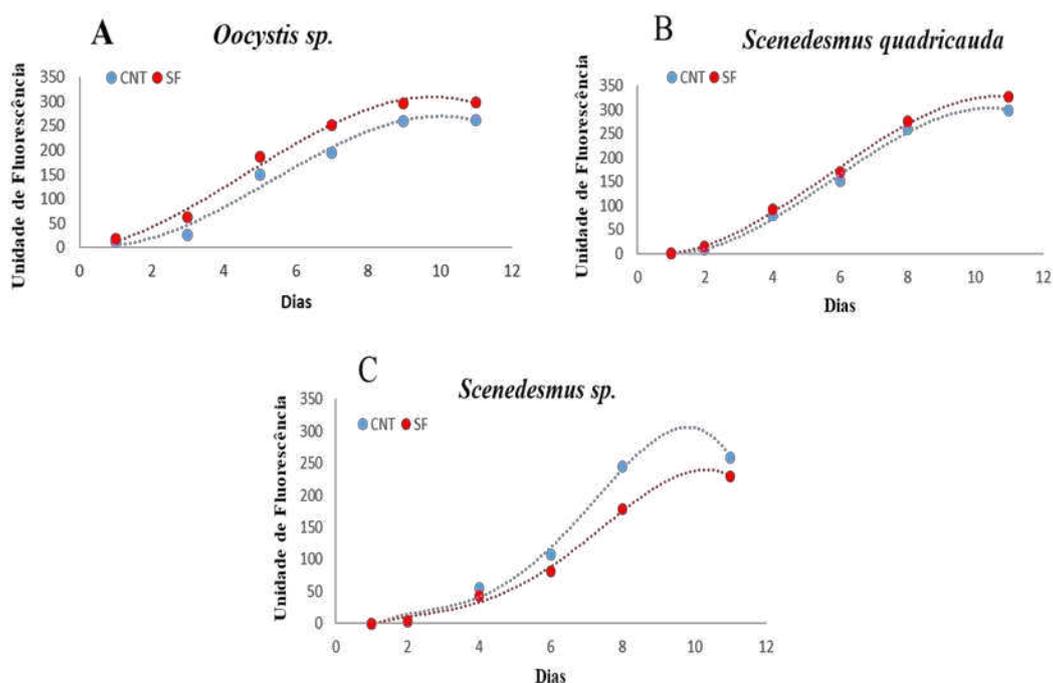
## **2.2 Análises estatísticas**

Os dados da cinética de crescimento das microalgas foram expressos como média ± desvio-padrão. Os dados da composição química das microalgas foram analisados quanto à homocedasticidade pelo teste de Levene, utilizando o programa **R Core Team (2018)**. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), em delineamento inteiramente casualizado (DIC), seguida de comparações múltiplas de Tukey (P<0,05).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os cultivos das microalgas selecionadas tiveram duração de 11 dias e mostraram curvas de crescimento similares, tendo, porém, as espécies D338WC *Oocystis* sp. e D447WC *Scenedesmus quadricauda* apresentado medidas de fluorescência superiores ao controle (**Figura 1**). O valor de  $k$  para essas duas espécies na fase exponencial foi de  $0,39 \pm 0,07$  e  $0,69 \pm 0,34$  divisões celulares.dia<sup>-1</sup> em SFM, e  $0,19 \pm 0,02$  e  $0,611 \pm 0,39$  no meio WC.

Influência positiva superior ao controle em outros meios alternativos foram também encontradas por outros autores para diferentes espécies de *Scenedesmus* (RAMIREZ; TRIERWEILER, 2014; BARROS, 2017).



**Figura 1.** Curvas de crescimento das três clorófitas estudadas, nas diferentes concentrações de SFM e no meio WC (A- *Oocystis* sp.; B- *Scenedesmus quadricauda*; C- *Scenedesmus* sp.)

Os valores em biomassa seca obtida em SFM foram sempre superiores do que aqueles registrados em meio completo em todas as espécies estudadas, evidenciando que esse meio alternativo apresenta grande potencialidade para o desenvolvimento de cultivos em massa de microalgas. As maiores diferenças em biomassa entre o controle e o meio preparado a partir de SFM foram registradas para *Oocystis* sp (D338WC) e D545WC (*Scenedesmus* sp.) que apresentaram mais do que o dobro da produtividade em SFM (**Tabela 2**). Esse achado evidencia mais uma vez a eficácia na utilização desse

tipo de meio alternativo para o cultivo de algumas espécies de microalgas. Desde que fécula de tapioca é muito rica em compostos orgânicos, particularmente amido, presume-se que o maior desempenho de algumas espécies em relação a outras, em cultivos preparados com esse tipo de resíduo, esteja relacionado com a mixotrofia já que todas as diluições foram preparadas contendo a mesma concentração do meio sintético WC.

**Tabela 2.** Parâmetros de rendimento e produtividade de biomassa das microalgas cultivadas em meio sintético e alternativo. B=Biomassa total, P=Produtividade relativa à biomassa e RP=Relação de produtividade entre SFM e WC

| Espécie                        | Meio de cultivo | B (g.L <sup>-1</sup> ) | P (g.L <sup>-1</sup> .dia <sup>-1</sup> ) | RP (SFM/WC) |
|--------------------------------|-----------------|------------------------|---|-------------|
| <i>Oocystys</i> sp.            | WC              | 0,394                  | 0,0356                                    | 2,11        |
|                                | SFM             | 0,750                  | 0,075                                     |             |
| <i>Scenedesmus quadricauda</i> | WC              | 0,630                  | 0,0681                                    | 1,10        |
|                                | SFM             | 0,752                  | 0,0752                                    |             |
| <i>Scenedesmus</i> sp.         | WC              | 0,316                  | 0,0287                                    | 2,48        |
|                                | SFM             | 0,785                  | 0,0714                                    |             |

O rendimento e a produtividade de biomassa em espécies de *Scenedesmus* mostra variações quando diferentes tipos de meios alternativos são utilizados, como registrado por Costa, 2018 para *S. acuminatus* cultivada em solução hidropônica residual de alface a 40% com valores de biomassa de  $0,85 \pm 0,04$  g.L<sup>-1</sup> e por Barros (2017) para *S. quadricauda* em extrato de biocomposto hortifrútiis com valores de biomassa de  $506 \pm 1,75$  mg.L<sup>-1</sup> e  $33,73$  mg.L<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup>, muito superior ao registrado na presente pesquisa, evidenciando que a capacidade mixotrófica das espécies desse gênero varia de acordo com a natureza dos resíduos usados no preparo desses meios.

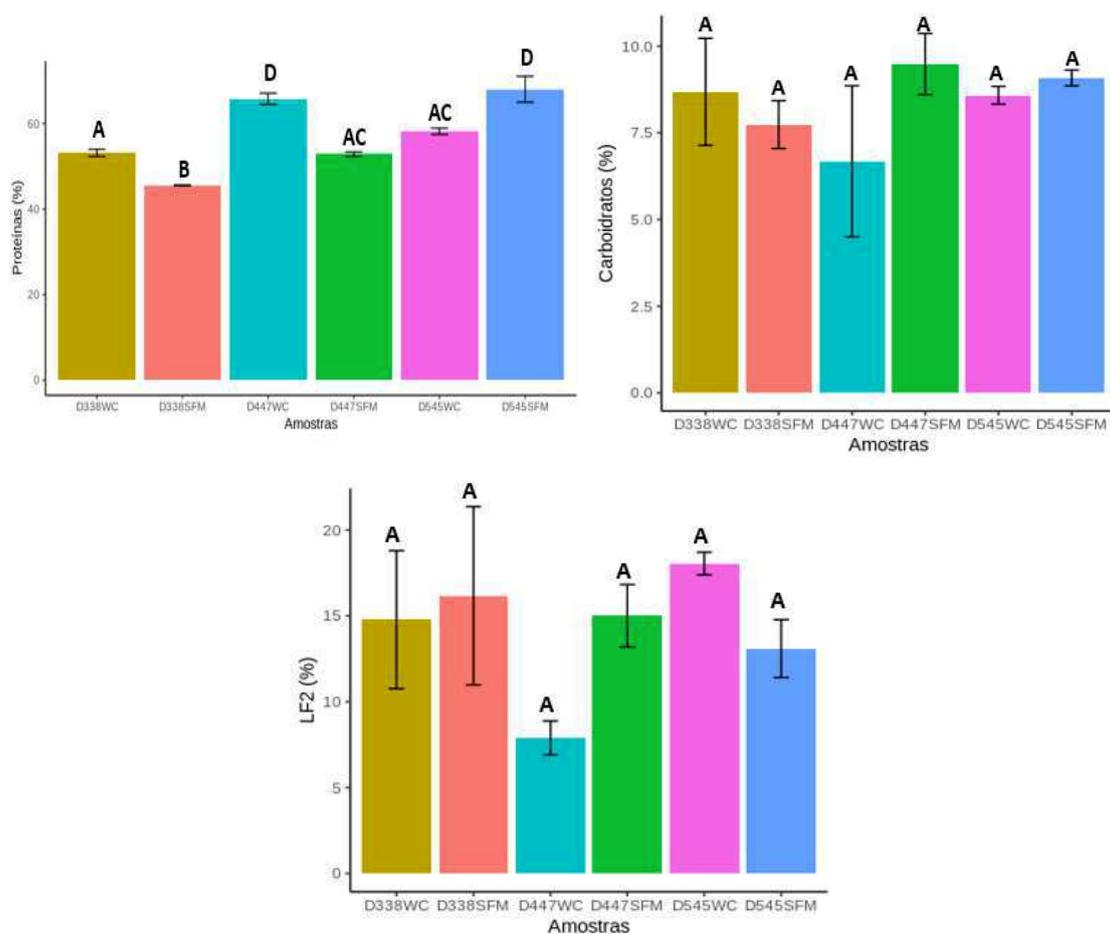
### 3.1 Bioativos determinados na biomassa das microalgas cultivadas

As características bioquímicas das microalgas podem variar de acordo com a espécie e condições de cultivo. Em geral, a composição de lipídios é de 20 a 40%, de proteínas é de 30 a 50%, de carboidratos é de 0 a 20% e de ácidos nucleicos de 0 a 5% de (ZHAO; BRÜCK; LERCHER, 2013; ARAÚJO, 2018). Os resultados desses metabólitos registrados nesta pesquisa mostraram que na maioria dos casos as diferenças entre os valores obtidos no controle WC e em SFM não foram significativas, a não ser para proteínas nas espécies D447WC e D545WC. Valores mais elevados de carboidratos em SFM foram registrados nas espécies D447WC (*Scenedesmus quadricauda*) e D545WC (*Scenedesmus* sp.), de lipídios em SFM foram maiores em

D477WC (*Scenedesmus quadricauda*) e de proteínas, em D545WC (*Scenedesmus* sp.) (Figura 5).

Os valores de carboidratos registrados nos meios WC (controle) e SFM foram, respectivamente,  $8,7\% \pm 2,7$  e  $7,7\% \pm 1,2$  para *Oocistys* sp (D338WC),  $6,7\% \pm 3,8$  e  $9,5\% \pm 1,5$  para *Scenedesmus quadricauda* (D447WC) e  $8,6\% \pm 0,4$  e  $9,1\% \pm 0,4$  para *Scenedesmus* sp. (D545WC), os de proteínas foram superiores a 45% nas condições testadas, destacando *Scenedesmus* sp. (D545WC) que apresentou  $68,02\% \pm 5,4$  de proteínas em SFM, valor este próximo aos valores máximos referidos para *Spirulina platensis* (70%), espécie referência por ser mundialmente conhecida por seu elevado conteúdo proteico (LUPATINI et al., 2017; WELLS et al.; 2017.; JESUS et al., 2018), evidenciando que o cultivo desta microalga em SFM é promissor quando se deseja obter um alto teor de proteína. Os de lipídios, por sua vez, oscilaram de  $8,9\% \pm 0,0$  a  $18,7\% \pm 0,0$  nas espécies cultivadas em meio controle (WC), já as cepas cultivadas em meio misto tiveram uma variação de  $13,4\% \pm 4,1$  a  $16,2\% \pm 4,9$  (Figura 5).

