



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA
DE PROCESSOS**



DOUTORADO EM ENGENHARIA DE PROCESSOS

**CULTIVO E SECAGEM DA MICROALGA *Chlorella* sp. EM
DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NUTRIENTES**

JOSÉ FRANCIRALDO DE LIMA

**Campina Grande – Paraíba
AGOSTO - 2016**

**CULTIVO E SECAGEM DA MICROALGA *Chlorella sp.* EM DIFERENTES
CONCENTRAÇÕES DE NUTRIENTES**

JOSÉ FRANCIRALDO DE LIMA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos da Universidade Federal de Campina Grande, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Doutor em Engenharia de Processos.

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Desenvolvimento de Processos

ORIENTADORES: Prof. Dr. Alexandre José de Melo Queiroz

Prof.^ª. Dr.^ª. Rossana Maria Feitosa de Figueirêdo

Campina Grande - Paraíba

AGOSTO - 2016

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL DA
UFCG**

XXXXX

LIMA, J. F.

2015 CULTIVO E SECAGEM DA MICROALGA *Chlorella sp.* EM
DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NUTRIENTES

JOSÉ FRANCIRALDO DE LIMA – Campina Grande.

XXXXX

Tese de (Doutorado) Universidade Federal de Campina Grande,
Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos.

Referências

Orientadores: Prof. Dr. Alexandre José de Melo Queiroz Proa.
Dra. Rossana Maria Feitosa de Figueiredo.

1- Microalgas, Bioprodutos, Lipídeos, Açúcares.

CDU XXXX XXXXXX

**CULTIVO E SECAGEM DA MICROALGA *Chlorella sp.* EM
DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NUTRIENTES**

Tese apresentada ao programa de pós-graduação em engenharia de processos da
Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande 2016.

Prof. Dr. Alexandre José de Melo Queiroz (Orientador -UFCG)

Profa. Dra. Rossana Maria Feitosa de Figueiredo (Orientadora – UFCG)

Profa. Dra. Ângela Maria Santiago (Examinadora externa – UEPB)

Profa Dra. Pablícia Oliveira Galdino (Examinadora Externo – UEPB)

Profa. Dra. Tânila Kassimura da Silva Fernandes (Examinador Externo – IFPB)

DEDICATÓRIA

*À força suprema pela permissão
existencial de tudo e de todos!*

*À mulher da minha vida, Josicleide, pelo
apoio incondicional em todos os
momentos, principalmente nos de
incerteza, muito comuns para quem tenta
trilhar novos caminhos.*

*Sem você, nenhuma conquista valeria a
pena.*

AGRADECIMENTOS

À força que move todas as energias do cosmo! Por permitir a minha existência e pela proteção de energias supremas que muito me ajudaram a chegar aqui.

A **meus pais, Francisco e Maria**, que dignamente me apresentaram à importância da família e ao caminho da honestidade e persistência. Pelo apoio incondicional em momentos difíceis da minha jornada. O meu muito obrigado por permitir que eu existisse e possa estar aqui agora, neste momento, passando para uma nova etapa de minha vida.

A meus filhos, Erickson e Letícia, pelas boas energias emanadas de seus corações e que muito me ajudaram a cumprir mais essa jornada em minha vida.

Aos meus Orientadores: Prof. Dr. Alexandre José de Melo Queiroz e Profa. Dra. Rossana Maria Feitosa de Figueiredo, pela oportunidade de ter feito parte de sua equipe durante essa jornada e pelas orientações de grande valor para elucidação deste trabalho.

À fazenda Tamanduá representada pela pessoa de Pierre Landolt. Obrigado pelo apoio e confiança durante o desenvolvimento deste trabalho.

A meus irmãos Andrea, Fátima, Vicente, Márcio, Francineide, Francisco e Francimar, pela boa convivência que tivemos durante este trabalho.

Aos amigos de curso, Francisco Pinto, José Gledson, Arimateia e José Bezerra, pelo apoio nos momentos difíceis e pelas soluções sugeridas.

Ao ex-Coordenador Antonio Gilson, pela força e pensamentos positivos e ajuda incondicional durante toda a jornada.

Ao coordenador da pós-graduação em engenharia de processos, Dr. Severino, pelo apoio e atenção.

Aos professores da UFCG, meu muito obrigado pelas grandes colaborações em prol da minha tese.

Ao professor Adeilton Pereira da UFMA, pela colaboração em minhas análises, em seu laboratório.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	vii
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
1 - INTRODUÇÃO	1
1.1 -Objetivos	3
1.1.1 - Objetivo geral	3
1.1.2- Objetivos específicos	3
2 - REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1- Microalgas	4
2.1.1- A espécie <i>Chlorella sp</i>	5
2.1.2 - Nutrição das microalgas	6
2.2 - Sistema de cultivo	8
2.3 - Métodos de separação de biomassa de microalgas	12
2.4 - Secagem.....	12
2.5 - Pó da biomassa da <i>Chlorella sp.</i>	13
2.6 - Açúcares de microalgas	14
2.7 - Lipídeos de microalgas	16
2.8 - Potencial das algas	18
2.9 - Isoterma de adsorção de umidade	19
3 - MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1 - Matéria prima	21
3.2 - Cultivo e processamento da microalga.....	21
3.3- Inóculo de <i>Chlorella sp.</i> e meio de cultura	22
3.4- Cultivo da <i>Chlorella sp.</i> em fotobiorreator aberto	23
3.4.1- Crescimento celular	24
3.4.2- Produção de lipídeos e açúcares totais	25
3.5 - Colheita e secagem da biomassa.....	25
3.6 - Microscopia eletrônica de varredura.....	28
3.6.1 - Rompimento da parede celular.....	28
3.6.2 - Extração quantificação e caracterização morfológica do amido	28

3.7 - Caracterização química física e físico-química da biomassa seca.....	29
3.7.1 - Teor de umidade.....	28
3.7.2 - Cinzas.....	29
3.7.3 - Lipídeos.....	29
3.7.4 - Proteínas.....	29
3.7.5 - Açúcares totais.....	29
3.7.6 - pH.....	30
3.7.7 - Clorofila e Feofitina.....	30
3.7.8 - Atividade de água	32
3.7.9 - Amido.....	32
3.7.10 - Perfil dos minerais.....	32
3.7.11 - Perfil dos aminoácidos.....	32
3.7.12 - Perfil dos ácidos graxos.....	33
3.8 - Isoterma de adsorção de umidade.....	33
3.9 - Análise estatística.....	35
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
4.1 - Monitoramento da <i>Chlorella sp.</i> durante o cultivo.....	36
4.1.1 - Crescimento celular.....	36
4.1.2 - Lipídeos.....	44
4.1.3 - Açúcares totais.....	48
4.2 - Microscopia eletrônica de varredura.....	52
4.2.1 - Micrografias das células de <i>Chlorella sp.</i>	52
4.2.2 - Micrografias dos grânulos de amido.....	60
4.3 - Caracterização química, física e físico-química da biomassa seca.....	72
4.3.1 - Perfil dos minerais da biomassa seca de <i>Chlorella sp.</i>	72
4.3.2 - Perfil dos aminoácidos.....	74
4.3.3 - Perfil dos ácidos graxos.....	76
4.4 - Isoterma de adsorção de umidade.....	80
5- CONCLUSÕES	86
6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87
APÊNDICES	117

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1-	Células de <i>Chlorella sp.</i>	5
Figura 2.2 -	Fotobiorreator tubular	9
Figura 2.3 -	Fotobiorreator de placas	10
Figura 2.4 -	Fotobiorreator aberto	11
Figura 2.5 -	Estrutura química dos açúcares.....	14
Figura 2.6 -	Estrutura química dos ácidos graxos	17
Figura 3.1 -	Cultivo de <i>Chlorella sp</i> em fotobiorreator de bancada	22
Figura 3.2 -	Início do cultivo de <i>Chlorella sp.</i> em tanque aberto	23
Figura 3.3 -	Cultura de <i>Chlorella sp.</i> em tanque aberto.....	23
Figura 3.4 -	Inóculo da <i>Chlorella sp.</i> aumento de 400x.....	25
Figura 3.5 -	Biomassa fresca de <i>Chlorella sp.</i> após colheita	26
Figura 3.6-	Extrusoura Distribuido a biomassa fresca de <i>Chlorella sp</i> . nas bandejas...	26
Figura 3.7-	Secagem da biomassa de <i>Chlorella sp</i> em estufa.....	27
Figura 3.8-	Biomassa seca de <i>Chlorella sp.</i> em flocos	27
Figura 3.9-	Biomassa de <i>Chlorella sp.</i> em pó e em flocos	27
Figura 4.1 -	Valores médios do crescimento celular de <i>Chlorella sp</i> em função do tempo de cultivo para o tratamento controle	39
Figura 4.2-	Valores médios do crescimento celular de <i>Chlorella sp</i> em função do tempo de cultivo para o tratamento T1	40
Figura 4.3 -	Valores médios do crescimento celular de <i>Chlorella sp</i> em função do tempo de cultivo para o tratamento T2	41
Figura 4.4 -	Valores médios do crescimento celular de <i>Chlorella sp</i> em função do tempo de cultivo para o tratamento T3	42
Figura 4.5 -	Valores médios do crescimento celular de <i>Chlorella sp</i> em função do tempo de cultivo para o tratamento T4	43
Figura 4.6 -	Valores médios do crescimento celular de <i>Chlorella sp</i> em função do tempo de cultivo para o tratamento T5	44
Figura 4.7 -	Valores médios dos lipídeos de <i>Chlorella sp.</i> em função do tempo de cultivo para os tratamentos com diferentes concentrações de nutrientes (TC, T1, T2, T3, T4 e T5)	47

Figura 4.8 -	Valores médios dos açúcares totais <i>Chlorella sp.</i> em função do tempo de cultivo para os tratamentos com diferentes concentrações de nutrientes (TC, T1, T2, T3, T4 e T5)	51
Figura 4.9 -	Micrografias das células de <i>Chlorella sp</i> após o rompimento da parede celular, no tratamento controle. (a) aumento de 100x, (b) 300x, (c) 500x, (d) 1000x e (e) 2000x.	53
Figura 4.10-	Micrografias das células de <i>Chlorella sp</i> após o rompimento da parede celular, no tratamento 1. (a) aumento de 100x, (b) 300x, (c) 500x, (d) 1000x e (e) 2000x	54
Figura 4.11-	Micrografias das células de <i>Chlorella sp</i> após o rompimento da parede celular, no tratamento 2. (a) aumento de 100x, (b) 300x, (c) 500x, (d) 1000x e (e) 2000x	55
Figura 4.12 -	Micrografias das células de <i>Chlorella sp</i> após o rompimento da parede celular, no tratamento 3. (a) aumento de 100x, (b) 300x, (c) 500x, (d) 1000x e (e) 2000x	56
Figura 4.13 -	Micrografias das células de <i>Chlorella sp</i> após o rompimento da parede celular, no tratamento 4. (a) aumento de 100x, (b) 300x, (c) 500x, (d) 1000x e (e) 2000x	57
Figura 4.14 -	Micrografias das células de <i>Chlorella sp</i> após o rompimento da parede celular, no tratamento 5. (a) aumento de 100x, (b) 300x, (c) 500x, (d) 1000x e (e) 2000x	58
Figura 4.15 -	Micrografias do amido de <i>Chlorella sp.</i> no tratamento controle. (a) aumento de 100x, (b) 300x, (c) 500x, (d) 1000x e (e) 2000x	61
Figura 4.16 -	Micrografias do amido de <i>Chlorella sp.</i> no tratamento 1. (a) aumento de 100x, (b) 300x, (c) 500x, (d) 1000x e (e) 2000x	62
Figura 4.17 -	Micrografias do amido de <i>Chlorella sp.</i> no tratamento 2. (a) aumento de 100x, (b) 300x, (c) 500x, (d) 1000x e (e) 2000x	63
Figura 4.18 -	Micrografias do amido de <i>Chlorella sp.</i> no tratamento 3. (a) aumento de 100x, (b) 300x, (c) 500x, (d) 1000x e (e) 2000x	64
Figura 4.19 -	Micrografias do amido de <i>Chlorella sp.</i> no tratamento 4. (a) aumento de 100x, (b) 300x, (c) 500x, (d) 1000x e (e) 2000x	65

Figura 4.20 - Micrografias do amido de <i>Chlorella sp.</i> no tratamento 5. (a) aumento de 100x, (b) 300x, (c) 500x, (d) 1000x e (e) 2000x	66
Figura 4.21 - Isoterma de adsorção de água da biomassa de <i>Chlorella sp.</i> tratamentos controle, T1, T2, T3, T4 e T5 temperatura de 25 °C ajustadas pelo modelo de Oswin, GAB Peleg.....	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 -	Variação da concentração de constituintes químicos para modulação da cultura de <i>Chlorella sp.</i>	24
Tabela 4.1 -	Valores médios do crescimento celular da <i>Chlorella sp.</i> durante o tempo de crescimento para diferentes tratamentos	35
Tabela 4.2 -	Valores médios dos lipídeos da <i>Chlorella sp.</i> (peso seco) em diferentes tratamentos	44
Tabela 4.3 -	Valores médios dos carboidratos totais <i>Chlorella sp.</i> (peso seco) para os diferentes tratamentos	49
Tabela 4.4 -	Perfil dos ácidos graxos (g/100 g) da biomassa de <i>Chlorella sp.</i> nos diferentes tratamentos	52
Tabela 4.5 -	Perfil dos ésteres metílicos da <i>Chlorella sp.</i> em diferentes tratamentos .	54
Tabela 4.6 -	Valores médios das análises físico-químicas nos diferentes tratamentos	71
Tabela 4.7 -	Valores médios da análise elementar por EDS das biomassas da <i>Chlorella sp.</i> obtidas em diferentes tratamentos	74
Tabela 4.8 -	Valores médios da análise de aminoácidos (g/100 g) da biomassa da <i>Chlorella sp.</i> nos diferentes tratamentos	76
Tabela 4.9 -	Parâmetros, coeficientes de determinação (R^2) e desvios percentuais médios (P) do modelo Oswin, GAB e Peleg ajustado às isotermas de adsorção de umidade da biomassa de <i>Chlorella sp.</i> em pó para os tratamentos TC, T1, T2, T3, T4 e T5 desidratada na temperatura de secagem de 40 °C	79
Tabela A.1 -	Dados de coleta de Luminosidade nos tanques de <i>Chlorella sp.</i>	115
Tabela A.2 -	Dados de coleta de Temperatura nos tanques de <i>Chlorella sp.</i>	117
Tabela A.3 -	Dados de coleta de pH nos tanques de <i>Chlorella sp.</i>	119

RESUMO

As microalgas produzem quantidades elevadas de compostos, principalmente lipídeos e açúcares. Quando essas são submetidas a variações de nutrientes podem elevar consideravelmente a concentração desses compostos, os quais são empregados para a produção de alimentos, biocombustíveis, cosméticos e componentes farmacêuticos. Esta pesquisa objetivou realizar o cultivo da microalga *Chlorella* sp., em fotobiorreator aberto de campo com diferentes concentrações de nutrientes, em seis tratamentos distintos (TC, T1, T2, T3, T4 e T5), secar as biomassas dos diferentes tratamentos e caracterizá-las quanto aos parâmetros físicos, químicos e físico-químicos, como também construir suas isotermas de adsorção de umidade a 25 °C. A estirpe utilizada neste trabalho foi isolada da barragem da Conceição, localizada na Fazenda Tamanduá, Santa Teresinha, PB, e o meio utilizado foi meio MC. (Medium *Chlorella ellipsodea*). As características da microalga durante 16 dias de cultivo foram avaliadas com relação ao crescimento celular (peso úmido e peso seco), teor de lipídeos e açúcares totais. De acordo com os resultados verificou-se que a maior produção de biomassa da *Chlorella* sp. em termos de peso seco, foi alcançada nos tratamentos TC, T1, T2 e T5 no 10º dia de cultivo e que com a redução nos tratamentos das concentrações de nitrogênio, fósforo, potássio e ferro houve aumento da síntese de lipídeos; para os tratamentos T3 e T4 o maior peso seco foi atingido no 12º e 16º dias de cultivo, respectivamente. A redução nas concentrações dos elementos nitrogênio, fósforo, potássio e ferro não favoreceu o aumento da produção dos minerais, proteínas, clorofila e feofitina. Os modelos de GAB, Peleg e Oswin podem ser usados para estimar as isotermas de adsorção de umidade, a 25 °C, da *Chlorella* sp. secas de todos os tratamentos, e foram classificadas como tipo II (TC, T1 e T5) e tipo III (T2, T3 e T4). Diante dos resultados constatou-se que a produção da biomassa da *Chlorella* sp. apresenta grande potencial de aplicação industrial para a produção de lipídeos e carboidratos com menores concentrações de NPK e ferro, que são os elementos de maior custo na produção de biomassa para aplicações nas áreas de alimentos e energia.

Palavras-chave: fotobiorreator, composição química, Microalgas, Lipídeos, Açúcares

ABSTRACT

Microalgae produce high amounts of the compounds, mainly lipids and sugars. When these are subjected to nutrient variations can greatly increase the concentration of these compounds, which are used for food production, biofuel, cosmetic and pharmaceutical components. This research aimed to carry out the cultivation of microalgae *Chlorella sp.*, Open photobioreactor field with different concentrations of nutrients in six different treatments (TC, T1, T2, T3, T4 and T5), dry biomasses of different treatments and character- them as to the physical, chemical and physical-chemical parameters, but also build their moisture adsorption isotherms at 25 ° C. The strain used in this study was isolated from the Conception dam, located in Tamanduá Farm, Santa Teresinha, PB, and the medium was medium MC. (Medium *Chlorella ellipsodea*). The microalgae features for 16 days of culture were evaluated with respect to cell growth (wet weight, dry weight), lipid content and total sugars. According to the results it was found that the higher biomass *Chlorella sp.* in terms of dry weight was achieved in the TC treatment, T1, T2 and T5 on the 10th day of culture and treatments with the reduction in the concentrations of nitrogen, phosphorus, potassium and iron was increased lipid synthesis; for treatments T3 and T4 the highest dry weight was achieved in the 12th and 16th day of cultivation, respectively. The reduction in the concentrations of the elements nitrogen, phosphorus, potassium and iron did not favor increased production of minerals, proteins, chlorophyll and pheophytin. The models of GAB, Oswin Peleg and can be used to estimate the moisture adsorption isotherms at 25 ° C, the *Chlorella sp.* dry all treatments and were classified as Type II (CT, T1 and T5) and type III (T2, T3 and T4). From the results it was found that the production of biomass *Chlorella sp.* It has great potential for industrial application for the production of lipids and carbohydrates with lower NPK and iron concentrations, which are the largest cost component in the production of biomass for applications in the areas of food and energy.

Keywords: photobioreactor, chemical composition, Microalgae, Lipids, Sugars

1 - INTRODUÇÃO

As microalgas vêm sendo amplamente estudadas para a produção em larga escala de biocombustíveis, proteínas, ésteres, carotenóides, clorofila, enzimas, antibióticos, hidrocarbonetos e vitaminas, e se mostrado como fonte promissora e inovadora para esta área. Sua biomassa é rica em lipídeos, como triacilglicerídeos e vários outros ácidos graxos (WANG et al., 2012; MATHIAS et al., 2013; MORIOKA et al., 2014).

Outro ponto importante das microalgas é sua capacidade de absorver e converter a energia solar em bioprodutos com uma velocidade de maior síntese em relação a outras culturas. Também utiliza o ar atmosférico como fonte de carbono já que o ar atmosférico está repleto de CO₂, molécula absorvida pelas mesmas e convertida em açúcares e lipídeos e muitos metabolitos secundários úteis tanto aos processos industriais, como na alimentação humana e animal (HONDA et al., 2012; NGUYEN et al., 2013; GUCCIONE et al., 2014; CHOI et al., 2014).

Os processos pelos quais são obtidos esses biocombustíveis podem ser considerados uma tecnologia limpa e renovável, por não se tratar de fontes esgotáveis, como o petróleo. Esses organismos possuem a capacidade de converter luz solar em diversos produtos de alta aplicação em nosso cotidiano (CHENG et al., 2009; BHATNAGAR et al., 2010).

Existem inúmeras aplicações para biomassa de microalgas, principalmente pelas características químicas em que muitas substâncias contidas nas células desses organismos apresentam um exemplo: é a astaxantina, um pigmento de alto valor econômico produzido pelas microalgas. Mas o que realmente tem-se tornado atraente ao mercado; é a possibilidade das aplicações desta biomassa como base para produção de vários combustíveis, incluindo o bio-hidrogênio e o biodiesel (LAURENS et al., 2012; BADDORF et al., 2013).

A possibilidade de cultivar essas microalgas em terras impróprias para a produção de alimentos tem um aspecto sócioeconômico que chama a atenção das autoridades mundiais. Tendo em vista que é possível cultivá-las com águas impróprias para o consumo humano e vegetal, e em terras não agricultáveis (MORIOKA et al., 2014).

As projeções do U. S. Energy Information Administration (EIA), publicadas no relatório International Energy Outlook 2010, mostram que o consumo mundial total de energia comercializada aumentará em 49% entre 2007 e 2035. O estudo indica que, dentre

as fontes de energia, as renováveis terão o mais acelerado crescimento do consumo no período, atingindo 2,6% ao ano. Tendência de alta nos preços do petróleo, preocupação com os impactos ambientais oriundos da utilização de combustíveis fósseis, bem como fortes incentivos governamentais para o aumento da utilização de energias renováveis em muitos países, justificam as perspectivas para a expansão das fontes renováveis em todo o mundo (FRANCO et al., 2013).

De modo geral, o cenário futuro que se apresenta para os projetos de biocombustíveis a partir de microalgas, se sobressai muito otimista em relação a outras áreas. Ante este cenário há um grande fluxo de investimentos sendo aplicados para aperfeiçoar sistemas de biorrefinarias especializadas em processar matérias-primas diversas englobando principalmente as biomassas de origem microalgal (HOUJIAN et al., 2015).

Porém, todos os projetos que envolvem as microalgas têm mais de um objetivo. Quando se pensa em viabilidade econômica para este setor, logo se pensa em contabilizar os produtos e subprodutos que a biomassa pode gerar e garantir uma amortização de investimentos com maior eficiência podendo aumentar a oferta de muitos produtos na linha de alimentos, tanto humano como animal já que após o processo de extração tanto de lipídeos como açúcares fermentescíveis, ainda se obtém uma biomassa com teor proteico, matéria-prima para a elaboração de muitos produtos agroindustriais (RADZUN et al., 2015).

Pontos que ainda se fazem necessários analisar, como as estratégias de cultivo de *Chlorella* sp. em grandes fazendas só são viáveis se implantadas em regiões com alta insolação, e que possuam recursos hídricos adequados para o cultivo em larga escala já que projetos que apresentem um alto custo com iluminação e aquecimento poderão não atingir metas que garantam a estabilidade em longo prazo do empreendimento. Da mesma forma serão os processos de obtenção de biodiesel e açúcares de microalgas, conforme as aplicações de investimentos no setor crescerem, as soluções para cada processo serão encontradas (MEDIPALLY et al., 2015; WIRTH et al., 2015).

A biomassa de *Chlorella* possui amplas aplicações, sendo destaque atual sua utilização na produção de biocombustíveis, seguido pelo uso em formulações cosméticas, produção de componentes poliméricos, aditivos em biomateriais, extração de moléculas bioativas, preparações farmacêuticas e utilizadas como ingredientes nutracêuticos nas indústrias de alimentos (SPOLAORE et al., 2006; OTSUKI et al., 2015).

O cultivo de microalgas para a obtenção de biomassa e seus produtos de síntese é uma atividade industrial estabelecida em escala comercial em alguns países, cuja produção está a cargo de grandes empresas. A indústria de biomassa de microalgas produz mais de 5000 t/ano de massa seca gerando renda superior a US\$ 1,25 bilhões de dólares por ano, não incluindo os subprodutos, o que demonstra o potencial de exploração deste seguimento (SPOLAORE et al., 2006).

Apesar de ser uma atividade consolidada em outros países, o cultivo comercial de microalgas no Brasil tem sido realizado por empresas que produzem a biomassa e a empregam na alimentação de organismos, como camarões e moluscos marinhos (GARCIA-MALEA et al., 2009).

1.1 - Objetivos

1.1.1 - Objetivo geral

Realizar o cultivo e a secagem da microalga *Chlorella* sp. em fotobiorreator aberto de campo com diferentes concentrações de constituintes químicos.

1.1.2 - Objetivos específicos

- Preparar o meio de cultivo com diferentes concentrações de constituintes químicos (KNO_3 , KH_2PO_4 , FeSO_4 , NaHCO_3), correspondentes aos tratamentos TC, T1, T2, T3, T4 e T5, e monitorar o crescimento celular da biomassa de *Chlorella* sp. em fotobiorreator aberto, a produção de lipídeos e de açúcares totais durante 16 dias de cultivo;

- Secar a biomassa de *Chlorella* sp. dos tratamentos TC, T1, T2, T3, T4 e T5 após 16 dias de cultivo em secador a 40 °C e avaliar as células e os grânulos de amido da biomassa seca dos diferentes tratamentos, através da análise da microscopia eletrônica de varredura

- Caracterizar a biomassa seca dos diferentes tratamentos quanto aos parâmetros físicos, químicos e físicos-químicos;

- Construir as isotermas de adsorção de umidade da biomassa seca dos diferentes tratamentos a 25 °C e ajustar os modelos de GAB, Peleg e Oswin aos dados experimentais.

2 - REVISÃO DA LITERATURA

2.1 - Microalgas

As algas são seres presentes em sistemas aquáticos que realizam fotossíntese através de sistemas e organelas contendo a clorofila. Podem ser unicelulares e multicelulares; apresentam hábitos planctônicos e bentônicos. É com base nessas características que se derivam os termos de uso consagrado: microalgas (algas com dimensões microscópicas) e macroalgas (algas com dimensões macroscópicas). A grande parte das microalgas tem hábito planctônico e, devido às suas características, é que são utilizadas em cultivos (LOURENÇO, 2006; MOHSENPOUR et al., 2012).

As principais vantagens do cultivo de microalgas são apresentadas como a simplicidade de nutrientes no cultivo, rapidez no crescimento celular, aumentando rapidamente a biomassa em um curto período de tempo, e a possibilidade da elicitação das condições de cultivo, de forma a permitir o direcionamento do controle das condições para a produção de um metabólito pretendido, a exemplo os ácidos graxos, que podem ser utilizados como alimento, fármacos ou transformados em biocombustíveis (BROWN e ZEILER, 1993; COSTA et al., 2006; ZHU et al., 2011; MOHSENPOUR et al., 2012).

A biomassa de microalgas também tem outros componentes valiosos incluindo carboidratos, ácidos graxos de cadeia longa, pigmentos, e proteínas. Os carboidratos de microalgas são constituídos principalmente de xilose e amido sem lignina, podendo ser aplicados nas indústrias de fermentação, tanto para produção alimentícia como para fabricação de combustíveis (YEN et al., 2012).

Outro importante potencial relevante da biomassa de microalgas, é a produção de bioetanol através das biorrefinarias, são empreendimentos que seguem uma linha regional já que para sua instalação é necessário adaptar uma abordagem diversificada para maximizar rendimentos, aproveitando os emparelhamentos naturais de água, clima, recursos naturais, infraestrutura e geografia local (ÇETINKOL et al., 2012).

Existem outras formas de se aplicar as matérias-primas advindas do processo de cultivo integrado de microalgas, como bom exemplo. a utilização de cultivo integrado com águas residuais de indústrias e residências. DALRYMPLE et al. (2013) realizaram importantes pesquisas com águas poluídas com resíduos industriais na Flórida e obtiveram concentrações elevadas de biomassa demonstrando que é viável o desenvolvimento desses

processos cujos ganhos são ilimitados quando se utilizam as microalgas como biorremediadores e ao mesmo tempo usar todos os produtos capturados durante o processo de crescimento desses microrganismos.

2.1.1 - A espécie *Chlorella* sp.

A Figura 2.1 mostra a foto da estrutura da espécie *Chlorella* sp. que é uma microalga pertencente à classe *Chlorophyceae*, ordem *Chlorococcales* e família *Oocystaceae*. Apresenta forma unicelular ou colonial e, pode acumular pigmentos como clorofila α e β , β -caroteno e xantofilas. Sua reprodução pode ser por divisão binária, esporos assexuais e reprodução sexual (HOEK et al., 1995; FALKOWSKI e RAVEN, 1997; ESTEVES, 1998; TOMASELLI, 2004; LEE, 2008; SCHAAP et al., 2012).

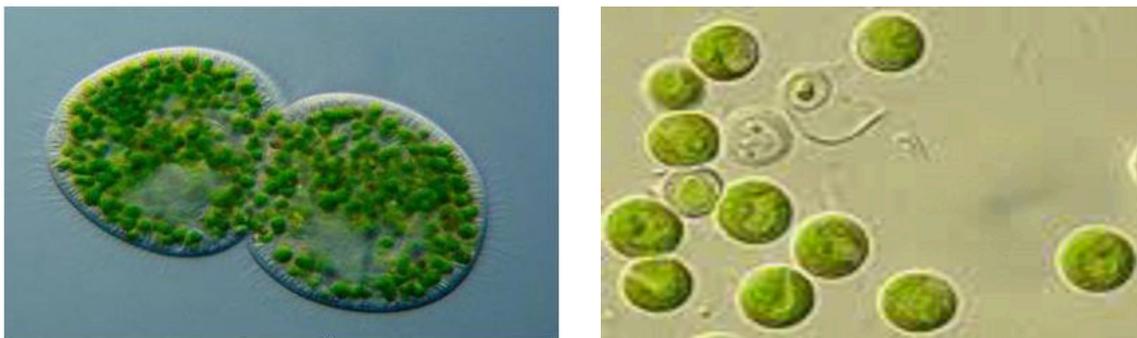


Figura 2.1- Célula de *Chlorella* sp. Fonte: ALGAE (2013)

A microalga *Chlorella* sp. foi o primeiro microrganismo unicelular descoberto que apresentou um núcleo verdadeiro. Em condições de excesso de luminosidade e água doce ou salobra ela é capaz de se reproduzir por divisão celular em uma velocidade de crescimento de uma razão de quatro novas células em 17 a 24 horas (MYERS e BURR, 1940).

Este microrganismo cresce em corpos d'água em diversas localidades do planeta terra, chamadas plantas elementares sem raízes, caule e folhas. Similares às plantas superiores, possuem uma quantidade elevada de clorofila (SOROKIN e MYERS, 1957).

A produção de *Chlorella* em larga escala se iniciou no Japão, em 1961, pela empresa Nihon *Chlorella* tendo, como aplicação, a alimentação suplementar humana

devido as suas propriedades nutricionais, contendo grande concentração de compostos bioativos, logo ganhou destaque na alimentação oriental e asiática (LOURENÇO, 2006).

Outras aplicações têm sido descobertas para a biomassa de *Chlorella*, principalmente na área de fármacos, cosméticos e energia, e cada vez mais se ampliam as aplicações para essa microalga (RICHMOND, 2004).

2.1.2 - Nutrição das microalgas

As algas possuem a capacidade de autotrofia, (condição na qual necessita essencialmente de minerais inorgânicos para seu crescimento e pequenas quantidades de vitaminas), heterotrofia (fagotrofia), mixotrofia (quando tanto o CO₂ como nutrientes orgânicos são necessários para o crescimento). As microalgas apresentam as mesmas necessidades básicas de nutrição que as plantas superiores, luz, água, gás carbônico e nutrientes inorgânicos (WEISSMAN e GOEBEL, 1988).

Os organismos fotoautotróficos carecem essencialmente de nutrientes minerais inorgânicos, sendo que alguns têm a necessidade de quantidades mínimas de compostos orgânicos como as vitaminas (GROBBELAAR, 2004).

Em uma representação média tem-se que 50% da biomassa algal são compostas por carbono, em razão de se tratar do principal elemento para o crescimento celular, em que o gás carbônico representa apenas 0,03% do ar atmosférico, isso porque os fluxos de transferência de CO₂ na atmosfera em condições normais, são relativamente baixos mas, diferente disto, o ar enriquecido com CO₂ é a mistura mais utilizada na indústria deste segmento. Vários pesquisadores verificaram que o cultivo de *Chlorella* sp. em fotobiorreator aberto, utilizando-se CO₂ ou gás de queima, não prejudicou a produtividade (CARVALHO et al., 2006; DOUCHA et al., 2005; MALCATA, 2011).

Depois do carbono, o nitrogênio é o segundo nutriente mais importante na nutrição das algas; sua variação é, na composição da biomassa, 1 a 10%, dependendo do sistema do cultivo, sendo NO₃ o mais comumente utilizado para formulação dos principais meios, podendo ser substituído por fontes de custos mais baixos sendo o cloreto de amônia recomendado como fonte de nitrogênio para o cultivo da microalga *Spirulina platensis*. O impacto dos custos com a fonte de nitrogênio nesta cultura é da ordem de US\$ 1,4/Kg de biomassa final (PRESCOTT, 2002; GROBBELAAR, 2004; SASSONO et al., 2007; GREENWELL et al., 2010).

O fósforo é o elemento essencial para o crescimento dos processos celulares; ele participa principalmente da transferência de energia e biossíntese de ácidos nucleicos entre outras reações na célula, apesar de sua concentração ser em torno de 1% na biomassa das algas, este pode ser o fator limitante do crescimento celular, possível também de influenciar na qualidade da biomassa produzida, em especial nas concentrações de lipídeos e carboidratos. Os índices de N e P no meio de cultivo, não só podem determinar a produtividade mas também a dominância das espécies cultivadas durante um longo tempo (MOSTERT e GROBBELAAR, 1987; GROBBELAAR, 2004).

Com base nas limitações das tecnologias de cultivos fotoautotrófica que tem baixa produção, risco de contaminação, com a necessidade de suplementos de luz entre outras variáveis para esse sistema, o cultivo heterotrófico é o método mais indicado para cultivo em larga escala.

O cultivo heterotrófico difere do cultivo fotoautotrófico em virtude da minimização de custos referentes à iluminação, baixo custo de meio de cultura, podendo ser realizado em locais abertos, motivo pelo qual vem recebendo atenção especial da academia e de empresas de tecnologia do setor, esse processo que é baseado na adaptação do sistema de cultivo tradicional juntamente com um meio rico em fontes de Carbono (APT e BEHRENS, 1999; ERIKSEN, 2008).

Quando comparados os sistemas de cultivo fotoautotrófico e heterotrófico, o sistema heterotrófico permite não apenas que as algas acumulem mais óleo em menos tempo de cultivo mas permite, também, que a expansão da escala do sistema de cultivo seja rápida e simples. Como estratégia, o caldo de cana-de-açúcar foi utilizado no cultivo heterotrófico de microalgas como fonte de carbono para a produção de óleo, atingindo um volume de óleo de 53% (CHENG et al., 2009).

Muitas alternativas para reduzir os custos de cultivo de algas vêm sendo investigadas, por exemplo, a utilização de água do mar, esgoto e de efluentes industriais, além do desenvolvimento de um meio alternativo para a produção industrial de *Spirulina platensis* utilizando-se alguns fertilizantes comerciais, como superfosfato simples $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$, CaSO_4 e MOP (Murato de Potássio), substituindo o bicarbonato de sódio e modificando algumas concentrações do meio Zarrouk, o novo meio modificado tem custo bem reduzido em relação aos meios comerciais, com um preço de US\$ 79/kg comparado com US\$ 16/kg do meio modificado e permitiu uma produtividade semelhante à dos meios comerciais (RAOOF et al., 2006; CRUZ, 2011).

2.2 - Sistemas de cultivo

Os sistemas de cultivo para algas são multivariados, alguns com fotobiorreatores com volume de 10^2 L até 10^{10} L; como exemplo, o cultivo de *Dunaliella salina* (BOROWITZKA, 1999; GREENWELL et al., 2010).

O termo fotobiorreator é empregado para denominar o sistema do processo de foto reação biológica realizada pelos microrganismos, que se utilizam da luz para crescimento (TREDICE, 2004).

Os processos de produção de microalgas em sistemas fechados fotobiorreatores tipo (*Stritu sensu*) tem alcançado alta produtividade e boa qualidade do produto final, porém é um sistema limitado e de alto custo em que em quanto maior o sistema maior sera os custos de operação (CARVALHO et al., 2006; CRISTI, 2007; TREDICI, 2004).

Esses sistemas permitem trabalhar com maior concentração celular e menor perda de CO_2 e nutrientes já que todos os parâmetros são devidamente controlados. Um número muito grande de designer de fotobiorreatores tem sido proposto na literatura com técnicas e patenteamento, variando o tipo de material de construção, mecanismo de agitação, orientação, interação com a fase gasosa enquanto muitos outros sistemas foram estudados propondo a construção e comparação para fotobiorreator de cultivo (TREDICI, 2004; MIRON et al., 1999).

Este tipo de sistemas de cultivo consiste num fotobiorreator do qual se controlam todas as variáveis (temperatura do meio de cultivo e sua composição química, iluminação, nível de pH, injeção de dióxido de carbono e remoção de oxigênio) necessárias ao pleno e eficaz crescimento de microalgas. Os fotobiorreatores de sacos consistem em sacos plásticos transparentes suportados por uma estrutura metálica; os tubulares consistem em tubos, em plástico, acrílico ou vidro, que podem ser posicionados na horizontal, na vertical ou inclinados, tornando o aproveitamento da luz solar ao máximo (SUALI e SARBATRY, 2012).

Reatores tubulares são estruturas fabricadas com tubos transparentes e montada cada paralela, à outra, formando grandes estruturas com diâmetro circular de 10 cm conforme indica a Figura 2.2 uma configuração tubular já implantada em cultivo de larga escala.

Para realizar o movimento das algas dentro da tubulação, é utilizada uma bomba mecânica ou o uso do sistema tipo airlift que oferece menor cisalhamento em razão da

ausência de bombeamento mecânico e possibilita que os gases CO_2 ou O_2 , permaneçam em quantidades equilibradas virtude da aeração no meio.

Scale-up desses reatores são necessários, entretanto, o cuidado com o acúmulo de oxigênio e a insuficiência de CO_2 , para não prejudicar a fotossíntese das algas ao longo da tubulação; assim, o scale-up é realizado pelo aumento do módulo e não pelo prolongamento dos tubos e seus diâmetros (XU et al., 2009).



Figura 2.2- Biorreator tubular Fonte: PULZ e GROSS (2004)

Os fotobiorreatores de placas são sistemas de cultivo que ocupam pouco espaço em suas instalações, formados por placas de materiais transparentes com espessuras finas que possibilitam a passagem de luz solar; essas placas podem ser montadas de várias posições, seja verticalmente ou com inclinações que possibilitem o melhor posicionamento em relação à iluminação solar, ocasionando maior produtividade das algas, de acordo com a orientação das placas, norte/sul e leste/oeste (Figura 2.3); os resultados até aqui obtidos mostram que o posicionamento das placas interfere na produtividade (XU et al., 2009; WEWETZER et al., 2015).

As vantagens que esses biorreatores oferecem são: uma maior superfície de maior contato com a luz solar, o baixo acúmulo de oxigênio dissolvido comparado aos reatores tubulares, a facilidade de escoamento e módulos independentes que facilitam sua manipulação; mas algumas espécies de microalgas se aderem às paredes do reator, impossibilitando melhor absorção da luz solar; além disso, o controle de temperatura desses sistemas deve ser rigoroso para evitar maior evaporação de água durante o cultivo e não comprometer o crescimento da microalga; uma solução para evitar este problema é a utilização de trocadores de calor dentro dos sistemas de placas que podem amenizar a

elevação brusca da temperatura do meio durante o cultivo (XU et al., 2009; WEWETZER et al., 2015).

Os custos de implantação dos fotobiorreatores de placas são elevados, porém compensados pela alta produtividade e facilidade de instalação, o que justifica sua aplicação principalmente em áreas urbanas nas quais há menos espaços para implantação de outros sistemas tornando assim uma alternativa viável para a captura de CO₂ nos grandes centros urbanos (LOURENÇO et al., 2006; WEWETZER et al., 2015).



Figura 2.3- Fotobiorreator de placas. Fonte: NOVUS (2013)

A definição de sistemas abertos é dada como (lagoas, lagos, represas) e reservatórios artificiais construídos com materiais e formas diversificadas. A forma de construção mais comum para reatores abertos é representada por tanques em formato de pista, agitados por roda tipo moinho de água (roda d'água), com profundidade entre 15 a 20 cm. A principal desvantagem desse tipo de cultivo, é a perda de água por evaporação, difusão de CO₂ para atmosfera e risco de contaminação e poluição (PULZ, 2001).

Os sistemas para cultivos comerciais de algas geralmente são pouco sofisticados (BOROWITZKA, 1999; GREENWELL et al., 2010).

Os tanques construídos em formatos de pistas representam a maioria escolhidos pelas empresas, por serem mais baratos e fáceis de operar e poder se expandir rapidamente para vários hectares (TREDICI, 2004; BENENMANN, 2008; GREENWELL et al., 2010).

Na maioria dos produtos de algas os sistemas abertos representam a única alternativa capaz de atender os requisitos econômicos e operacionais deste processo, os

quais são utilizados por empresas dos Estados Unidos, Israel e China (WEISSMAN; GOEBEL, 1988; COSTA e MORAIS, 2011; ZHANG et al., 2012).

Os principais problemas reportados aos sistemas abertos são; baixa produtividade, difícil controle dos fatores ambientais e a exposição dos elementos a intempéries do ambiente, esses sistemas têm baixa produtividade, pois não conseguem responder rapidamente as variações de luminosidade do ambiente aberto (BOROWITZKA, 1999; LEE, 2001; TREDICI, 2004; GREENWELL et al., 2010).

Os fotobiorreatores abertos podem ser lagoas naturais ou artificiais, como tanques, piscinas circulares, piscinas raceway; essas últimas são bastante utilizadas nos Estados Unidos e em Israel, e são piscinas grandes, agitadas por sistemas; de pás conhecidas como chicanas, que possibilitam a aeração desses grandes sistemas; essas pás permitem que o dióxido de carbono da atmosfera seja captado pelas microalgas e também a captação de luz durante a circulação do meio no sistema, a Figura 2.4 apresenta a foto do sistema de cultivo aberto.

A profundidade da lâmina de meio nesses sistemas não pode ultrapassar de 35 cm, para melhorar a eficiência de captação de CO₂ pelas algas em 78%, seria necessária a instalação de um sistema de aeração desses gases no meio de cultivo (SU et al., 2008; XU et al., 2009).

De modo geral, este sistema de cultivo é o mais utilizado, haja vista que os custos de construção e operação são mais baratos e também a facilidade de operação se torna um atrativo para a escolha desse sistema (LOURENÇO et al., 2006).



Figura 2.4 - Fotobiorreator aberto. Fonte: GAZZONI (2013)

2.3- Métodos de separação da biomassa de microalgas

O maior custo de produção de biomassa algal, reside na separação e purificação, visto que os custos com este processo podem chegar à ordem de 20 a 30%, podendo chegar a 60% do custo final do processo. Este impacto está diretamente relacionado com a baixa concentração celular no meio de cultivo, algo em torno de (0,5–5 kg/m³) obtidas na coleta (GRIMA et al., 2003).

Os principais métodos de separação da biomassa algal são: centrifugação, filtração e floculação química.

A centrifugação: é um dos métodos mais eficientes para a coleta da biomassa de algas; sua eficiência pode chegar a 95% em condições otimizadas, apesar dos custos com a energia serem muito altos, é compensatório pela forma de operação contínua e a recuperação de quase 100% de todas as partículas do meio de cultura (BENEMANN e OSWALD, 1996; GRIMA et al., 2003; CRISTI, 2008; GREENWELL et al., 2010).

A filtração é um método eficiente apenas para microalgas filamentosas ou formadora de colônias e cianobactérias de tamanho grande, é um método relativamente simples de baixo custo e permite o rendimento de concentração de 27% de sólidos (GRIMA et al., 2003; SCHENK, 2008).

A floculação química é um meio eficiente e econômico para a coleta de microalgas, pois aumenta o tamanho das partículas, facilitando sua remoção. A coleta de microalgas por floculação é mais eficiente que outras técnicas convencionais, a qual permite que grandes quantidades de culturas sejam tratadas de uma só vez (BILANOVIC et al., 1988; HO et al., 2011; SALIM et al., 2011).

2.4 - Secagem

A secagem é a operação unitária destinada à remoção de um líquido agregado a um sólido para uma fase gasosa insaturada através de vaporização térmica. Esta vaporização ocorre em uma temperatura inferior àquela de ebulição do líquido na pressão do sistema (NONHEBEL e MOSS, 1971).

Normalmente se imagina um sólido como algo com forma definida, em alguns casos, o que se tem na alimentação do secador é uma pasta ou uma suspensão de sólidos ou

ainda uma solução, porém em qualquer situação o produto final é sólido, com alguma umidade.

A fase gasosa chamada, de meio de seca, deve ser insaturada para que possa receber a umidade como vapor. O mecanismo de vaporização térmica para a remoção do teor de água distingue a secagem dos processos de filtração e centrifugação. O teor de água mais comum é a água e o sistema comumente encontrado é o de um sólido úmido exposto ao ar em certa temperatura e teor de água (CRUZ, 2011).

A etapa mais importante para o processamento de biomassa algal, é a secagem seguida de extração dos produtos acabados; após as fases de coleta a biomassa passa por secagem que deve obedecer parâmetros de viabilidade econômica na aplicação das regras da linha de produção (RYCKEBOSCH et al., 2011; SHOW et al., 2012).

2.5 - Pó da biomassa da *Chlorella* sp.

Vários métodos têm sido aplicados para secagem de microalgas; uma delas, a atomização, técnica também conhecida por spray drying tem como princípio básico, a maximização da área de troca de calor e a massa durante a secagem. O secador atomizador é o equipamento mais relevante para a desidratação de produtos líquidos com ar quente na indústria alimentícia. Esta técnica pode ser aplicada a qualquer material bombeável, ou seja, com comportamento líquido como, por exemplo, pastas, lamas, suspensões e soluções (BARUFFALDI e OLIVEIRA, 1998; PEREDA, 2005).

Outra técnica também utilizada é a liofilização, que é um processo de estabilização no qual uma substância é previamente congelada e a quantidade de solvente (geralmente água) é reduzida, primeiro por sublimação e posteriormente por dessorção, para valores tais que impeçam atividade biológica e reações químicas e passam pelos processos de congelamento inicial, secagem primária e secagem secundária (MARQUES, 2008).

Outros equipamentos empregados na secagem, são os secadores de bandeja, que são utilizados para realizar secagem em pequenas escalas de produção com volumes de 1 a 20 t/dia; podem, também ser usados no desenvolvimento de processos de secagem em escala-piloto; seu custo é relativamente baixo, porém possui limitações, principalmente ocorrência de variações na uniformidade da secagem; com isto, o produto obtido por este método pode não conter as características desejadas, sobretudo se houver falhas na distribuição do produto na hora da secagem (FELLOWS, 2006).

Além de conservar a biomassa, a secagem auxilia na ruptura celular das microalgas para a liberação dos metabólitos de interesse. Em alguns casos, a extração com solvente com a biomassa seca tem demonstrado maior recuperação de moléculas intracelulares do que a biomassa úmida. Produtos intracelulares como óleos podem ser de difícil extração a partir de biomassas úmidas de células não rompidas, mas são extraídas facilmente se a biomassa for secada antes da extração. Vários métodos para romper a parede celular podem ser utilizados (dependendo da parede das microalgas e da natureza dos produtos a serem obtidos), os quais utilizam ou não a ação mecânica (prensas, por exemplo) (congelamento, solvente orgânico, choque osmótico e reações ácidas) (ADERLÂNIO et al., 2011).

2.6 - Açúcares de microalgas

Os carboidratos, também denominados glicídios ou açúcares, são as principais moléculas constituintes dos seres vivos; assim, como proteínas, lipídios e ácidos nucleicos. A junção das diferentes funções bioquímicas destas moléculas permite a funcionalidade da célula e de seus processos metabólicos, fisiológicos e genéticos dos organismos vivos. A Figura 2.5 mostra a estrutura química de alguns carboidratos estes recebem a classificação de monossacarídeos, dissacarídeos e polissacarídeos (NELSON e COX, 2011).

Através de processos bioquímicos da fermentação da biomassa sacaríneas de algas, e após hidrólise de amiláceas e celulósicas, obtém-se o bioetanol de terceira geração; e por processo termoquímico (gaseificação da biomassa) produzem-se hidrocarbonetos que podem ser utilizados como matéria-prima de muitos combustíveis.

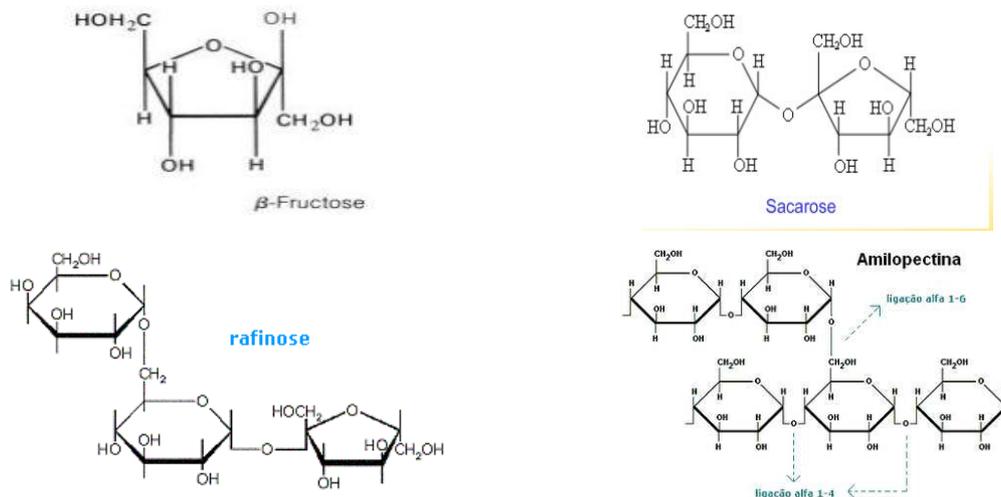


Figura 2.5 - Estrutura química de açúcares. Fonte: SEGALI (2013)

As biomassas frequentemente empregadas na obtenção de etanol, como o milho e a cana-de-açúcar, têm problemas em comum: são muito utilizadas na alimentação e é necessária à disponibilização de terras agricultáveis para serem produzidas. Em virtude disto, tem havido, atualmente, interesse na produção de etanol, a partir dos carboidratos (celulose, xilose, galactose, arabinose, glicose e manose) presentes em microalgas (HARUN et al., 2009).

O interesse em carboidratos da biomassa de microalgas vem crescendo devido a sua capacidade de fornecer quantidades expressivas desses componentes para a fermentação e produção de bioetanol que podem ser hidrolisados por diversas técnicas seja por enzimas, aquecimento, tratamento químico ou pela extração por etapas usando microrganismos capazes de transformar estes constituintes em bioetanol. Uma vez obtidos os monossacarídeos, é realizada a fermentação com leveduras específicas para a produção do biocombustível (VARFOLOMEEV e WASSERMAN, 2011).

Para aumentar as concentrações de carboidrato na biomassa da microalga é necessário que seja feito o ajuste do meio de cultura para que a microalga possa aumentar a produção desses compostos em relação aos demais constituintes. DRAGONE et al.(2011) realizaram testes para verificar a influência da concentração de nitrogênio e ferro sobre o acúmulo de amido em *C. vulgaris* P12 verificando que o maior teor de amido (acima de 41%, em relação à massa seca da biomassa) foi obtido quando as concentrações de nitrogênio e ferro adicionadas à cultura, foram menores; entretanto, a quantidade de biomassa produzida sofreu decréscimo em comparação com as maiores dosagens desses

nutrientes; logo, eles sugerem que o cultivo seja feito em duas etapas: a primeira para obtenção de biomassa (maiores concentrações de nitrogênio e ferro) e a segunda para o aumento do teor de amido (meio livre de nitrogênio e ferro por poucos dias de cultivo).

2.7 - Lipídeos de microalgas

Os lipídeos são biomoléculas compostas de carbono (C), hidrogênio (H) e Oxigênio (O), fisicamente caracterizadas por serem insolúveis em água e solúveis em solventes orgânicos. A família desses compostos é muito vasta e classificados segundo sua cadeia carbônica e a origem de sua síntese (Figura 2.6).

A composição dos lipídeos da biomassa das microalgas é formada por diferentes ácidos graxos saturados e insaturados, entre esses o ω -3 e o ω -6. Geralmente, os ácidos graxos saturados e mono-insaturados que compõem os lipídeos totais desses organismos são da classe C16:0 e C16:1 em *Bacillariophyceae*; C16:0 e C18:1 em *Chlorophyceae*, *Prasinophyceae*, *Euglenophyceae* e *Eustigmatophyceae*; C16:0, C16:1 e C18:1 em *Cryptophyceae*, *Prymnesiophyceae*, e *Cianobactéria*; C16:0 em *Dinophyceae* e *Rhodophyceae*; e C14:0, C16:0 e C16:1 em *Xanthophyceae*. Já os poli-insaturados são C20:5. ω 3 e C22:6 ω 3 em *Bacillariophyceae*; C18:2 e C18:3 ω 3 em algas verdes e *Euglenophyceae*; C20:5, C22:5 e C22:6 em *Crysophyceae*; C18:3 ω 3, C18:4 e C20:5 em *Cryptophyceae*; C20:3 e C20:4 ω 3 em *Eustigmatophyceae*; C18:3 ω 3 e C20:5 em *Prasinophyceae*; C18:5 ω 3 e C22:6 ω 3 em *Dinophyceae*; C18:2, C18:3 ω 3 e C22:6 ω 3 em *Prymnesiophyceae*; C18:2 e C20:5 em *Rhodophyceae*; C16:3 e C20:5 em *Xanthophyceae*; e C16:2, C18:2 e C18:3 ω 3 em *Cianobactéria* (ZHUKOVA e AIZDAICHER, 1995; ŘEZANKA et al.,2003; HU et al.,2008; HUANG et al.,2010).

As microalgas são frequentemente compostas por triglicerídeos e ácidos graxos poli-insaturados, que não são tradicionalmente utilizados para a obtenção de biodiesel, sendo propensos a reações de oxidação indesejáveis. Além disso, o óleo de microalga pode apresentar elevada acidez/ por isso, podem ser feitas modificações para corrigir a produção de ácidos graxos impróprios para a produção desses combustíveis (MIAO e WU, 2006).

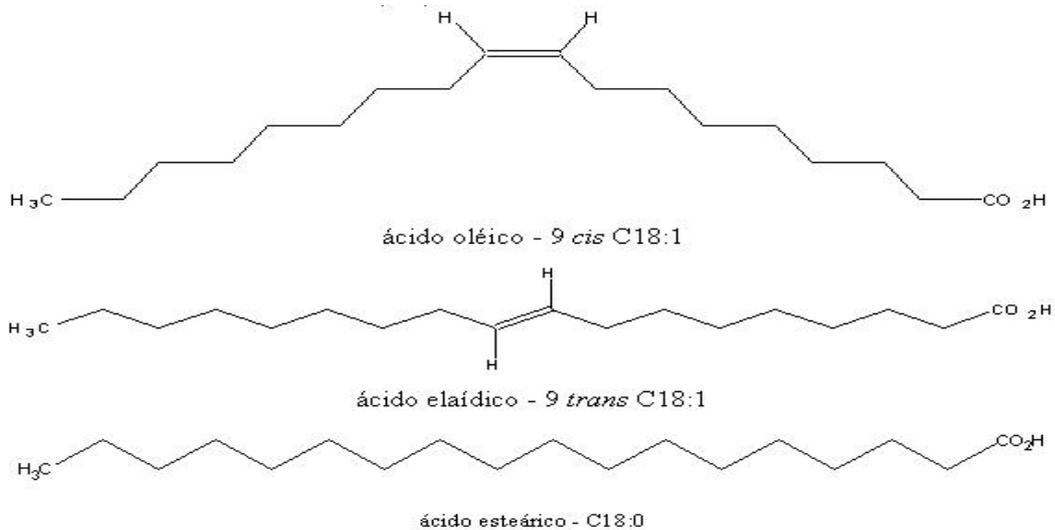


Figura 2.6 - Estrutura de química de ácidos graxos Fonte: NUTRITOTAL (2013)

A quantidade de lipídeos na biomassa de microalgas pode variar entre 1 e 70%; dependendo das condições de cultivo, algumas espécies podem produzir até 90% do peso seco. O teor de óleo em microalgas pode atingir 75% em peso em relação à biomassa seca, mas com baixa produtividade, como em *Botryococcus braunii*. Por exemplo, as microalgas mais comuns são: *Chlorella*, *Cryptocodinium*, *Cylindrotheca*, *Dunaliella*, *Isochrysis*, *Nannochloris*, *Nannochloropsis*, *Neochloris*, *nitzschia*, *Phaeodactylum*, *Porphyridium*, *Schizochytrium*, *Tetraselmis*. Com níveis de produtividade de óleo entre 20 e 50%, mas é possível aumentar este resultado. A fonte de carbono utilizado pelas microalgas pode ser tanto carbono inorgânico (CO₂) quanto orgânico (glucose, acetato, etc.) para a formação de ácidos graxos e, conseqüentemente, lipídios, sendo a quantidade de lipídeos variável de espécie para espécie. As vias de síntese de ácidos graxos e triglicerídeos em microalgas podem ser descritas nas seguintes etapas: síntese da acetil coenzima A (acetil-coA) no citoplasma; o alongamento e a insaturação da cadeia de carbono de ácidos graxos, dependentes principalmente dos sistemas enzimáticos acetil-coA carboxilase (ACCE) e ácido graxo sintase (FAS); e a biossíntese de triglicerídeos, tendo L- α -fosfoglicerol e acetil-coA como os dois maiores precursores (*primers*) (CHISTI, 2007; HU et al., 2008; HUANG et al., 2010; MATA et al., 2010).

Uma das etapas mais onerosas para a produção de óleos de microalgas é a extração dos componentes lipídicos. Alguns métodos são mais aplicados que outros mas é

necessário conhecer com profundidade as características de cada tipo de lipídeos de cada espécie (NIELS et al., 2012).

A extração da biomassa secada com solvente tem demonstrado maior recuperação de metabólitos intracelulares comparado com a biomassa úmida. Produtos intracelulares como óleos podem ser de difícil extração a partir de biomassas úmidas de células não rompidas, mas são extraídas facilmente se a biomassa for secada anteriormente. Vários métodos para romper a parede celular podem ser utilizados (dependendo da parede das microalgas e da natureza dos produtos a serem obtidos), os quais utilizam ou não a ação mecânica, por exemplo, (prensas), (congelamento, solvente orgânico, choque osmótico e reações ácidas, básicas e enzimáticas são exemplos de ação não mecânica). O ultra-som pode ser utilizado para romper células de microalgas suspensas em pequenas quantidades de biomassa, mas este não é aplicável em grandes escalas. O tratamento com álcalis é outro método efetivo de ruptura da parede celular, mas geralmente não é indicado para a extração de produtos sensíveis como proteínas. No entanto, a ruptura alcalina pode ser utilizada para isolar ácidos graxos livres; entretanto, prensas mecânicas e solventes apolares são os métodos mais utilizados para a extração de lipídeos das microalgas, tal como é realizado com oleaginosas tradicionais (GRIMA et al., 2003; MATA et al., 2010; ADERLANIO et al., 2011).

2.8 - Potencial das algas

O biodiesel derivado das algas tem recebido mais atenção dada à sua elevada potencialidade para substituir a dependência dos combustíveis fósseis, principalmente no domínio dos transportes; contudo, muitas formas de energia alternativa podem ser obtidas a partir desta matéria-prima, como o etanol, hidrogênio, metano, biomassa para combustão e gaseificação. Em outras aplicações como hidrocarbonetos em geral (MATA et al., 2010).

Outro importante produto do bioprocessamento da biomassa algal é o bioetanol obtido a partir da conversão do amido e da celulose, polissacarídeos da fina parede das células das algas, são fonte ideal para o bioetanol de segunda geração.

O processo de produção de etanol a partir das algas baseia na fermentação dos açúcares, em várias etapas: produção de biomassa algal, desconstrução da parede celular para liberação dos açúcares, fermentação dos açúcares obtidos através de leveduras

(*Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces uvarum*), e posterior retirada do etanol presente no líquido fermentado (GREENWEL et al., 2010).

Outro ponto a ser considerado é a produção de etanol após a extração dos produtos de valor comercial, como as proteínas e os lipídeos, o que permite otimizar o potencial energético da biomassa das algas. Adicionalmente, o dióxido de carbono produzido durante a fermentação pode ser utilizado para produzir nova biomassa, podendo permitir um funcionamento fechado de produção, elevando o aproveitamento do sistema produtivo (GAROFALO, 2011).

2.9 - Isotermas de adsorção de umidade

A biomassa de algas é constituída por inúmeras substâncias que podem ajudar ou dificultar sua secagem. Muitas pesquisas já foram realizadas com o intuito de melhorar as condições de secagem desses materiais (LIMOUSIN et al., 2007). No entanto, algumas considerações termodinâmicas referentes às equações teóricas devem ser levadas em conta. Uma das principais aplicações das equações de isotermas se refere à energia das ligações da água e sua adsorção nas superfícies dos materiais. É necessário também considerar os valores de monocamada molecular de água que estão ligadas diretamente com as reações químicas que ocorrem na deterioração dos materiais biológicos em virtude das áreas de respostas da matriz sólida (SANCHEZ et al., 2008). Muitas pesquisas têm sido realizadas com a finalidade de se prever o comportamento das isotermas em que muitas propostas de modelos de ajustes de isotermas de sorção têm procurado formas diversas de ajustar esses modelos para a compreensão do comportamento de muitos materiais, sobretudo os de origem biológica, o que ajuda a explicar as características de cada material e a reatividade em relação ao tempo de uso (REZAE et al., 2011). Grande parte desses modelos é empírica, e, devido às características de cada material, torna-se mais difícil encontrar modelos generalistas que possam ser utilizados em diversas análises (PARK et al., 2014).

As isotermas de adsorção possibilitam determinar os parâmetros relacionados ao equilíbrio do processo, tais como a constante de adsorção (K_{ads}) e a quantidade máxima de adsorvato que o material pode reter na sua superfície (Q_{max}) (ADAMSON e GAST, 1997). A isoterma ideal é aquela em que a quantidade de adsorvato sobre a superfície do adsorvente é proporcional à concentração da espécie química na solução, até a saturação da superfície do material, representada por um platô nos valores de Q_{max} .

Existem diferentes modelos de adsorção para as diferentes formas de interação; a adequação de um modelo teórico adsorptivo aos dados experimentais obtidos promove melhor conhecimento do mecanismo envolvido no processo, como um todo.

As isotermas de adsorção mais conhecidas são as de Langmuir e Freundlich, o modelo de adsorção proposto por Langmuir, apresentado como isoterma de Langmuir considera o fenômeno de adsorção em superfície homogênea, como um número fixo de posições de adsorção disponíveis na superfície e com a formação de uma camada superficial monomolecular. O modelo também considera que as moléculas adsorvidas não sofrem interação no meio nem entre si (ORTIZ, 2000).

O modelo de adsorção proposto por Freundlich foi um dos primeiros a equacionar a relação entre a quantidade de material adsorvido e a concentração do material na solução (ORTIZ, 2000). Este considera que o processo de adsorção apresenta distribuição exponencial de calores de adsorção, a partir da monocamada adsorvida.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado na Universidade Federal de Campina Grande no Laboratório de Armazenamento e Processamento de Produtos Agrícolas da Unidade Acadêmica de Engenharia Agrícola, em Campina Grande e na Fazenda Tamanduá, localizada no município de Santa Teresinha, PB.

3.1 - Matéria-prima

A microalga utilizada como matéria-prima foi a estirpe da espécie *Chlorella* sp. O inóculo inicial foi coletado na barragem da Conceição, Fazenda Tamanduá, localizada no município de Santa Teresinha, PB, colhida em 2010 e mantida na unidade de processamento de microalgas da Fazenda Tamanduá.

3.2 - Cultivo e processamento da microalga

Na Figura 3.1 tem-se o fluxograma das etapas do cultivo até o processamento da microalga. Inicialmente foram preparados os meios de cultivo (TC, T1, T2, T3, T4 e T5) com diferentes concentrações de nutrientes, subsequente ao monitoramento do crescimento celular, produção de lipídeos e de açúcares totais; depois foi realizada a colheita das biomassas frescas, seguida da secagem e obtenção das biomassas em pó que foram analisadas em relação ao perfil dos ácidos graxos, microscopia eletrônica de varredura, teor de amido, análises físico-químicas (umidade, cinzas, lipídios, proteínas, açúcares totais, pH, clorofila, feofitina e atividade de água), perfil de minerais e de aminoácidos. Ainda foram construídas as isotermas de adsorção de umidade das biomassas em pó, a 25 °C.

A microalga *Chlorella* sp. foi cultivada em fotobiorreator aberto e processada na Fazenda Tamanduá, Santa Terezinha, PB.

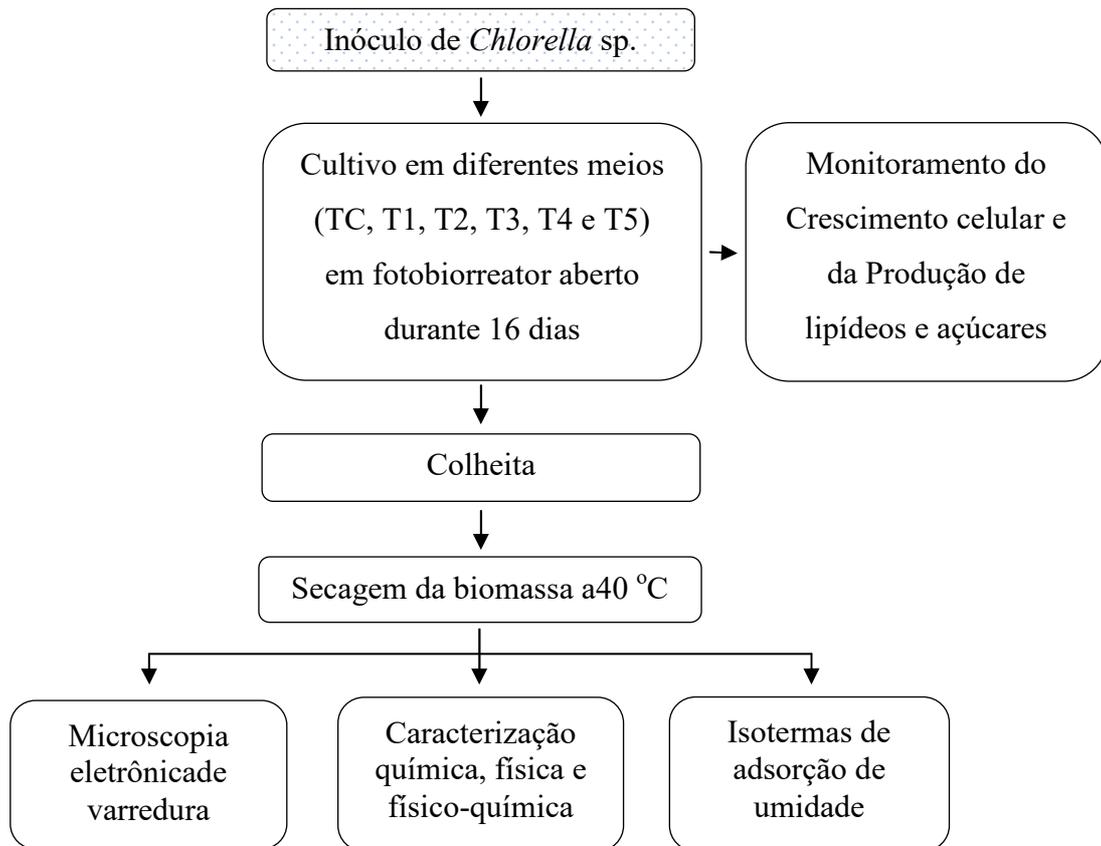


Figura 3.1 - Fluxograma das etapas do cultivo e processamento da microalga *Chlorella* sp.