Os teores de lipídios foram mais elevados em SFM em *Oocistys* sp. e *Scenedesmus quadricauda* ( $16,2\% \pm 4,9$  e  $15,7\% \pm 4,2$ , respectivamente), em relação ao controle, enquanto que em *Scenedesmus* sp. houve redução na síntese de lipídios no meio WC ( $18,7\% \pm 0,0$  -  $13,4\% \pm 4,1$ ) (Figura 5). Valores de até 29,54% de lipídios para *Oocistys solitaria* e 18,5% para *Scenedesmus* sp. foram registrados por Araújo (2018) em meio WC. Ferreira; Soares; Costa, (2013) demonstraram valores variando entre 1,9% e 18,4% de acordo com as condições de cultivo em análises efetuadas com *Scenedesmus quadricauda*. Variações nos conteúdos lipídicos numa mesma espécie podem ser dependentes tanto da natureza dos meios utilizados como das condições de cultivo visto que mecanismos de estresse decorrentes de mudanças de condições térmicas, fóticas e/ou nutricionais podem alterar a biossíntese desse metabólito (TIBÚRCIO, 2014).



**Figura 2.** Teores de Proteínas, Carboidratos e Lipídios na biomassa seca das cepas *Oocistys* sp. (D338WC), *Scenedesmus quadricauda* (D447WC) e *Scenedesmus* sp. (D545WC) cultivadas em meio WC e SFM. Valores expressos em média  $\pm$  erro padrão (barras verticais). Colunas seguidas pela mesma letra não diferem significativamente ANOVA ( $p < 0,05$ ).

As quantidades de carboidratos são modestas e certamente não têm nenhuma importância no enriquecimento de alimentos com soro de fécula de mandioca, pelo fato desse alimento ser naturalmente rico em amido. Entretanto, dados da literatura, conforme apresentados por Ravindran et al., (2016) para 26 espécies de microalgas de

diferentes grupos taxonômicos, mostram que os teores de carboidratos podem variar desde 4% em *Dunaliella bioculata* até 56% em *Anabaena cylindrica* e 63% em *Spirulina platensis*. Para o gênero *Scenedesmus* estes autores relatam valores de 15 a 52% em *S. dimorphus* e de 10 a 17% em *S. obliquus*. Também tem se relatado de valores de carboidrato de 14,5% e 36,54% em *S. acuminatus* (SASSI, 2016; ARAÚJO, 2018). Espécies ricas em carboidrato são de interesse na fabricação de suplementos e rações animais, bem como na produção de biocombustível como o bioetanol, por serem importantes fontes de carbono para a fermentação (CHEN et al., 2013).

Os teores de proteína determinados nas microalgas estudadas foram consideravelmente altos nas três espécies estudadas. Em *Oocistys* sp. e *Scenedesmus quadricauda* foram mais elevados em meio WC, chegando a 53,15% e 65,79%, respectivamente, contra 45,53% e 52,43%, respectivamente em SFM. Em *Scenedesmus* sp. observou-se, por outro lado, valores mais elevados de proteínas em SFM, chegando a 68,02% contra 51,01% em meio WC. Estes resultados são relevantes por demonstrarem a eficácia do soro de fécula da mandioca na obtenção de biomassa de microalgas ricas em proteína visando o enriquecimento de alimentos, e diminuindo, por conseguinte, custos de produção em cultivos em massa.

Barros, (2017) utilizando extrato de biocomposto hortifrúti em cultivos de *Scenedesmus quadricauda* também encontrou valores altos de proteínas para esta espécie (60%) nesse tipo de meio alternativo. Outros autores estudando outras espécies de clorofíceas em meios alternativos ou não também observaram valores consideráveis desse metabólito, a exemplo de Visca et al. (2017) que encontrou 40,39% de proteínas em *Golenkinia radiata* ao cultivá-la em meio sintético com redução na concentração de nitrato, e Varandas (2016), obteve até 72,1% de proteínas para *Chlorococcum* sp. cf. *hypnosporum* e 62,5% para *Chlorella* sp. em meio sintético.

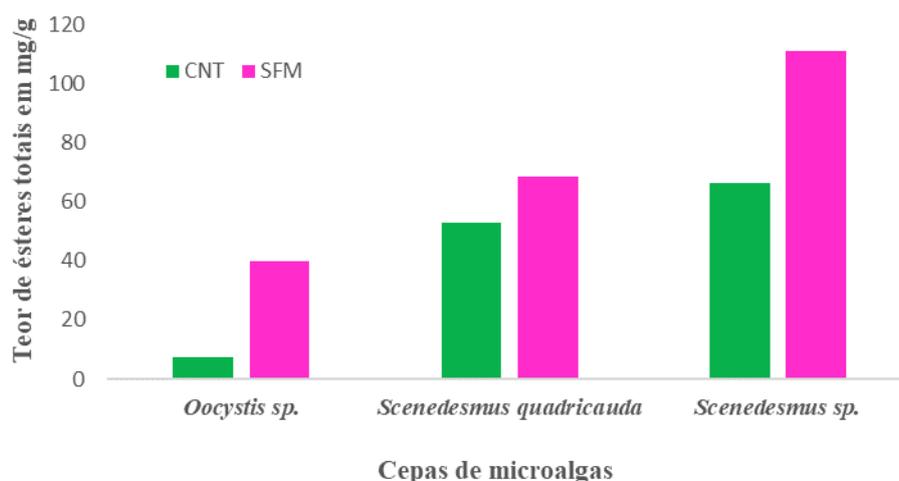
No tocante ao ácido fólico, os valores ficaram acima de 75% em todas as espécies e nos dois meios utilizados, sendo que *Scenedesmus* sp. foi a espécie que apresentou os maiores teores dessa vitamina, com 93,18 µg/100g. As diferenças dos percentuais de ácido fólico entre as microalgas estudadas foram estatisticamente diferentes ( $F=7.929$ ,  $p = 0.00165$ ) (Figura 6). Ao relacionar o ácido fólico com a quantidade de proteína observa-se que os maiores valores dessa vitamina também foram registrados na espécie D545WC (*Scenedesmus* sp.) em SFM, reforçando a ideia de que a síntese desse composto está diretamente relacionada a quantidade de proteína (Vannucchi, 2010).



Vannucchi, (2010) também ressalta que a maior parte do folato consumido na dieta (cerca de 90%) está na forma de poliglutamatos reduzidos, ligados a proteínas. Essa citação corrobora com os valores achados nesse estudo. Na figura 3 pode-se evidenciar as quantidades de ácido fólico encontradas nas biomassas das microalgas estudadas.

As maiores fontes de ácido fólico podem ser encontradas em vegetais de cor verde escuro, muito embora frutas e cereais também são ricas nesse composto (ACEVEDO-FANI et al., 2018; EVANGELHO, 2018), sendo que nesses alimentos os teores de folato variam entre 20 a 160  $\mu\text{g}/100\text{g}$ . Alimentos de origem animal são usualmente pobres em ácido fólico, exceto o fígado bovino que tem uma concentração entre 700 a 1400  $\mu\text{g}/100\text{g}$  (MARTINEZ et al., 2005, LIMA et al., 2004; CATHARINO et al, 2006). A recomendação diária do consumo de folato para adultos é de 200  $\mu\text{g}$  para homens, 180  $\mu\text{g}$  para mulheres e 400  $\mu\text{g}$  para gestantes (MELO, 2004). Ingestão acima desses níveis pode levar ao aparecimento de ácido fólico não metabolizado na circulação fetal e materna, o qual pode atuar como doador de metila, influenciando na regulação da expressão gênica, tendo como consequência a má formação fetal (SILVA, KEATING, & PINTO, 2017).

No tocante às análises de ácidos graxos efetuadas nas biomassas das três espécies cultivadas observa-se que nenhuma delas atingiu os teores da soja que é principal commodity agrícola empregada na extração de óleo para fins alimentícios e produção de biodiesel. A soja possui 196,9 mg de ésteres metílicos de ácidos graxos por grama de biomassa seca (BARROS, 2017; CALIXTO, 2017; MENEZES, 2013) e nas microalgas estudadas apenas a espécie D545WC cultivada em SFM apresentou o valor mais próximo, de 110,9 mg de ésteres por grama de biomassa seca (Figura 5). Ainda assim este é um resultado satisfatório visto que no meio controle (WC) o teor determinado foi de 66,46 mg de ésteres por grama de biomassa seca, ou cerca da metade.



**Figura 5.** Teor de ésteres metílicos de ácidos graxos das cepas *Oocystis sp.* (D338), *Scenedesmus quadricauda* (D477) e *Scenedesmus sp.* (D545) cultivadas em meio WC e em SFM.

**Fonte:** autor, 2019.

Os dados dos perfis dos ácidos graxos mostraram componentes com cadeia carbônica variando entre C10 a C22, compostas por ligações saturadas, monoinsaturadas e poli-insaturadas (Tabela 5).

O ácido palmítico (C16:0) foi o que mais se destacou, com concentrações variando de 18,12% a 29,37% entre as espécies e condições de cultivo, sendo os valores mais elevados registrados no meio preparado com SFM, sendo o maior percentual encontrado na espécie *Scenedesmus sp.* (D545). O ácido palmítico é uma fonte de energia na alimentação infantil e sua concentração no leite materno varia de 20% a 30% (SILVA; GIOIELLI, 2009). Além do ácido palmítico, os ácidos: láurico (C12:0), tridecanoico (C13:0), mirístico (C14:0), miristioléico (C14:1), pentadecanoico (C15:0), pentadecenoico (C15:1), heptadecanóico (C17:0), cis10-heptadecanóico (C17:1), palmitoleico (C16:1), esteárico (C18:0), também estiveram presentes em todas as cepas e condições de cultivo.

**Tabela 3.** Perfil de ácidos graxos das microalgas cultivadas em meio sintético e alternativo

| Ácidos Graxos | Microalgas estudadas |         |         |         |        |         |
|---------------|----------------------|---------|---------|---------|--------|---------|
|               | D338WC               | D338SFN | D447WC  | D447SFM | D545WC | D545SFM |
| C10:0         | 0,269                | -       | -       | -       | -      | -       |
| C11:0         | 0,277                | 0,225   | 0,581   | 0,41    | -      | 0,294   |
| C12:0         | 1,041                | 0,534   | 0,812   | 1,219   | 0,765  | 0,577   |
| C13:0         | 0,934                | 0,533   | 1,665   | 1,245   | 0,842  | 0,203   |
| C14:0         | 1,341                | 1,56333 | 0,432   | 0,431   | 0,386  | 0,618   |
| C14:1         | 0,403                | 0,21333 | 0,51    | 0,574   | -      | 0,635   |
| C15:0         | 0,941                | 0,76566 | 1,581   | 1,18    | 0,697  | 0,42    |
| C15:1         | 1,975                | 1,07    | 2,528   | 1,718   | 1,084  | 0,289   |
| C16:0         | 18,122               | 27,144  | 24,138  | 26,19   | 25,423 | 29,378  |
| C16:1         | 0,757                | 0,687   | 0,892   | 0,8     | 1,434  | 2,272   |
| C17:0         | 0,709                | 0,504   | 0,307   | 0,217   | 0,476  | 0,279   |
| C17:1         | 0,555                | 1,235   | 0,268   | 0,532   | 1,013  | 0,366   |
| C18:0         | 1,63                 | 2,00133 | 1,681   | 1,821   | 2,019  | 0,298   |
| C18:1         | -                    | -       | 1,794   | 0,919   | 1,161  | 1,319   |
| C18:1(ω9c)    | 3,402                | 7,71233 | 7,827   | 10,873  | 10,836 | 22,711  |
| C18:1(ω9t)    | 13,485               | 9,007   | 6,211   | 6,7     | 4,502  | 3,044   |
| C18:2(ω6c)    | 2,072                | 7,12366 | 3,806   | 5,233   | 5,565  | 5,612   |
| C18:2(ω6t)    | -                    | -       | -       | -       | -      | -       |
| C20:0         | 0,596                | 0,48033 | 0,584   | 0,616   | 0,767  | 0,433   |
| C18:3(ω6)     | -                    | -       | -       | -       | -      | -       |
| C20:1         | 29,101               | 21,3826 | 25,2418 | 13,74   | 17,266 | 13,74   |
| C18:3(ω3)     | -                    | -       | -       | -       | -      | -       |
| C21:0         | -                    | -       | 13,583  | 16,332  | -      | -       |
| C20:2         | 1,84                 | 1,311   | 0,901   | 1,479   | 1,213  | 1,146   |
| C22:0         | -                    | -       | 0,243   | 0,284   | 5,399  | 1,493   |
| C20:3(ω6)     | -                    | -       | -       | -       | 0,63   | 0,266   |
| C22:1(ω9)     | -                    | -       | -       | -       | -      | -       |
| C20:3 (ω3)    | 0,5                  | 0,603   | -       | -       | -      | -       |
| C20:4 (ω6)    | 0,256                | 0,327   | -       | -       | -      | -       |
| C22:2         | 1,303                | 0,988   | -       | -       | -      | -       |
| C24:0         | -                    | -       | -       | -       | -      | -       |
| C20:5(ω3)     | 2,778                | 2,831   | 0,321   | 0,397   | -      | -       |
| C24:1         | -                    | -       | 0,276   | 0,487   | -      | -       |
| C22:6(ω3)     | -                    | -       | -       | -       | 0,336  | -       |

**Fonte:** autor, 2019.

O ácido gadolêico (C20:1) também esteve presente em todas as espécies e condições de cultivo, com valores entre 13,74% e 25,56%, e o oleico (C18:1 ω9c) com teores entre 3,40 a 22,71%, sendo o registrado em *Oocistys* sp. (D338) em meio controle. O maior valor foi registrado em *Scenedesmus* sp. (D545) cultivada em SFM. Aliás, os resultados em SFM mostraram sempre os maiores teores, indicando melhor efetividade desse meio alternativo na produção deste tipo de ácido graxo. Barros, (2017) cultivando *Scenedesmus quadricauda* em biocomposto hortifrutis encontrou valores similares aos encontrados nesta pesquisa. O ácido eláidico (C18:1 9t) apresentou

valores de 3,04% a 13,48%, com maiores valores sempre registrados em meio WC. Dentro do espectro dos ácidos graxos poli-insaturados, o ácido linoleico (C18:2  $\omega$ 6) ocorreu em baixa concentração, variando entre 2,07% e 7,12%. Matos (2017) afirma que a quantidade dos PUFA's varia com a espécie e condições de cultivo, corroborando tal assertiva com os achados nesse trabalho.