3.3 – Inóculo de *Chlorella* sp. e meios de cultivo

A cultura da estirpe foi mantida em três fotobiorreatores de vidro com 1,6 litros de capacidade conforme indicado na Figura 3.2. O meio artificial utilizado foi segundo Watanabe (1960), denominado meio “*Medium for Chlorella ellipsoidea*” (MC) e replicada mensalmente. Cerca de um terço da cultura foi usado para replicação e os volumes restantes foram utilizados para criar culturas do inóculo. Assim foram transferidas para uma sala de cultura na unidade de processamento de microalgas da Fazenda Tamanduá, em que foram aclimatadas às condições da cultura. A expansão do cultivo foi efetuada duplicando-se o volume das culturas a cada 15 dias, através da repartição por novos fotobiorreatores e adição de meio de cultura. A cultura foi mantida na temperatura de $30 \pm 1^\circ\text{C}$ e luminosidade constante de 3500 a 4000 lux, medida com um luxímetro digital, marca ICEL, modelo LD - 510.



Figura 3.2 - Cultivo de *Chlorella* sp. em fotobiorreator de bancada

3.4 - Cultivo da *Chlorella* sp. em fotobiorreator aberto

O cultivo da *Chlorella* sp. foi realizado em fotobiorreatores abertos (Figura 3.3) com volume de 10 m³, localizados na unidade de processamento de microalgas da Fazenda Tamanduá. A aeração foi feita com aerador axial, marca Aeromack, modelo CRE-01, com fluxo contínuo de 1,4 m³/min, pressão de 1.200 m.c.a, potência de 0,5 CV.



(a)



(b)

Figura 3.3 - Cultivo de *Chlorella* sp. em tanque aberto: (a) Início do cultivo; (b) Fase final

O meio de cultivo foi preparado segundo Watanabe (1960), denominado “*Medium for Chlorella ellipsoidea*”(MC) com variações das concentrações dos nutrientes como descrito na Tabela 3.1, correspondendo aos tratamentos TC (controle), T1, T2, T3, T4 e T5. Como fonte de carbono suplementar foi utilizado o bicarbonato de sódio (NaHCO₃), em diferentes concentrações (Tabela 3.1), conforme citado por Sunja et al. (2011) e

Henrard et al. (2014). A modulação da síntese de lipídeos e carboidratos foi realizada através das variações de concentrações de nitrogênio (KNO_3), fósforo (KH_2PO_4), potássio (KH_2PO_4), ferro (FeSO_4) e fonte de carbono (NaHCO_3) (Tabela 3.1) com base em estudos realizados por Grima et al. (1992); Cornet et al. (1992); Rodrigues et al. (2003); Binaghi et al. (2003); Li et al. (2010) e Baumgartner et al. (2013).

Tabela 3.1 - Concentração dos constituintes químicos para a modulação da cultura *Chlorella* sp. para os diferentes tratamentos

Tratamentos	$\text{KNO}_3(\text{g/L})$	$\text{KH}_2\text{PO}_4(\text{g/L})$	$\text{FeSO}_4(\text{mg/L})$	$\text{NaHCO}_3(\%)$
TC	1,25	1,25	10	0,04
T1	0,625	0,625	5	0,04
T2	0,313	0,313	2,5	0,06
T3	0,157	0,157	1,25	0,08
T4	0,157	0,157	1,25	0,10
T5	0,157	0,157	1,25	0,12

O cultivo para cada tratamento, realizado em triplicata, foi iniciado colocando-se no biorreator aberto 339 mg/L de inóculo (Figura 3.4) da microalga *Chlorella* sp., mantida sob aeração contínua, sendo monitoradas: a temperatura, o pH, a intensidade luminosa (Apêndice A) avaliando-se, durante 16 dias de cultivo, o crescimento celular, a produção de lipídeos e de açúcares totais.

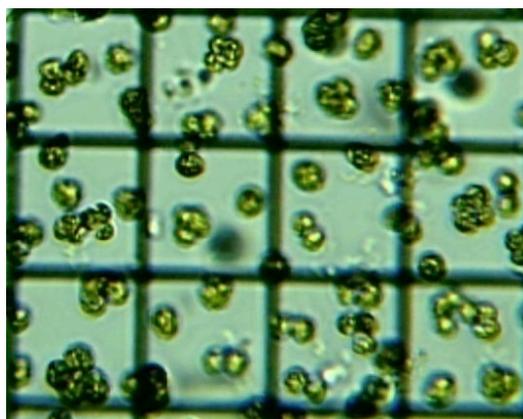


Figura 3.4 – Inóculo da microalga *Chlorella* sp. aumento 400x

3.4.1 - Crescimento celular

A cada 2 dias, durante os 16 dias de cultivo no fotobiorreator aberto foi avaliado o crescimento celular da *Chlorella* sp. Para a determinação do crescimento celular, expresso em termos de peso úmido e peso seco, da *Chlorella* sp. foram coletadas alíquotas de 1L do meio de cultivo com a biomassa, em triplicata, de cada tratamento, em intervalos de tempo de 2 dias por 16 dias as alíquotas foram centrifugadas a 5000 rpm durante 15 minutos determinando-se o peso úmido (g/L) de cada amostra; logo após a biomassa foi secada em estufa com circulação de ar na temperatura de 40 °C, até massa constante; após secagem a biomassa seca foi pesada determinando-se o peso seco (g/L).

3.4.2 - Produção de lipídeos e açúcares totais

Para a determinação dos lipídeos e dos açúcares totais da *Chlorella* sp. durante os 16 dias de cultivo foram coletadas, no fotobiorreator aberto, alíquotas de 1L do meio de cultivo com a biomassa, em triplicata, de cada tratamento (TC, T1, T2, T3, T4 e T5) em intervalos de tempo de 2 dias por 16 dias. As alíquotas foram centrifugadas a 5000 rpm por 15 minutos e a biomassa foi secada em estufa com circulação de ar na temperatura de 40 °C, até massa constante.

A determinação do teor de lipídeos na biomassa seca foi realizada submetendo-a ao processo de extração em banho ultrassônico na presença de solvente (hexano) de acordo com a metodologia de Viêgas (2010). As concentrações dos açúcares totais foram determinadas pelo método de DNS (ácido dinitrossalicílico) segundo Miller (1959).

3.5 - Colheita e secagem da biomassa

Após 16 dias de cultivo foi realizada a colheita da microalga dos diferentes tratamentos, através de floculação seguida de decantação; para tal foi utilizado sulfato de alumínio ($Al_2(SO_4)_3 \cdot 18 H_2O$) com a concentração de 0,5 g/L por 30 minutos (LIRA, 2011). Decorrido este tempo, o sobrenadante do tanque foi removido com uma bomba centrífuga na qual se retirou a água acima do decantado transferindo-a para outro tanque vazio, em que a água foi recepcionada. Finalizado este processo, as células decantadas foram

removidas para um filtro de nylon de 325 mesh. Deixou-se a biomassa de *Chlorella* sp. filtrando por 3 horas, que depois foi recolhida (Figura 3.5) para secagem.



Figura 3.5-Biomassa fresca de *Chlorella* sp. após a filtração

Após a filtração a biomassa de *Chlorella* sp. dos diferentes tratamentos foi pesada e colocadas em uma extrusora de rosca sem fim (Figura 3.6) e distribuídas em bandejas de aço inoxidável para a secagem com as dimensões de 0,7 m de largura x 1m de comprimento e furos quadriculados de 0,5 cm de espaçamento. A distribuição da biomassa foi realizada obedecendo-se ao critério de uniformidade com uma lâmina do produto de 0,3 cm de espessura e 5 cm de largura e espaçamento de 1 cm entre cada lâmina (Figuras 3.6 e 3.7). Logo após as bandejas foram colocadas em uma estufa com circulação de ar da marca Marconi, modelo MA035/1152, com velocidade do ar de 2 m/s e temperatura de 40 °C, até peso constante (KNOWLES e CASTENHOLZ, 2008).



Figura 3.6 – Extrusora distribuindo a biomassa fresca de *Chlorella* nas bandejas



Figura 3.7 - Secagem da biomassa de *Chlorella* sp. em estufa

Após o término da secagem a biomassa seca foi retirada das bandejas (Figura 3.8) e triturada em moinho de martelos com velocidade de rotação de 8000 rpm e com peneira de 0,5 mm, obtendo-se a biomassa em pó (Figura 3.9), a qual foi embalada em sacos laminados de 1 kg e selados para análise subsequente.



Figura 3.8 - Biomassa de *Chlorella* sp. secada em flocos



Figura 3.9 - Biomassa de *Chlorella* sp. em pó e em flocos

3.6 - Microscopia eletrônica de varredura

Para avaliar as partículas da biomassa de *Chlorella sp.* seca dos diferentes tratamentos através do microscópio eletrônico de varredura (MEV), marca SEDX, fez-se a análise em duas etapas: com a parede celular rompida e com o amido extraído.

3.6.1 – Rompimento da parede celular

Para a análise no MEV das partículas com a parede celular rompida, fez-se o rompimento da parede celular da *Chlorella sp.* secada pesando-se 1g da biomassa seca de cada tratamento em um almofariz; adicionou-se nitrogênio líquido e com auxílio de um pistilo, a biomassa foi triturada; após a trituração as amostras foram fixadas com uma fita adesiva de dupla face condutora convencional em porta amostras (*stubs*) e metalizadas com uma liga de ouro/paládio em um metalizador; a seguir, foram colocadas no microscópio eletrônico de varredura (MEV) e observadas as características estruturais da superfície das células após rompimento da parede celular (XU et al., 2006)

3.6.2 – Extração, quantificação e morfologia do amido

A extração do amido da biomassa de *Chlorella sp.* seca dos diferentes tratamentos foi realizada segundo a metodologia adaptada de Leonel et al. (2003), usando 100g da biomassa seca, a qual foi homogeneizada em liquidificador doméstico com água destilada na proporção de 1:2 (biomassa: água) por 5 minutos; a seguir a mistura biomassa/água foi peneirada em malha de 200 mesh; depois, o material passado na peneira foi lavado 4 vezes com água destilada a 5 °C, sendo que entre cada lavagem foi realizada uma etapa de decantação durante 40 a 50 minutos sob refrigeração a 5 °C. Após a extração o amido extraído foi secado em estufa a 40 °C, até massa constante, calculando-se o teor de amido em g/100 g.

Para a análise no microscópio eletrônico de varredura (MEV) após a secagem, o material foi resfriado e triturado em moinho de martelos da marca Vieira, com peneira 0,5 mm e velocidade de rotação de 8000 rpm. Após a trituração do amido extraído de cada tratamento, os mesmos foram fixados em porta-amostras (*stubs*) e metalizados com uma liga de ouro/paládio em um metalizador; a seguir, foram colocadas, no microscópio

eletrônico de varredura (MEV), marca SEDX operando em 200 KV, e ver as características estruturais da superfície granular do amido com aumento da imagem de 100 a 2000x.

3.7 - Caracterização química, física e físico-química da biomassa seca

As biomassas de *Chlorella sp.* dos tratamentos TC, T1, T2, T3, T4 e T5 colhidas com 16 dias de cultivo e secadas a 40 °C, foram caracterizadas química, física e físico-quimicamente, em triplicata.

3.7.1 - Teor de umidade

Os teores de umidade das biomassas secadas dos diferentes tratamentos, foram determinados por secagem em estufa a 105 °C, até massa constante (BRASIL, 2005).

3.7.2 - Cinzas

A análise de cinzas das biomassas secas dos diferentes tratamentos, foi realizada por incineração em mufla a 550 °C até eliminação completa do carvão (cinzas brancas) (BRASIL, 2005).

3.7.3 – Lipídeos

A quantificação lipídica das amostras dos diferentes tratamentos foi realizada segundo Adam et al. (2012) utilizando-se um tubo de ensaio de vidro de 10 mL, onde foi adicionado 1 g da biomassa seca de *Chlorella sp.* juntamente com 6 mL de solvente (hexano) e colocando-se o tubo de ensaio em um banho ultrasônico, com a potência de 40 khz, durante 30 minutos na temperatura de 30 °C, a seguir, as amostras foram centrifugadas a 2000 rpm durante 10 minutos. A fase orgânica foi recolhida com uma pipeta Pasteur e transferida para outro tubo de ensaio. Repetiu-se o procedimento por duas vezes até que não houvesse mais lipídeos na amostra. Terminada esta etapa os lipídeos extraídos foram evaporados em evaporador rotativo e depois secados em estufa a 105 °C por 24 horas, até atingir massa constante para quantificar os lipídeos. A amostra

concentrada em evaporador rotativo a 40 °C, foi utilizada na determinação do perfil dos ácidos graxos.

3.7.4 - Proteínas

A concentração de proteínas das biomassas secas dos diferentes tratamentos foi determinada pela quantificação de nitrogênio da amostra utilizando-se o método de Kjeldahl (BRASIL, 2005). Foi utilizado o fator de conversão de nitrogênio para proteína de 6,25.

3.7.5 - Açúcares totais

Os açúcares totais das biomassas secas dos diferentes tratamentos foram determinados segundo a metodologia de Miller (1959).

3.7.6 - pH

Pesaram-se 10 g da amostra em um béquer de 200 mL e se diluiu com 100 mL de água destilada; agitou-se o conteúdo até que as partículas ficassem uniformemente suspensas; e se determinou o pH com o potenciômetro de bancada da marca Denver modelo UB-10 previamente calibrado, operando de acordo com as instruções do manual do fabricante (BRASIL, 2005).

3.7.7 - Clorofila e feofitina

Para a determinação da concentração de clorofila seguiu-se a metodologia segundo CETESB (2014) Foi usado 1 g da biomassa de *Chlorella* sp. seca, a qual foi triturada em almofariz até obter um pó fino; este pó foi transferido para um frasco âmbar com tampa e acrescentados 5 mL de acetona a 90%; a seguir macerou-se novamente e acrescentou-se mais 5 mL de acetona tomando cuidado de proteger a amostra da exposição a luz; deixou-se em repouso a 4 °C, por 5 horas. Após o período de extração os tubos foram retirados do refrigerador e centrifugados a 3.000 rpm durante 20 minutos; fez-se a leitura do sobrenadante em espectrofotômetro UV-VIS, marca Spectrum modelo SP 1105, com

cubeta de quartzo com caminho óptico de 1cm colocando-se 3 mL da amostra na cubeta e se procedeu às leituras tendo como branco uma amostra da solução de acetona a 90%. Foram realizadas as leituras em comprimento de onda de 664, 665 e 750nm, a primeira leitura nos comprimentos de onda 664 e 750nm.

A correção para feofitina (*a*) foi feita acidificando-se a solução contida nas cubetas, após a 1ª leitura (664 e 750 nm), pela adição de 50 µL de ácido clorídrico 0,1 N; após 90 segundos determinaram-se as densidades ópticas após acidificação em 750 e 665 nm (665 nm - pico máximo de absorção da feofitina *a*).

Para a obtenção dos resultados foram realizados os seguintes cálculos:

Correção da turbidez

D664c- densidade óptica corrigida a 664 nm, obtida antes da acidificação.

Correção: D664 corrigida = D664 – D750

D665c-densidade óptica corrigida a 665 nm, obtida depois da acidificação.

Correção: D665 corrigida = D665 – D750

As concentrações de clorofila *a* e feofitina *a* foram obtidas a partir das Equações 3.1 e 3.2, respectivamente:

$$\text{Clorofila } a \text{ } (\mu\text{g/L}) = 26,73 \times (\text{D664c} - \text{D665c}) \times \frac{V}{v \times L} \quad (3.1)$$

$$\text{Feofitina } a \text{ } (\mu\text{g/L}) = 26,73 \times [(1,7 \times \text{D665c}) - \text{D664c}] \times \frac{V}{v \times L} \quad (3.2)$$

Onde:

V - volume da amostra filtrada, em litros;

v - volume de acetona 90% usados para extração, em mL;

L - caminho óptico da cubeta espectrofotométrica usada, em cm;

D664c - densidade óptica corrigida a 664 nm;

D665c - densidade óptica corrigida a 665nm.

3.7.8- Atividade de água

As leituras dos valores da atividade de água, a 25 °C, das biomassas secas dos diferentes tratamentos foram obtidas utilizando-se o higrômetro AquaLab, modelo 3TE, fabricado pela Decagon Devices Inc.

3.7.9 - Amido

A quantificação do amido foi realizada segundo a metodologia de Leonel et al., (2003) descrita no item 3.6.2.

3.7.10 – Perfil dos minerais

A determinação dos minerais foi realizada em triplicata utilizando-se amostras da biomassa seca de *Chlorella* sp. de todos os tratamentos em espectrômetro microscópio Philips CM-200 operando com 200 KV, acoplado a um espectrômetro de análise de energia dispersiva de raios X (EDX).

3.7.11 – Perfil dos aminoácidos

A determinação dos aminoácidos contidos na biomassa seca de *Chlorella* sp. foi realizada pelo método de derivatização utilizando-se fenilisotiocianato (PITC) após hidrólise ácida. Obteve-se uma mistura de vários aminoácidos como produto, os quais foram submetidos a análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). As proteínas contidas na biomassa foram hidrolisadas a 110 °C, com ácido clorídrico 6 N, durante 24 horas. Os aminoácidos liberados na hidrólise ácida reagidos com PITC, segundo Hagen et al. (1989), foram separados por CLAE em fase reversa, utilizando-se coluna LUNA C18 (100Å, 5 µm 250 x 4,6 mm; cód. 00G-4252-EQ), e quantificados por detector UV em 254 nm. A quantificação foi feita por calibração interna multinível, utilizando o ácido α -aminobutírico (AAAB) como padrão interno, como descrito por White et al. (1986). Para o cálculo do teor de cada aminoácido o valor do peso molecular de cada aminoácido foi tomado na forma condensada, ou seja, o peso molecular completo do

aminoácido, diminuído em 18 u.a.m. (massa de uma molécula de água), de forma a considerar o aminoácido como se estivesse na sua forma protica.

Os valores de triptofano foram determinados por espectrofotometria, em meio alcalino. A amostra foi submetida à hidrólise enzimática com pronase a 40 °C, por 24 h, posteriormente foram submetidas a reação colorimétrica com p-dimetileno benzaldeído (DAB) e feita a leitura em espectrofotômetro a 590 nm (SPIES, 1967). A concentração de triptofano foi calculada por comparação com a curva padrão.

3.7.12 – Perfil dos ácidos graxos

A determinação dos ésteres metílicos de ácidos graxos da biomassa seca dos diferentes tratamentos foi realizada com base nas metodologias de Firestone (2009), Horwitz et al. (2010), Hartman e Lago (1973) e de Food Standards Agency Cambridge (2002). Foi utilizado cromatógrafo a gás, modelo Varian-3400CX, equipado com detector de ionização de chama e coluna modelo DB-FFAP Megabore (fase estacionária: ácido nitroterftálico modificado por polietilenoglicol). A coluna tinha 30 m de comprimento e 0,545 mm de diâmetro com um filme de 1 mm de espessura. O gás de arraste utilizado foi nitrogênio a 2 mL/min. As temperaturas do injetor e do detector foram de 250 e 270 °C, respectivamente. A temperatura inicial da coluna era de 120 °C, permanecendo nesta temperatura por 1 min. Foram utilizadas três programações de temperatura: aumento a uma taxa de aquecimento de 5 °C/min até 180 °C, permanecendo por 2 min; aumento a uma taxa de aquecimento a 2 °C/min até 200 °C, permanecendo por 2 min e aumento a uma taxa de aquecimento a 5 °C/min até 220 °C, permanecendo nesta temperatura durante 25 min, totalizando 50 min. A quantidade de amostra injetada foi 1 µL. Os ésteres metílicos de ácidos graxos foram identificados pela comparação dos tempos de retenção com padrões e quantificados por normalização de áreas através do *software* Varian Star 4.51.

3.8 - Isotermas de adsorção de umidade

A avaliação das isotermas de adsorção de umidade, a 25 °C, das biomassas secas de *Chlorella* sp. dos diferentes tratamentos, foi determinada em triplicata, utilizando-se o método estático-indireto segundo a metodologia de Capriste e Rotstein (1982). As leituras de atividade de água foram feitas no higrômetro Aqualab, modelo 3TE da Decagon

Devices e o teor de umidade de equilíbrio determinado em estufa a 105 °C, até massa constante.

Os modelos matemáticos de GAB (Equação 3.3), Oswin (Equação 3.4) e Peleg (Equação 3.5) foram ajustados às isotermas de adsorção de umidade através de regressão não linear pelo método de estimativa Quase-Newton, usando o programa Statistica.

GAB

$$X_e = \frac{X_m C K a_w}{(1 - K a_w)(1 - K a_w + C K a_w)} \quad (3.3)$$

Em que:

X_e - teor de umidade de equilíbrio;

a_w - atividade de água;

X_m - umidade na monocamada molecular;

C e K - parâmetros que dependem da temperatura da natureza do produto.

Oswin

$$X_e = a \left(\frac{a_w}{(1 - a_w)} \right)^b \quad (3.4)$$

Em que:

X_e - teor de umidade de equilíbrio

a_w - atividade de água

a e b - parâmetros de ajuste do modelo

Peleg

$$X_e = K_1 a_w^{n_1} + K_2 a_w^{n_2} \quad (3.5)$$

Em que:

X_e - teor de umidade de equilíbrio

K_1 e K_2 - constantes da equação

a_w - atividade de água

n_1 e n_2 - constantes da equação

Os critérios empregados na determinação do melhor ajuste dos modelos às isotermas, foram: o coeficiente de determinação (R^2) e o desvio percentual médio (P), calculados pela Equação 3.6.

$$P = \frac{100}{n} \cdot \sum_{i=1}^n \frac{|(X_{\text{exp}} - X_{\text{teor}})|}{X_{\text{exp}}} \quad (3.6)$$

Em que:

P - desvio percentual médio (%);

X_{exp} - valores obtidos experimentalmente;

X_{teor} - valores preditos pelo modelo;

n - número de dados experimentais

3.9 - Análise estatística

Foi utilizado o programa Assistat versão 7.7 beta na análise estatística dos dados experimentais.

A análise estatística dos dados de crescimento celular, lipídeos e açúcares totais durante o tempo de cultivo da *Chlorella* sp. seguiu o delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 6 (tratamentos: TC, T1, T2, T3, T4 e T5) x 9 (tempo de cultivo: 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 e 16 dias), com três repetições. A comparação entre médias foi feita pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Para a análise estatística dos dados da caracterização química, física e físico-química das biomassas secas dos tratamentos TC, T1, T2, T3, T4 e T5 foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado com a comparação entre médias feita pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - Monitoramento da *Chlorella* sp. durante o cultivo

Durante os 16 dias de cultivo da *Chlorella* sp. no biorreator aberto para os diferentes tratamentos (TC, T1, T2, T3, T4 e T5) foram monitorados o crescimento celular, expresso em termos de peso úmido e o peso seco, a produção de lipídeos e de açúcares totais.

4.1.1 - Crescimento celular

A Tabela 4.1 apresenta os valores médios dos dados referentes ao crescimento celular de *Chlorella* sp. nos tratamentos TC, T1, T2, T3, T4 e T5 cultivadas em diferentes concentrações de nutrientes em que o melhor resultado foi obtido quando a microalga foi cultivada no tratamento controle atingindo uma produção de 4,85 g/L de biomassa seca no 10º dia, seguido do resultado do tratamento T1, que teve produtividade de 4,75 g/L

Tabela 4.1 – Valores médios do peso seco de *Chlorella* sp. (g/L) durante o tempo de cultivo para os diferentes tratamentos

Tempo (dia)	Peso seco (g/L)					
	TC	T1	T2	T3	T4	T5
1	0,34 gA	0,34 fA	0,33 fA	0,38 fA	0,36 gA	0,39 eA
2	1,03 fA	1,06 eA	0,90 eAB	0,63 eC	0,60 gC	0,77 dBC
4	2,80 eA	2,61 dA	2,00 dB	1,34 dC	0,97 fD	1,08 cD
6	3,67 dA	3,73 cA	2,91 cB	1,82 cC	1,30 eD	1,13 cD
8	4,33 cA	4,05 bB	3,22 bC	2,00 cD	1,82 dD	1,42 bE
10	4,85 aA	4,75 aA	3,63 aB	2,33 bC	2,00 cdD	1,64 abE
12	4,69 abA	4,21 bB	3,79 aC	2,63 aD	2,18 cE	1,77 aF
14	4,61 abA	4,09 bB	3,57 aC	2,50 abD	2,53 bD	1,75 aE
16	4,54 bcA	4,01 bB	3,58 aC	2,43 abE	2,86 aD	1,66 abF

MG = 2,34; CV = 4,04%; DMS para colunas = 0,24; DMS para linhas = 0,22; MG - Média geral; CV - Coeficiente de variação; DMS - Desvio mínimo significativo Obs.: Médias seguidas da mesma letra minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade

Resultados e discussão

de biomassa seca no 10º dia sem no entanto apresentarem diferença significativa entre esses valores. Analisando-se os valores médios para o melhor crescimento celular nos tratamentos T2, T3, T4 e T5 verifica-se que T2 não apresentou diferença significativa entre os dias de cultivo 10, 12, 14 e 16 com valores médios de 3,63, 3,79, 3,57 e 3,58 g/L de biomassa seca; no tratamento T3 o melhor crescimento foi alcançado no 12º dia de cultivo com 2,63 g/L de biomassa seca; o tratamento T4 teve o maior crescimento no 16º dia com 2,86 g/L de biomassa seca; e o tratamento T5 apresentou o maior crescimento no 14º com 1,77 g/L de biomassa seca mas não houve diferenças significativas entre as médias nos tempos 10, 12, 14 e 16 dias indicando que, estatisticamente o 10º dia pode ser considerado como o de crescimento máximo.

A privação de nitrogênio, fósforo e potássio, induziram a célula a uma rota de crescimento com prioridade em estoque intracelular de reserva, para suportar a escassez desses nutrientes, mostrando que um ajuste na quantidade ideal de NPK, pode resultar na produção de biomassa em maior volume, juntamente com outros produtos de interesse como, por exemplo, carboidratos e lipídeos (MARTIN et al., 2014).

Ainda que cada elemento tenha sua importância relativa para a nutrição algácea, não há um número exato de elementos químicos essenciais, pois certos elementos são essenciais para determinadas espécies e não o são para outras (BAUMGATNER et al., 2013). Entre os elementos contidos na formulação do meio de cultivo o nitrogênio (N) é tido como o mais importante por ser o elemento constituinte de muitas substâncias do metabolismo primário, sua abundância no meio de cultivo pode favorecer a síntese de proteínas e clorofila e sua carência tende a reduzir as taxas de crescimento celular (LOURENÇO, 2006; BERTOLDI, 2008). De fato, esta informação pode ser confirmada quando analisados os resultados das concentrações de nitrogênio nos tratamentos, TC, T1, T2, T3, T4 e T5. Conforme descrito na Tabela 3.1 a concentração de NPK no meio controle foi de 1,25 g/L resultando na produção de 4,85 g/L de biomassa seca, em T1 a concentração desses elementos foi de 0,625 g/L produzindo 4,75 g/L de biomassa seca e T2 0,312 g/L produzindo 3,79 g/L, T3, T4 e T5 0,156 g/L produziu 2,63 g/L, 2,86 g/L e 1,77 g/L, sendo que o aumento da fonte de carbono nos tratamentos T3, T4 e T5, não favoreceu o aumento da concentração celular; provavelmente o nitrogênio não tenha sido o fator limitante para a redução de crescimento celular mas, sim o elemento fósforo (P), já que este elemento é necessário para o crescimento normal de todas as algas. O potássio é o

Resultados e discussão

elemento de maior abundância no meio de cultivo; no entanto, também não foi o fator limitante para o crescimento celular neste trabalho (BERCKER, 1994; LOURENÇO, 2006; BERTOLDI, 2008).

A produção de biomassa foi, em todos os tratamentos, satisfatória, quando comparada com a produção relatada por Matos (2012) trabalhando com *Chlorella vulgaris* cultivada no meio BBM (Bold Basal Medium), produzindo 0,590 g/L de biomassa seca; por LI et al. (2011) produzindo 2,83 g/L de biomassa seca de *Chlorella vulgaris* usando o meio de cultivo SRH (solução residual hidropônica) e glicose como fonte de carbono; por Putri et al. (2011) com uma produção de *Chlorella vulgaris* de 0,118 g/L, de *Chlorella pyrenoidosa* de 0,058 g/L e de *Chlorella sorokiana* de 0,160 g/L por Niels et al. (2012) com uma produção de *Chlorella* sp. de 0,410 g/L e de *Chlorella minutissima* de 0,490 g/L usando o meio de cultivo BG11 (*blue green medium*) modificado e por Shi et al. (2016) com produtividade de 0,160 g/L de biomassa seca no cultivo de *Chlorella vulgaris* com meio de cultivo BG11 (*blue green medium*). Conclui-se que o crescimento celular obtido neste trabalho está em conformidade com a literatura.

De forma geral e se baseando nos dados do crescimento celular recomenda-se que *Chlorella* sp. para os TC, T1, T2 e T5 seja cultivada durante 10 dias; para o tratamento T3 durante 12 dias; e para o tratamento T4 durante 16 dias. Os maiores valores de crescimento celular foram dos tratamentos TC e T1, sem apresentarem diferença significativa entre si no 10º dia, seguido dos tratamentos T2, T3, T4 e T5.

Na Figura 4.1 estão apresentados os resultados dos valores médios do crescimento celular de *Chlorella* sp., expresso em termos de peso úmido e peso seco, em função do tempo de cultivo para o tratamento TC. Não foi possível observar a fase adaptativa durante o início da cultura, devido ao espaço de tempo do monitoramento do cultivo, que foi de 2 dias. A fase de maior crescimento celular foi observada a partir do segundo dia de cultivo, apresentando comportamento de crescimento logarítmico nos tempos 1º ao 16º dias, tanto para peso seco como para peso úmido. Não foi possível observar a ocorrência da fase estacionária sendo este comportamento de crescimento geralmente atribuído às algas que, no início da fase de maior crescimento tende a apresentar crescimento acelerado e depois sofre um decaimento no crescimento. Outros trabalhos também reportaram o comportamento multivariado no crescimento, das espécies *Chlorella* sp. e *Chlorella vulgaris* (NIELS et al., 2012; SHI et al., 2016).

Resultados e discussão

Fan et al. (2014) verificaram para, o cultivo de *Chlorella pyrenoidosa*, em meio F/2 (Guillard ferro modificado) que o crescimento celular apresentou maior taxa de divisão celular dos 1º ao 5º dias, com comportamento exponencial e dos 6º ao 7º dias o crescimento foi linear.

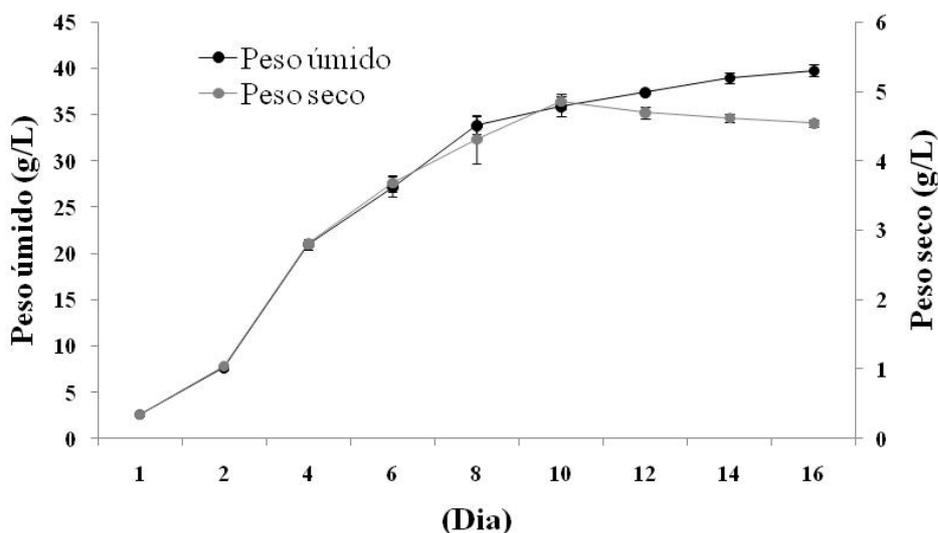


Figura 4.1 - Valores médios do crescimento celular de *Chlorella* sp. em função do tempo de cultivo para o tratamento controle (TC)

Na Figura 4.2 estão apresentados os resultados dos valores médios do crescimento celular da *Chlorella* sp., expressos em termos de peso úmido e peso seco, em função do tempo de cultivo para o tratamento T1, durante 16 dias. A fase adaptativa ocorreu no espaço de tempo fora do monitoramento compreendido entre 0 e 2 dias, não sendo possível determinar com exatidão seu tempo de ocorrência; a fase de maior crescimento celular teve no primeiro momento um comportamento exponencial nos tempos de 2, 4 e 6 dias da curva de crescimento, tanto para o peso seco quanto para o peso úmido; após o 6º dia a curva apresentou crescimento logarítmico, o qual comportamento se estendeu até o 16º dia para o peso úmido, o mesmo ocorrendo para o peso seco nos tempo 6, 8 e 10 dias; a partir do 10º dia, a curva do peso seco entrou em fase de declínio; nos três últimos tempos da curva é possível observar que ocorreu uma divergência entre os valores de peso úmido e peso seco, verificando-se que o peso úmido manteve o ritmo de crescimento; no entanto, o peso seco decaiu; supõe-se que possa ter ocorrido perda de massa durante a secagem na estufa ou

Resultados e discussão

mudança da biomassa em relação às propriedades químicas e estruturais das células durante a fase final de cultivo.

Kim et al. (2013) ao verificaram, o cultivo da *Chlorella vulgaris* em meio ANM (*Acetate nitrogen medium*) na presença de BFA (*Brefildin A*) crescimento linear do 1º até o 6º dia de cultivo.

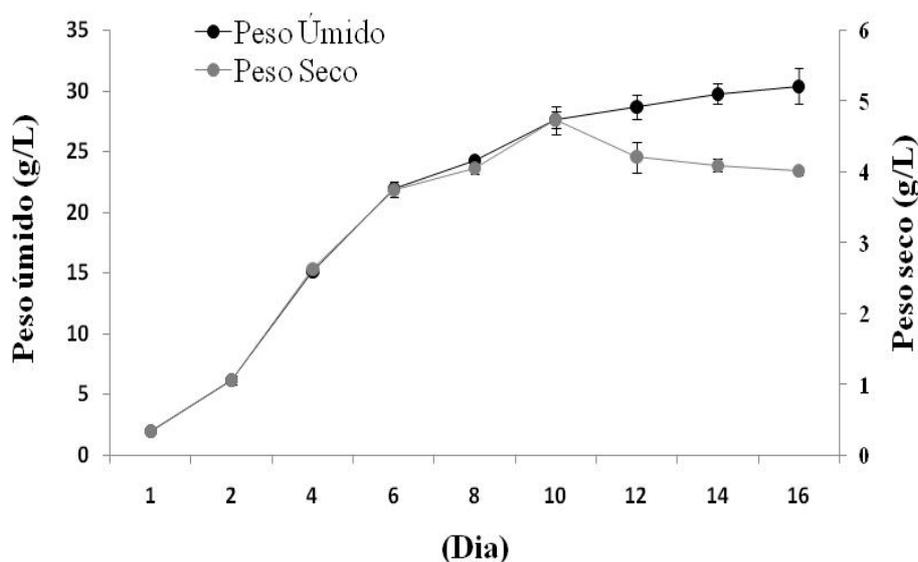


Figura 4.2 - Valores médios do crescimento celular de *Chlorella sp* em função do tempo de cultivo para o tratamento T1

Na Figura 4.3 estão representados os resultados dos valores médios do crescimento celular da *Chlorella sp* em função do tempo de cultivo para o tratamento T2. No início do cultivo nos tempos de 0 a 2 dias não foi possível determinar a ocorrência da fase adaptativa; no 2º dia de cultivo foi observado o início da fase de maior crescimento celular; nos tempos de 2 a 12 dias para o peso úmido e para o peso seco a fase de maior crescimento celular foi determinada como de crescimento logarítmico e em seguida ocorreu a fase de declínio. Verifica-se que o comportamento da curva de crescimento em relação às concentrações de NPK e ferro na fase de maior crescimento se estendeu até o 12º dia de cultivo; apesar de menor crescimento a cultura manteve o ritmo de divisão celular e não teve a ocorrência da fase estacionária, que pode ser justificada pelo esgotamento dos nutrientes na tentativa da célula continuar crescendo mesmo quando o

Resultados e discussão

nível de nutrientes no meio permanece baixo, o que explica o decaimento da fase logarítmica direto, a fase de declínio.

Algumas microalgas podem apresentar comportamentos diversificados em relação ao crescimento celular. Baumgartner et al. (2013) realizaram o cultivo da microalga *Scenedesmus obliquus* em meio à base de fertilizantes com diluição de até 10 vezes da diluição padrão e obtiveram resultados similares aos meios com maior concentração de nutrientes.

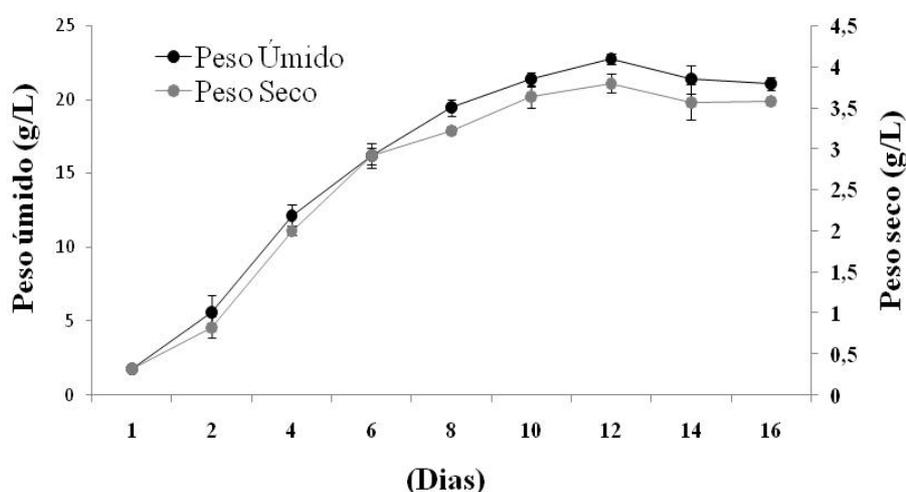


Figura 4.3 - Valores médios do crescimento celular de *Chlorella* sp. em função do tempo de cultivo para o tratamento T2

A Figura 4.4 apresenta os resultados dos valores médios do crescimento celular da *Chlorella* sp. em função do tempo de cultivo para o tratamento T3. Analisando os resultados, verifica-se que a cultura teve um crescimento muito rápido não sendo possível determinar a ocorrência da fase adaptativa. A fase logarítmica foi iniciada no 2º dia de cultivo e se estendeu até o 10º dia, tanto para peso úmido como para o peso seco; em seguida, ocorreu a fase estacionária com um período do 10º ao 14º dia e, por fim, a cultura entrou em fase de declínio no último tempo de cultivo.

Observa-se que a dosagem de 0,6 g/L de bicarbonato de sódio, conforme descrito na Tabela 3.1, pode ter atuado como fonte de reserva para sustentar tanto o crescimento celular como a estabilidade das células durante a fase estacionária, que teve um período longo em relação aos tratamentos TC (Figura 4.1), T1 (Figura 4.2) e T2 (Figura 4.3). Nota-

Resultados e discussão

se que os meios com maior concentração de carbono mantiveram o crescimento, apesar do volume de biomassa ser inferior aos tratamentos TC, T1 e T2.

Meios de cultivo preparados com maiores concentrações de carbono podem ajudar a manter a cultura por mais tempo em crescimento, evitando que a cultura entre em fase de declínio após o término da fase de maior crescimento (MATOS, 2012).

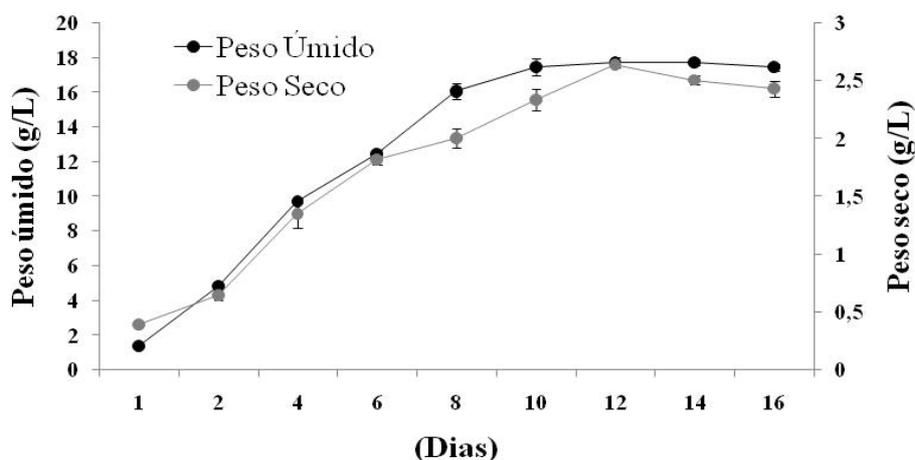


Figura 4.4 - Valores médios do crescimento celular da *Chlorella* sp. em função do tempo de cultivo para o tratamento T3

A Figura 4.5 apresenta os resultados dos valores médios do crescimento celular da *Chlorella* sp. em função do tempo de cultivo para o tratamento T4. Observa-se que no início do cultivo, não foi possível verificar a fase adaptativa em virtude do tempo de monitoramento da cultura ser superior ao tempo de sua ocorrência. A fase de maior crescimento para o peso úmido se inicia no 2º dia de cultivo e prossegue até o 16º dia, final do monitoramento, apresentando perfil de curva logarítmica. A curva para o peso seco também se iniciou no 2º dia de cultivo e se manteve em crescimento constante até o último dia de cultivo, curva caracterizada como sendo de crescimento linear.

Se comparados os nutrientes que foram utilizados para formular o meio de cultivo, verifica-se que uma diferença significativa em relação aos tratamentos TC, T1 e T2, pois os tratamentos T3 (Figura 4.4) e T5 (Figura 4.5) receberam as mesmas quantidades de NPK e ferro, no entanto, o que realmente variou foram as concentrações de carbono. As

Resultados e discussão

diferenças que ocorreram nas curvas são perceptíveis ao se analisar os dados e se percebe que ocorreu crescimento linear, não havendo as fases estacionárias e declínio.

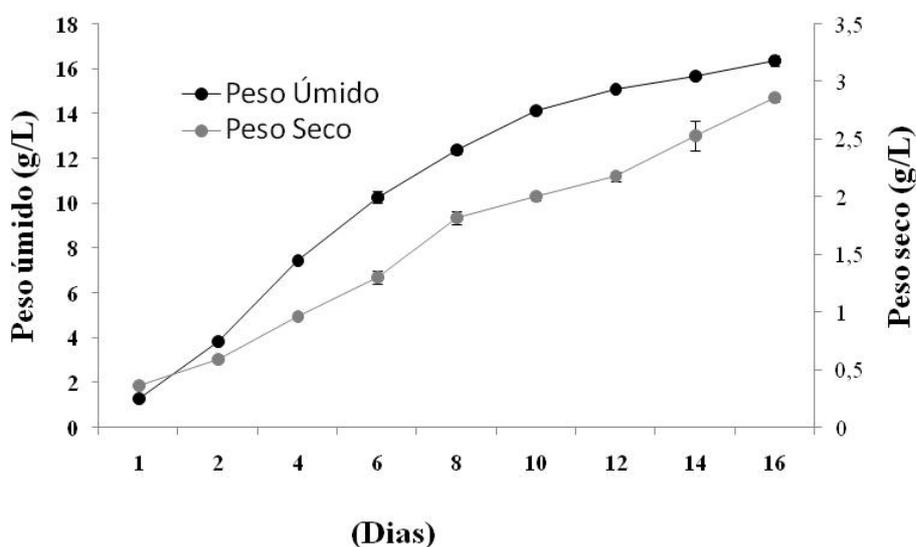


Figura 4.5 - Valores médios do crescimento celular da *Chlorella* sp. em função do tempo de cultivo para o tratamento T4

Na Figura 4.6 se encontram os resultados dos valores médios do crescimento celular da *Chlorella* sp. em função do tempo de cultivo para o tratamento T5. O cultivo se inicia com a fase adaptativa, que é imperceptível, devido a faixa de tempo de monitoramento não possibilitar a observação do evento. A fase de maior crescimento para o peso úmido apresentou crescimento logarítmico com início no 2º dia de cultivo e se estendeu até o 16º dia, ponto final do monitoramento da cultura. O peso seco também apresentou comportamento de crescimento logarítmico a partir do 2º dia de cultivo e se estendeu até o 16º dia, final do monitoramento; tanto o peso úmido como o peso seco não apresentaram a fase estacionária e declínio.

A espécie *Chlorella* apresenta diferentes respostas de crescimento em relação aos meios de cultivos. Costa et al. (2006) cultivaram a espécie *Chlorella vulgaris*, em meio MBM (Meio Bristol Modificado) verificando que a curva de crescimento obtida apresentou comportamento linear durante todo o período de cultivo, não se observando as fases estacionária e de declínio. Esses autores relataram que esses organismos podem ter

Resultados e discussão

crescimento continuado mesmo quando as taxas de nutrientes se apresentam em baixas concentrações.

O tratamento T5 foi o tratamento que recebeu a maior dosagem de bicarbonato de sódio 0,12 g/L comparado com o tratamento T4 que recebeu uma dosagem de 0,10 g/L; no entanto, o crescimento para T5 (1,77 g/L) foi menor se comparado com o maior valor do pico de biomassa produzida em T4 (2,86 g/L), significando que a dosagem de 0,12 g/L de bicarbonato de sódio não favoreceu o crescimento celular no tratamento T5.

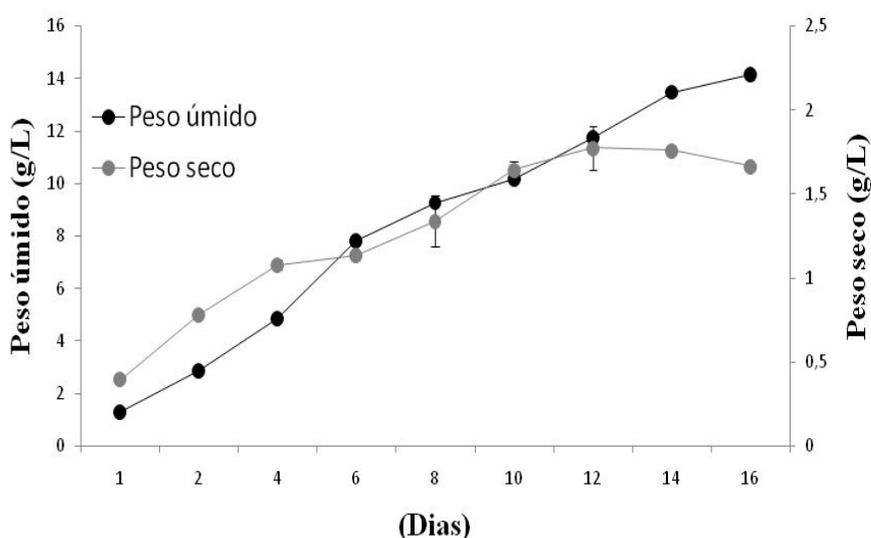


Figura 4.6 - Valores médios do crescimento celular da *Chlorella* sp. em função do tempo de cultivo para o tratamento T5

4.1.2 - Lipídeos

A Tabela 4.2 mostra os valores médios dos lipídeos da *Chlorella* sp. dos diferentes tratamentos TC, T1, T2, T3, T4 e T5, durante 16 dias de cultivo. O tratamento controle (TC) teve, no tempo 1º dia, teor de lipídeos de 1,89 g/100 g na biomassa seca e atingiu a maior produção no 10º dia com valor de 4,33 g/100 g; para o tratamento T1 a concentração inicial dos lipídeos no 1º dia foi de 1,60 g/100 g, e atingiu o maior teor de lipídeos no 10º dia, com 5,17 g/100 g; a quantificação da concentração de lipídeos no tratamento T2 no 1º dia, foi de 1,78 g/100 g e o maior teor foi encontrado no 12º dia com valor médio de 8,52 g/100g; o valor inicial para o tratamento T3 no 1º dia, foi de 1,73 g/100 g e maior pico de

Resultados e discussão

lipídeos foi atingido no 16º dia com volume de 9,19 g/100 g; no tratamento T4 o teor inicial (1º dia) foi de 1,34 g/100 g atingindo o maior pico no 10º dia com valor de 18,69 g/100 g; e para o tratamento T5 o teor inicial (1º dia) foi de 1,28 g/100g e a maior quantidade de lipídeos foi alcançada no 10º dia com volume de 17,77 g/100 g.

Analisando-se os valores médios para cada tratamento verifica-se que os maiores teores de lipídeos foram encontrados: para o tratamento TC nos tempos 8, 10, 12, 14 e 16 dias, sem diferenças estatísticas entre as médias nesses tempos; para o tratamento T1 nos tempos 8, 10, 12 e 14 dias, sem, no entanto apresentarem diferenças estatísticas; para o tratamento T2 nos tempos 8, 10, 12, 14 e 16 dias, sem diferenças estatísticas entre os mesmos; para o tratamento T3 nos tempos 14 e 16 dias; para o tratamento T4 nos tempos 8 e 10 dias; e para o tratamento T5 no 10º dia.

Tabela 4.2 - Valores médios dos lipídeos (g/100 g) da *Chlorella* sp. durante o tempo de cultivo para os diferentes tratamentos

Tempo (dia)	Lipídeos (g/100 g)					
	TC	T1	T2	T3	T4	T5
1	1,89 cA	1,60 eA	1,78 dA	1,73 fA	1,34 gA	1,28 fA
2	2,16 cB	3,01 dAB	3,76 cA	3,61 eA	2,53 fB	2,84 eAB
4	2,29 cD	3,00 dCD	4,45 cB	4,33 deB	7,78 eA	3,71 eBC
6	2,73 bcE	3,79 bcdD	5,87 bC	4,63 deD	13,70 dA	7,88 dB
8	3,63 abE	4,85 abD	7,60 aC	5,40 cdD	18,60 aA	16,39 bB
10	4,33 aD	5,17 aD	8,38 aB	6,31 cC	18,69 aA	17,77 aA
12	4,19 aC	4,56 abcC	8,52 aB	8,02 bB	16,76 bA	16,03 bcA
14	3,79 abD	4,17 abcd	8,38 aC	9,12 aC	16,97 bA	15,54 bcB
16	3,39 abD	3,76 cdD	7,57 aC	9,19 aB	14,94 cA	15,10 cA

MG = 7,02; CV = 5,92%; DMS para colunas = 1,07; DMS para linhas = 0,99MG: Média geral; CV: Coeficiente de variação; DMS: Desvio mínimo significativo Obs.: Médias seguidas da mesma letra minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade

As microalgas podem, em sua maioria acumular quantidades consideráveis de lipídeos em diferentes condições de cultivo. Meios com deficiência de nutrientes, principalmente deficientes em nitrogênio, fósforo e ferro, são utilizados como estratégia para o aumento da síntese de lipídeos em microalgas (FAN et al., 2014).

Resultados e discussão

Com base nos valores médios verifica-se que a melhor concentração de lipídeos foi produzida pelo tratamento T4, com pico máximo de 18,69 g/100g no 10º dia, seguido pelo tratamento T5, com uma produção de 17,77 g/100 g, lembrando que os níveis de nitrogênio, fósforo, potássio e ferro nesses dois tratamentos foram iguais variando apenas a concentração de carbono no meio de cultivo, daí a proximidade dos valores. A concentração de bicarbonato de sódio foi maior para o tratamento T5, no entanto, resultou em um decréscimo de produção de lipídeos, resultado diferente para o tratamento T4 que teve uma suplementação menor e resultou em uma maior produção. Este fato comprova a ocorrência da saturação da oferta de bicarbonato sódio disponível no meio de cultivo (HENRARD et al., 2014).

Observa-se que a síntese de lipídeos atingiu seu pico máximo nos tratamentos T1, T4 e T5 e em seguida ocorreu tendência de diminuição da síntese de lipídeos; no tratamento T3 verifica-se tendência aumento da síntese de lipídeos durante todo o período de cultivo (16 dias). Nas microalgas, os lipídios funcionam como componentes de membrana, produtos de reserva, metabólitos e como fonte de energia, sendo grande parte deles constituída de ácidos graxos.

Comportamento similar em cultivo de *Chlorella* sp. foi observado por FERREIRA et al. (2013) verificando que a célula utilizou ao máximo os nutrientes em uma faixa de tempo entre o 1º e o 10º dias de cultivo e, conforme os níveis de nutrientes tenham baixado, a síntese de lipídeos também foi reduzida.

De acordo com a literatura os valores de lipídeos entre as espécies de microalgas podem variar muito podendo atingir teores de lipídeos acima da média, fato verificado por Chen et al. (2016) que produziram múltiplas variedades de ácidos graxos com a espécie de *Chlorella pyrenoidosa*, em meio de cultivo BG11 (Bold Green), atingindo uma concentração de lipídeos totais de 50% demonstrando que é possível produzir altas concentrações de lipídeos com características específicas por Chakraborty et al. (2016) que verificaram, para a *Chlorella minutissima* MCC 5 cultivada em meio TAP (tris acetato fosfato) um teor máximo de lipídeos de 46%.

Produzir biomassas com altas concentrações de lipídeos pode ser uma estratégia a ser empregada em cultivos comerciais. Ndikubwimana et al. (2016) trabalharam com um sistema de produção de *Desmodesmus brasiliensis* cultivada em meio modificado bold 3 N obtendo uma produção de 24,1-24,2% de lipídeos na biomassa seca. Manandhar-Shrestha e Hildebrand (2013) realizaram pesquisas com a mutagênese de *Chlorella* sp. e conseguiram

Resultados e discussão

uma concentração lipídica de 40% na biomassa algal. Sangwoet al. (2013) testaram um indutor de síntese lipídica Brefeldin A (TFA) em células de *Chlamidomonas reinhardtii* e *Chlorella vulgaris* e conseguiram aumentar a concentração de lipídeos nas duas espécies, tendo uma produção final de 23% e 36%.

A Figura 4.7 mostra os valores médios de lipídeos quantificados durante as etapas de crescimento da microalga *Chlorella* sp. nos diferentes tratamentos (TC, T1, T2, T3, T4 e T5), suplementados com diferentes concentrações de nutrientes, em faixa de tempo de 0 a 16 dias de cultivo. Observa-se que os maiores teores de lipídeos foram dos tratamentos T4 e T5.

Analisando os resultados da produção de lipídeos durante o cultivo da *Chlorella* sp. nos diferentes tratamentos constata-se que durante o crescimento a microalga sintetiza grande parte desses compostos para finalidade de reserva. É possível verificar que as mesmas respondem muito bem aos estímulos de escassez de nutrientes, prioritariamente o nitrogênio (N). Os resultados mostram que quanto menor o nível dos elementos nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K) e ferro (Fe) maior a concentração de lipídeos totais na biomassa seca.

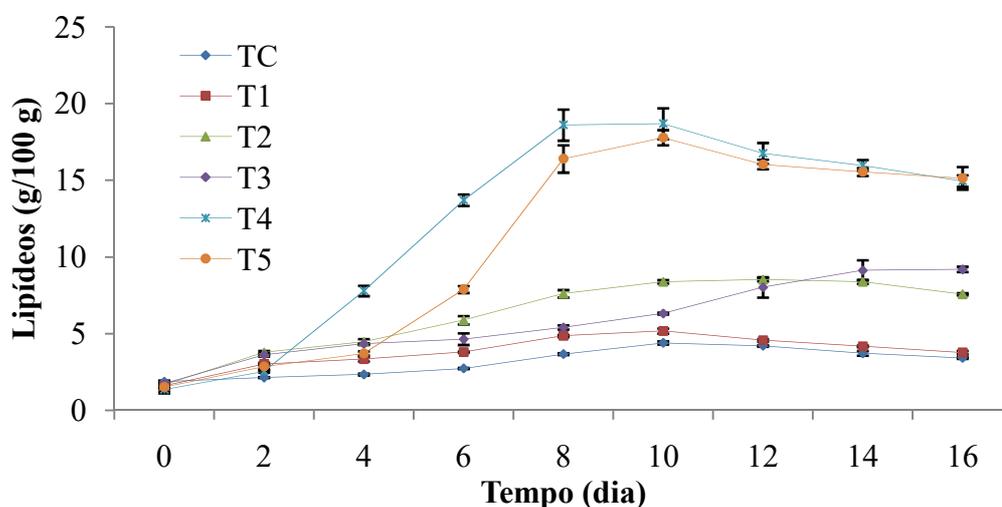


Figura 4.7 - Valores médios dos lipídeos da *Chlorella* sp. em função do tempo de cultivo para os diferentes tratamentos

Quando as células de *Chlorella pyrenoidosa* foram cultivadas com baixas concentrações de nitrogênio, fósforo e ferro, as mesmas passaram a acumular lipídeos em maior quantidade (FAN et al., 2014) o que vem a convergir com os resultados deste

Resultados e discussão

trabalho. Uma explicação para este mecanismo de acumulação lipídica é o fato de que, quando os níveis de macronutrientes são reduzidos, algumas espécies químicas, espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN), são rapidamente geradas para sustentar a alta síntese dessas moléculas causando a expressão de genes relacionados com a síntese de reserva de energia na célula. Cultivos com alta deficiência de fósforo apresentam essa característica de acumulação de lipídeos.

Shuhuan et al. (2013) pesquisaram a produção de fosfolipídios pelas células de *Chlorella sorokiniana* verificando que esta espécie produziu vários tipos de fosfolipídios, conseguindo uma concentração final da massa lipídica na biomassa de 32%. Zhan et al. (2016) verificaram para a *Chlorella* sp. cultivada em meio de cultivo BG11, uma concentração de lipídeos totais de 62% na biomassa seca.

Fan et al. (2014) realizaram o cultivo de *Chlorella pyrenoidosa* em quatro diferentes condições de cultivo e obtiveram as seguintes contrações percentuais de lipídeos totais, meio completo BBM (Bold Basal Medium) 30%, o mesmo meio com deficiência de nitrogênio obtenção de 50% de lipídeos, meio com deficiência de fósforo 35% e meio com deficiência de ferro 39% de lipídeos totais. Cheol et al. (2014) realizaram o cultivo de *Chlorella* sp. em três diferentes formulações do meio f/2 Guillard compreendidos como: f/2 completo, f/2 com deficiência de nitrogênio e f/2 com traços de metal obtendo 10,8, 11,8 e 10,7% de lipídeos na biomassa seca, respectivamente.

Rosenberg et al. (2014) investigaram a produção de lipídeos em *Chlorella vulgaris*, *C. sorokiniana* e *C. protothecoides* utilizando a privação de nitrogênio nos meios de cultivo, produzindo 25, 30 e 23%, respectivamente. Fan et al. (2015) realizaram pesquisas com *Chlorella pyrenoidos* obtendo uma produção de 35% de lipídeos, esses autores ainda analisaram o transcriptoma (Cp) constatando que as baixas concentrações de NPK favoreceram a síntese de enzimas relacionadas à produção de lipídeos, devido a este fato, a produção de lipídeos pela célula aumentou significativamente. Mansfeldt et al. (2016) analisaram as principais enzimas envolvidas na síntese de lipídeos em condições deficientes de NPK; em seguida, codificaram o transcriptoma da célula de *Chlorella* sp. quando estava sob baixas concentrações de nutrientes e isolaram os genes relacionados à síntese de amidos e lipídeos comprovando que este mecanismo é o elemento-chave para a produção eficiente de lipídeos. Com base nos resultados obtidos neste trabalho e se comparando com os resultados dos trabalhos citados verifica-se que a deficiência nutricional (nitrogênio, fósforo, potássio, ferro e fonte de carbono) aumentou a produção

Resultados e discussão

de lipídeos, sobretudo em meios com baixas concentrações de nitrogênio, sendo esta a estratégia mais utilizada e a que apresentou os melhores resultados.

4.1.3 - Açúcares totais

A Tabela 4.3 apresenta os valores médios da quantificação dos açúcares totais na biomassa seca de *Chlorella* sp. dos tratamentos TC, T1, T2, T3, T4 e T5, durante 16 dias de cultivo.

Verifica-se, para o tratamento TC, que o teor de açúcares totais apresentou tendência de aumento até o 6º dia de cultivo, permanecendo do 6º ao 16º dia estatisticamente no mesmo nível de açúcares e com os maiores valores; para o tratamento T1 o aumento significativo dos açúcares foi até o 8º dia, do 8º ao 12º dia os açúcares permaneceram estáveis e com os maiores valores e do 14º ao 16º dia houve redução; para os tratamentos T2 e T4 houve aumento da concentração dos açúcares até o 14º dia e do 14º ao 16º dia, ocorrendo uma estabilidade e, para os tratamentos T3 e T5, mesmo com baixas concentrações de NPK e Fe, o aumento da concentração dos açúcares foi até o fim do cultivo. Os tratamentos TC, T1, T2 e T3 tiveram a maior suplementação de NPK e Fe, mas apresentaram os menores teores de açúcares totais e os tratamentos T4 e T5 receberam as maiores concentrações de bicarbonato de sódio e como consequência, tiveram a maior síntese de açúcares. Diante os resultados é possível sugerir que as baixas concentrações de NPK e Fe associadas com 0,08, 0,10 e 0,12% de bicarbonato de sódio induziram o aumento da concentração dos açúcares totais nas células de *Chlorella* sp. Rodrigues et al. (2015) quantificaram um teor de açúcares totais de 59,7% na biomassa seca de *Chlorella homosphaera* cultivada em meio inorgânico WC, teor superior aos valores do presente trabalho.

Os maiores valores dos açúcares totais para os tratamentos TC, T1, T2, T3, T4 e T5 ocorreram a partir dos tempos 6 (9,22 g/100 g), 8 (10,62 g/100 g), 14 (10,47 g/100 g), 16 (14,19 g/100 g), 14 (16,43 g/100 g) e 16 dias (20,37 g/100 g), respectivamente.

Dentre os tratamentos testados o tratamento T5 produziu a maior concentração de açúcares no 16º dia com teor de 20,37 g/100 g.

Existe uma grande variação no teor de açúcares ou carboidratos produzidos a partir de microalgas; geralmente, estas variações ocorrem em razão das diferentes espécies, condições e meio de cultivo, entre outros fatores. Mizuno et al. (2013) realizaram o cultivo

Resultados e discussão

de quatro espécies de *Chlorella* utilizando o meio TAP (Tris acetato fosfato) em diferentes concentrações de macronutrientes verificando o teor de açúcares totais de 20% para a *C. vulgaris*, de 18% para a *C. sorokiniana*, de 21% para a *C. lobophora* e de 48% para a *Parachlorella kessleri*.

Tabela 4.3 - Valores médios dos açúcares totais (g/100 g de glicose) da *Chlorella* sp. para os diferentes tratamentos

Tempo (dia)	Açúcares totais (g/100 g)					
	TC	T1	T2	T3	T4	T5
1	5,93 cA	5,44 fA	4,86 eA	5,27 fA	6,05 gA	5,53 gA
2	6,59cB	7,02 eAB	5,27 deC	6,24 efBC	7,91 fA	6,25 gBC
4	8,04 bA	8,48 dA	6,09 cdeC	6,58 efBC	8,51 efA	7,81 fAB
6	9,22 abAB	9,81 cdA	6,46 cdC	7,09 deC	9,34 deAB	8,38 fB
8	9,49 aA	10,62abcA	7,25 cB	7,49 deB	10,21 cdA	10,33 eA
10	9,80 aB	11,32 abA	7,41 cC	8,36 dC	11,55 cA	12,26 dA
12	9,59 aC	11,99 aB	9,00 bC	9,86 cC	13,22 bAB	14,39 cA
14	8,95 abC	10,56 bcB	10,47 aB	11,42 bB	16,43 aA	17,27 bA
16	8,85 abE	9,68 cdDE	10,42 aD	14,19 aC	17,74 aB	20,37 aA

MG =9,42; CV = 5,66%; DMS para colunas =1,38; DMS para linhas = 1,27MG: Média geral; CV: Coeficiente de variação; DMS: Desvio mínimo significativo Obs.: Médias seguidas da mesma letra minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade

A Figura 4.8 apresenta os resultados médios da quantificação dos açúcares totais da biomassa de *Chlorella* sp. dos tratamentos TC, T1, T2, T3, T4 e T5. Analisando os resultados das concentrações dos açúcares totais produzidos durante o cultivo da *Chlorella* sp. em todos os tratamentos, observa-se que a síntese de açúcares foi menor nos tratamentos TC, T1, T2 e T3 sendo que esses foram os tratamentos que continham as maiores concentrações de N, P, K e Fe, e os maiores valores foram obtidos nos tratamentos T4 e T5, os quais receberam as menores concentração desses elementos.

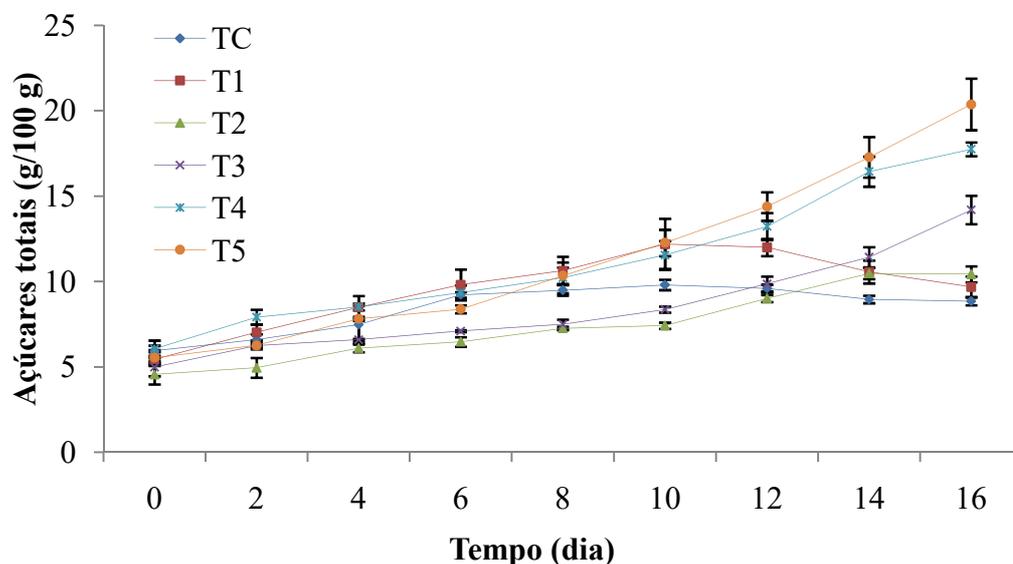


Figura 4.8- Valores médios dos açúcares totais da *Chlorella* sp. em função do tempo de cultivo para os diferentes tratamentos

É provável que a fonte de carbono tenha sido responsável pelo aumento da acumulação de açúcares nas células de *Chlorella* sp. Ho et al. (2013) reportaram um teor de açúcares de 51% na *Chlorella vulgaris* cultivada no meio BBM (Bold Basal medium), sem a restrição de nitrogênio. Miranda (2011) realizou o cultivo da microalga *Scenedesmus obliquus* no meio MC obtendo uma produção de açúcares totais na biomassa úmida variando de 1,27 - 8,20%.