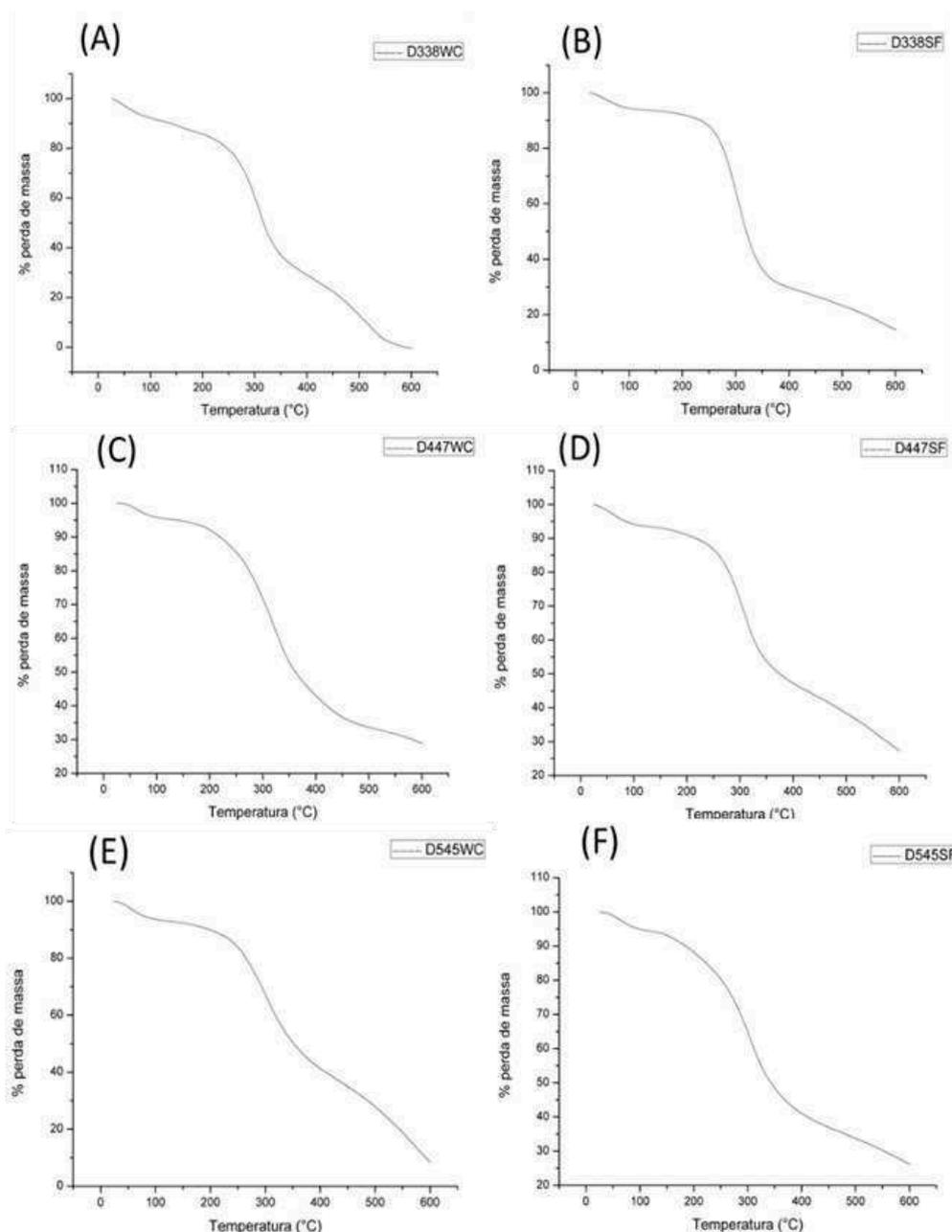
As espécies *Oocistys* sp. (D338) e *Scenedesmus quadricauda* (D447) apresentaram valores de graxo eicosapentaenoico (EPA 20:5, n-3) variando de 0,38% a 2,78% e o ácido docosa-hexaenoico (C22:6n3 DHA) foi registrado apenas em *Scenedesmus* sp. (D545) no meio controle, mas em baixíssima concentração (0,336%). O primeiro é um ácido graxo essencial da série ômega 3, de grande interesse para a indústria de alimentos, devido aos múltiplos efeitos benéficos à saúde humana (WU; ROE; WEN, 2015; BARROS, 2017). O EPA é um precursor a DHA no corpo humano, relacionado ao componente estrutural primário do cérebro e retina ocular, sendo fundamental para o desenvolvimento cerebral e ocular de crianças além de atuar na diminuição dos de doenças cardiovasculares (KLEINER; CLADIS; SANTERRE, 2015, BRINTON; MASON, 2017).

Esses dois tipos de ácidos graxos são de alto valor comercial e podem ser diretamente agregados em suplementos dietéticos, alimentos e bebidas funcionais; fórmulas infantis, nutrição animal, entre outros (BARROS, 2017). Mesmo que os valores para esses dois ácidos graxos tenham sido baixos ressalta-se ser possível modular seu metabolismo mediante alterações nos meios e condições de cultivo, inclusive cultivando as microalgas de interesse em condições de estresse (TIBÚRCIO, 2014).

As biomassas secas das microalgas avaliadas no presente estudo podem ser utilizadas *in natura* como fonte de ácidos graxos essenciais com potencial para extração do óleo puro (WU; ROE; WEN, 2015; BHARATHIRAJA et al., 2017). Isso é importante pois além de se obter uma goma de tapioca com alto valor proteico pode-se enfatizar também, o seu enriquecimento com ácidos graxos essenciais.

### 3.2 Termogravimetria

As curvas de perda de massa das biomassas das microalgas cultivadas mostraram uma série de alterações após o aquecimento, com três eventos térmicos como pode ser visto na **Figura 6**. Esses eventos estão relacionados a degradação de estruturas complexas de biomoléculas dispostas em suas células.



**Figura 6.** Curva da TG das cepas *Oocistys* sp (A,B), *Scenedesmus quadricauda* (C,D) e *Scenedesmus* sp (E,F) cultivadas em meio WC e misto.

Em Análises Termogravimétricas para microalgas são observadas a decomposição/volatilização dos seus componentes essenciais como água, carboidrato, lípidios e proteínas (KRAMER, 2017).

Nos três eventos observou-se uma resposta bem semelhante para as 3 espécies nos dois tipos de cultivo (**Tabela 4**). O primeiro evento teve uma variação entre 24,07°C-27,2°C mostrando a presença de umidade na amostra com menor perda de massa. Essa zona é relacionada a perda de água na forma livre ligadas as biomoléculas

(PANE; FRANCESCHI; NUCCIO, 2001; CALIXTO, 2016). O segundo evento variou de 130°C a 450°C entre as espécies, com perda de massa de 50,46% a 66,89%, sendo esta zona marcada pela decomposição de carboidratos, proteínas e lipídios. XU et al., (2017) encontrou resposta semelhante no segundo evento com perda de massa no intervalo de temperatura entre 140°C a 560°C para a microlaga dulcicola *Chlorella vulgaris*. O terceiro evento iniciou-se em 450°C e variou até 600°C. Esse evento está relacionado a degradação da matéria orgânica decorrente da etapa anterior principiamente triglicerídeos. Após isso, o material remanescente é decomposto a uma velocidade muito baixa, resultando na formação de um resíduo não degradável (BATISTA et al., 2013 e GOMES, 2013).

**Tabela 4.** Temperaturas iniciais e finais de cada evento térmico e a respectiva perda de massa em amostras de microalgas cultivadas em meio sintético e alternativo

| Amostra | Evento térmico | $\Delta T$ (°C) | $\Delta m$ (%) |
|---------|----------------|-----------------|----------------|
| D338WC  | 1              | 27,2,1-120,8    | 8,963          |
|         | 2              | 120,8-420       | 60,282         |
|         | 3              | 420-600         | 26,76          |
| D338SF  | 1              | 26,53-150       | 6,54           |
|         | 2              | 150-450         | 66,83          |
|         | 3              | 450-600         | 11,95          |
| D447WC  | 1              | 26-130          | 4,83           |
|         | 2              | 130-450         | 62,7           |
|         | 3              | 450-600         | 3,4            |
| D44SF   | 1              | 24,07-130       | 6,5            |
|         | 2              | 130-450         | 50,4           |
|         | 3              | 450-600         | 15,6           |
| D545WC  | 1              | 27-130          | 7,0            |
|         | 2              | 130-450         | 57,9           |
|         | 3              | 450-600         | 26,3           |
| D545SF  | 1              | 27-120          | 5,6            |
|         | 2              | 120-450         | 57,3           |
|         | 3              | 450-600         | 10,7           |

**Fonte:** autor, 2019.

Alguns autores chegam a usar essa técnica para caracterização da biomassa dando uma estimativa em (%) em médio de componentes como triglicerídios e proteínas antes e após extração desses componentes (GOMES, 2013) Outros ressaltam que o procedimento pode ser até usado para fins quantitativos obtendo resultados de forma eficiente e rápida (CASTELLÓ, 2009; CHAND; et al., 2009; GOMES, 2013).

#### 4 CONCLUSÕES

O estudo realizado usando meio alternativo preparado a partir de soro de fécula de mandioca, mostrou-se eficiente, evidenciando maior rendimento em biomassa do que em meio controle, sendo a melhor resposta encontrada na espécie *Scenedesmus* sp. Esta espécie, e esta condição de cultivo, também foi a que apresentou o maior teor em proteína e os melhores resultados para ácido fólico e para os ésteres metílicos de ácidos graxos. Esses achados reforçam o fato de que *Scenedesmus* sp. tem grande potencial para ser cultivada em larga escala em meio alternativo preparado a partir de soro de fécula de mandioca, a fim de ser obter biomassa rica nesses compostos para ser utilizada como ingrediente funcional para o enriquecimento de alimento.

## REFERÊNCIAS

ACEVEDO-FANI, A.; SOLIVA-FORTUNY, R.; MARTÍN-BELLOSO, O. Photoprotection and controlled release of folic acid using edible alginate/chitosan nanolaminates. *Journal of Food Engineering*, p. 1-11, 2018.

APLEVICZ, K. S.; DEMIATE, I. M. Caracterização de amidos de mandioca nativos e modificados e utilização em produtos panificados. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 27, n. 3, p. 478-484, 2007.

ARAÚJO, B,V,S,. Metabólitos de Interesse à Indústria Alimentícia, Produzidos por Microalgas Isoladas da Região Nordeste do Brasil. 143f. Tese (Doutorado) Ciência e Tecnologia de Alimentos – Universidade Federal da Paraíba, 2018

BARROS, V, P, M,. Potencial nutricional e antimicrobiano de microalgas dulcícolas isoladas da região nordeste do Brasil. 89f. Mestrado (Dissertação)- Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal da Paraíba, 2017

BATISTA, A. P.; GOUVEIA, L.; BANDARRA, M. N.; FRANCO, J.; RAYMUNDO, A. Comparison of microalgal biomass profiles as novel functional ingredient for food products. *Algal Research*, v.2, p. 164-173, 2013

BELEIA, A.; BUTARELO, S. S.; SILVA, R. S. F. Modeling of starch gelatinization during cooking of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *LWT - Food Science and Technology*, London, v. 39, n. 4, p. 400-405, 2006.

BHARATHIRAJA, B.; SRIDHARAN, S.; SOWMYA, V.; YUVARAJ, D.; PRAVEENKUMAR, R. Microbial oil – A plausible alternate resource for food and fuel application, *Bioresource Technology*, v.233, p.423-432, 2017.

*Biomass Bioenergy*, 46 (2012), pp. 805-808

BORGHETTI, A, I, AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DA MICROALGA *Chlorella minutissima* EM MEIO DE CULTURA COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE MANIPUEIRA. 103f. Dissertação (Engenharia de Bioprocessos) - Universidade Federal do Paraná, 2009.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 46, DE 6 DE OUTUBRO DE 2011. Dispõe dos requisitos gerais dos sistemas orgânicos de produção. BRASÍLIA- DF, 6 out. 2011. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/sustentabilidade/organicos/legislacao/portugues/instrucao-normativa-no-46-de-06-de-outubro-de-2011-producao-vegetal-e-animal-regulada-pela-in-17-2014.pdf/view>. Acesso em 20 de setembro de 2019.

BRINTON, E. A.; MASON, R. P. Prescription omega-3 fatty acid products containing highly purified eicosapentaenoic acid (EPA). *Lipids in Health and Disease*, v.16, n.23, p. 1-13, 2017.

CALIXTO, C. D. et al. Biochemical compositions and fatty acid profiles in four species of microalgae cultivated on household sewage and agro-industrial residues. *Bioresource Technology*, v. 221, p. 438–446, 2016.

CARDOSO, E. Uso de manipueira como biofertilizante no cultivo do milho: avaliação do efeito no solo, nas águas subterrâneas e na produtividade do milho. 2005. 35 f. Dissertação (Ciências Ambientais) – Universidade do Extremo Sul Catarinense. Criciúma, 2005

CASTELLÓ, M L., Estudo da Glicerina por Análises Térmicas. – Rio de Janeiro/2009. Dissertação (Mestrado em Tecnologias de Processos Químicos e Bioquímicos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ. Escola de Química, 2009.

CEPEA, Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada/ABAM (Associação Brasileira dos Produtores de Amido de Mandioca), Produção brasileira de amido de mandioca 2005.

CEREDA, M.P.; VILPOUX, O.F. (Coord.). Tecnologias, usos e potencialidades de tuberosas amiláceas latino americanas. v. 3. São Paulo: Fundação Cargill, 2003, 711p. (Série Cultura de tuberosas amiláceas latino-americanas)

CHAND, P.; REDDY, C. V.; VERKADE, J. G.; WANG, T.; GREWELL, D. Thermogravimetric quantification of biodiesel produced via alkali catalyzed transesterification of soybean oil Energy Fuels 2009

CHINNASAMY, S.; BHATNAGAR, A.; CLAXTON, R.; DAS, K.C. Biomass and energy production potential of microalgae consortium in open and closed bioreactors using untreated carpet industry effluent as growth medium. **Bioresource Technology**, v.101, n.17, p. 67516760, 2010

COÊLHO,D,J., Produção de Mandioca – Raiz, Farinha e Fécula Escritório Técnico de Estudos Econômicos do Nordeste – ETENE, Ano 3 N° 44 |Setembro, 2018.

EVANGELHO, Jarine Amaral. Encapsulação do ácido fólico e avaliação de sua estabilidade frente a tratamentos térmicos e irradiação UVA 2018, 69 f. Qualificação (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Programa de PósGraduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018.

FAROOQ, W.; LEE, Y.C.; RYU, B. G.; KIM, B. H.; KIM, H. S.; CHOI. Y. E, YANG, J. W Two-stage cultivation of two *Chlorella* sp. strains by simultaneous treatment of brewery wastewater and maximizing lipid productivity. **Bioresource Technology**, v. 132, p. 230–238, 2013.

FERREIRA, S. P.; SOARES, L. S.; COSTA, J. A.V. Revisão: microalgas: uma fonte alternativa na obtenção de ácidos gordos essenciais. *Revista de Ciências Agrárias*, v. 36, n. 3, p. 275-287, 2013.

FIORETTO, R. A. Uso direto da Manipueira em Fertirrigação: Série Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas, Fundação Cargill. Manejo, uso e tratamento de subprodutos da industrialização da mandioca, v. 4, 2001;

FOGAÇA,F,M, MORAIS,L,C,K, OLIVEIRA, A,G, KAGAKI,M,j Cultivo de Microalga em meio alternativo enriquecido com vinhaça para indicativo de potencialidade na produção de biocombustíveis, XIV Encontro Nacional de Estudantes

de Engenharia Ambiental, Blucher Engineering Proceedings, Volume 3, 2016, Pages 674-681, ISSN 2357-7592.

FOLCH, J.; LESS, M.; STANLEY, S. A simples method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **Journal Biological Chemistry**, v. 226, n.1, p. 497-509, 1957.

GENTILI, F. G. Microalgal biomass and lipid production in mixed municipal, dairy, pulp and paper wastewater together with added flue gases. **Bioresource Technology**, v. 169, p. 27–32, 2014.

GOMEZ, F.A. Extração e Análise da Fração Lipídica da Microalga *Monoraphidium* sp., Síntese e Caracterização do seu Biodiesel. 2013. (Tese de Mestrado). Instituto de Química. Universidade Federal do Rio Grande do Norte UFRN. Natal-RN.

GUILLARD, R.R.L.; LORENZEN, C.J. Yellow-green algae with chlorophyllide. **Journal of Phycology**, v.8, p.10-14, 1972.

HENA, S.; FATIMAH, S.; TABASSUM, S. Cultivation of algae consortium in a dairy farm wastewater for biodiesel production. **Water Resources and Industry**, v, 10, p. 1–14, 2015.

ILVA, C., KEATING, E., & PINTO, E. The impact of folic acid supplementation on gestational and long term health: Critical temporal windows, benefits and risks. *Porto Biomedical Journal*, 2, 315–332. 2017

JESUS, C.S.; UEBEL, L.S.; COSTA, S. S.; MIRANDA, A. L.; MORAIS, E.G.; MORAIS, M.G.; COSTA, J.A.V.; NUNES, L.I.; FERREIRA, E.S.; DRUZIAN, J. I. Outdoor pilot-scale cultivation of *Spirulina* sp. LEB-18 in different geographic locations for evaluating its growth and chemical composition. *Bioresource Technology*, v. 256, p. 86–94, 2018.

KLEINER, A. C.; CLADIS, D.P.; SANTERRE, C.R. A comparison of actual versus stated label amounts of EPA and DHA in commercial omega-3 dietary supplements in the United States. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 95, p. 1260–1267, 2015.

KOCHERT, G. Carbohydrate determination by the phenol-sulfuric method. In: HELLEMBUST, J. A., CRAIGIE, J. S. (eds.). **Handbook of Phycological Methods**. Physiological and Biochemical Methods. Cambridge: Cambridge University, p.95-97. 1978.

LAM, M. K.; LEE, K. T. Renewable and sustainable bioenergies production from palm oil mill effluent (POME): win–win strategies toward better environmental protection. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 1, p. 124–141, 2011.

LIMA, J. A.; CATHARINO, R. R.; GODOY, H. T. Ácido fólico em leite e bebida láctea enriquecidos - estudo da vida-de-prateleira. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 1, n. 24, p.82-87, 2004.

LIMA-PALLONE, J. A.; CATHARINO, R.H.; GODOY, H. T. Avaliação do comportamento do ácido fólico no processo de leites enriquecidos. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 9, n. 1, p. 57-62, 2006

- LUPATINI, A.L.; COLLA, L.M.; CANAN, C.; COLLA, E. Potential application of microalga *Spirulina platensis* as a protein source. *J. Sci. Food Agric.* 2017, 97, 724–732
- MANDAL, S.; MALLICK, N. Waste utilization and biodiesel production by the green microalga *Scenedesmus obliquus*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 77, n. 1, p. 374–377, 2011
- MARTÍNEZ-HUITLE, C.A.; FERRO, S.; DE BATTISTI, Ch., FERRO, S.; De BATTISTI, A. Electrochemical incineration of oxalic acid: Reactivity and engineering parameters. *Journal Applied Electrochemistry*, v. 11, p. 1087, 2005
- MATOS, A. P. The Impact of Microalgae in Food Science and Technology. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 94, p. 1333–1350, 2017.
- MELO, G.J.O. A importância do ácido fólico para o desenvolvimento embrionário e seu papel protetor de ocorrência de gestações afetadas pelos defeitos do tubo neural fetal. *Cadernos Interdisciplinares: Saúde Tecnologia e Questão Social*, v.1, p. 1-20, 2004
- MENEZES, R. S; LELES, M. I. G.; SOARES, A. T.; FRANCO, P. I. M.; ANTONIOSI FILHO, N. R.; SANT'ANNA, C. L.; VIEIRA, A. A. H. Avaliação da potencialidade de microalgas dulcícolas como fonte de matéria-prima graxa para a produção de biodiesel. *Química Nova*, v. 13, n. 1, p. 10-15, 2013
- NIBA, L. L.; BOKANGA, M. M.; JACKSON, F. L.; SCHLIMME, D. S.; LI, B. W. Physicochemical properties and starch granular characteristics of flour from various *Manihot Esculenta* (Cassava) genotypes. *Journal of Food Science*, Chicago, v. 67, n. 5, p. 1701-1705, 2001.
- NWOKOCHA, L. M.; AVIARA, N. A.; SENAN, C.; WILLIAMS, P. A. A comparative study of some properties of cassava (*Manihot esculenta*, Crantz) and cocoyam (*Colocasia esculenta*, Linn) starches. *Carbohydrate Polymers*, Barking, v. 76, n. 3, p.362–367, 2009.
- PANE, L., FRANCESCHI, E., DE NUCCIO, L. ET AL. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* (2001) 66: 145.
- 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
- 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
- RAVINDRAN ET AL., 2016  
B. RAVINDRAN, S.K. GUPTA, W.M. CHO, J.K. KIM, S.R. LEE, K.H. JEONG, D.J. LEE, H.C. CHOI. **Microalgae potential and multiple roles- current progress and future prospects: an overview** *Sustainability*, 8 (2016), pp. 1215-1230.
- RIBEIRO, M, V, M, MELO I, S, M, LOPES, F, C, DA C, MOITA G, C,. Development and validation of a method for the determination of folic acid in different

pharmaceutical formulations using derivative spectrophotometry. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences** vol. 52, n. 4, oct./dec., 2016

S. ARCHANAA, S. MOISE, G.K. SURAIISKUMAR **Chlorophyll interference in microalgal lipid quantification through the Bligh and Dyer method**

SANTOS, S.F.M. Estudo da produção de pectinases por fermentação em estado sólido utilizando pedúnculo de caju como substrato. Tese de Doutorado em Engenharia química. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2007

SASSI, K., K., B. Bioprospecção de metabólitos de interesse à indústria de alimentos produzidos por cepas regionais de microalgas em cultivos monoespecíficos, 2016. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2016.

SILVA, A, P., Estudo do Processamento e da Qualidade Física, Físico-química e Sensorial da Farinha de Tapioca. 92f. Dissertação ( Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Pará, 2011

TIBÚRCIO, V, P., Bioprospecção de ácidos graxos em microalgas isoladas da região semiárida da Paraíba e ensaios com espécies potencialmente produtoras de biodiesel em condições de estresse. 60f. Mestrado (Dissertação) –Engenharia Química Universidade Federal de Campina Grande. 2014

VANNUCCHI, H., MONTEIRO, T. H. Funções Plenamente Reconhecidas de Nutrientes Ácido Fólico. Ilsi Brasil International Life Sciences Institute do Brasil, São Paulo, v.10, p. 1-24, 2010.