Com base nos resultados encontrados nota-se que, o aumento da síntese de açúcares pelas células de *Chlorella* sp. não depende apenas da nutrição mas também de outros fatores envolvidos na estimulação da síntese dessas moléculas.

Os mecanismos de síntese e acúmulo de açúcares pelas células também estão relacionados a fatores como: pH, temperatura, luminosidade e estresse ambiental (SLOCOMBE et al., 2015).

Klein (2013) não encontraram, trabalhando com a *Chlorella* sp. celulose nem arabinose na biomassa algal, mas o maior conteúdo de carboidratos encontrado foi de xilose e amido, evidenciando que a maior parte da constituição dos açúcares da *Chlorella* é, em sua maioria amido.

Resultados e discussão

A produção de açúcares também foi avaliada por Chen et al. (2016) em *Chlorella vulgaris* cultivada em meio BM (Basal Medium) suplementado com 0,565 g/L de ureia e 2 g/L de acetato, verificando-se após 8 dias de cultivo, um teor de açúcares de 54% na biomassa seca.

Outro ponto importante verificado é o fato das células de *Chlorella* terem continuado a aumentar o conteúdo de açúcares, mesmo com a restrição de nitrogênio, fósforo e potássio.

Jasim et al. (2014) observaram que a produção de açúcares na microalga *Chlorella vulgaris* teve dependência direta com a concentração de nitrogênio, observando que, quando a suplementação de nitrogênio no meio BG11 (Bold Green) foi reduzida de 12 g/L para 4 g/L, a microalga aumentou a produção de açúcares de 17,35% para 51,17%.

Rodrigues et al. (2015) relataram que a produção de açúcares totais na microalga *Chlorella homosphaera* cultivada no meio WC foi de 59,7%, sendo que desse total 53,9% foram de glicose, 3,2% de galactose, 1,6% de arabinose, 0,8% de manose e 0,3% de xilose. O meio WC contém em sua composição baixas concentrações de nitrogênio e fósforo indicando que as baixas concentrações desses elementos são capazes de promover aumento dos açúcares nas células da *Chlorella*.

4.2–Microscopia eletrônica de varredura

As partículas da biomassa de *Chlorella sp.* seca, após 16 dias de cultivo, dos diferentes tratamentos foram avaliadas através do microscópio eletrônico de varredura (MEV) em duas etapas: com a parede celular rompida e com o amido extraído.

4.2.1 - Micrografias das células de *Chlorella sp.*

Nas Figuras 4.9 a 4.14 estão apresentadas as micrografias da microscopia eletrônica de varredura das células de *Chlorella sp.* após o rompimento da parede celular para os tratamentos TC, T1, T2, T3, T4 e T5, com ampliações de 100, 300, 500, 1000 e 2000 vezes. Observam-se pequenas estruturas globulares de amido aderidas nas paredes das células previamente rompidas, parte do amido ficou aderido nas paredes das células e outra parte ficou livre, apresentando-se em forma de pequenos grânulos irregulares.

Resultados e discussão

Analisando as imagens das micrografias verifica-se que as estruturas têm formatos diversos, sugerindo material de parede celular e aderido a essas estruturas têm-se pequenas esferas com formato ovoide, que são pequenos grânulos de amido que foram

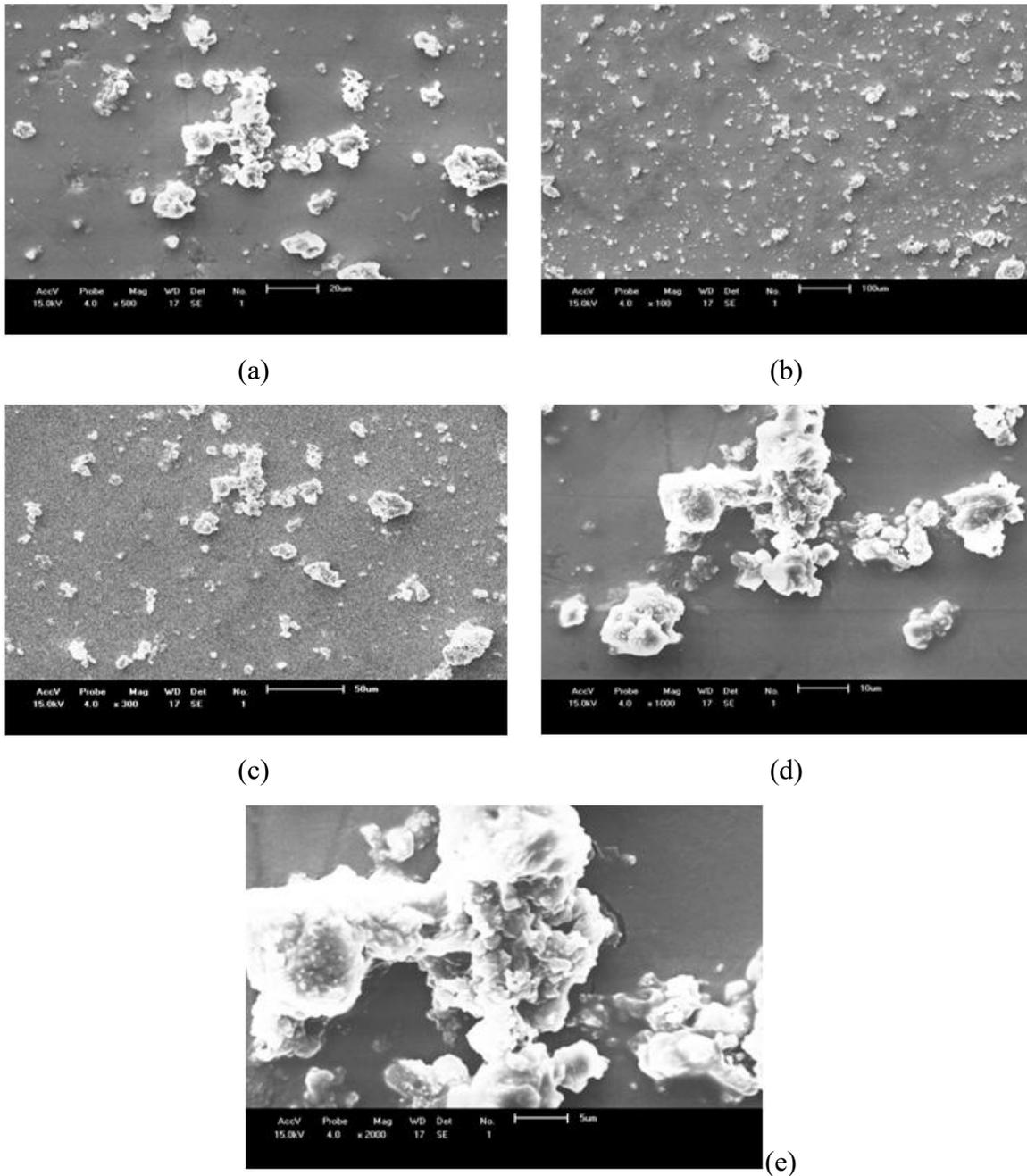


Figura 4.9 - Micrografias das células de *Chlorella* sp. após o rompimento da parede celular para o tratamento TC: (a) aumento de 100x; (b) 300x; (c) 500x; (d) 1000x; e (e) 2000x

Resultados e discussão

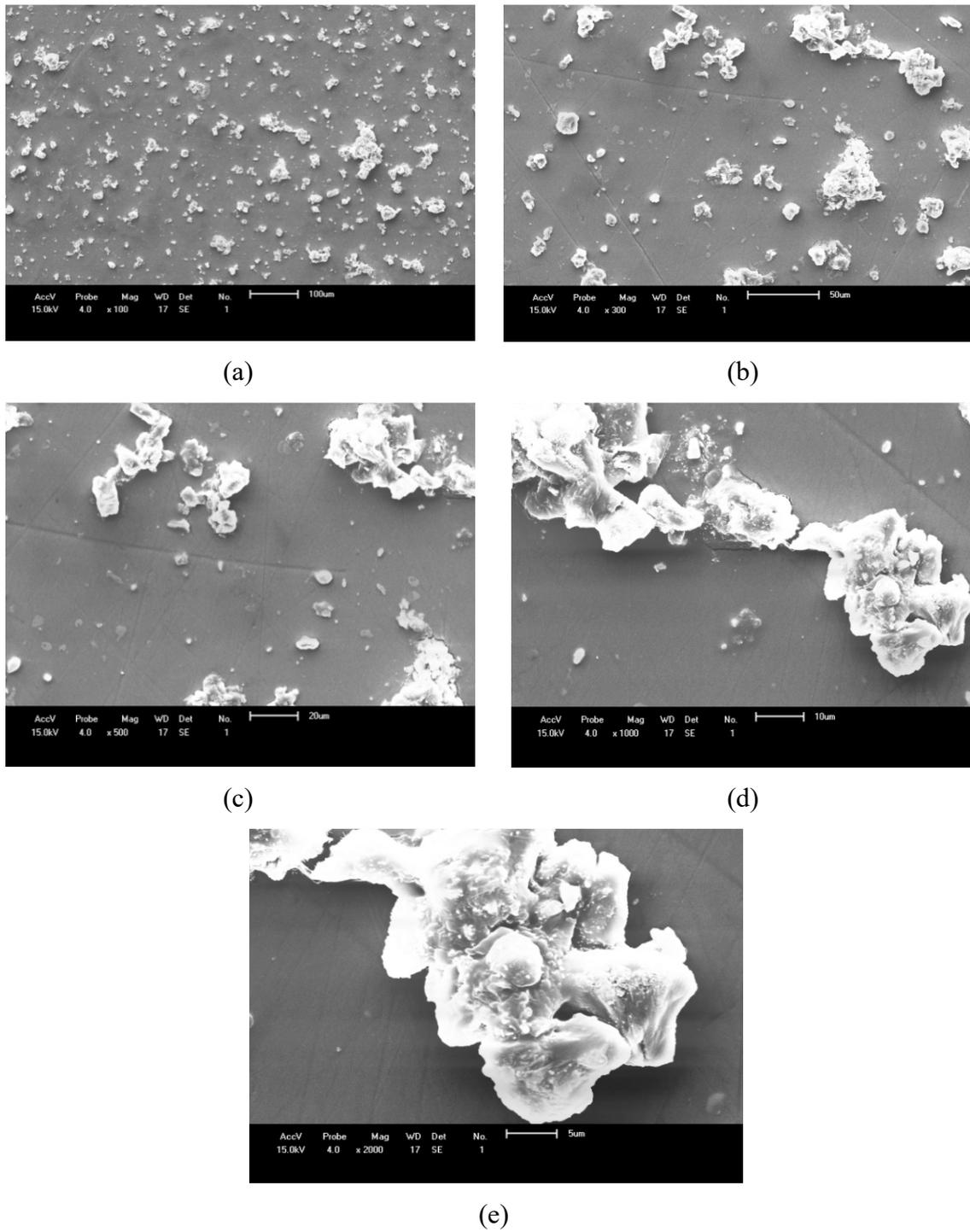


Figura 4.10 - Micrografias das células de *Chlorella sp* após o rompimento da parede celular para o tratamento T1: (a) aumento de 100x; (b) 300x; (c) 500x; (d) 1000x; e (e) 2000x

Resultados e discussão

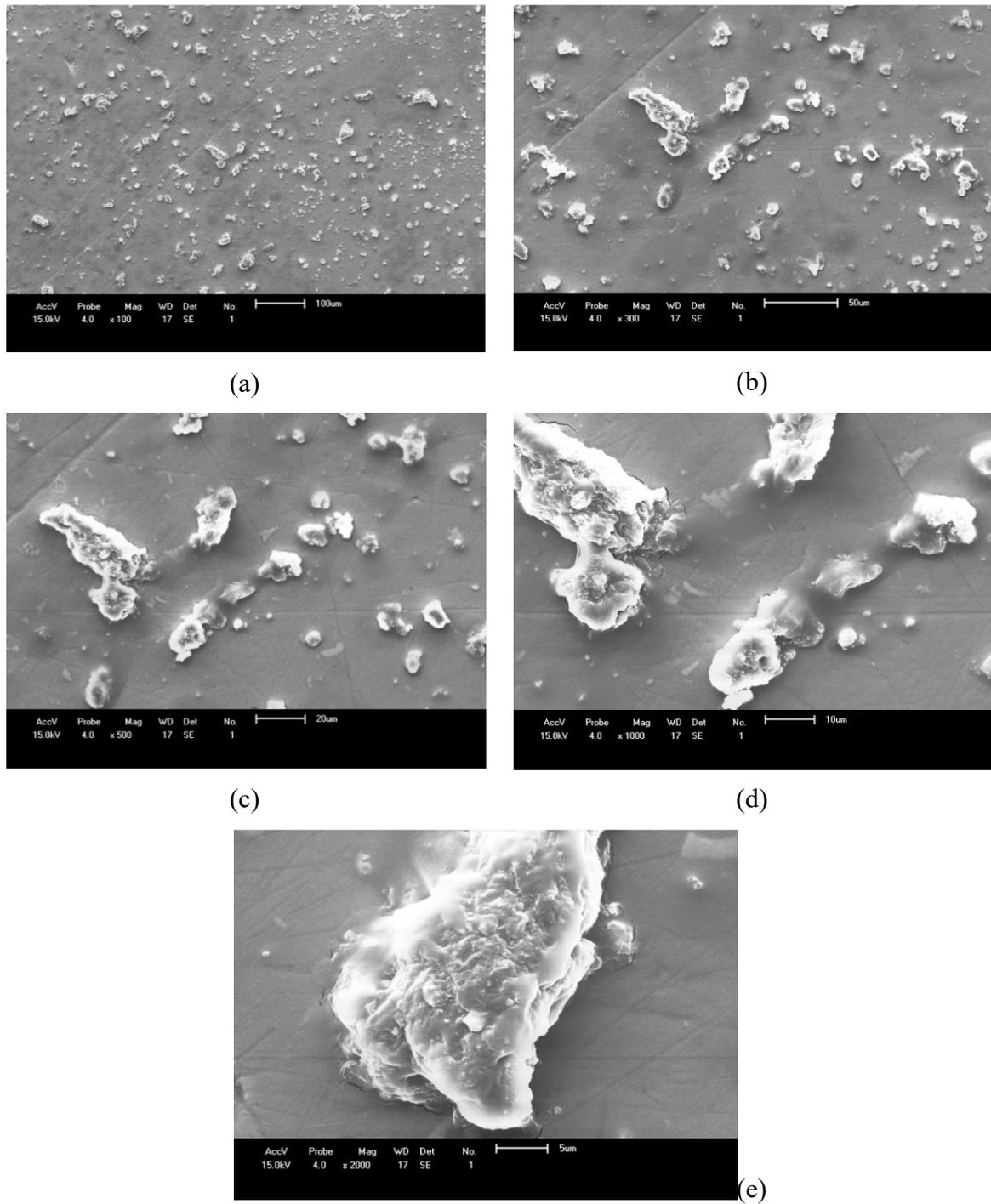


Figura 4.11- Micrografias das células de *Chlorella sp* após o rompimento da parede celular para o tratamento T2: (a) aumento de 100x; (b) 300x; (c) 500x; (d) 1000x; e (e) 2000x

Resultados e discussão

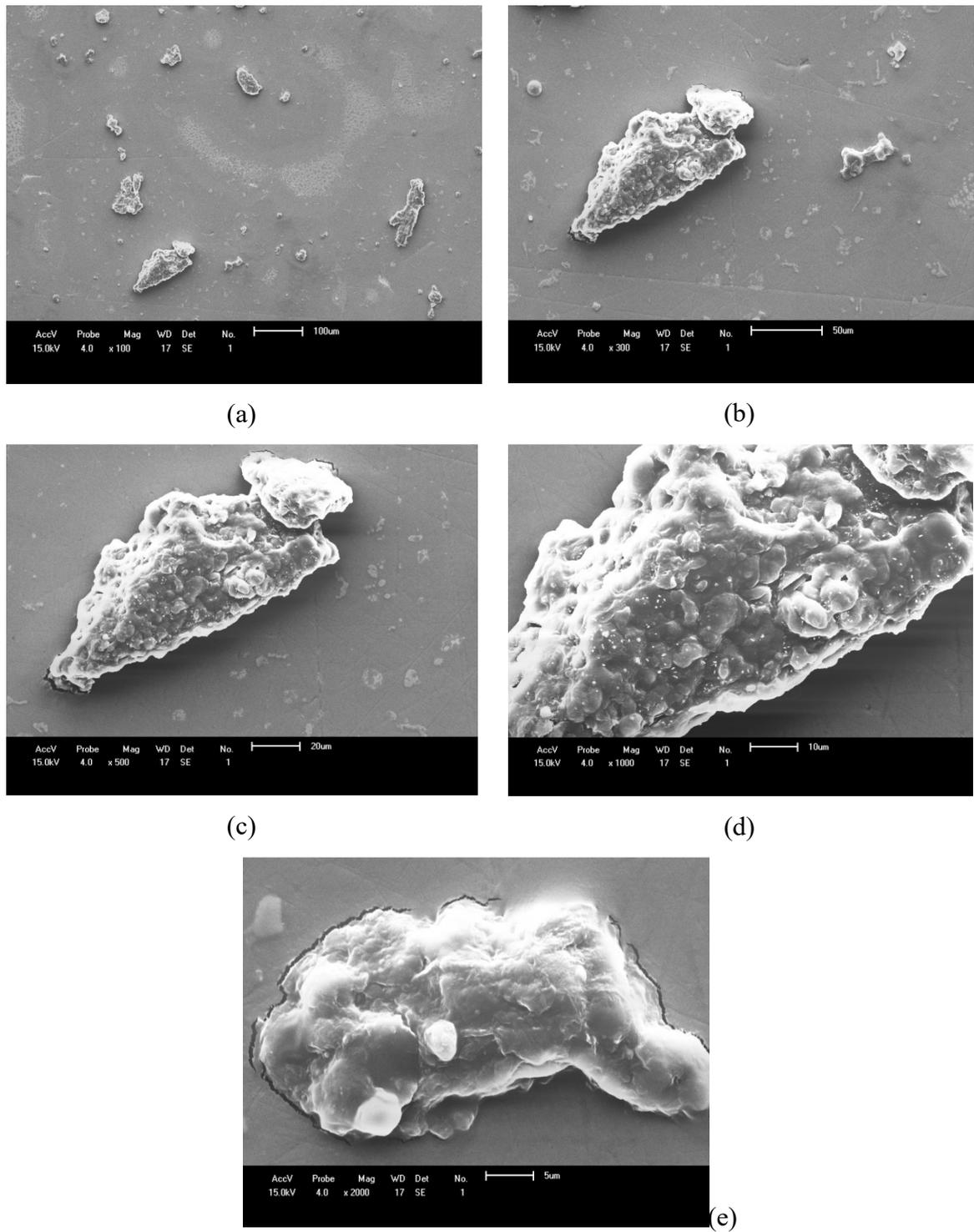


Figura 4.12 - Micrografias das células de *Chlorella* sp. após o rompimento da parede celular para o tratamento T3: (a) aumento de 100x; (b) 300x; (c) 500x; (d) 1000x; e (e) 2000x

Resultados e discussão

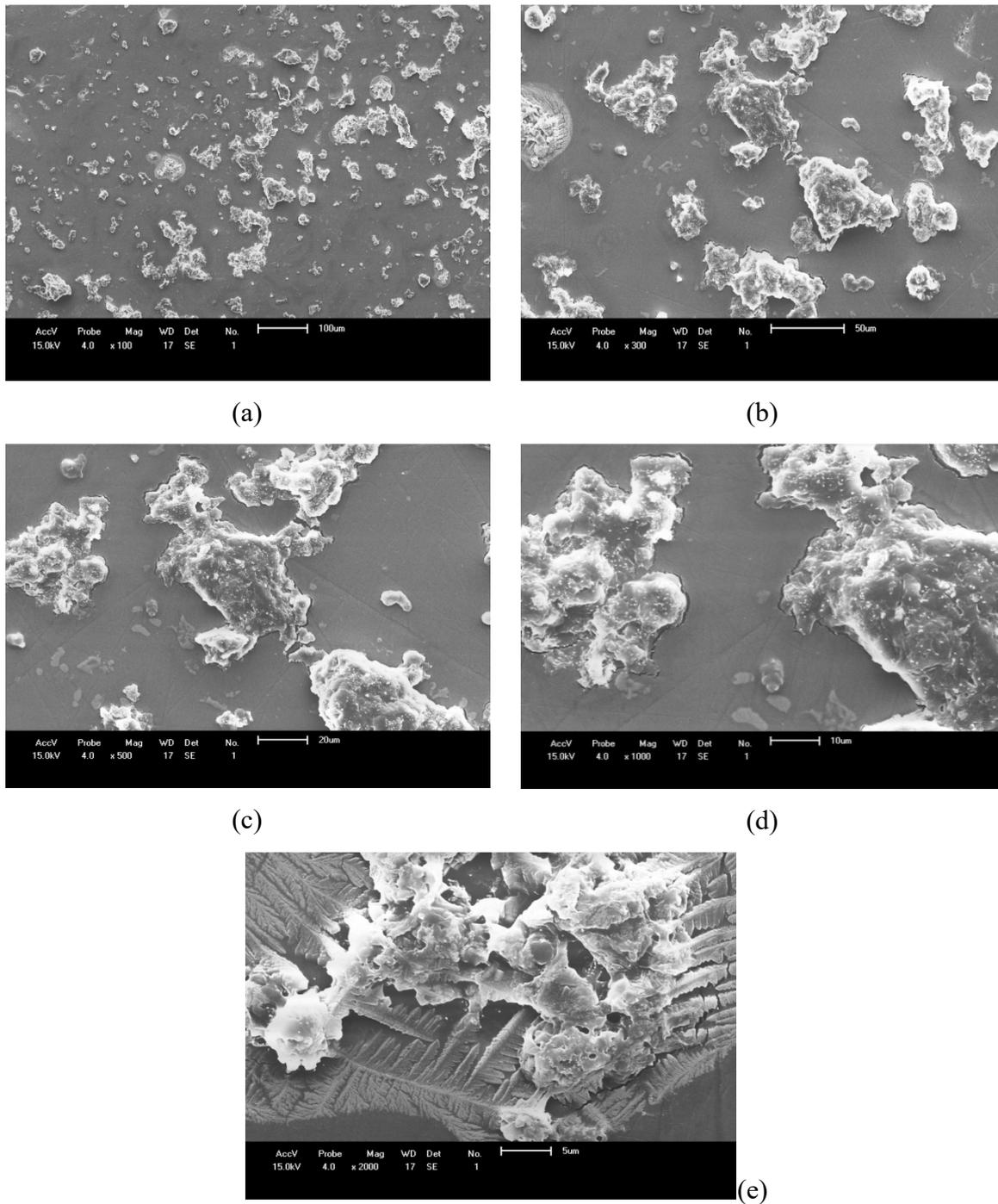


Figura 4.13 - Micrografias das células de *Chlorella* sp. após o rompimento da parede celular para o tratamento T4: (a) aumento de 100x; (b) 300x; (c) 500x; (d) 1000x; e (e) 2000x

Resultados e discussão

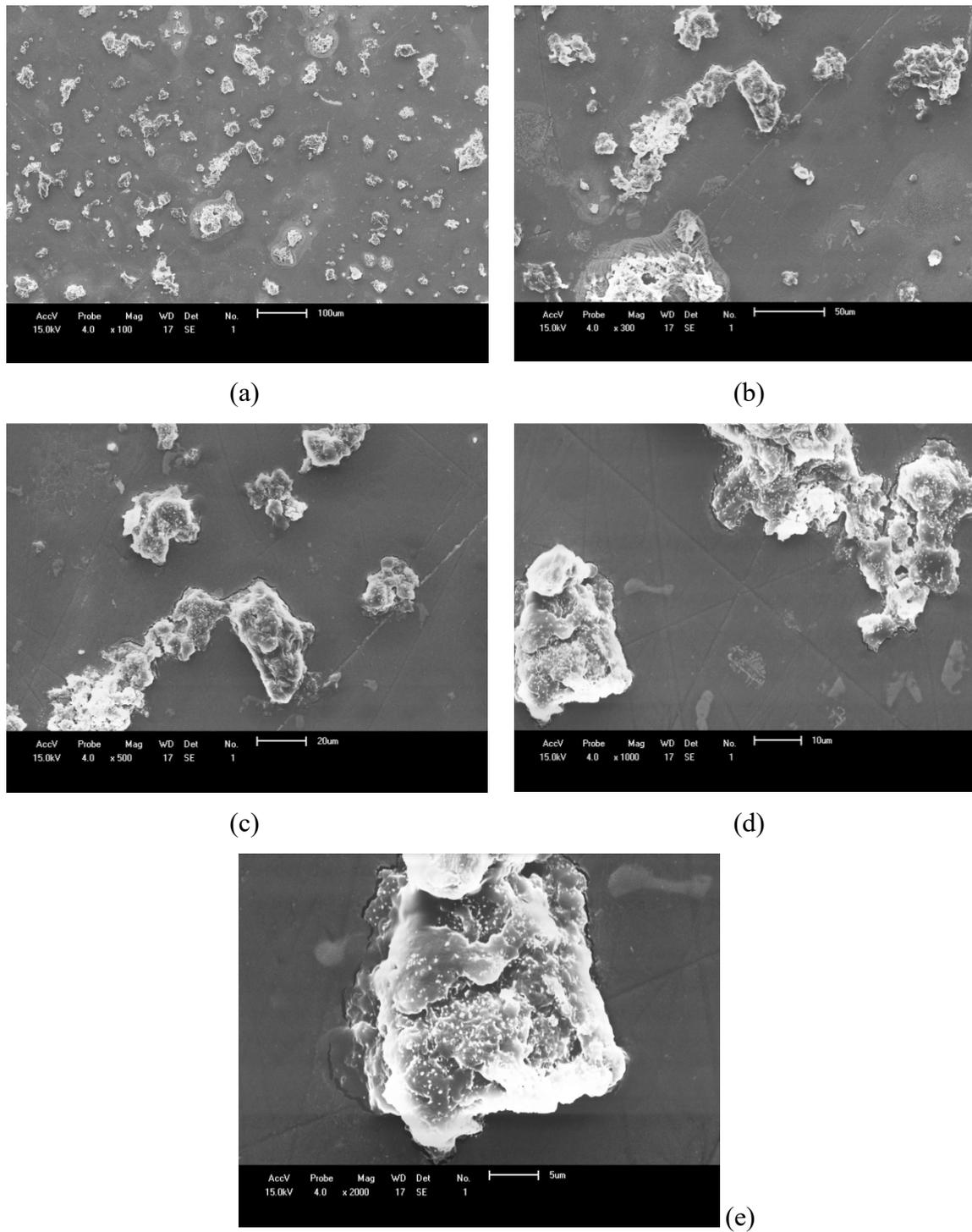


Figura 4.14 - Micrografias das células de *Chlorella* sp. após o rompimento da parede celular para o tratamento T5: (a) aumento de 100x; (b) 300x; (c) 500x; (d) 1000x; e (e) 2000x

Resultados e discussão

expostos quando ocorreu a quebra da parede celular. Klein (2013) verificou por meio das imagens de microscopia ótica, que as células de *Chlorella vulgaris* quando rompidas apresentavam estruturas morfológicas desorganizadas, diferentes das células não rompidas, em que a estrutura da parede celular inteira (não rompida) apresentava formato esferoidal mantendo a forma estrutural original.

Em seu estudo, Huss et al. (2002) com *Chlorella* sp. usando microscopia eletrônica de transmissão para avaliar as estruturas da microalga, verificaram que antes e depois da ruptura da parede celular que as células, mesmo após desidratação, apresentaram formato esferoidal e que, depois do rompimento, apresentavam formas desorganizadas. Larrosa et al. (2015) também observaram esse efeito nas células de *Arthrospira spirulina*, após as análises antes e depois do rompimento da parede celular.

Observando imagens das micrografias de todos os tratamentos, sugere-se que o rompimento celular tenha ocorrido integralmente de vez que não são observadas estruturas com formato esferoidal, o que caracteriza a ausência de células intactas. Gojkovic et al. (2014) usaram a microscopia eletrônica de transmissão para visualizar o efeito de selênio sobre a estrutura da célula de *Chlorella sorokiniana*, foi verificado que a estrutura e organização das células não foram alteradas pela adição de selênio; esses autores conseguiram visualizar a estrutura da célula livre, a parede celular, o citoplasma, o núcleo e suas organelas, plastídeos, cloroplastos, tilacoides, periplasma, plastoglobulos e o pirenoide.

Xião et al. (2015) avaliaram o efeito do rompimento celular de *Auxenachlorella sorokiniana* através de moinho de bolas e na presença de solvente extrator, comparando as imagens das células intactas e depois do processo de rompimento celular, verificando que as células submetidas ao processo de rompimento não mais apresentavam formato esférico, o que vem a convergir com as imagens das células rompidas do presente trabalho.

4.2.2- Micrografias dos grânulos de amido

As Figuras 4.15 a 4.20 exibem as micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura do amido extraído da biomassa seca de *Chlorella* sp. dos tratamentos TC, T1, T2, T3, T4 e T5. Verificam-se aglomerados de amido sem forma definida, sugerindo que o material tenha interação entre suas estruturas.

Observa-se que os grânulos de amido no tratamento TC apresentaram fragmentos de parede celular (Figuras 4.15b e 4.15d). Uma hipótese para este comportamento é que pode ter ocorrido sedimentação de fragmentos da parede celular durante a fase de purificação do amido, ponto considerado recorrente nas técnicas de extração e purificação desse tipo de material.

O amido extraído no tratamento T1 apresentou grânulos quebradiços e irregulares (Figuras 4.16a e 4.16c). Um dos motivos desta forma dos grânulos de amido se deve à extração mecânica que pode danificar a estrutura dos grânulos de amido mas isto não o inviabiliza para as aplicações nas indústrias de panificação ou na fermentação alcoólica, durante os processos de produção de etanol.

Verifica-se nas Figuras 4.17, 4.18, 4.19 e 4.20 que as amostras dos tratamentos T2, T3, T4 e T5 apresentaram as mesmas características estruturais. Constata-se que a deformação estrutural do amido ocorre em razão deste se encontrar compartimentalizado em organelas intracelulares, e por isso é notória a necessidade da utilização de métodos mecânicos para liberá-lo. Geralmente, o amido de outras fontes, como, por exemplo, amido de mandioca, pinhão, batata e de outros produtos, é diferente em aspectos estruturais, como tamanho do grânulo, esfericidade e cor, evidenciando que a extração se torna muito mais fácil em relação à extração do amido de *Chlorella* sp. conforme citado por Mizuno et al. (2013).