VARANDAS, R. C. R. Formulação de ração para juvenis de *Litopenaeus vannamei* a partir de espécies regionais de microalgas. 2016. Dissertação. (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa

VISCA, A. et al. Microalgae cultivation for lipids and carbohydrates production. **Chemical Engineering Transactions**, v. 57, p. 127–132, 2017.

WELLS, M.L.; POTIN, P.; CRAIGIE, J. S.; RAVEN, J.A.; MERCHANT, S.S.; HELLIWELL, K. E.; SMITH, A.G.; CAMIRE, M.E.; BRAWLEY. S.H. Algae as nutritional and functional food sources: revisiting our understanding. **Journal of Applied Phycology**. v. 29, n.2, p. 949-982, 2017.

WU, L.; ROE, C. L.; WEN, Z. The safety assessment of *Pythium irregulare* as a producer of biomass and eicosapentaenoic acid for use in dietary supplements and food ingredients, **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.97, p. 7579–7585, 2013.

ZHAO, C.; BRÜCK, T.; LERCHER, J. A. Catalytic deoxygenation of microalgae oil to green hydrocarbons. **Green Chemistry**, v. 15, n. 7, p. 1720, 2013.

ZHU, X.Z.; DAVIS, D.A.; ROY, L.A.; SAMOCHA, T.M.; LAZO, J.P. Response of Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, to Three Sources of Solvent Extracted 103 Soybean Meal. **Journal of the World Aquaculture Society**, v.44, n.3, p. 396-404, 2013.

## ***5.3 ARTIGO 3***

---

**ENRIQUECIMENTO DA GOMA DA TAPIOCA COM BIOMASSA SECA DE *Scenedesmus* sp. CULTIVADA EM FOTOBIOREATOR EM MEIO ALTERNATIVO PREPARADO COM SORO DE FÉCULA DE MANDIOCA.**

**RESUMO**

A goma de tapioca é bastante encontrada na mesa dos brasileiros, um alimento com elevado teor de amido e quase zero de proteínas, lipídios e minerais. Seu alto índice calórico traduz-se em preocupação onde ela é muito consumida, a exemplo da região Nordeste. Desse modo esse estudo é direcionado na perspectiva de incrementar nutricionalmente este alimento, com biomassa de microalga com potencial proteico a fim de disponibilizar aos consumidores um alimento natural e mais saudável. Para isso a cepa *Scenedesmus* sp. foi cultivada em fotobiorreator usando como meio de cultura o SFM 50% para obtenção da biomassa seca e assim realizar as determinação dos componentes bioquímicos presentes nela. Em seguida a biomassa obtida é usada na formulação da goma de tapioca em diferentes concentrações (g de biomassa/g de goma de tapioca) para assim realizar as determinações físico-química. O rendimento em biomassa foi de 875mg.L<sup>-1</sup> e como resposta dos componentes bioquímicos presentes biomassa observa-se um alto teor de proteína 53,46% e 15,7% de lipídios, ao incorporar na goma tapioca o valor proteico teve uma variação de 0% até 55,01% nas diferentes concentrações (g de biomassa/ g de goma de tapioca. O valor de 55,01 % de proteína foi encontrado na goma com 1,6de g de biomassa introduzida em 100g de goma. Diante desses achado pode-se concluir que ade 1,6de g de biomassa introduzida em 100g de goma sugere como a concentração ideal de biomassa para formulação da tapioca.

**Palavras-chaves:** Biomassa; Teor proteico; Perfil de ácidos graxos; Ciclo industrial; Biomassa.

## ABSTRACT

Tapioca gum, widely found on the table of Brazilians is a food with high starch content and almost zero protein, lipid and minerals. Your high rate caloric translates into concern where it is very consumed, as in the region Northeast. Thus, this study had the perspective of nutritionally increasing microalgae biomass with protein potential to provide consumers a natural and healthier food. For this the strain *Scenedesmus* sp. was grown in a photobioreactor using SFM 50% as culture medium to obtain dry biomass and the determination of biochemical components was performed. Then The biomass obtained was used in the formulation of tapioca gum in different concentrations (g of biomass / g of tapioca gum) to carry out the determinations physicochemical. The biomass yield was 875mg.L<sup>-1</sup> and as a response of the biochemical components present biomass a high protein content was observed 53.46% and 15.7% of lipids, when incorporating in tapioca gum the protein value presented a variation from 0% to 55.01% in the different concentrations (g of biomass / g of tapioca gum). The value of 55.01% protein was found in gum with 1.6 g of biomass introduced in 100 g of gum. From these findings it can be concluded that the value of 1.6 g of biomass introduced in 100 g of gum suggests as the ideal biomass concentration for tapioca formulation.

**Keywords:** Biomass; Protein content; Fatty acid profile; Industrial cycle; Biomass.

## 1 INTRODUÇÃO

Em muitos países as denominações “cassava starch”, “tapioca flour” e “tapioca starch” são confundidas com a denominação “farinha de tapioca”, mas significam fécula de mandioca, que é diferente do produto que recebe tal denominação no Brasil. A farinha de tapioca é um produto característico das regiões Norte e Nordeste, onde a fabricação é realizada de forma semelhante, em fornos com movimentação manual ou mecanizados (CEREDA; VILPOUX, 2003; SILVA, 2011; ALMEIDA, 2017).

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), aprovou o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade dos Produtos Amiláceos Derivados da Raiz de Mandioca, através da Instrução Normativa nº 23, de 14 de dezembro de 2005 (BRASIL, 2005). Essa legislação estabelece os limites de tolerância para os produtos amiláceos derivados da raiz de mandioca e enquadra-os em grupo, subgrupo e tipo.

De acordo com a tecnologia de fabricação utilizada, o produto amiláceo é classificado em 2 (dois) grupos: **Grupo I** – Fécula e **Grupo II** – Tapioca. Segundo a forma dos grânulos, a tapioca é classificada em 2 (dois) subgrupos: **Tapioca Granulada** – Tapioca “Flakes granulated” (flocos granulados): é o produto sob forma de grânulos, poliédricos irregulares, de diversos tamanhos. **Tapioca perola ou sagu artificial** – “Pearl” (pérola) tapioca: é o produto sob forma de grânulos esféricos irregulares, de diversos tamanhos.

Entretanto, não existe uma regulamentação para fécula hidratada, ou a famosa goma de tapioca bastante encontrada na mesa dos brasileiros, um alimento com elevado teor de amido e quase zero de proteínas, lipídios e minerais. Seu alto índice calórico traduz-se em preocupação onde ela é muito consumida, a exemplo da região Nordeste. Desse modo, incrementar nutricionalmente este alimento é desejável nessa região, a fim de disponibilizar aos consumidores um alimento natural mais saudável, com baixo teor de sódio, sem gordura, rico em carboidratos de fácil digestão, e sem glúten (ALMEIDA, 2017). A tapioca tem se destacado no mercado por ser vista como uma saída para substituição do pão, para aqueles que não podem consumir o glúten ou tentam excluí-lo da alimentação por outros motivos.

Frente a preocupação com a saúde por parte dos consumidores a indústria de alimentos vem buscando ampliar suas matérias-primas aliadas a técnicas de processamento adequadas, no intuito de desenvolver produtos que respondam a

demanda deste novo nicho de mercado (AUGUSTIN et al, 2016). Neste cenário, a indústria alimentícia tem aumentado o seu interesse sobre os compostos existentes na biomassa microalgal (KOLLER; MUHR; BRAUNEGG, 2014).

As microalgas são facilmente cultivadas e se constituem numa importante fonte de compostos bioativos como proteínas, ácidos graxos poli-insaturados (PUFA), vitaminas, minerais, antioxidantes, carotenóides, ficobilinas e de outros nutrientes que promovem a saúde (BUONO et al., 2014; CARDOSO; BANDARRA; AFONSO, 2017; BARROS, 2017).

O interesse em produzir biomassa de microalgas nutricionalmente importantes a baixo custo tem sido objeto de muitas pesquisas e o uso de resíduos agroindustriais tem recebido grande atenção (CALIXTO et al 2016). Entretanto, poucos estudos tem procurado utilizar resíduos do processamento de alimentos como meio alternativo para a produção de biomassa de microalgas visando o enriquecimento dos mesmos alimentos.

Esse trabalho teve como objetivo cultivar *Scenedesmus* sp. (D545WC) num fotobiorreator em meio de cultura preparado com soro da fécula de mandioca e utilizar a biomassa seca no enriquecimento da goma de tapioca com a finalidade de obter um produto com alto teor proteico.

## **2 METODOLOGIA**

### **2.1 Cultivo de *Scenedesmus* sp em fotobiorreator**

A espécie *Scenedesmus* sp. (D545WC) selecionada da Coleção de Microalgas do Laboratório de Ambientes Recifais e Biotecnologia com Microalgas (LARBIM/LEA/UFPB) foi cultivada em meio alternativo preparado com soro de fécula de mandioca (SFM) em um fotobiorreator tubular “outdoor”, num volume total de 400 litros de meio.

O cultivo foi monitorado por medidas de fluorescência “in vivo” usando um fluorometro Turner Design até a fase estacionária. Nessemomento o experimento foi interrompido, a biomassa produzida foi transferida para uma mesa de decantação. A biomassa concentrada foi congelada a  $-30^{\circ}$  C num ultrafreezer (Terroni 90LT), liofilizadas num liofilizador Terroni (modelo LD1500) e pesada em balança analítica para assim determinar o rendimento de biomassa. A biomassa assim obtida foi utilizada para a caracterização dos bioativos e no enriquecimento da goma.

## 2.2 Caracterização bioquímica da biomassa microalgal

Na biomassa obtida foram determinados os teores de: Proteínas totais, pelo método de Kjeldahl usando reagente de Nessler e medidas espectrofotométricas a 420nm (SANTOS, 2007), carboidratos totais, pelo método adaptado de Kochert (1978), lipídios totais, de acordo com o método de Folch, Less e Stanley (1957), e ésteres metílicos de ácidos graxos, pela técnica da transesterificação direta da biomassa microalgal liofilizada, segundo a metodologia descrita por Hartman e Lago (1973), adaptado para microescala (MENEZES, 2013). Os ácidos graxos oriundos do processo de transesterificação foram identificados por Cromatografia Gasosa utilizando um cromatógrafo GCMS-QP2010 (Shimadzu, Kyoto, Japan) equipado com uma coluna Durabound DB-23 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm. A temperatura do injetor e do detector foram fixados em 230 °C e temperatura da coluna em 90 °C. O gradiente de eluição na coluna foi de 90 a 150 °C (10 °C/min), 150 a 200 °C (5 °C/min), 200 a 230 °C (3 °C/min) em um tempo total de corrida de 34 min, utilizando hélio como gás de arraste vazão de 187,2 mL/min

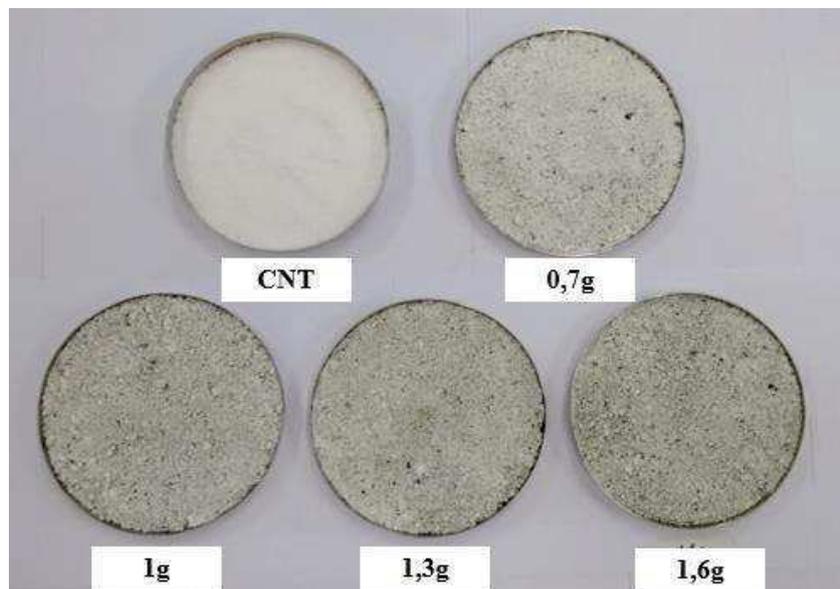
## 2.3 Análise termogravimétrica

A análise termogravimétrica (TG) da biomassa foi efetuada em Analisador Térmico Shimadzu, massa de 10 mg, cadinho de alumina, razão de aquecimento de 10 °C/min., em atmosfera de nitrogênio, fluxo de 50 mL de temperatura ambiente até 700 °C.

## 2.4 Preparo e caracterização físico-química da goma de tapioca

O FDA (Food and Drug Administration), após classificar *Spirulina* como GRAS (Generally Recognized as Safe), sugere que a ingestão diária deva ser de acordo com o porte físico do consumidor, podendo variar de 0,1 a 6g e a estimativa média de consumo é 3g/dia (FDA, 2003).

Foram preparadas diferentes concentrações da goma enriquecida com biomassa (0; 0,7g de biomassa/100 gramas de goma; 1g de biomassa/100 gramas de goma; 1,3g de biomassa/100 gramas de goma e 1,6 g de biomassa/100 gramas de goma) como pode ser verificado na figura 1. Posteriormente, foram realizados os ensaios físico-químicos do alimento assim preparado, determinando-se os teores de umidade, cinzas e proteínas em triplicatas, utilizando a metodologia descrita pela AOAC (2005).



**Figura 1** Preparo da goma de tapioca em diferentes concentrações de g de biomassa/100 gramas de goma.

**Fonte:** autor, 2019

## 2.5 Análise Estatística

Os dados da determinação físico-química da goma de tapioca foram analisados, utilizando a linguagem de programação **R Core Team (2018)**. Os resultados foram submetidos à uma análise de distribuição dos dados utilizando o teste de Shapiro-Wilk, e a homocedasticidade das amostras foi avaliada através do teste de Fligner-killeen. As amostras mostram uma distribuição normal e foram submetidas a análise de variância (ANOVA) seguida de teste post-hoc de Tukey para identificar os grupos que possuem diferença significativa estatisticamente ( $P < 0,05$ ). Aqueles que não possuíam uma distribuição normal foram submetidos a um teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis.

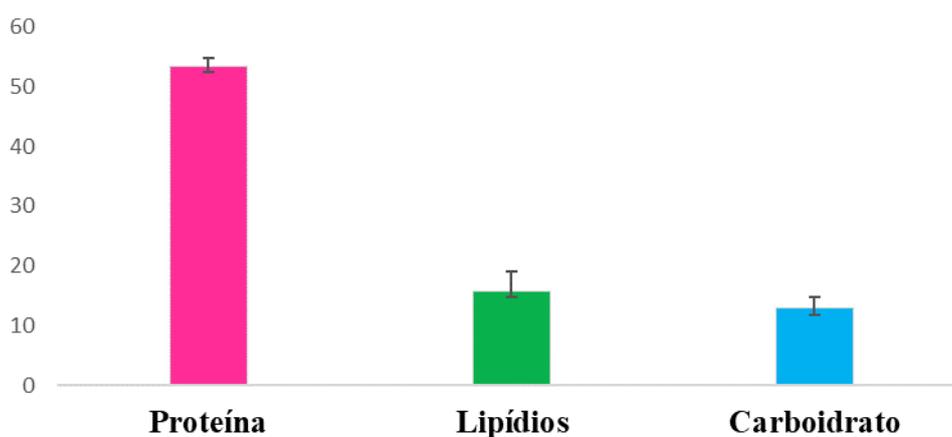
## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O cultivo teve uma duração de 10 dias. Os valores em biomassa seca obtida em SFM foi de 350g, este valor refere-se a uma área de 1,125 m<sup>2</sup> que corresponde a ¼ da área ocupada pela planta do fotobiorreator. O rendimento de biomassa foi de 875mg.L<sup>-1</sup> e a produtividade de 87,5mg/Ld<sup>-1</sup>. Pina (2019) ao cultivar *Selenastrum gracile* (Clorofíceas) no mesmo fotobiorreator em uma área de 4,5 m<sup>2</sup> e em meio preparado com

extrato de biocomposto obteve um rendimento e de  $19,69 \text{ mg.L}^{-1}$ . Comparação esta que permite enfatizar a eficiência do meio preparado com soro de fécula de mandioca em cultivos em massa utilizando um fotobiorreator, visto que nesse meio o rendimento em biomassa cultivada foi 44,64 vezes superior daquela registrada por esse autor, numa área de cultivo bastante inferior.

### 3.1 Determinação da composição bioquímica da biomassa produzida

Os teores de proteínas, carboidratos e lipídios encontrados na biomassa da microalga estudada (**Figura 2**) mostraram que a proteína foi o mais abundante, com percentual de  $53,46\% \pm 1,26$ . Esse valor encontra-se dentro da escala do teor proteico da *Spirulina* sp. (20-60%) que é uma das espécies de referência no tocante aos valores de proteína de microalgas (WELLS et al.; 2017.; BARROS, 2017; JESUS et al., 2018). Diante da resposta obtida com *Scenedesmus* sp. pode-se afirmar que o leque de opções no tocando ao uso da biomassa de microalgas na suplementação alimentar de humanos pode ser ampliado.



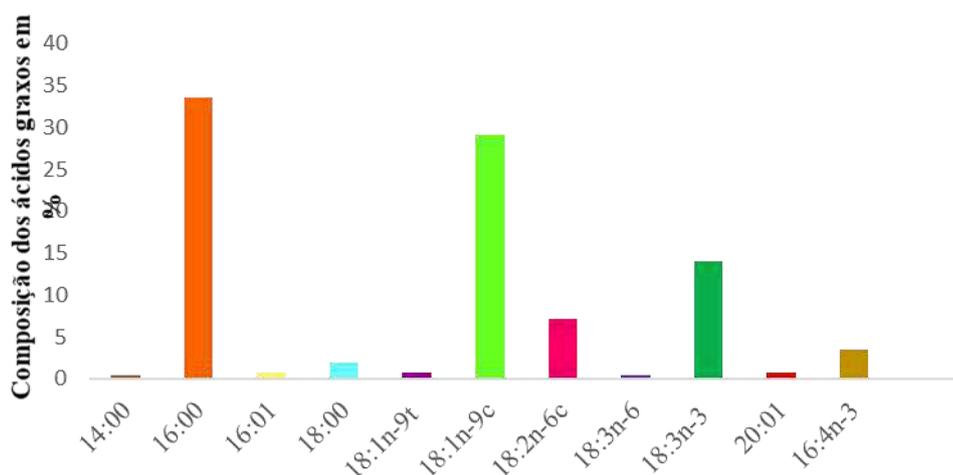
**Figura 2** Composição bioquímica *Scenedesmus* sp. cultivada em fotobiorreator, em meio de cultura preparado com soro de fécula de mandioca.

**Fonte:** autor, 2019

Os valores dos carboidratos obtidos na biomassa de *Scenedesmus* sp. cultivada em fotobiorreator foram muito baixos ( $12,89\% \pm 1,82$ ), contrastando com outros autores que chegaram a registrar 30,5% para *Scenedesmus* sp. (Visca et al., 2017) e 36,54% para *Scenedesmus acuminatus*. O conteúdo lipídico, por sua vez foi de  $15,7\% \pm 3,3$ . O teor médio de lipídios na biomassa de microalgas pode variar de 1 a 70%, mas em determinadas condições algumas espécies podem atingir até 90% do peso seco (LI et al., 2008; CHISTI, 2007; CALIXTO 2016).

Vidal et al. (2018) ao cultivar *Scenedesmus acuminatus* em concentração de 100% de efluente do reator UASB com concentração de 100%, apresentou um teor de lipídios de 10,42%. Baumgartner (2011) realizou extração de lipídios da microalga *Scenedesmus* sp. e obteve 8,3% de lipídios totais. Cheng et al. (2016) realizaram estudos de extração da microalga *Scenedesmus dimorphus* alcançou um teor de 14% de lipídios totais. Esses dados indicam que o cultivo de *Scenedesmus* sp. em soro de fécula de mandioca em fotobiorreator mostra-se mais promissor no tocante a obtenção de lipídios do que os registrados por esses autores por evidenciar valores mais elevados.

Quanto aos ácidos graxos as análises efetuadas na biomassa de *Scenedesmus* sp. evidenciaram um total de 55,01 mg de ácidos graxos/grama de biomassa. Os perfis dos ácidos graxos mostraram componentes com cadeia carbônica variando entre C14 a C20, compostas por ligações saturadas, monoinsaturadas e poli-insaturadas (**Figura 3**).



**F**  
**figura 3** Perfil de ácido graxo da espécie *Scenedesmus* sp. cultivada em meio de cultura preparado com soro de fécula da mandioca em fotobiorreator.

**Fonte:** autor, 2019

Os resultados evidenciaram uma maior concentração dos ácidos palmítico (C16:0) e oléico (C18:1  $\omega$ -9 c), seguido pelo  $\alpha$ -linoleico (C18:3  $\omega$ -3) e linoleico (C18:2  $\omega$ -6) em menores proporções, na microalga estudada.

Maiores níveis de ácido palmítico (C16:0) e oleico (C18:1  $\omega$  9c) e baixos níveis de ácidos graxos poli-insaturados foram encontrados por Rocha et al., (2017) em *Scenedesmus*, corroborando com a resposta do presente estudo, visto que o ácido graxo majoritário da espécie *Scenedesmus* sp. foi o ácido palmítico (C16:0) que apresentou 33,6 %. O ácido palmítico está presente em produtos animais (leite, carne, manteiga, e

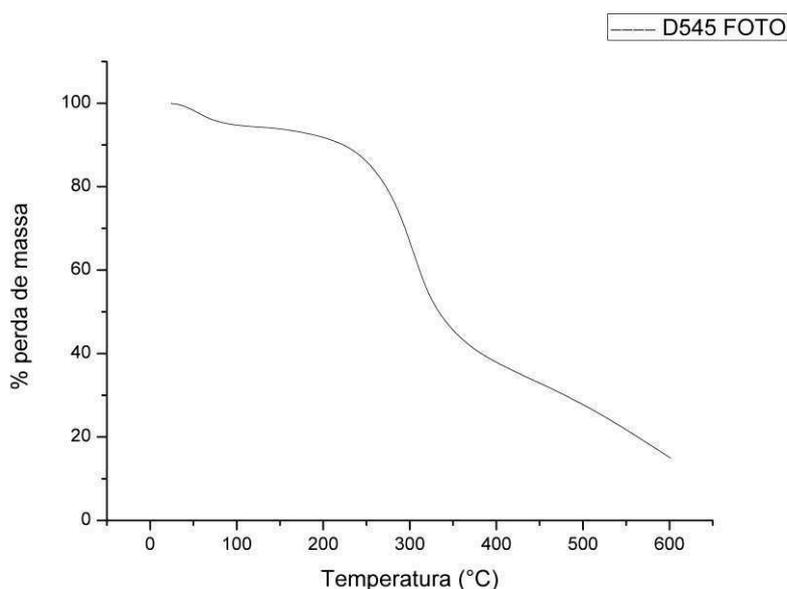
queijo) e produtos vegetais, como manteiga de cacau, óleo de soja e óleo de girassol (MATOS., 2017).

Os ácidos graxos insaturados, oleico, linoleico e linolênico foram predominantes, com destaque para ácido oleico, alcançando uma concentração de 29,16%, seguido do  $\alpha$ -linolênico ( $\omega$ 3), com 14,01%, e o ácido linoleico, com 7,19. Araújo (2018) ao trabalhar com *Scenedesmus* sp. em meio sintético obteve 1,64% de  $\alpha$ -linolênico ( $\omega$ 3), portanto muito inferior ao achado nesse estudo. Isso é um dado de grande relevância visto que os humanos não sintetizam os ácidos graxos  $\omega$ 3, sendo por isso esses ácidos, considerados essenciais, devendo ser obtidos pela dieta alimentar (AMBROZOVA et al., 2014).

### 3.3 Termogravimetria (TG)

Além das determinações químicas é importante para o produto obtido a análise térmica, uma vez que a goma de tapioca vai diretamente ao fogo com temperatura podendo chegar até 100°C, sendo necessário verificar a influência da temperatura na decomposição da matéria.

Sendo assim, foi obtida uma curva de perda de massa das biomassas da microalga usada na formulação da goma, que mostra uma série de alterações após o aquecimento, com três eventos térmicos como pode ser visto na **Figura 4**. Esses eventos estão relacionados a degradação de estruturas complexas de biomoléculas dispostas em suas células.



**Figura 4** Curva de TG para cepa *Scenedesmus* sp cultivada em SFM.

**Fonte:** autor, 2019

Análises térmicas em microalgas são observadas a decomposição/volatilização dos seus componentes essenciais como água, carboidrato, lipídios e proteínas (CALIXTO, 2016).