Resultados e discussão

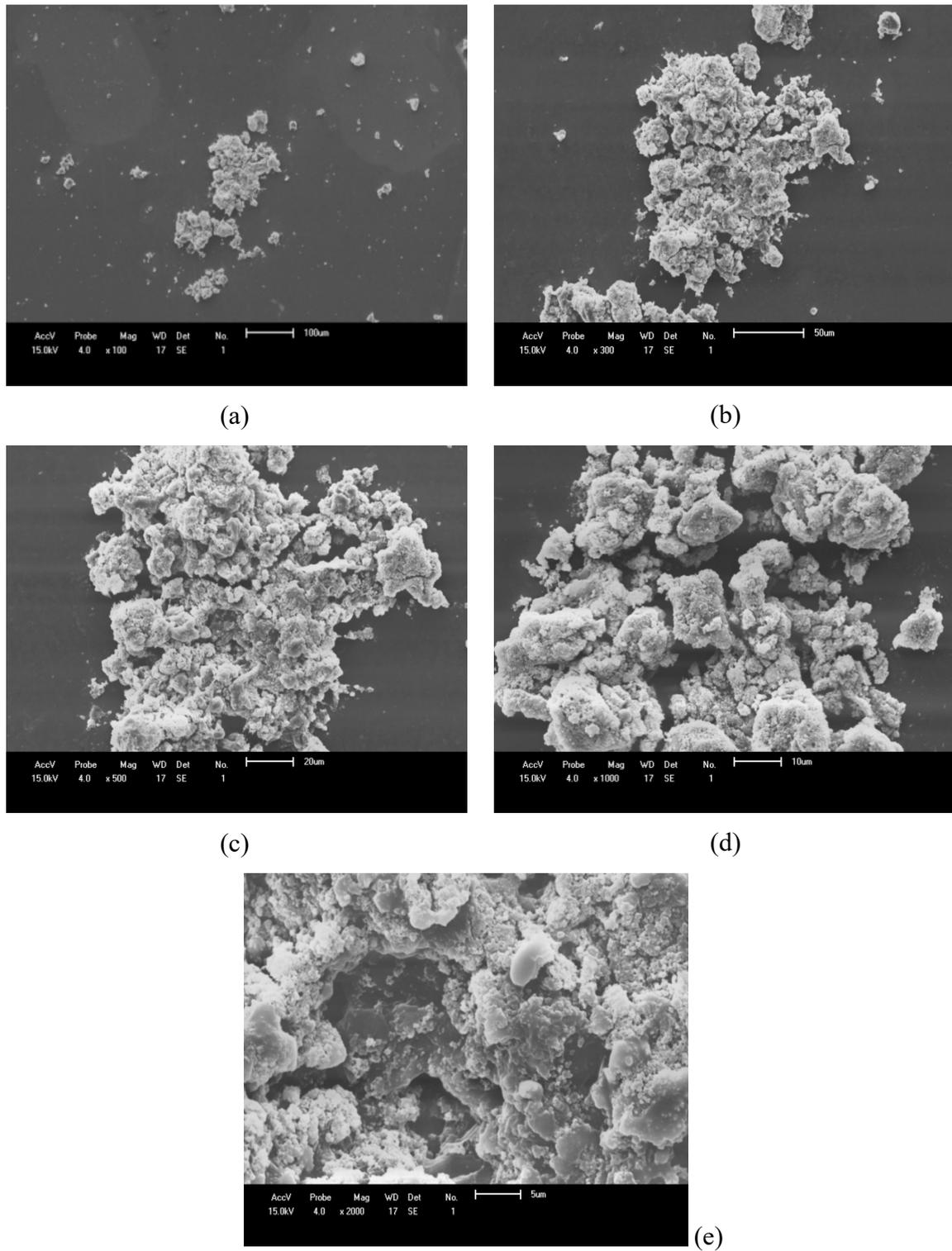


Figura 4.15 - Micrografias do amido de *Chlorella* sp. para o tratamento TC:(a) aumento de 100x; (b) 300x; (c) 500x; (d) 1000x; e (e) 2000x

Resultados e discussão

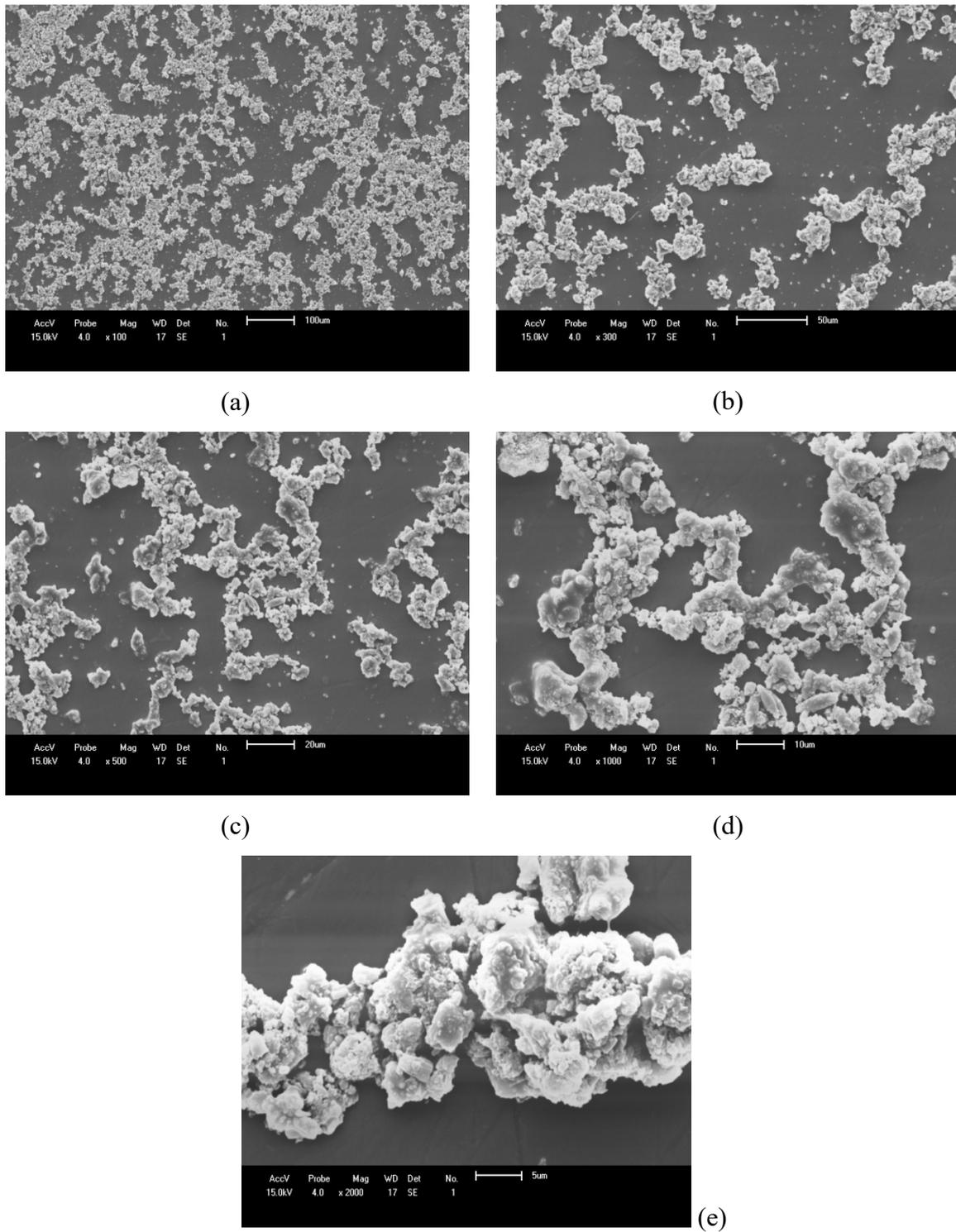


Figura 4.16 - Micrografias do amido de *Chlorella* sp. para o tratamento T1: (a) aumento de 100x; (b) 300x; (c) 500x; (d) 1000x; e (e) 2000x

Resultados e discussão

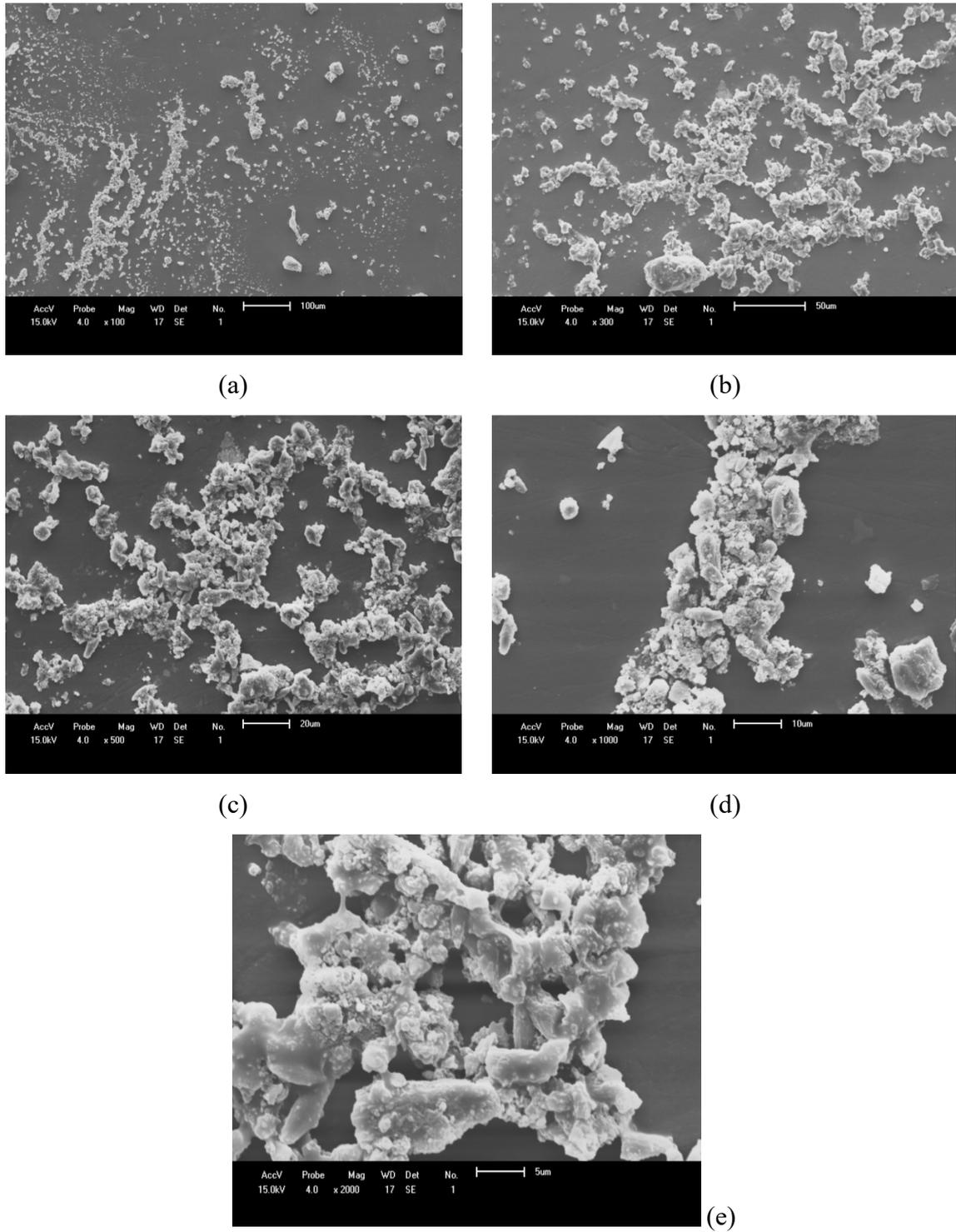


Figura 4.17 - Micrografias do amido de *Chlorella* sp. para o tratamento T2: (a) aumento de 100x; (b) 300x; (c) 500x; (d) 1000x; e (e) 2000x

Resultados e discussão

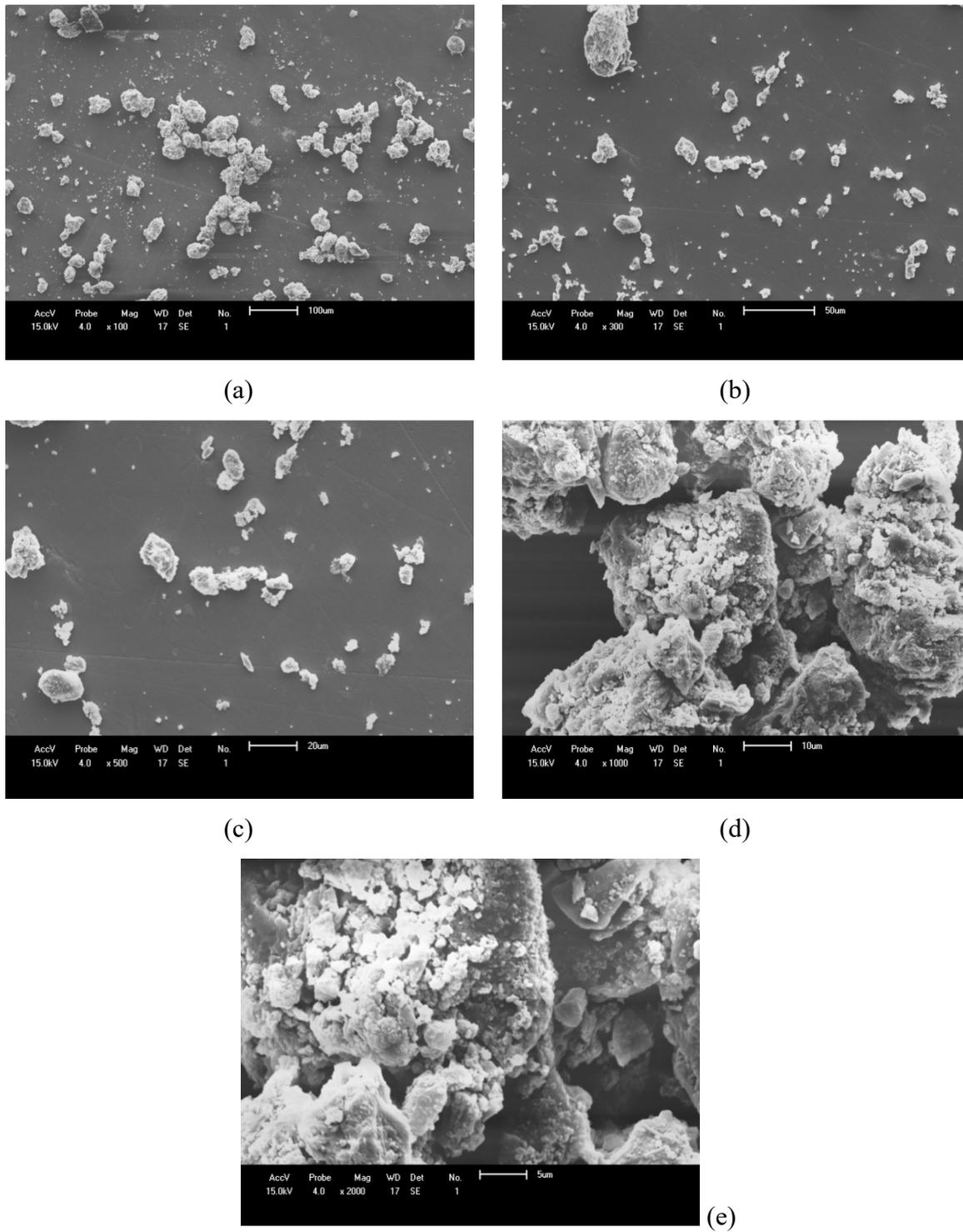


Figura 4.18 - Micrografias do amido de *Chlorella* sp. para o tratamento T3: (a) aumento de 100x; (b) 300x; (c) 500x; (d) 1000x; e (e) 2000x

Resultados e discussão

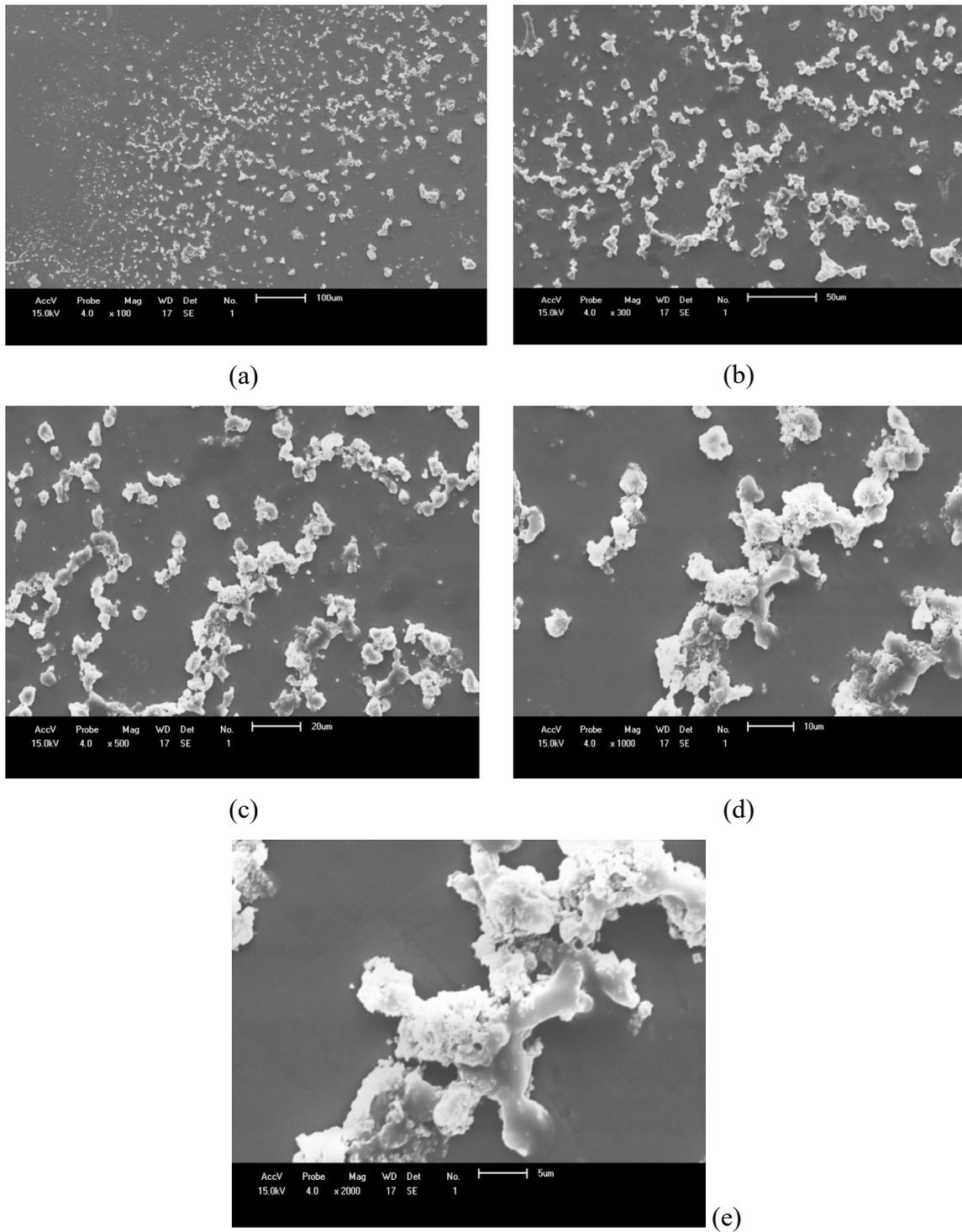


Figura 4.19 - Micrografias do amido de *Chlorella* sp. para o tratamento T4: (a) aumento de 100x; (b) 300x; (c) 500x; (d) 1000x; e (e) 2000x

Resultados e discussão

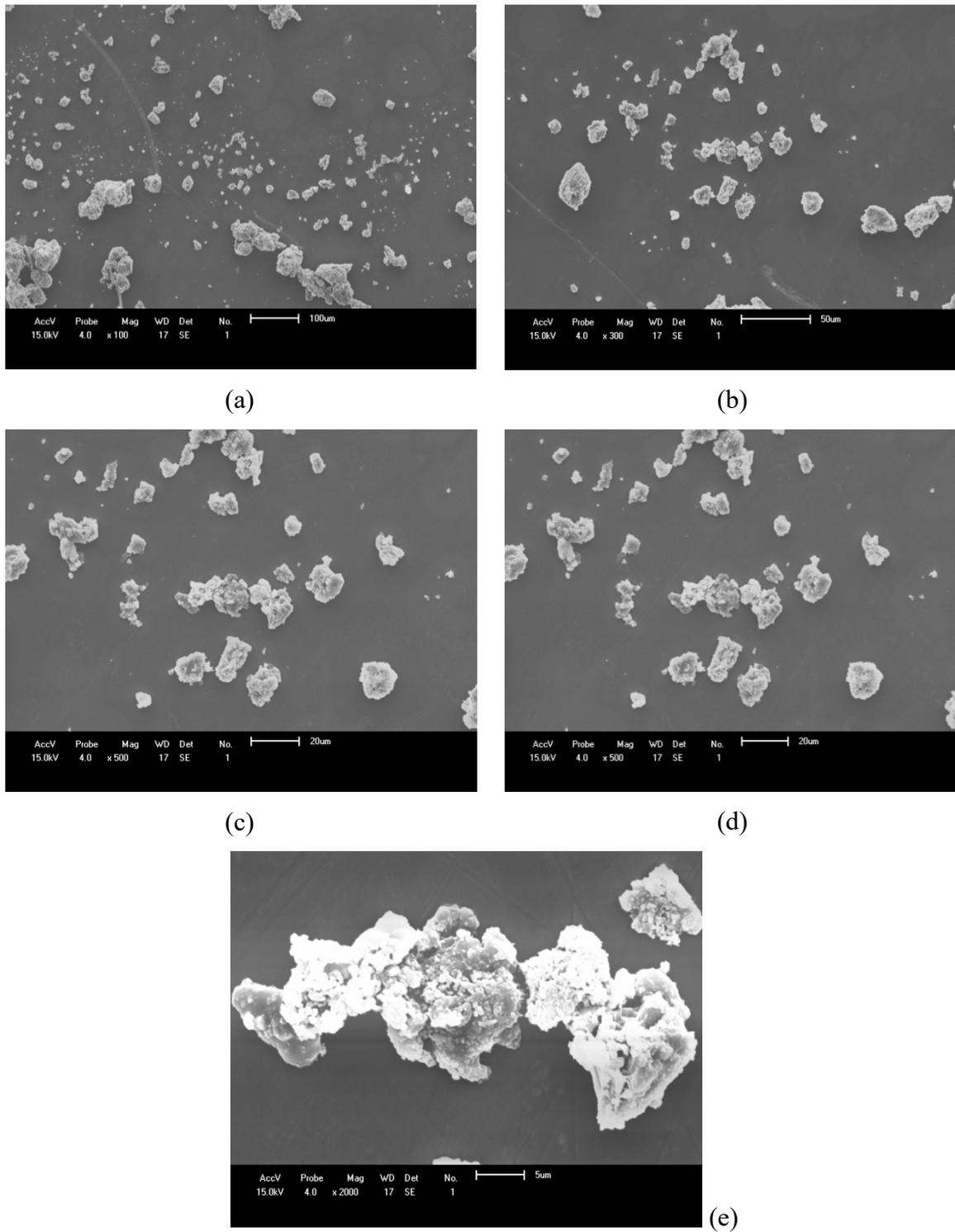


Figura 4.20 - Micrografias do amido de *Chlorella sp.* para o tratamento T5: (a) aumento de 100x; (b) 300x; (c) 500x; (d) 1000x; e (e) 2000x

4.3 - Caracterização química, física e físico-química da biomassa seca

Após 16 dias de cultivo as biomassas da *Chlorella* sp. dos diferentes tratamentos (TC, T1, T2, T3, T4, T5) foram secadas a 40 °C e caracterizadas quanto aos parâmetros químicos, físicos e físico-químicos (umidade; cinzas; lipídios; proteínas; açúcares totais; pH; clorofila; feofitina; atividade de água; amido; perfil de minerais; perfil de aminoácidos; e perfil de ácidos graxos).

Na Tabela 4.4 tem-se os resultados das análises químicas, físicas e físico-químicas da biomassa secada em estufa a 40 °C da *Chlorella* sp. cultivada de acordo com os tratamentos TC, T1, T2, T3, T4, T5. O tratamento T3 apresentou o maior teor de água com valor médio de 6,89% e o menor teor foi de 6,59% para o tratamento T4.

Tabela 4.4 - Valores médios das análises químicas, físicas e físico-químicas da biomassa seca de *Chlorella* sp. para os diferentes tratamentos

Parâmetro	Tratamento					
	TC	T1	T2	T3	T4	T5
Umidade (g/100 g)	6,74 bc	6,81 b	6,64 de	6,89 a	6,59 e	6,71 cd
Cinzas (g/100 g)	26,28 a	24,15 b	22,39 c	22,26 c	21,88 d	21,67 e
Lipídios (g/100 g)	5,23 f	11,48 e	12,30 d	14,25 c	19,27 a	16,81 b
Proteínas (g/100 g)	41,72 a	36,57 b	32,44 b	28,82 c	21,89 d	21,70 d
Açúcares totais (g/100 g)	8,85 e	9,68 d	10,42 c	17,77 b	17,75 b	20,37 a
pH	8,21 a	8,15 ab	8,08 ab	7,94 b	8,02 ab	8,14 ab
Clorofila (mg/g)	7,67 a	6,54 b	6,30 b	5,50 c	5,50 c	5,20 c
Feofitina (mg/g)	4,43 a	4,18 a	3,70 b	3,49 b	3,43 bc	3,12 c
Atividade de água (a _w)	0,496 ab	0,486 bc	0,503 a	0,490 abc	0,463 d	0,473 cd
Amido (g/100 g)	3,53 f	4,47 d	4,26 e	7,53 b	6,86 c	13,85 a

Obs.: médias seguidas da mesma letra minúscula nas linhas não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

Da Silva et al. (2014) encontraram teores de umidade superiores na *Spirulina* sp. seca em leite de jorro variando entre 8,8 - 9,8%. Teores de umidade inferiores ao da *Chlorella* sp. seca foram determinados por Brandalize (2014) na microalga *Chlorella pyrenoidosa* seca obtendo o valor de 4,21% e por Menezes et al. (2013) nas microalgas

Resultados e discussão

lioofilizadas com os teores de umidade de 1,78% em *Kirchneriella lunaris*, 2,36% em *Kirchneriella irregularis*, 2,38% em *Monoraphidium komarkovae*, 2,56% em *Tetranephris brasiliensis*, 2,85% em *Choricystis sp. (A)* e 3,93% em *Choricystis sp. (B)*.

As cinzas tiveram a maior concentração para o tratamento TC com teor médio de 26,28 g/100 g e o menor para T5 com 21,67 g/100 g. Analisando esses resultados observa-se sempre que a concentração de macronutrientes (N, P, K e Fe) é reduzida, o teor de cinzas diminui. Os teores de cinzas variam com a espécie, condições climáticas e com o meio de cultivo. Kobayashi et al. (2013) obtiveram ao analisar as cinzas da biomassa seca de *Chlorella sorokiniana* obtida em dois cultivos em meio BBM (Bold Basal Medium) valores de 23 g/100 g e 34 g/100 g. Valores inferiores de cinzas foram quantificados por Kent et al. (2015) na microalga *Nannochloropsis sp.* cultivada em meio f/2 (Guillard Medium) com teor de 11,32 g/100 g, na *Scenedesmus sp.* cultivada em BBM (Bold Basal Medium) com 15,72 g/100g, na *Dunaliella sp.* cultivada em meio MJM (Modified Johnson Media) com 19,29 g/100 g e na *Chlorella sp.* cultivada em meio BBM com 5,71 g/100 g.

A maior concentração lipídica foi determinada em T4 com um teor de 19,27 g/100 g e TC foi o tratamento que teve a menor concentração 5,23 g/100 g. A influência da redução dos elementos N, K, P e Fe modulou respostas de aumento do conteúdo lipídico, principalmente no tratamento T4, que teve adição de bicarbonato de sódio (0,08%); entretanto, T5 teve uma adição de bicarbonato de sódio superior (0,12%), mas obteve uma redução na produção de lipídeos em relação a T4. Esperava-se que T5 tivesse a maior produção em relação a T4, já que T5 recebeu maior concentração de bicarbonato de sódio e as mesmas concentrações dos demais nutrientes; supõe-se, então, que a concentração de 0,12% de bicarbonato de sódio em T5 pode ter influência direta na diminuição da produção de lipídeos. Moraes e Costa (2008) cultivaram a *Spirulina platensis* com suplementação de 16,8 g/L de bicarbonato de sódio e 0,038 g/L de CO₂ obtendo uma produção de lipídeos de 2,2%, sendo este teor muito inferior ao do presente trabalho para a biomassa seca da *Chlorella sp.* dos diferentes tratamentos.

Para os resultados das concentrações proteicas na biomassa seca de *Chlorella sp.* o tratamento TC apresentou a maior concentração com 41,72 g/100 g e a menor concentração foi de 21,70 g/100 g em T5. Nota-se que a síntese de proteínas ficou prejudicada com a redução dos macronutrientes, ocorrendo a redução no teor de proteínas. Este efeito foi verificando-se em culturas de *Chlorella* e *Spirulina* em que foi verificado que a síntese de proteínas é dependente da concentração de nitrogênio, fósforo e potássio

Resultados e discussão

(LOURENÇO et al., 2004; NGUYEN et al., 2013). Matos et al. (2015) reportaram um conteúdo de proteínas na *Chlorella* sp., cultivada em meio de cultura à base de concentrado de dessalinização, um teor de 45,27 g/100g, próximo ao do tratamento TC. Maurya et al. (2016) quantificaram na *Chlorella* sp. cultivada em meio à base de uréia fósforo e potássio um teor de proteínas de 36,31 g/100 g, sendo próximo ao do tratamento T1. De acordo com a legislação brasileira, RDC nº 54 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2012), um alimento para ser declarado com o atributo “alto conteúdo de proteínas” deve apresentar no mínimo 12 g/100 g de proteínas indicando que todos os tratamentos da biomassa seca de *Chlorella* sp. foram considerados com alto teor de proteínas.

Para a produção de açúcares totais o maior percentual foi produzido em T5 com 20,37 g/100 g e o menor percentual em TC com 8,85 g/100 g, indicativo de acúmulo de reserva na fase de menor oferta de macronutrientes e maior oferta de carbono; demonstrando claramente que a síntese de açúcares está diretamente ligada à maior oferta de carbono no meio de cultivo. Apesar de uma forte queda no crescimento celular, as células foram capazes de sustentar essa síntese indicando que com baixas concentrações dos elementos N, P, K e Fe a mesma foi capaz de aumentar significativamente a concentração dos açúcares intracelulares. Mizuno et al. (2013) observaram durante o cultivo da *Chlorella* sp. em meio TAP (Tris acetato fosfato) que ocorreu elevação na produção de açúcares, mas após duas semanas de cultivo ocorreu uma redução elevada dessa síntese de 21 para 7%, enquanto que a produção de lipídeos aumentou sugerindo-se que parte dos açúcares foi convertida em lipídeos.

O pH das biomassas secas variou entre 7,94 e 8,21, apresentando pH alcalino. O pH inicial do cultivo da *Chlorella* sp. ficou entre 6,9 a 7,2; no entanto, quando o processo de fotossíntese se inicia esses valores tendem a aumentar devido às espécies químicas geradas pela captação de carbono pelas células (LEKANG, 2007). Com isto, a biomassa no final do cultivo apresentou pH alcalino, apesar de parte dos íons contidos no meio ser retirada durante o processamento da biomassa porém à outra parte desses íons ainda permanece agregada à superfície das paredes celulares e intracelulares. Valores próximos foram obtidos por Tastan et al. (2016) para a *Chlorella* sp. cultivada em meio BG11 (Bold Green) obtendo pH na biomassa após secagem entre 7,5 a 8,5.

As concentrações de clorofila e feofitina na biomassa seca de *Chlorella* sp. foram maiores no tratamento TC, com 7,67 mg/g e 4,43 mg/g e as menores em T5, com 5,20 mg/g e 3,12 mg/g, respectivamente. Verifica-se uma tendência de redução na produção

Resultados e discussão

desses dois compostos quando houve redução de N, P, K e Fe. Valores superiores de clorofila foram encontrados por Fan et al. (2014) no cultivo da *Chlorella pyrenoidosa* em quatro diferentes condições de cultivo, meio completo (Guillard F/2 medium), meio com deficiência de nitrogênio, meio com deficiência de fósforo e meio com deficiência de ferro, obtendo 30 mg/g, 28 mg/g, 25 mg/g e 27 mg/g de clorofila presentes na biomassa seca, respectivamente. Uquiche et al. (2016) cultivaram a espécie *Botryococcus braunii* em meio BBM (Bold Basal Medium) e submeteram a biomassa seca à extração por fluido supercrítico, obtendo um teor de clorofila de 0,18 mg/g, sendo inferior ao da *Chlorella*. Syrett (1992) observou que as células algais podem se recuperar das baixas concentrações de nitrogênio no meio, com o conteúdo de clorofila aumentando após adaptação, mas se deve levar em conta as condições em que foram realizados os cultivos. Ainda de acordo com o autor anterior, em fotobiorreatores abertos pode ocorrer a fotoinibição em períodos do dia quando a isolação é mais elevada. Os tratamentos que tiveram maior densidade celular apresentaram maior concentração da clorofila e feofitina. Cazzaniga et al. (2014) verificaram, mutantes de *Chlorella*, que culturas cultivadas em tanques abertos apresentaram maior eficiência de divisão celular com produtividade de 30% a mais que em cultivos laboratoriais e concentrações mais elevadas de compostos clorofilados. Manter níveis elevados de carbono no meio pode favorecer a síntese de lipídeos e carboidratos, enquanto ao mesmo tempo, a síntese de clorofila e as proteínas ficam prejudicadas, dependendo dos níveis de macroelementos presentes no meio (ILLMAN et al., 2000; HEREDIA et al., 2010; FRANCISCO et al., 2010; CHI et al., 2014).

A atividade de água na biomassa seca de *Chlorella sp.* variou entre 0,463 e 0,503, com uma faixa considerada adequada para a estabilidade do produto. Quando a atividade de água baixa para 0,40, haverá possibilidade de ocorrer reações químicas e enzimáticas rápidas, pelo aumento da concentração de reagente mas para a_w próxima de 0,60 tem-se pouco ou nenhum crescimento microbiano (DAMODARAN, 2008). Valores inferiores de atividade de água foram verificados por Ferreira et al. (2005) para a farinha de mandioca temperada com valor de 0,280 e por Oliveira et al. (2015) que encontraram, para a polpa do fruto de mandacaru em pó, atividade de água variando de 0,313 a 0,351.

Verifica-se que a maior concentração de amido foi atingida no tratamento T5 com valor médio de 13,85 g/100 g e a menor produção no tratamento TC com 3,53 g/100 g; o tratamento T1 apresentou teor de amido de 4,47 g/100 g, T2 de 4,26 g/100 g, T3 de 7,53 g/100 g e T4 de 6,86 g/100 g. À medida que o nível de nitrogênio, fósforo e potássio foi

Resultados e discussão

reduzido, constata-se um acréscimo na síntese de amido. Valores superiores de amido foram encontrados por Zhu et al. (2014) quando cultivaram a espécie *Chlorella zofingiensis* utilizando redução de nitrogênio como estratégia para o aumento de síntese de amido e verificaram uma produção de 66,7 g/100 g na biomassa seca e por ANJOS et al. (2013) ao avaliando o cultivo da *Chlorella vulgaris* em diferentes condições de aeração e suplementação de CO₂ obtendo uma produção de amido entre 30 a 43 g/100g em base seca. Vonlanthen et al. (2015) verificaram na *Chlorella sorokiniana* cultivada em meio TAP teor de amido variando entre 6,8 e 35 g/100 g.