O primeiro evento variou de 25,3-130,0 °C e corresponde a processos de desidratação devido à presença da água na forma livre e/ou fracamente ligada a biomoléculas (ZOU et al., 2010; PENG et al., 2001). O segundo, entre 130° C e 450° C, está relacionado a um processo de decomposição térmica de carboidratos e proteínas e lipídios (RIZZO et al., 2013; BARROS, 2017), e se constitui como um dos principais eventos de perda de massa (61,3%), especialmente porque estes dois componentes são encontrados em quantidades elevadas na microalga em estudo.

A terceira etapa (entre 450° C e 600 °C), com perda de massa de 17,05% é atribuída à decomposição de materiais carbonáceos presentes nos resíduos sólidos (LIU et al., 2002; RIZZO et al., 2013).

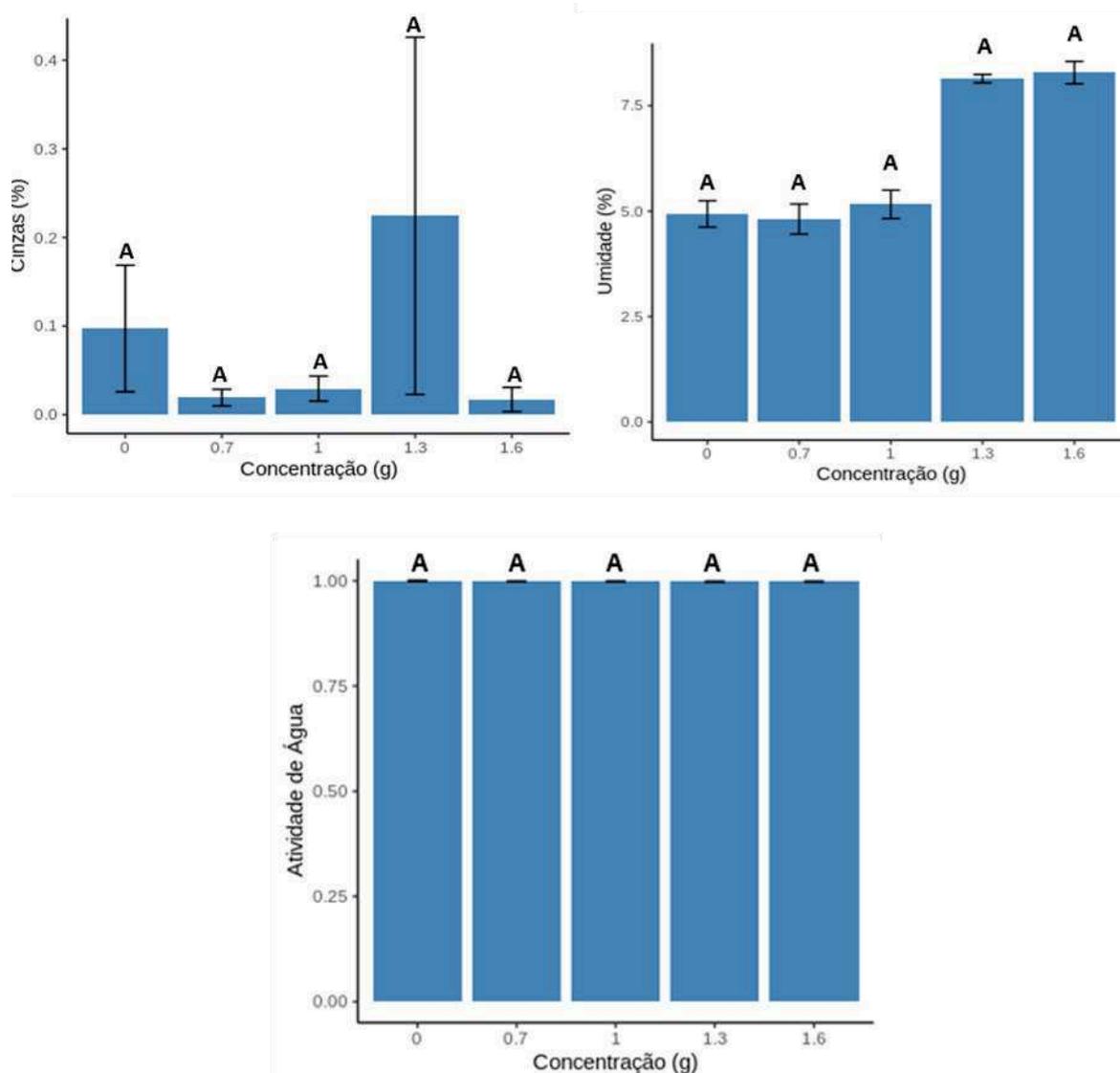
### **3.2 Determinação físico-química da goma de tapioca enriquecida com biomassa**

Os resultados dos parâmetros físico-químicos das amostras de goma de tapioca controle e as com adição de biomassa microalgal se acham apresentados na **Figura 5**.

Ramos (2013), afirma que a determinação do teor de umidade de um produto é uma medida indispensável nas análises de alimentos, por estar diretamente relacionada com a composição, qualidade e estabilidade. Um alimento é considerado com alta umidade quando seu valor está acima de 40%, portanto as gomas analisadas estão abaixo desse valor (ALMEIDA et al., 2017).

O teor de umidade do presente estudo variou de 4,43% a 8,28% nas diferentes concentrações de goma de tapioca enriquecida. Não houve diferença significativa entre as amostras ( $p = 0.03373$ ). A goma que mostrou maior valor foi a formulada com 1,6g de biomassa em 100g de tapioca ( $8,28 \pm 0,46$ ), portanto dentro dos padrões exigidos pela Portaria N° 554 de 30.08.1995 da Secretaria da Agricultura, do Abastecimento e Reforma Agrária (BRASIL, 1995). Silva et al. (2012), ao analisar fécula de mandioca encontrou uma umidade de 13,64%. Já Almeida (2017), ao formular uma goma de tapioca com beterraba encontrou uma umidade que variou entre 36,09 a 39,04% para diferentes concentrações de betalaína. Os dados registrados no presente estudo mostram, portanto, que o enriquecimento da goma de tapioca com biomassa de microalga é

positivo quanto a este aspecto. A avaliação do teor de umidade é de grande importância em alimentos visto que níveis maiores que 13% podem proporcionar crescimento microbiano e deterioração em curto tempo (CHISTÉ et al. 2006).



**Figura 5** Teores de Umidade, Atividade de água ( $A_w$ ) e Cinzas na biomassa seca de *Scenedesmus* sp. cultivada no fotobiorreator em soro de fécula de mandioca. Valores expressos em média  $\pm$  erro padrão (barras verticais). Colunas seguidas pela mesma letra não diferem significativamente ( $p < 0,05$ ).

**Fonte:** autor, 2019

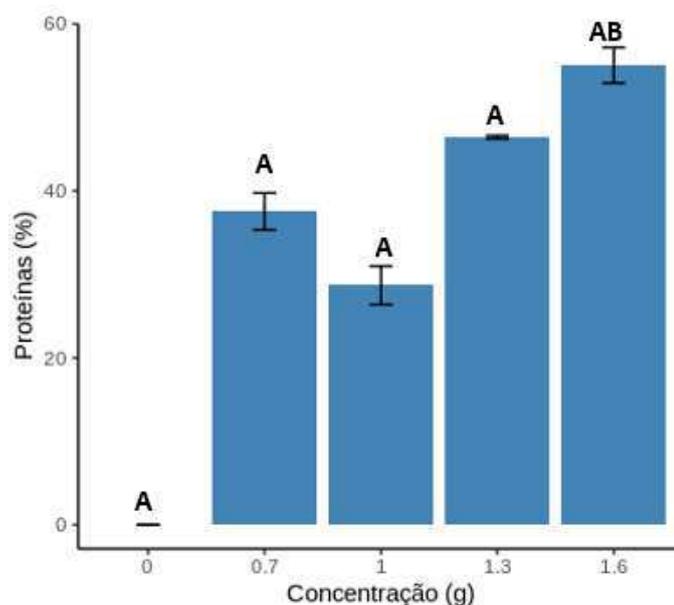
Assim como a umidade a atividade de água ( $A_w$ ) é de grande importância e tem sido o parâmetro preferido para ser medido e acompanhado, por representar melhor a água disponível ou o estado da água disponível que melhor se correlaciona com a conservação dos mesmos (SILVA, 2011). A atividade de água ( $A_w$ ) encontrada nas gomas de tapioca enriquecidas com biomassa microalgal ficaram entre  $1 \pm 0,002$  e

0,986±0,001, apresentando entre o controle (0g) e a goma formulada com 1g de biomassa de microalga, não apresentando diferenças significativas entre as concentrações ( $p= 0.4107$ ).

As amostras analisadas mostraram altos valores de atividade de água, permitindo ao produto uma maior vulnerabilidade a contaminação microbiológica e reações bioquímicas. Entretanto, fica difícil determinar uma faixa de atividade de água ideal para a goma de mandioca hidratada, uma vez que não há legislação específica desse produto.

Os resultados de cinzas também não mostraram diferença significativa entre as formulações ( $p= 0,7786$ ). É possível observar, a partir dos resultados obtidos na análise de cinzas, que o conteúdo mineral nas amostras analisadas variou de 0,017% ± 0,02 até 0,224% ± 0,35. A legislação para produtos amiláceos estabelece um conteúdo máximo de 0,25%. Almeida (2017) constatou que goma de tapioca enriquecida com betalaina apresentava conteúdo de cinzas superior a legislação devida, justificando concentrações elevadas do suco de beterraba que é fonte de minerais. Na literatura encontram-se trabalhos com goma de mandioca com resultados de cinzas que também estão dentro da legislação, variando o seu conteúdo de 0,08% até 0,23%, (SILVA, 2012; LUNA, 2013).

Um parâmetro físico-químico de grande importância para esse estudo é a proteína. As análises de proteínas efetuadas na biomassa seca de *Scenedesmus* sp. cultivada no fotobiorreator em meio de cultura preparado com soro de fécula de mandioca mostraram valores entre 0% ± 0 e 55,05%± 3,67 (**Figura 6**), sendo significativa a diferença entre as amostras de 0g de biomassa de microalga /100g de goma de tapioca e 1,6g de biomassa de microalga /100g de goma de tapioca ( $p= 0.009777$ ).



**Figura 6** Teor de Proteínas na biomassa seca de *Scenedesmus* sp. cultivada em meio SFM. Valores expressos em média  $\pm$  erro padrão (barras verticais). Colunas seguidas pela mesma letra não diferem significativamente ( $p < 0,05$ ).

**Fonte:** autor, 2019

O dado de proteína para maior concentração (1,6g/100g) exibido a cima corrobora com o valor encontrado na biomassa da *Scenedesmus* sp. cultivada em soro de fécula de mandioca (53,46), provando que esse alto teor de proteína encontrada na goma de tapioca é de fato proveniente da formulação com a biomassa microalgal. Gomas de tapioca no geral apresentam baixíssimos valores de proteína, como os determinados por Trombini et al., (2013), Vieira et al., (2010), Luna et al., (2013), Silva et al.,(2012) e Almeida (2017), respectivamente: 0,14%, 0,39% e 0,71%, 0,09%, 1%, evidenciando esses dados a de enriquecer a goma de tapioca com biomassa de *Scenedesmus* sp. cultivada no soro de fécula de mandioca.

#### 4. CONCLUSÃO

Os dados obtidos neste estudo revelaram a possibilidade de se implementar um perfeito ciclo industrial em que se utiliza o resíduo gerado pela hidratação da goma como meio alternativo de baixo custo para o cultivo em larga escala da microalga *Scenedesmus* sp., obtendo-se a curto tempo grandes quantidades de biomassa com elevado percentual de proteína. A incorporação da biomassa seca da microalga cultivada na goma da tapioca aumenta sua qualidade nutricional, gerando um produto final muito rico em material proteico (máximo de 55,05% na proporção de 1,6 g de biomassa microalgal em 100g de tapioca). Desde que a análise termogravimétrica evidenciou

degradação dos componentes bioquímicos presentes na biomassa microalgal apenas em um intervalo de temperatura ente 130 e 450°C conclui-se, ainda, que a biomassa microalgal adicionada a goma da tapioca mantem-se íntegra no produto final obtido pronto para consumo, visto que seu preparo ao fogo (em fogão convencional) atingir aos 100°C. Conclui-se, ainda, que a incorporação da biomassa seca de *Scenedesmus* sp. na goma da tapioca gera benefícios adicionais à saúde, potencializados pela presença de ácidos graxos essenciais presentes na biomassa dessa microalga.