As baixas concentrações de NPK podem induzir as células de *Chlorella* sp. a síntese de amido sobretudo na presença de bicarbonato de sódio. Zhu et al. (2014) testaram duas possibilidades, concentrações elevadas de nitrogênio e concentrações mínimas, cujos resultados mostraram que as baixas concentrações de nitrogênio no cultivo fazem com que o microrganismo ative mecanismos para garantir sua sobrevivência, passando a estocar energia e desacelerando o crescimento. Em seus estudos, Choix et al. (2014) comprovaram que a enzima ADPase foi ativada quando os níveis de nitrogênio se encontravam críticos no meio de cultivo, o que causou maior absorção de carbono do meio e rápida síntese de amido. Comparot e Denyer (2009) detalharam as vias pelas quais o mecanismo de síntese de amido ocorre nas microalgas; todo processo se inicia a partir da enzima sacarose sintase formando moléculas intermediárias através da enzima AGPase, que converte ATP em ADPglucose, e a enzima amido sintase converte ADPglucose em amido.

Observa-se nos resultados obtidos para o amido que sempre que se decresceu os níveis de macronutrientes entre eles o nitrogênio, percebeu-se o decréscimo no crescimento com menor produção de biomassa e aumento do amido de reserva.

Tanadul et al. (2014) verificaram que a síntese de amido na *Chlorella sorokiniana* foi precedida de acúmulo de lipídios e sob condições de estresse o amido passou a ser parcialmente degradado, possivelmente para suportar a síntese de lipídios. Especulou-se que o acúmulo de amido tenha atuado como uma resposta rápida ao estresse ambiental enquanto o lipídeo serviu como armazenamento de energia em longo prazo. Esses autores, também verificaram que a influência da deficiência de enxofre no meio de cultivo é uma variável determinante para a produção de biomassa, promovendo o acúmulo transitório de amido, seguido de constante aumento de lipídeos.

4.3.1 – Perfil de minerais da biomassa seca de *Chlorella* sp.

Na Tabela 4.5 tem-se o perfil dos minerais das biomassas secas de *Chlorella* sp. obtidas nos tratamentos TC, T1, T2, T3, T4 e T5.

Observa-se que a concentração de cálcio foi maior na biomassa seca do tratamento T2 com teor de 17,50 g/100 g e a menor concentração em T1, com 5,60 g/100 g. Teores de cálcio inferiores (0,1388 a 2,9016 g/100 g) foram encontrados por Bertoldi et al. (2008) para a *Chlorella vulgaris* cultivada em diferentes meios de cultivo

O nitrogênio apresentou a maior concentração em TC, 5,36 g/100 g e a menor em T5, com 3,55 g/100 g.

O fósforo teve a maior concentração atingida em T4, com 5,12 g/100 g e a menor em T3, com 1,05 g/100g. Bertoldi et al. (2008) encontraram, para a *Chlorella vulgaris* teor de fósforo variando entre 1,3 a 3,53 g/100 g.

O magnésio teve a maior concentração em T3, com 2,35 g/100 g e a menor em T4, com 1,36 g/100 g. Para o potássio o maior valor foi atingido em TC, com 2,02 g/100 g e o menor em T4, com 0,42 g/100 g. Para o sódio, a maior concentração foi determinada em TC, com valor de 1,03 g/100 g e menor concentração em T2, com 0,21 g/100 g.

O ferro teve a maior concentração no TC, com 42,10 mg/100 g e T4 com a menor concentração de 23,00 mg/100 g. A concentração de manganês foi maior em TC com 18,90 mg/100g e o menor teor em T3 com 5,74 mg/100 g. O cobre foi encontrado em maior concentração em TC, com 18,70 mg/100g e a menor em T3, com 8,70 mg/100g. Para os resultados do elemento zinco obteve-se a maior acumulação em T2, com 1,60 mg/100 g e a menor acumulação em TC com 0,70 mg/100 g. O elemento níquel que teve o maior valor atingido foi em TC, com 8,90 mg/100 g e o menor valor em T3, com 4,58 mg/100 g. A maior concentração para o elemento enxofre foi atingida em T3, com 7,61 mg/100 g e a menor em T1, com 4,30 mg/100 g.

Tabela 4.5 – Perfil dos minerais das biomassas secadas dos diferentes tratamentos

Parâmetro	Tratamento					
	TC	T1	T2	T3	T4	T5
Cálcio (g/100 g)	7,15 e	5,60 f	17,50 a	16,48 b	9,60 d	15,65 c
Cobalto (mg/100 g)	5,62 a	4,90 b	3,67 c	2,87 e	3,22 d	3,55 c
Nitrogênio (g/100 g)	5,36 a	4,61 b	4,27 c	4,03 cd	3,84 d	3,55 e
Cobre (mg/100 g)	18,70 a	14,20 b	12,40 c	8,70 f	11,20 d	9,77 e
Enxofre (mg/100 g)	4,60 e	4,30 f	5,31 d	7,61 a	6,38 b	5,75 c
Ferro (mg/100 g)	42,10 a	35,50 b	24,12 e	26,76 c	23,00 f	24,64 d
Fósforo (g/100 g)	4,18 b	1,45 c	1,27 d	1,05 f	5,12 a	1,15 e
Magnésio (g/100 g)	1,66 e	2,25 b	2,19 c	2,35 a	1,36 f	2,03 d
Manganês (mg/100 g)	18,90 a	13,10 b	6,91 d	5,74 f	7,44 c	6,39 e
Níquel (mg/100 g)	8,90 a	7,69 b	5,28 d	4,58 e	6,10 c	5,24 d
Potássio (g/100 g)	2,02 a	1,00 b	0,53 d	0,46 e	0,42 e	0,91 c
Sódio (g/100 g)	1,03 a	0,49 d	0,21 e	0,55 c	0,62 b	0,47 d
Zinco (mg/100 g)	0,70 e	1,2 b	1,60 a	0,89 cd	0,93 c	0,87 d

Os resultados demonstram que as concentrações de minerais encontradas nesse estudo variaram com o meio de cultivo. Verifica-se que o cálcio foi o mineral com maior concentração na biomassa seca de *Chlorella* sp. em todos os tratamentos. De acordo com Brasil (2005) a Ingestão Diária Recomendada (IDR) para adultos de cálcio é de 1000 mg, indicando que a *Chlorella* sp. seca possui muito além deste valor em 100g. A *Chlorella vulgaris* é de acordo com o FDA (Food and Drug Administration) com um produto GRAS (Generally Recognized As Safe), isto é um produto “Geralmente reconhecido como seguro”.

Comparando-se os resultados das análises para os metais Cu, Fe, Mn, Ni e Zn com os resultados obtidos por Joe et al. (2015) com o cultivo da *Chlorella protothecoides* em meio BBM (Bold Basal Medium) e após pré-tratamento da biomassa com radiação obtiveram as seguintes concentrações desses metais: Cu 27,1 mg/100 g, Fe 18,52 mg/100 g, Mn 30,47 mg/100 g, Ni 0,28 mg/100 g, Zn 3,81 mg/100 g. Observa-se que essas concentrações foram acima das obtidas nesse estudo, exceto para Fe e Ni; esses minerais são importantes para a manutenção das células das microalgas e desempenham funções

Resultados e discussão

vitais; no entanto, podem ser bioacumulados na biomassa e em concentrações mais elevadas, se tornarem tóxicos para alimentação humana, ou animal (TREVIZANI 2014)

Não foram encontrados traços dos metais pesados, arsênio, bário, cádmio, cromo, chumbo, mercúrio, selênio, alumínio e prata, nas análises da biomassa da *Chlorella sp.* nos tratamentos TC, T1, T2, T3, T4 e T5, geralmente esses metais são absorvidos microalgas quando essas são cultivadas em águas residuárias que apresentam elevados níveis elevados desses metais; fora dessas condições, não são detectados em análises (TREVIZANI 2014).

4.3.2- Perfil dos aminoácidos

Na Tabela 4.6 se encontram os resultados do perfil dos aminoácidos da biomassa seca de *Chlorella sp.* dos tratamentos TC, T1, T2, T3, T4 e T5.

Observa-se que o teor total de aminoácidos variou entre 17,79 e 36,56 g/100 g, com a menor concentração para o tratamento T5 e a maior concentração para o tratamento controle TC, respectivamente. Valores superiores de aminoácidos foram quantificados por Andrade et al. (2007) na biomassa da *Chlorella vulgaris* cultivada em meio à base de fertilizante triplo 15 (Nutrimon 15-15-15®) produzindo total de 41,41 g/100 g de aminoácidos e por Kent et al. (2015) na biomassa de *Chlorella* cultivada em meio BBM (Bold Basal Medium) que obtiveram 39,9 g/100 g. Teor próximo ao dos tratamentos T2 e T3 foi verificado por Guccione et al. (2014) para a *Chlorella sp.* cultivada no meio BG11 (fresh water - based médium) com teor de 26,1 g/100 g e valor inferior foi verificado por Slocombe et al.(2015) com uma produção de 14,6 g/100 g na biomassa da *Chlorella vulgaris* cultivada no meio 3NBBM+V (Bold Basal médium modificado).

Constata-se que houve produção de 18 aminoácidos no tratamento T3 e de 17 aminoácidos nos tratamentos TC, T1, T2, T4 e T5. Quantificou-se, no tratamento T3, um teor de triptofano de 0,16 g/ 100 g; nos demais tratamentos não foi avaliado o teor de triptofano. Gorgônio (2013) investigou a produção de aminoácidos na biomassa da espécie *Chlorella pyrenoidosa* cultivada em meio F/2 (Guillard) relatando a produção de 18 tipos de aminoácidos incluindo o triptofano, com uma concentração superior na biomassa seca de 2,5 g/100 g.

Em todos os tratamentos a maior concentração dos aminoácidos foi dos essenciais, seguido, dos condicionalmente essenciais e em menor concentração os aminoácidos não essenciais. Dentre os aminoácidos essenciais o de maior concentração foi

Resultados e discussão

a L-leucina, dos condicionalmente essenciais foi a L-arginina e dos não essenciais o ácido L-glutâmico. Campos et al. (2010) cultivaram *Chlorella minutissima* em meio Conway, relatando valores de L-leucina de 7,9 g/100 g, L-arginina de 3,6 g/100 g e L-glutâmico de 11,1 g/100 g.

Tabela 4.6 - Perfil dos aminoácidos (g/100 g) da biomassa seca de *Chlorella* sp. dos tratamentos TC, T1, T2, T3, T4 e T5

Aminoácidos	Tratamentos (g/100 g)					
	TC	T1	T2	T3	T4	T5
L-Fenilalanina *	1,82	1,69	1,53	1,24	1,07	1,06
L-Lisina*	2,02	1,87	1,75	1,49	1,11	1,10
Triptofano*	-	-	-	0,16	-	-
L-Treonina*	2,43	2,22	2,17	1,58	1,33	1,30
L-Isoleucina*	2,70	2,43	2,15	1,38	1,38	1,31
L-Leucina*	3,00	2,76	2,49	1,83	1,64	1,61
L-Arginina**	3,72	3,35	3,03	2,42	1,94	1,89
L-Prolina**	1,55	1,65	1,61	1,62	1,02	1,03
L-Tirosina**	1,81	1,60	1,39	0,97	0,91	0,87
L-Cistina**	0,33	0,31	0,16	0,13	0,22	0,20
L-Serina**	2,00	1,77	1,60	1,36	0,99	0,97
Glicina**	2,06	1,91	1,77	1,26	1,19	1,17
L-Histidina**	0,74	0,66	0,56	0,60	0,36	0,33
L-Alanina	2,80	2,58	2,34	1,44	1,60	1,56
Ácido L-Aspártico	1,51	1,06	0,69	1,33	0,33	0,26
Ácido L-glutâmico	4,79	3,97	3,21	2,37	1,44	1,33
Total	36,56	32,83	29	23	18,45	17,79

*Aminoácidos essenciais; ** Aminoácidos condicionalmente essenciais; Sem asterisco são os aminoácidos não essenciais.

Nos tratamentos TC, T1 e T2, o aminoácido com maior teor foi o ácido L-glutâmico (aminoácido não essencial) com valores de 4,79, 3,97 e 3,21 g/100 g, respectivamente e L-arginina (aminoácido condicionalmente essencial) com teores de 3,72, 3,35 e 3,03 g/100 g, respectivamente. Comparados os resultados obtidos por Kent et al.

Resultados e discussão

(2015) que analisaram a biomassa seca de *Chlorella vulgaris*, produzida por uma empresa japonesa, a caracterização desse material apresentou 12,89 g/100 g de ácido L-glutâmico e 7,15 g/100 g de L-arginina

Verifica-se que, com a redução dos elementos N, P, K e Fe, a síntese de aminoácidos foi reduzida. O mesmo comportamento foi verificado por Lu et al. (2016) no cultivo de *Chlamydomonas nivalis* cultivada sob a privação de nitrogênio e fósforo. A soma das concentrações dos aminoácidos para cada tratamento foi de TC 36,56 g/100 g, T1 32,83g/100 g, T2 29 g/100 g, T3 23 g/100 g, T4 18,45 g/100 g e T5 17,79 g/100 g, sendo um indicativo de que a síntese de aminoácidos é dependente de macronutrientes, conforme relatado por Lu et al. (2016). Observou-se que os tratamentos com menores concentrações de NPK produziram as menores quantidades de aminoácidos totais.

4.3.3 - Perfil dos ácidos graxos

Na Tabela 4.7 tem-se as classes de ácidos graxos obtidos na caracterização cromatográfica das frações lipídicas extraídas da biomassa de *Chlorella* sp. dos tratamentos TC, T1, T2, T3, T4 e T5. Verifica-se que as maiores concentrações produzidas foram as seguintes: ácidos graxos saturados, com o tratamento T3, com o maior valor (24,39 g/100g); monoinsaturados, com o maior teor para o tratamento TC (30,47 g/100 g); poli-insaturados com maior teor atingido em T2 (28,09 g/100 g); ômega 3, com maior produção para o tratamento T2 com valor de 15,54 g/100 g; ômega 6, com maior teor para T5 com 12,57 g/100 g; trans-isômeros totais com destaque para T2 (3,80 g/100 g) e os ácidos graxos não identificados com maior produção em T3 de 33,89 g/100 g.

Observa-se, que para os tratamentos TC, T1, T4 e T5 que os maiores teores foram dos ácidos graxos monoinsaturados; para o tratamento T2 foi de poliinsaturados e para o tratamento T3 foi de ácidos graxos não identificados.

Chakraborty et al. (2016) reportaram uma produção de 29,14 g/100 g de ácidos graxos saturados e de 70,86 g/100 g de ácidos graxos insaturados na biomassa da *Chlorella minutissima* cultivada em meio TAP (tri acetato fosfato).

A maior concentração de ácidos graxos saturados foi produzida no tratamento T3 (24,39 g/100g) e a menor concentração em T2 (18,91 g/100 g) com uma diferença entre a maior e a menor concentração de 5,48 g. Kumar et al. (2016) cultivaram a espécie *Chlorella sorokiniana* em meio BG11 (Bold Green Medium) obtendo 23,82 g/100 g de

Resultados e discussão

ácidos graxos saturados, 41,61 g/100 g de monoinsaturados, 31,8 g/100g de poli-insaturados e de 2,77 g/100 g de ácidos graxos não identificados.

Para os ácidos graxos monoinsaturados a maior produção ocorreu em TC (30,47 g/100 g) e a menor produção em T4 (26,24 g/100 g) com diferença de 13,88% entre a maior e a menor produção. Ördög et al. (2016) reportaram a produção de ácidos graxos pela *Chlorella* sp. cultivada em meio MTM (Modified Tamiya Medium) obtendo 24 g/100 g de ácidos graxos saturados, 21,1 g/100 g de monoinsaturados, 23,5 g/100g de poli-insaturados e de 19,9 g/100 g de ácidos graxos não identificados.

Os ácidos graxos poli-insaturados apresentaram uma maior produção no tratamento T2 (28,09 g/100 g) e a menor produção em TC (15,57 g/100 g) representando uma diferença de 44,6%.

Para os ácidos graxos não identificados (N.I) a maior produção ocorreu em T3 (33,89 g/100 g) e a menor em T5 (17,27 g/100 g) com diferença de 49,0%.

Tabela 4.7 - Perfil das classes dos ácidos graxos (g/100 g) da *Chlorella* sp. nos diferentes tratamentos

Ácidos graxos	Tratamento					
	TC	T1	T2	T3	T4	T5
Saturados	22,67	21,16	18,91	24,39	22,69	19,31
Monoinsaturados	30,47	26,45	26,53	18,48	26,24	28,50
Poli-insaturados	15,57	26,21	28,09	15,93	24,21	27,36
Ômega 3	3,20	13,67	15,54	8,18	13,06	14,79
Ômega 6	12,37	12,54	12,55	7,75	11,15	12,57
Trans-isômeros totais	0,41	3,02	3,80	2,91	3,04	3,16
N.I.	26,47	18,76	18,28	33,89	19,43	17,27

N.I. - não identificado

Fan et al. (2014) reduziram os níveis de ferro e nitrogênio no cultivo da *Chlorella pyrenoidosa* obtendo uma elevação nos níveis de lipídeos totais e, em maior quantidade de triacilglicerol (TAG), com grande parte do percentual lipídico constituído por ácidos graxos saturados neutros, ácidos graxos com essas características podem não ser adequados para o consumo em dietas humanas porém podem ser empregados na produção de biocombustíveis ou para outras finalidades. Radmann e Costa (2008) produziram 37,8% de

Resultados e discussão

ácidos graxos saturados em cultura de *Chlorella vulgaris* usando, como estimuladores de produção o CO₂, SO₂ e NO, dependendo dos estímulos utilizados na cultura pode-se direcionar a produção de ácidos graxos com perfis específicos para sua aplicabilidade (ROSENBERG et al., 2014; LIU et al., 2015).

Na Tabela 4.8 tem-se a composição dos ácidos graxos da *Chlorella* sp. dos tratamentos TC, T1, T2, T3, T4 e T5. Analisando os resultados verifica-se que foram identificados 19 ácidos graxos na *Chlorella* sp.

O perfil dos ácidos graxos saturados apresentou variações em todos os tratamentos, apresentando o ácido láurico (C12:0) a maior produção no tratamento controle TC (1,49 g/100 g) e a menor produção em T2 (0,61 g/100 g), com diferença de 59,06% entre a maior e a menor produção; o ácido mirístico (C14:0) teve a maior concentração para o tratamento T3 (2,18 g/100 g) e a menor concentração para TC (0,58 g/100 g), a diferença entre a maior e a menor produção foi de 73,4%; o ácido pentadecanoico (C 15:0) apresentou a maior concentração para o TC (2,54 g/100 g) e a menor produção em T2 (1,04 g/100 g) com uma diferença entre a maior e a menor produção de 59,06%; o ácido palmítico (C16:0) apresentou a maior produção em T3 (13,42 g/100 g) e a menor em TC (10,67 g/100 g) tendo uma diferença de 20,5% entre a maior e a menor concentração; e o ácido margárico (C 17:0) obteve a maior produção em TC (3,62 g/100 g) e a menor em T2 (0,71 g/100 g) diferença de 80,4% entre o, maior e a menor produção; o ácido esteárico (C18:0) apresentou a maior produção em T4 (4,03 g/100 g) e a menor em T2 (2,61 g/100 g) com uma diferença de 35,3% entre a maior e a menor produção.

Os ácidos graxos monoinsaturados apresentaram as seguintes concentrações: para o ácido ω7 palmitoleico (C16:1) houve produção desse ácido graxo nos tratamentos T1, T2, T3, T4 e T5, com a maior produção em T3 (1,01 g/100 g) e menor produção em T4 (0,35 g/100 g), apresentando diferença de 188% entre a maior e a menor produção; o ácido graxo cis-10-heptadecanóico (C17:1) teve a maior concentração alcançada em TC (9,83 g/100 g) e a menor produção em T3 (0,18 g/100 g) com uma diferença de 98,2%; o ácido graxo ω 9 trans elaídico (C18:1) só foi produzido nos tratamentos T1, T2, T3 e T5 com a maior produção alcançada em T2 (0,61 g/100 g) e a menor em T1 (0,19 g/100 g) com uma diferença de 68,9% entre a maior e menor produção; o ácido graxo ω 9 oleico(C18:1) teve a maior produção no tratamento TC (20,64 g/100 g) e a menor produção em T3 (17,80 g/100 g) tendo uma diferença entre a maior e a menor produção de 13,76% e o ácido graxo

Resultados e discussão

C20:1 ω 11 cis-11- eicosenoico que só foi produzido nos tratamentos T2 (0,21 g/100 g) e T3 (0,20 g/100 g) apresentando baixa concentração.

Choi et al. (2014) testaram o meio de cultivo f/2 (meio Guillard) com deficiência de nitrogênio no cultivo de *Chlorella* sp. durante 27 dias verificando apenas dois tipos de ácidos graxos monoinsaturados, C16:1 e C18:1. Observa-se que as variações de macro nutrientes foram capazes de modular a produção de ácidos graxos específicos como, por exemplo, a produção do ácido graxo C20:1 ω 11 cis-11-eicosenoico, que só foi produzido nos tratamentos T2 e T3 indicando que é possível obter resultados de síntese de novos ácidos graxos e encontrar as rotas metabólicas possíveis de serem ativadas pelo balanceamento de nutrientes no meio de cultivo (LU et al., 2014).

Tabela 4.8 - Perfil dos ácidos graxos (g/100 g) da *Chlorella* sp. nos diferentes tratamentos

Ácidos graxos (g/100 g)	Tratamento					
	TC	T1	T2	T3	T4	T5
C12:0 Láurico	1,49	0,65	0,61	1,22	0,85	0,76
C13:0 Tridecanoico				0,11		
C14:0 Mirístico	0,58	0,63	0,63	2,18	0,70	0,72
C15:0 Pentadecanoico	2,54	1,21	1,04	1,52	1,75	1,28
C16:0 Palmítico	10,67	13,24	12,73	13,42	13,17	12,30
C16:1 ω 7 Palmitoleico	-	0,50	0,54	1,01	0,35	0,54
C17:0 Margárico	3,62	1,05	0,71	0,86	1,35	0,94
C17:1 Cis-10-heptadecanoico	9,83	6,60	6,52	0,18	7,69	8,11
C18:0 Estearico	3,77	3,82	2,61	3,76	4,03	2,95
C18:1 ω 9trans Elaídico	-	0,19	0,35	0,61	-	0,28
C18:1 ω 9 Oléico	20,64	19,36	19,25	17,08	18,20	19,85
C18:2 ω 6trans-linoleico	0,41	2,83	3,44	1,96	3,04	2,89
C18:2 ω 6 Linoleico	12,37	12,54	12,55	7,75	11,15	12,57
C 20:0 Araquídico				0,31		
C20:1 ω 11 cis-11- eicosenoico		-	0,21	0,20	-	-
C 18:3 ω 3 trans-linolênico				0,33		
C18:3 ω 3 alfa-linolênico	3,20	13,67	15,54	8,18	13,06	14,79
C22:0 Behênico	-	0,33	0,35	0,21	0,58	0,35
C24:0 Lignocérico	-	0,21	0,22	0,43	0,25	-

Os ácidos graxos poli-insaturados apresentaram para, o ácido ω 6 linoleico (C18:2) a maior produção em T2 (12,57g/100 g) e a menor produção em TC (7,75 g/100 g) com diferença entre a maior e a menor produção de 38,4%; para os ácidos graxos ω 3 alfa-linolênico (C18:3) a maior produção foi em T2 (15,54 g/100 g) e a menor produção em TC (3,20 g/100 g) com uma diferença de 79,4%. Geralmente essa classe de ácidos graxos faz

Resultados e discussão

parte da maioria das microalgas, porém o nível de alguns poli-insaturados pode não ser produzido em algumas condições (TAKESHITA et al., 2014).

Os ácidos graxos trans-isômeros totais Omega 6 trans-linoléico T5 atingiu a maior concentração com 3,44 g/100 g, e a menor produção T2 volume de 0,41 g/100 g, diferença de 88,08%; para o ácido graxo ω 3 trans-linolênico só o tratamento T3 produziu esse ácido com teor de 0,33 g/100 g.

A microalga *Chlorella* sp. é caracterizada pela capacidade de produzir diversos tipos de ácidos graxos. Costa et al. (2006) cultivaram as espécies *Chlorella vulgaris* e a *C. minutissima* obtendo um conteúdo de ácido oleico (C18:1) de 34,13% e de palmitoleico (C16:1 ω 7) de 82,63%, respectivamente.

Kumar et al. (2016) cultivaram a microalga *Chlorella* sp. em meio BG11 (Bold Green) modificado obtendo uma produção de ácido graxo palmítico (C16:0) de 19,72 g/100 g, de ácido palmitoléico (C16:1) de 11,76 g/100 g, de ácido oleico (C18:0) de 29,85 g/100 g e de ácido linoleico (C18:2) de 31,80 g/100 g.

Vários fatores podem modular a produção de lipídios e ácidos graxos nas microalgas, como intensidade luminosa, temperatura nutrientes, entre outros. Dentre os nutrientes que podem modular a produção de lipídios e ácidos graxos, estão as fontes de nitrogênio e de enxofre, elementos esses, essenciais para a síntese de ácidos graxos nas microalgas (PIRT, 1986; HIRANO et al., 1990; THOMPSON, 1992; NGANGKHAM et al., 2012; MARTIN et al., 2014; LU et al., 2016).

4.4- Isotermas de adsorção de umidade

Foram construídas as isotermas de adsorção de umidade da biomassa de *Chlorella* sp. secadas 40 °C, a correspondentes aos tratamentos TC, T1, T2, T3, T4 e T5, na temperatura de 25°C.

Na Tabela 4.9 se encontram os valores dos parâmetros dos modelos de Oswin, GAB e Peleg ajustados às isotermas de adsorção de umidade da biomassa seca de *Chlorella* sp. para os tratamentos TC, T1, T2, T3, T4 e T5, os coeficientes de determinação (R^2) e os desvios percentuais médios (P) na temperatura de 25 °C.

Verifica-se que todos os coeficientes de determinação (R^2) apresentaram valores acima de 0,97 e desvios percentuais médios (P) inferiores a 10%, indicando que todos os modelos testados (GAB, Peleg e Oswin) para a predição das isotermas de adsorção de

Resultados e discussão

umidade da *Chlorella* sp. seca podem ser usados com precisão. Vários pesquisadores encontraram boas estimativas de isotermas com esses modelos (RIBEIRO et al., 2016; SILVA et al., 2015; LIMA et al., 2008; ALEXANDRE et al., 2007). O modelo que melhor se ajustou aos dados experimentais das isotermas para os Tratamentos TC, T1, T2 e T4, foi o de Peleg e para os tratamentos T3 e T5 foi o de GAB.

Tabela 4.9 - Parâmetros, coeficientes de determinação (R^2) e desvios percentuais médios (P) do modelo Oswin, GAB e Peleg ajustados às isotermas de adsorção de umidade a 25 °C da biomassa seca de *Chlorella* sp. para os tratamentos TC, T1, T2, T3, T4 e T5

Modelo	Tratamento	Parâmetro		R^2	P (%)		
		a	b				
Oswin	TC	5,3563	0,5237	0,9974	2,04		
	T1	5,7243	0,5278	0,9868	5,56		
	T2	6,1936	0,5313	0,9834	5,02		
	T3	5,1677	0,5134	0,9842	7,42		
	T4	4,9262	0,6295	0,9860	7,42		
	T5	5,9119	0,6019	0,9980	1,36		
Tratamento		X_m	C	K	R^2	P (%)	
GAB	TC	2,8427	117,1637	0,9267	0,9941	2,86	
	T1	3,1491	33,1764	0,9220	0,9909	4,69	
	T2	4,4858	2,5589	0,8853	0,9918	4,84	
	T3	4,4257	2,0589	0,9064	0,9933	5,20	
	T4	9,4789	0,3951	0,8278	0,9960	3,81	
	T5	3,2570	68,7968	0,9499	0,9987	2,33	
Tratamento		K_1	n_1	K_2	n_2	R^2	P (%)
Peleg	TC	30,8481	17,749	13,7767	1,2627	0,9989	1,36
	T1	25,3102	6,7153	6,1091	0,0252	0,9958	2,52
	T2	6,0412	0,2670	25,5107	5,4444	0,9960	2,61
	T3	24,2719	4,1146	1,7216	-1,036	0,9871	6,49
	T4	29,5145	5,4416	3,4002	-0,054	0,9977	1,69
	T5	34,7553	10,0032	11,4451	0,79226	0,9979	2,66

Resultados e discussão

Este comportamento era previsto de vez que, geralmente, quanto maior o número de parâmetros dos modelos melhor é o ajuste.

Verifica-se para o modelo de Oswin que a constante 'a' teve valores variando entre 4,9262 (T4) e 6,1936 (T2) e para a constante 'b' de 0,5134 (T3) a 0,6295 (T4), estando de acordo com Blahovec (2004) que citou que para este modelo, que os valores para a constante 'a' devem ser maiores que zero e para a constante 'b' devem ser entre zero e 1,0. Valores próximos foram verificados para a isoterma de adsorção de água, a 20 °C, da farinha das fibras residuais secadas, de manga com 'a' igual a 7,79 e 'b' igual a 0,88 (SILVA et al., 2015).

O modelo de GAB apresentou valores da umidade na monocamada molecular (X_m) variando entre 2,8427 (TC) e 9,4789% (T4). O valor de X_m indica a quantidade de água que se encontra fortemente adsorvida aos sítios ativos na superfície dos produtos e está também relacionado com a estabilidade do produto, sendo considerado como o melhor valor para a garantia da estabilidade do produto (GABAS et al., 2009; FABRA et al., 2011). Teores de umidade na monocamada molecular (X_m) dentro dessa faixa foram encontrados para a spirulina secada com valores de 6,9, 7,3 e 8,2%, nas temperaturas de 10, 20 e 30 °C, respectivamente (OLIVEIRA et al., 2009a).

A constante C determina a força de ligação das moléculas de água aos sítios primários sobre a superfície do produto (MUZAFFAR e KUMAR, 2016) e variou entre 0,3951 (T4) a 117,1637 (TC). Oliveira et al. (2009b) encontraram para a *Spirulina platensis* valores de C variando entre 36,14 e 37,41.

A constante K do modelo de GAB variou entre 0,8278 a 0,9499, sendo próximos ao determinado por Oliveira et al. (2009a) para as isotermas de adsorção da spirulina seca que variou entre 0,92 e 0,97. O valor de K fornece a medida das interações entre as moléculas nas multicamadas e o adsorvente, e tende a se situar entre o valor da energia das moléculas na monocamada e a água líquida (CANO-HIGUITA et al., 2015).

Analisando os valores dos parâmetros K e C do modelo de GAB e de acordo com a classificação de Blahovec (2004) as isotermas de adsorção de umidade da biomassa seca de *Chlorella* sp. para os tratamentos TC, T1 e T5 foram classificadas como tipo II ($0 < K \leq 1$, $C > 2$) e para T2, T3 e T4 como tipo III ($0 < K \leq 1$, $0 \leq C \leq 2$).

As isotermas de adsorção de umidade da biomassa de *Spirulina platensis* seca por convecção, por liofilização e por secagem por aspersão, também foram classificadas como

Resultados e discussão

sendo dos Tipos II e III (DONATO, 2015) e para a *Chlorella* secada Oliveira et al. (2009b) classificaram como Tipo II.

Os parâmetros do modelo de Peleg variaram entre os tratamentos: K_1 variou de 6,0412 (T2) a 34,7553 (T5), K_2 de 1,7216 a 25,5107, n_1 de 0,2671 a 17,7499 e n_2 de -0,0547 a 5,4444. Silva et al. (2015) encontraram valores de K_1 , K_2 , n_1 e $n_2 > 1,0$, para a isoterma de adsorção de água da farinha de fibras residuais de manga na temperatura de 20 °C, com $R^2 = 0,99$ e $P = 0,74$.

Na Figura 4.22 tem-se as isotermas de adsorção de umidade, a 25 °C, da biomassa de *Chlorella sp.* secada para os tratamentos TC, T1, T2, T3, T4 e T5 ajustadas pelos modelos de Oswin, GAB e Peleg. Verifica-se que, as isotermas de adsorção de água do tipo III, têm formato de J e, segundo a classificação de Brunauer et al. (1940) são geralmente típicas de alimentos ricos em compostos solúveis, como alimentos com alto teor de açúcares ou sais; e as do Tipo II são sigmoidais, em forma de S, típicas de produtos solúveis, com tendência assintótica. Isotermas de amido de batata, amilopectina e amilose em pó, também foram classificadas como Tipo II (AL-MUHTASEB et al., 2004).

Observa-se que o teor de umidade de equilíbrio (X_{eq}) das amostras aumentou com o aumento da atividade de água (a_w) e variou entre 3,84 e 28,30% b.s. Todos os tratamentos tiveram umidades de equilíbrio muito próximas, com poucas variações, justificadas pela ocorrência de pequenas diferenças na composição das amostras.

Alcântara et al. (2009) também verificaram para a isoterma de adsorção de umidade a 25 °C do pedúnculo seco de caju que, com o aumento da a_w houve aumento de X_{eq} e que na a_w de 0,86 a X_{eq} foi de 29,42% b.s., sendo próximo ao da *Chlorella sp.* seca que em a_w de 0,93 apresentou X_{eq} de 28,30% b.s., mesmo tendo composições químicas muito diferentes.

A mesma tendência foi verificada para o modelo de Peleg com comportamento semelhante encontrado por vários pesquisadores (MCMINN e MAGEE, 2003; AGUIRRE-CRUZ et al., 2010; CLAUDERA-OLIVEIRA et al., 2011; CHISTÉ et al., 2012; SPADA et al., 2013).