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, L, M, R, SOUZA, C, O, RIBEIRO ,P, L, L , DRUZIAN, J, I , MIRANDA M, S,. Estudo Prospectivo sobre Produtos Alimentares Incorporados de Biomassa de Microalgas. Salvador, v. 10, n. 4, p. 893-904 out/dez.2017
- AMBROZOVA, J. V. et al. Influence of extractive solvents on lipid and fatty acids content of edible freshwater algal and seaweed products, the green microalga *Chlorella kessleri* and the cyanobacterium *Spirulina platensis*. *Molecules*, v. 19, n. 2, p. 2344–2360, 2014.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists), 2005. Official Methods of the AOAC International, 18th ed. Maryland, USA.
- ARAÚJO, B,V,S,. Metabólitos de Interesse à Indústria Alimentícia, Produzidos por Microalgas Isoladas da Região Nordeste do Brasil. 143f. Tese (Doutorado) Ciência e Tecnologia de Alimentos – Universidade Federal da Paraíba, 2018
- AUGUSTIN, M. A.; RILEY, M.; STOCKMANN, R.; BENNETT, L.; KAHL, A.; LOCKETT, T.; OSMOND, M.; SANGUANSRI, P.; STONEHOUSE, W.; ZAJAC, I.; COBIAC, L. Role of food processing in food and nutrition security, **Trends in Food Science & Technology**, p. 1-52, 2016.
- BARROS, V, P, M,. Potencial nutricional e antimicrobiano de microalgas dulcícolas isoladas da região nordeste do Brasil. 89f. Mestrado (Dissertação)- Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal da Paraíba, 2017
- BAUMGARTNER, TRS. Cultivo e extração de óleo das microalgas *Scenedesmus* sp. e *Spirulina* sp. para a síntese de ésteres visando à produção de biodiesel. 124 p. 2011. Tese de Doutorado. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Maringá-PEQ/UEM, Paraná
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n.23, de 14 de dezembro de 2005. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade dos Produtos Amiláceos derivados da raiz da mandioca. Diário Oficial [da República Federativa do Brasil], Brasília, dez. 2005. Seção 1, p.5.
- BRASIL. Portaria nº 554 de 30 de agosto de 1995. Diário Oficial. Brasília, Secretaria da Agricultura, do Abastecimento e Reforma Agrária. 1 Set., Seção 1.
- BUONO S, LANGELLOTTI AL, MARTELLO A, BIMONTE M, TITO A, CAROLA A, APONE F, COLUCCI G, FOGLIANO V. Arch Dermatol Res. Biological activities of dermatological interest by the water extract of the microalga *Botryococcus braunii*. 2012 Nov;304(9):755-64. Epub 2012 Jun 9.
- CALIXTO, C. D. et al. Biochemical compositions and fatty acid profiles in four species of microalgae cultivated on household sewage and agro-industrial residues. *Bioresource Technology*, v. 221, p. 438–446, 2016.
- CALIXTO, C. D. Potencial de microalgas regionais cultivadas em meios alternativos para produção de biodiesel. 2016. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2016.
- CARDOSO, J.M.C.; BANDARRA, N.; M AFONSO, C. Microalgae as healthy ingredients for functional food: a review. *Food & Function*, v. 8, p. 2672–2685, 2017.

CEREDA, M. P. (Coord.). Manejo, uso e tratamento de subprodutos da industrialização da mandioca. v.4. São Paulo: Fundação Cargill, 2001, 340p. (Série Cultura de tuberosas amiláceas latino-americanas).

CEREDA, M. P.; CHUZEL, G. C.; VILPOUX, O. F.; NUNES, O. L. G. S. Biotecnologia industrial. In: Modificação de fécula por fermentação. São Paulo: Edgard Blücher, p. 413-460, 2003.

CHISTÉ, R.C. et al. sorption isotherms of tapioca flour. *international journal of food science and technology*, oxford, v.47, n.4, p.870-874, 2012.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, v.25, p.294-306, 2007.

FOLCH, J.; LESS, M.; STANLEY, S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **Journal Biological Chemistry**, v. 226, n.1, p. 497-509, 1957

JESUS, C.S.; UEBEL, L.S.; COSTA, S. S.; MIRANDA, A. L.; MORAIS, E.G.; MORAIS, M.G.; COSTA, J.A.V.; NUNES, L.I.; FERREIRA, E.S.; DRUZIAN, J. I. Outdoor pilot-scale cultivation of *Spirulina* sp. LEB-18 in different geographic locations for evaluating its growth and chemical composition. *Bioresource Technology*, v. 256, p. 86–94, 2018.

KOCHERT, G. Carbohydrate determination by the phenol-sulfuric method. In: HELLEMBUST, J. A., CRAIGIE, J. S. (eds.). *Handbook of Phycological Methods. Physiological and Biochemical Methods*. Cambridge: Cambridge University, p.95-97. 1978.

KOLLER, M.; MUHR, A.; BRAUNEGG, G. Microalgae as versatile cellular factories for valued products. **Algal Research**, v. 6 p. 52–63, 2014.

LI, Y.; HORSMAN, M.; WANG, B.; WU, N.; LAN, C. Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochloris oleoabundans*. **Appl. Microbiol. Biotechnol**, v.81, p.629–636, 2008.

LIU, N.A.; FAN, W.; DOBASHI, R.; HUANG, L. Kinetic modeling of thermal decomposition of natural cellulosic materials in air atmosphere. **J Anal Appl Pyrolysis**, v.63, p.303-25, 2002.

LUNA, Aurilene. T; RODRIGUES, Fabíola. F. G; COSTA, José. G. M; PEREIRA, Anita. O. B. PHYSICAL-CHEMICAL STUDY, MICROBIAL AND BROMATOLOGICAL OF *Manihot esculenta* Crantz (MANDIOCA). *Revista Interfaces: Saúde, Humanas e Tecnologia*. Ano 1, v. 1, n.3, jun, 2013. Faculdade Leão Sampaio

MATOS, A. P. The Impact of Microalgae in Food Science and Technology. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 94, p. 1333–1350, 2017.

MENEZES, R. S; LELES, M. I. G.; SOARES, A. T.; FRANCO, P. I. M.; ANTONIOSI FILHO, N. R.; SANT'ANNA, C. L.; VIEIRA, A. A. H. Avaliação da potencialidade de microalgas dulcícolas como fonte de matéria-prima graxa para a produção de biodiesel. *Química Nova*, v. 13, n. 1, p. 10-15, 2013

PENG, W. Pyrolytic characteristics of microalgae as renewable energy source determined by thermogravimetric analysis. **Bioresour Technol**, v.80, p.1-7, 2001.

RIZZO, A.M.; PRUSSI, M.; BETTUCCI, L.; LIBELLI, I.M.; CHIARAMONTI, D. Characterization of microalga *Chlorella* as a fuel and its thermogravimetric behavior. **Appl Energy**, v.102, p.24-31, 2013.

ROCHA, R. P.; MACHADO, M.; VAZA, M. G. M.V.; VINSON, C. C.; LEITE, M.; RICHARD, R.; MENDES, L. B. B.; ARAUJO, W. L.; CALDANA, C.; MARTINS, M. A.; THOMAS, C. R.; WILLIAMS, A. N. Exploring the metabolic and physiological diversity of native microalgal strains (Chlorophyta) isolated from tropical freshwater reservoirs. **Algal Research**, v.28, p. 139–150, 2017.

SANTOS, S.F.M. Estudo da produção de pectinases por fermentação em estado sólido utilizando pedúnculo de caju como substrato. Tese de Doutorado em Engenharia química. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2007

SILVA, A, P., Estudo do Processamento e da Qualidade Física, Físico-química e Sensorial da Farinha de Tapioca. 92f. Dissertação ( Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Pará, 2011

SILVA, A, P., Estudo do Processamento e da Qualidade Física, Físico-química e Sensorial da Farinha de Tapioca. 92f. Dissertação ( Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Pará, 2011

SILVA, P.A.; MELO, W.S.; CUNHA, R.L.; CUNHA, E.F.M.; LOPES, A.S.; PENA, R.S.; obtenção e caracterização das féculas de três variedades de mandioca produzidas no estado do Pará. XIX congresso brasileiro de engenharia química. búzios – RJ. 2012.

TIBÚRCIO, V, P., Bioprospecção de ácidos graxos em microalgas isoladas da região semiárida da Paraíba e ensaios com espécies potencialmente produtoras de biodiesel em condições de estresse. 60f. Mestrado (Dissertação) – Engenharia Química Universidade Federal de Campina Grande. 2014

TROMBINI, F. R. m.; leonel, m.; mischan, m. m. desenvolvimento de snacks extrusados a partir de misturas de farinha de soja, fécula e farelo de mandioca. ciência rural, santa maria, v. 43, n. 1, p. 178- 184, 2013

VIDAL, I,C,A,. Estudo da Potencialidade de Produção de Biocombustíveis entre as Microalgas *Chlorella* sp. E *Scenedesmus* sp. Cultivadas em Águas Residuárias. 103f. Trabalho de Conclusão de curso – Universidade Estadual da Paraíba, 2016

VIEIRA, J. C. et al. influência da adição de fécula de mandioca nas características do pão tipo chá. boletim ceppa, curitiba, v. 28, n. 1, p. 37-48, 2010.

VISCA, A. et al. Microalgae cultivation for lipids and carbohydrates production. **Chemical Engineering Transactions**, v. 57, p. 127–132, 2017.

WELLS, M.L.; POTIN, P.; CRAIGIE, J. S.; RAVEN, J.A.; MERCHANT, S.S.; HELLIWELL, K. E.; SMITH, A.G.; CAMIRE, M.E.; BRAWLEY. S.H. Algae as nutritional and functional food sources: revisiting our understanding. **Journal of Applied Phycology**. v. 29, n.2, p. 949-982, 2017.

ZOU, S. P.; WU, Y. L.; YANG, M. D.; LI, C.; TONG, J. M. Bio-oil production from sub- and supercritical water liquefaction of microalgae *Dunaliella tertiolecta* and related properties. **Energy Environ. Sci.**, v.3, p.1073–1078, 2010.

## 5 CONCLUSÃO GERAL

- O cultivo de microalgas com soro de fécula de mandioca é viável e apresenta grande perspectiva no tocante ao componente lipídico.
- As espécies *Coelastrum* sp e *Scenedesmus quadricauda* exibiram resultados positivos quando cultivadas na concentração de 25% de SFM e *Oocistys* e *Scenedesmus* sp. a 50% de SFM.
- Evidenciou-se um maior rendimento em biomassa quando cultivada em SFM do que em meio controle, sendo a melhor resposta encontrada na espécie *Scenedesmus* sp.
- A *Scenedesmus* sp. cultivada em SFM, foi a que apresentou o maior teor em proteína assim como melhores resultados para ácido fólico e para os ésteres metílicos de ácidos graxos. Esses achados reforçam o fato de que *Scenedesmus* sp. tem grande potencial para ser cultivada em larga escala em meio alternativo preparado a partir de soro de fécula de mandioca, a fim de ser obter biomassa rica nesses compostos para ser utilizada como ingrediente funcional para o enriquecimento de alimento.
- A incorporação da biomassa seca da microalga cultivada na goma da tapioca aumenta sua qualidade nutricional, gerando um produto final muito rico em material proteico (máximo de 55,05% na proporção de 1,6 g de biomassa microalgal em 100g de tapioca).
- Quando realizado os ensaios térmicos, foi possível verificar que mesmo com aquecimento da goma enriquecida com a biomassa microalga não houve perda matéria proteica.
- Conclui-se, ainda, que a incorporação da biomassa seca de *Scenedesmus* sp. na goma da tapioca gera benefícios adicionais à saúde, potencializados pela presença de ácidos graxos essenciais presentes na biomassa dessa microalga.

## PESPECTIVAS FUTURAS

- Caracterização microbiológica da goma da tapioca;
- Análise sensorial da goma da tapioca;
- Determinação da vida útil de prateleira do produto;
- Nova caracterização de uma forma mais detalhada do meio alternativo;
- Realização de novos ensaios com meio alternativo (soro de fécula de mandioca em fotobiorreator com cepas amplamente usadas na área de alimentos (*Spirulina sp.* e *Clorella vulgaris*);
- Determinação de antioxidante.