Segundo Goula et al. (2008) a sorção de água nos alimentos é um fenômeno complexo e os principais constituintes de adsorção de água nos alimentos são os polímeros (proteínas, amido, celulose, hemicelulose, etc.) e os açúcares.

Resultados e discussão

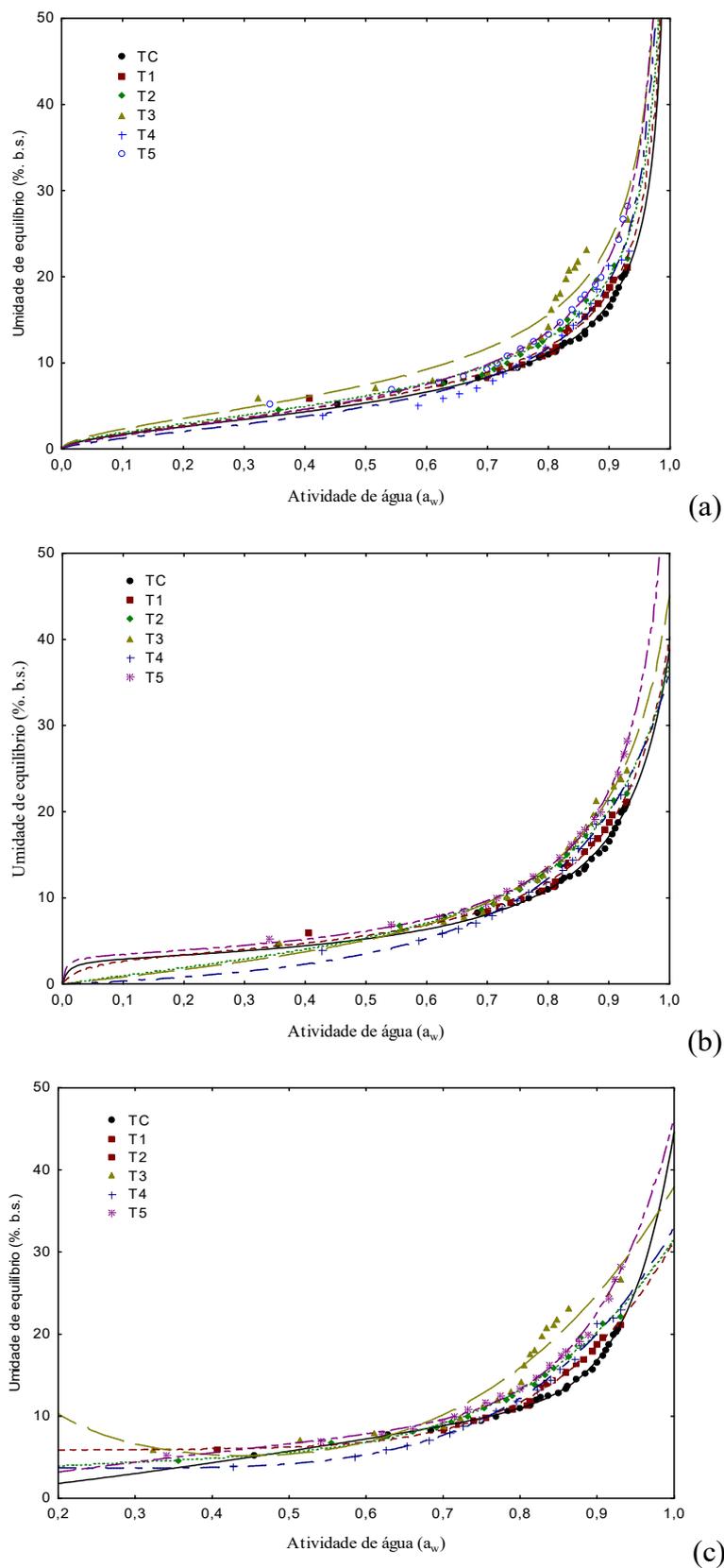


Figura: 4.21 - Isotherma de adsorção de umidade, a 25 °C, da biomassa de *Chlorella sp.* seca para os diferentes tratamentos com ajustes pelos modelos de Oswin (a), GAB (b) e Peleg (c)

Resultados e discussão

Os diferentes grupos polares dos polímeros proporcionam, energeticamente diferentes sítios para sorção e quando um polímero adsorve água sofre alterações na constituição, dimensões e em outras propriedades. A sorção de água também leva a transformações dos açúcares contidos no alimento.

5- CONCLUSÕES

- A relação entre a maior produtividade de lipídeos, de açúcares e crescimento celular, deve ser levada em conta uma vez que, ao reduzir os níveis dos macronutrientes, o crescimento celular decresce, ocorrendo a necessidade de se comparar a produção de biomassa e percentuais de produção de lipídeos e açúcares, para encontrar o ponto médio entre as duas condições.

- A maior produção de biomassa da *Chlorella* sp. foi alcançada nos tratamentos TC, T1 e T2 no 10º dia de cultivo, com teores entre 3,63-4,85 g/L de biomassa seca verificando-se que seu cultivo é viável para aplicação em cultivos comerciais;

- A síntese de lipídeos foi aumentada com a modulação dos componentes do meio de cultivo com a maior produção para o tratamento T4 (18,69 g/100 g) no 8º dia de cultivo;

- A concentração de açúcares totais foi aumentada com a modulação dos nutrientes do meio de cultivo, alcançando produção máxima para o tratamento T5 (20,37 g/100g) no 16º dia de cultivo;

- A modulação dos componentes do meio de cultivo (N, P, K, Fe) favoreceu a síntese de amido intracelular, com a maior produção para o tratamento T5, indicando que essa estratégia pode ser uma ferramenta para a produção de matérias fermentescíveis;

- As atividades de água nas biomassas secas apresentaram valores entre 0,463-0,503, consideradas na faixa ideal para evitar o crescimento microbiano;

- Os modelos de GAB, Peleg e Oswin podem ser usados para estimar as isotermas de adsorção de umidade, a 25 °C, da *Chlorella* sp. secas de todos os tratamentos;

- As isotermas de adsorção de umidade das biomassas secas de *Chlorella* sp. foram classificadas como tipo II para os tratamentos TC, T1, e T5 e como tipo III para T2, T3 e T4;

6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAM, F.; VIAN, M. A.; PELTIER, G.; CHEMAT, F. “Solvent-free” ultrasound assisted extraction of lipids from fresh microalgae cells: a green, clean and scalable process. **Bioresource Technology Journal**, v. 114, n. 1, p. 457–465, 2012.

ADAMSON, A.W.; GAST, A.P. **Physical chemistry of Surfaces**. 6 th ed. New York: John Wiley & Sons, 1997. v. 2, p. 808

ADERLÂNIO, S. C.; GLÁUCIA, E. G. V.; ANELISE, K. M. O uso de microalgas para a obtenção de biocombustíveis. **Brazilian Journal of Biosciences**, v. 9, n. 4, p. 542-549, 2011.

AGUIRRE-CRUZ, A. CASTILLO, A. A.; ROSALES, T. C.; GARCIA, R. C.; BELLO-PEREZ, L. A. Moisture adsorption behavior of banana flours (*Musa paradisíaca*) unmodified and modified by acid-treatment, **Starch**, v. 62, n. 12, p. 658-666,2010.

ALCÂNTARA, S. R.; ALMEIDA, F. A. C.; SILVA, F. L. H.; GOMES, J. P. Isoterma de adsorção do pendúnculo seco do caju. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 13, n. 1, p 81-87, 2009.

ALEXANDRE, H. V.; FIGUEIRÊDO, R. M. F.; QUEIROZ, A. J. M. Isotermas de adsorção de umidade da pitanga em pó. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 7, n. 1, p. 11-20, 2007.

AL-MUHTASEB, A. H.; MCMINN, W. A. M.; MAGEE, T. R. A. Water sorption isotherms of starch powders Part 1: mathematical description of experimental data. **Journal of Food Engineering**, v. 61, n. 3, p. 297–307, 2004.

ANDRADE, D. R.; TORRES, R.; MONTES, E. J.; FERNÁNDEZ, Y. A. C. Obtaining of flour to leave of the cultivation of *Chlorella vulgaris* and their protein analysis. **Temas Agrários**, v. 12, n.1, 2007.

ANJOS, M.; FERNANDES, B. D.; VICENTE, A. A.; TEXEIRA, J. A.; DRAGONE, G. Optimization of CO₂ bio-mitigation by *Chlorella vulgaris*. **Biorsource Technology**, v. 139, n. 2, p. 149-154, 2013.

ANVISA. Resolução da diretoria colegiada - RDC nº 54, de 12 de novembro de 2012. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/630a98804d7065b981f1e1c116238c3b/Resolucao+RDC+n.+54_2012.pdf?MOD=AJPERES> acesso em 07 de maio 2016.

AOAC - Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis. 14th ed. Arlington, 1997. 1141p.

AOAC. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. Method nr 991.20. **AOAC**: Washington D.C., 2005.

APT, K. E.; BEHRENS, W. Commercial developments in microalgal Biotechnology, **Journal of Phycology**, v. 35, n. 12, p. 215-226, 1999.

BADDORF, H. D. S.; CHUCK, C. J.; MOKEBO, K.R.; DONALD, H. M.; DAVIDSON, M. G.; SCOTT, R. J. Bioprospecting the thermal waters of the Roman baths: isolation of oleaginous species and analysis of the FAME profile for biodiesel production. **AMB Express**, v. 3, n. 9, p. 234 - 261, 2013.

BAILEY, J. M.; NEISH, A. C. Starch synthesis in *Chlorella vulgaris*. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 32, n. 4, p. 452 - 464, 1954.

BARUFFALDI, R.; OLIVEIRA, M. N. **Fundamentos da tecnologia de alimentos**. São Paulo: Atheneu, v. 3, 317 p 1998.

BAUMGARTNER, T. R. S.; BURAK, J. A. M.; KOGIKOSKI, M. E.; SEBASTIEN, N. Y.; ARROYO, P. A. Avaliação da produtividade da microalga *Scenedesmus acuminatus*

(Lagerheim) Chodat em diferentes meios de cultivo. **Revista Brasileira de Biociências**. Porto Alegre, v. 11, n. 2, p. 250 – 255, 2013.

BECKER, E. W. **Microalgae Biotechnology and microbiology**. Cambridge, Cambridge University Press, 1994. 301p.

BENEMANN, J. R.; OSWAL, W. J. Systems and economic analysis of microalgae ponds for conversion of CO₂ to biomass: Final report to the Department of energy. Pittsburgh Energy Technology Center Under grant no Defg 22-93PC3203. Pittsburgh: DOE, 1996. 201 p.

BENEMANN, J. R. Opportunities and challenges in algae biodiesel production. Singapura: Centre for Managements Technology. 2008. 15p.

BERTOLDI, F. C., SANT'ANNA, E. & OLIVEIRA, J. L. B. Revisão: **Biotechnologia de Microalgas**. Curitiba: *B. CEPPA*, v.26, n.1, p. 9-20, 2008a.

BERTOLDI, F. C.; SANT'ANNA, E.; OLIVEIRA, J. L. B. Teor de clorofila e perfil de sais minerais de *Chlorella vulgaris* cultivada em solução hidropônica residual. **Ciência Rural**, v.38, n.1, p.54-58, 2008b.

BHATNAGAR, A.; M. BHATNAGAR.; CHINNASAMY, K. DAS. Chlorella minutíssima – A promising Fuel alga for cultivation in municipal wastewaters. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 161, n. 1, p. 523 – 536. 2010.

BILANOVIC, D.; SHELEF, G.; SUKENIK, A. Flocculation of microalgae with cationic polymers – effects of médium salinity **Biomass**, v. 17, p. 65-76, 1988.

BINAGHI, L.; DEL BORGHI, A.; LODI, A.; CORVERTI, A.; DEL BORGHI, M. Batch and fed-batch uptake of Carbon dioxide by *Sp.irulina platensis* **Process Biochemistry**. v. 38, p. 1341-1346, 2003.

BLAHOVEC, J. Sorption isotherms in materials of biological origin mathematical and physical approach. **Journal of Food Engineering**, v.65, p.489-495, 2004.

BOROWITZKA, M. A. Comercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. **Journal of Biotechnology**, v. 25, p. 313-321, 1999.

BRANDALIZE, M. V. **Extração de óleo de *Chlorella pyrenoidosa* assistida em ultrassom**. 2014. 89 f. Dissertação (Engenharia Química) Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Métodos FísicoQuímicos para Análise de Alimentos**. 4. ed. Brasília, 2005. 1018 p.

BROWN , M.L.; ZEILER, K.G. Aquatic biomass and carbon dioxide trapping. **Energy Conversion and Management**, v. 34, n.9, p. 1005 1013, 1993.

BRUNAUER, S.; DEMING, L. S.; TELLER, E. On a theory of Van der Waals adsorption of gases. **Journal of the American Chemical Society**, v.62, p.1723-1732, 1940.

C. M. da S. GORGÔNIO.; DONATO, A. G. A.; SÔNIA, C. Morphological and chemical aspects of *Chlorella pyrenoidosa*, *Dunaliella tertiolecta*, *Isochrysis galbana* and *Tetraselmis gracilis* microalgae. **Natural Science**, vol.5, no.7, p. 783-791, 2013.

CAMPOS, V. B.; BARBARINO, E.; LOURENÇO, S. O... "Crescimento e composição química de dez espécies de microalgas marinhas em cultivos estanques." **Ciência Rural**, v.40.n. 2, p. 339 - 347, 2010.

CANO-HIGUITA, D. M.; VILLA-VÉLEZ, H. A.; TELIS-ROMERO, J.; VÁQUIRO, H. A.; TELIS, V. R. N. Influence of alternative drying aids on water sorption of spray dried mango mix powders: A thermodynamic approach. **Food and Bioproducts Processing**, v. 93, p. 19–28, 2015.

CAPRISTE, G.H.; ROTSTEIN, E. Prediction of sorption equilibrium data for starch-containing foodstuffs. **Journal of Food Science**, Chicago, v.47, n. 2, p.1501-1507, 1982.

CARVALHO, A. P.; MEIRELLES, L. A.; MALCATA, F. X. Microalgal reactors. A review of enclosed system designs and performances. **Biotechnology Progress**. v. 22, n. 4, p. 1490-1506, 2006.

CAZZANIGA, S.; DALL'OSTO, L.; SZAUB, J.; BALLOTTARI, M.; PURTON, S.; BASSI, R. Domestication of the green alga *Chlorella sorokiniana*: reduction of antenna size improves light-use efficiency in a photobioreactor. **Biotechnology Biofuels**, v.21; n. 7, p. 157, 2014.

CETESB. Análise de Clorofila a como Ferramenta no Monitoramento da qualidade das Águas. **Cadernos da Gestão do Conhecimento**. São Paulo, 2014. 83p.

ÇETINKOL, O. P.; SMITH – MORITZ, A. M.; CHENG, G. L. J.; GEORGE, A, et al. (2012). Structural and Chemical Characterization of Hardwood from Tree Species with applications as **Bioenergy Feedstocks** **PLoS ONE**, v. 7 n. 12, p. 55 - 64, 2012.

CHAKRABORTY, S.; MOHANTY, D.; GHOSH, S.; DAS, D. Improvement of lipid content of *Chlorella minutissima* MCC 5 for biodiesel production. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. v. 20, n. 20, p. 1 - 7, 2016.

CHEN, C. Y.; CHANG, H. Y.; CHANG, J. S. Producing carbohydrate-rich microalgal biomass grown under mixotrophic conditions as feedstock for biohydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 41, n. 5, p. 4413 - 4420, 2016.

CHENG, Y.; LU, Y.; GAO, G.; WU, Q. Alga-based biodiesel production and optimization using sugar cane as feedstock. **Energy & fuels**. v. 23, n. 10, p. 4166-4177, 2009.

CHEOL S. C.; WOON, Y. C.; DO, H. K.; HYEON, Y. L. Production of Biodiesel from *Chlorella* sp.. Enriched with Oyster Shell Extracts. Hindawi Publishing Corporation **BioMed Research International**, v. 1, n. 2, p. 1 - 8, 2014.

CHI, Z.; ELOY, F.; XIE, Y.; HU, Y.; CHEN, S. Selection of microalgae and cyanobacteria strains for bicarbonate-based integrated carbon capture and algae production system. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 172 n.1, p. 47-57, 2013.

CHISTÉ, R. C. et al. Sorption isotherms of tapioca flour. **International Journal of food Science and Technology**, v. 47, n. 4, p. 870-874, 2012.

CHOI, C. S.; CHOI, W. Y.; KANG, D.H.; LEES, H.Y. Production of Biodiesel from *Chlorella* sp.. Enriched with Oyster Shell Extracts. **Hindawi Publishing Corporation BioMed Research International**, v. 4, n. 5, p. 8-19, 2014.

CHOIX, F. J.; DE-BASHAN, L. E.; BASHAN. Enhanced accumulation of starch and total carbohydrates in alginate immobilized *Chlorella* sp.p. Induced by *Azospirillum brasilense* I. Autotrophic conditions. LA PAZ (MÉXICO). **Enzyme Microbiology Technology**, v.10, n. 3, p. 8 - 19, 2012.

CLADERA-OLIVEIRA, F. et al. Modeling water adsorption isotherms of Pinhão (*Araucária angustifolia* seeds) flour and thermodynamic analysis of the adsorption process. **Journal of Process Engineering**, v. 34, p. 826-843, 2011.

COMPAROT-MOSS, S.; DENYER, K. The evolution of starch biosynthetic pathway in cereals and other grasses. **Journal Experimental Botany**, v. 6, n. 9, p. 92 - 112, 2009.

CORNET, J. F.; DUSSAP, C. G.; CLUZEL, P.; DUBERTRET, G. A structured model for simulation of culture of cyanobacterium *Sp. irulina platensis* in photobioreactors: II Identification of kinetic parameters under light and mineral limitation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 40, n. 6, p. 826-834, 1992.

COSTA, J. A.; MORAES, M. G. The role of Biochemical Engineering in the products of biofuels from microalgae **Biosource Technology**, v. 102, n.2, p. 2-9, 2011.

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

CREITZ, G. I.; RICHARDS, F. A. The estimation and characterization of plankton populations by pigment analysis: III a note on the use of “Millipore” membrane filters in the estimation of plankton pigments. **Journal. Marine. Research**, v. 14, n. 3, p. 211-216, 1955.

CRISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 11, p. 294-306, 2007.

CRISTI, Y. Biodiesel from microalgal beats bioethnol. **Trends in Biotechnology**, v. 26 n. 3. P. 126-131, 2008.

CRUZ RUI VOGT ALVES DA. Estudo da utilização de microalgas e cianobactérias para a captura de dióxido de carbono e produção de matérias primas de interesse industrial/ R.V.A da Cruz – ed. rev. – SÃO PAULO, 2011. Departamento de engenharia química da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo.

DA SILVA, T. S.; DA SILVA, K. T.; DOS SANTOS, D. D.; LARROSA, A. P. Q.; PINTO, L. A. A. Análise das propriedades funcionais protéicas da *Spirulina sp.* seca em leite de jorro. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v. 1, n. 1, p. 1-5, 2014.

DALRYMPLE, O. K.; HALFHIDE, T.; UDOM, I.; GILLES, B.; WOLAN, J.; ZHANG, Q.; ERGAS, S. Wastewater use in algae production for generation of renewable resources: a review and preliminary results. **Aquatic Biosystems**, v. 9, n.:2, p.46 - 63, 2013.

DAMODARAN S, PARKIN K.L., FENNEMA O.R. Fennema’s Food Chemistry CRC Press, 4 Ed, 2008.

DONATO, N. R. Secagem de *spirulina* (*Spirulina platensis*) e utilização na produção de biscoitos. 117 f. 2015. Tese (Doutorado em Engenharia de Processos) – Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, 2015.

DOUCHA, J.; STRAKA, F.; LIVANSKY, K. Utilization of flue gas for cultivation of microalgae (*Chlorella sp.*) in an outdoor open thin-layer photobioreactor. **Journal of Applied Phycology**, v. 17, n. 6, p. 403-412, 2005.

DRAGONE, G., FERNANDES, B.D., ABREU, A.P., VICENTE, A.A. & TEIXEIRA, J.A. Nutrient limitation as a strategy for increasing starch accumulation in microalgae. **Applied Energy**, v. 88, n. 10, p. 3331-3335, 2011.

ERIKSEN, N. T. The technology of microalgal culturing. **Biotechnology Letters**, v. 30, n. 4, p. 1525 - 1526, 2008.

ESTEVEZ, F. A. Fundamentos de limnologia. **Rio de Janeiro: Interciência**. 1998, 575 p.

FABRA, M. J.; MÁRQUEZ, E.; CASTRO, D.; CHIRALT, A. Effect of maltodextrins in the water-content–water activity–glass transition relationships of noni (*Morinda citrifolia* L.) pulp powder. **Journal of Food Engineering**, v. 103, p. 47–51, 2011.

FALKOWSKI, P. G.; RAVEN, J. A. Aquatic photosynthesis Malden: **Blackwell Science**, 1997. 375 p.

FAN, J.; XU, H.; WAN, M.; HUANG, J.; WANG, W.; LI, Y. Impacts of CO₂ concentration on growth, lipid accumulation, and carbon-concentrating-mechanism-related gene expression in oleaginous *Chlorella*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 5, p. 51 - 62, 2015.

FAN, J.; YANBIN, CUI.; MINXI, WAN.; WEILIANG, WANG.; YUANGUANG, LI. Lipid accumulation and biosynthesis genes response of the oleaginous *Chlorella*

pyrenoidosa under three nutrition stressors. Shanghai CHINA **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, n. 17, p. 2 - 14, 2014.

FELLOWS, P. J. Tecnologia do processamento de Alimentos: princípios e prática. 2 ed. Porto Alegre; **Artmed**, 2006. 602p.

FERREIRA NETO, C. J.; R. F. M. FIGUEIREDO.; A. J. M. QUEIROZ. Avaliação sensorial e da atividade de água em farinhas de mandioca temperadas. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 29, n. 4, p. 795-802, 2005.

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

FIRESTONE, D. (Ed). **Official Methods** end recommended practices of the American oil Chemists Society. 6^a ed Urbana: AOCS, 2009. met. Ce 1f – 96, p. 1-7; ; met Ce 1-62, p. 14.

FOOD STANDARDS AGENCY. Mc Cance and Widdowson's the composition of foods. sixth Summary Edition. Cambridge. 2002, Royal Society of Chemistry. 537 p.

FRANCISCO, E., D.; NEVES, E.; JACOB-LOPES, AND T. FRANCO. 2010 Microalgae as feedstock for biodiesel production: Carbon dioxide sequestration, lipid production and biofuel quality. J. Chem. Technol. Biotechnol. Microalgae as feedstock for biodiesel production: Carbon dioxide sequestration, lipid production and biofuel quality. **Journal. Chemistry. Technology**, v. 85, p. 395-403, 2010.

FRANCO, A. L.C.; LÓBO, I. P.; CRUZ, R. S.; TEIXEIRA, C. M. L. L.; NETO, J. A. A. MENEZES, R. S. Biodiesel de microalgas: avanços e desafios. **Química nova**, v. 36, n. 3, p. 437-448, 2013.

GABAS, A. L.; TELIS-ROMERO, J.; GIRALDO-GÓMEA, G. I.; TELIS, V. R. N. Propiedades termodinámicas de sorción de agua de la pulpa de lulo en polvo com encapsulantes. **Ciências e Tecnologia de Alimentos**, v.29, n. 4, p. 911-918, 2009.

GAROFALO, R. Algae and aquatic biomass for a sustainable production of 2nd generation biofuels. **AquaFUELS – Taxonomy, Biology and Biotechnology**. v. 3, n. 1 p, 1 -258, 2011.

GAZZONI, DÉCIO LUIZ, 2012, Os desafios do biodiesel de algas. Disponível em: < <http://www.biodieselbr.com/noticias/colunistas/gazzoni/desafios-biodiesel-algas60212.htm> >. Acesso em maio de 2015.

GOJKOVIC, C.; VILCHEZ, C.; TORRONTERAS, R.; VIGARA, J.; JACINTO, V. G.; JANZER, N.; ARIZA, J. L. G.; MÁROVÁ, I.; GARBAYO, I. Effect of Selenate on Viability and Selenomethionine Accumulation of *Chlorella sorokiniana* Grown in Batch Culture. **Hindawi Publishing Corporation e Scientific World Journal**, v. 71, n. 7, p. 1 - 13, 2014.

GOULA, A. M.; KARAPANTSIOS, T. D.; ACHILIAS, D. S.; ADAMOPOULOS, K. G. Water sorption isotherms and glass transition temperature of spray dried tomato pulp. **Journal of Food Engineering**, v. 85, n. 1, p. 73–83, 2008.

GREENWELL, L. M. L.; LAURENS, L.; SHIELDB, R. J.; LOVITT, R. W.; FLYNN, K. J.. Placing microalgae on the biofuels priority list: A review of the Techological challenges. **Journal of the Royal Society Interface**,v 7, n. 3, p. 703-726,2010.

GRIMA, E. M.; BELARBI, E. H.; FERNANDEZ, F. G. A.; MEDINA, A. R.; CHISTI, Y. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process ophons and economies. **Biotechnology Advances**, v. 20, n. 2, p. 491-515, 2003.

GRIMA, E. M.; PEREZ, J. A. S.; SANCHEZ, J. L. G.; CAMACHO, K. G.; ALONSO, D. L. EPA. From *Isochrysis galbana*; Growth conditions and produtividade. **Process Biochemistry**, v. 27, n.8, p. 299-305, 1992.

GROBBELAAR, J. V.; 2004. Algal nutrition. In: Richmond, A, editor. Handbook of microalgal culture: **Biotechnology and applied phycology**, p. 97-115.

GUCCIONE, A.; BIODI, N.; SAMPIETRO, G.; BASSI, L. R. N.; TREDICI, M. R. *Chlorella* for protein and biofuels: from strain selection to outdoor cultivation in a Green Wall Panel photobioreactor. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5, n. 1, p. 1 - 12, 2014.

HAGEN, S. R.; FROST, B.; AUGUSTIN, J. Pre-column phenylisothiocyanate derivatization and liquid-chromatography of aminoacids in food. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, Gaithersburg, v. 72, n. 6, p. 912-916, 1989.

HARTMAN, L.; LAGO, R. C. A. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. *lab. Practice*, v. 22, n 8, p. 475 – 476, 1973.

HARUN, R., DANQUAH, M.K. & FORDE, G.M. Microalgal biomass as a fermentation feedstock for bioethanol production. **Journal of Chemical Technology Biotechnology**, v. 85, n. 2, 199-203, 209, 2009.

HENRARD, A. A.; DA ROSA, G. M.; MORAES, L.; DE MORAIS M. G.; COSTA, J. A.; Effect of the carbon concentration, blend concentration, and renewal rate in the growth kinetic of *Chlorella sp.*. **Scientific World Journal**, v. 1. n. 5, p. 1 - 9, 2014.

HEREDIA-ARROYO, T. W.; WEI, AND B. HU. Oil accumulation via heterotrophic/mixotrophic *Chlorella protothecoides*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* Oil accumulation via heterotrophic/mixotrophic *Chlorella protothecoides*. **Applied Biochemistry**, v. 162, n. 9, p. 1978-1995 2010.

HIRANO, M.; MORI, H.; MURA, Y.; MATSUNAGA, N.; NAKAMURA, N.; Matsunaga, T.; **Applied. Biochemistry. Biotechnology**, v. 1, n. 3, p. 24 - 83, 1990.

HO, S. H.; HUANG, S. W.; CHEN, C. Y.; HASUNUMA, T.; KONDO, A.; CHANG, J. S. Bioethanol production using carbohydrate-rich microalgae biomass as feedstock. **Bioresource Technology**, v. 135, n. 11, p. 191 - 198, 2013.

HOEK, V. D.; MANN, D. G.; JAHNS, H. M.; *Algae: introduction to phycology*. **Cambridge: Cambridge university Press**, 1995. 623 p.

HONDA, B.; BOONNORAT, J.; CHIEMCHASIRI, C.; CHIEMCHASIRI, W.; YAMAMOTO. Carbon dioxide capture and nutrients removal utilizing treated sewage by concentrated microalgae cultivation in a membrane photobioreactor. **Bioresour Technology**, v. 7, n. 10, p. 59 - 64, 2012.

HORWITZ, W.; LATMER, JR.; GEORGE W. (Ed). **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 18^a Ed. 2005. Current Through Revision 3, 2010 Gaithersburg. Maryland: AOAC, 2010. Chapter 41, met. 996.06, p. 20.

HOUJIAN.; YANG JING.; ZHANG PEIDONG. Life Cycle Analysis on Fossil Energy Ratio of Algal Biodiesel: Effects of Nitrogen Deficiency and Oil Extraction Technology. **Hindawi Publishing Corporation the Scientific World Journal**, v. 2, n. 6, p. 1 - 9, 2015.

HU, Q., SOMMERFELD, M., JARVIS, E., GUIRARDI, M., POSEWITZ, M., SEIBERT, M. & DARZINS, A. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuels production: perspectives and advances. **The Plant Journal**, v.54, n. 12, p. 621-639, 2008.

HUANG, G., CHEN, F., WEI, D., ZHANG, X. & CHEN, G. 2010. Biodiesel production by microalgal biotechnology. **Applied Energy**, v.87, n. 7, p. 38-46, 2010.

HUSS, V. A.; CINIGLIA, C.; CENNAMO, P.; COZZOLINO, S.; PINTO, G.; POLLIO, A. Phylogenetic relationships and taxonomic position of *Chlorella*-like isolates from low pH environments (pH < 3.0) **BMC Evolutionary Biology**, v. 4, n. 2, p. 1 - 9, 2002,

ILLMAN, A. M., A. H. SCRAGG, AND S. W. SHALES. Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium. *Enzyme Microb. Technol.* Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium. **Enzyme Microbiology**, v. 27, n. 15, p. 631-635, 2000.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. v. 1: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 27.

JASIM, M. S.; MAYSAM, A. M. A. Bioethanol Production from Green Alga *Chlorella Vulgaris* Under Different Concentrations of Nitrogen. **Asian Journal of Natural e Applied sciences**, v. 3, n. 3, p. 27 - 36, 2014.

JOE, M. H.; KIM, J. Y.; LIM, S.; KIM, D. H.; BAI, S.; PARK, H.; LEE, S. G.; HAN, S. J.; CHOI, J. "Microalgal lipid production using the hydrolysates of rice straw pretreated with gamma irradiation and alkali solution." **Biotechnology for biofuels**. v.8, n.1, p. 1 - 9, 2015.

KALPANA MANANDHAR-SHRESTHA & MARK HILDEBRAND. Development of flow cytometric procedures for the efficient isolation of improved lipid accumulation mutants in a *Chlorella sp.* Microalga. **Journal Applied Phycology**, v. 25, n. 11, p. 1643–1651, 2013.

KARAM, L. M.; SOCCOL, C. R. Efeito da temperatura e pH no cultivo de *Spirulina major*. **Aqüicultura Ciência Veterinária Zoologia**, v. 10, n. 1, p. 5-7, 2007.

KENT, M.; WELLADSEN, H. M.; MANGOTT, A.; LI, Y. (2015) Nutritional Evaluation of Australian Microalgae as Potential Human Health Supplements. **Plos One**, v.10, n. 2, p. 13 - 71, 2015.

KIM, S.; KIM, H.; KO, D.; YAMAOKA, Y.; OTSURU, M.; YAMADA, M. K.; SHIKAWA, T.; OH, H. M.; NISHIDA, Y. L.; LEE, Y. Rapid induction of lipid droplets in

Chlamydomonas reinhardtii and *Chlorella vulgaris* by Brefeldin A. **Plos One**, v. 8, n. 12, p. 1-12, 2013.

KLEIN, BRUNO COLLING. K673c cultura de microalgas para a produção de bioetanol de terceira geração. BRUNO COLLING KLEIN - Campinas. SP. [s n.]. 2013.

KNOWLES, E.; CASTENHOLZ, R. W. Effect of exogenous extracellular polysaccharides on the desiccation and freezing tolerance of rock-inhabiting phototrophic microorganisms. Colorado Boulder, CO, USA. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 66, n. 4, p. 261-270, 2008.

KOBAYASHI, N.; NOEL, E. A.; BARNES, A.; ROSENBERG, J.; DIRUSSO, C.; BLACK, P.; OYLER, G. A. Rapid Detection and Quantification of Triacylglycerol by HPLC–ELSD in *Chlamydomonas reinhardtii* and *Chlorella* Strains. **Lipids** v.48, n. 5, p. 1035 - 1049, 2013.

KUMAR, V.; MUTHURAJ, M.; PALABHANVI, B.; DAS, D. Synchronized growth and neutral lipid accumulation in *Chlorella sorokiniana* FC6 IITG under continuous mode of operation. **Bioresource Technology**. v. 200, n. 10, p. 770 - 779, 2016.

LARROSA, A. P. Q.; COMITRE, A. A.; VAZ, L. B.; PINTO, L. A. A. Efeito da ruptura celular em diferentes métodos de secagem no conteúdo de ficocianina da *Arthrospira Spirulina*. **Congresso Brasileiro de Sistemas Particulados**, de 18 a 21 de outubro de 2015, na cidade de São Carlos - SP.

LAURENS, L. M. L.; QUINN, M.; WYCHEN, S. V.; TEMPLETON, D.; WOLFRUM, E. Accurate and reliable quantification of total microalgal fuel potential as fatty acid methyl esters by in situ transesterification. **Analytical Bioanalytical Chemistry Springer**, v. 3, n. 6, p. 167 - 178, 2012.

LEE, R. E. Phycology. **Cambridge: Cambridge University Press Cambridge, UK**, 2008, 560 p.

LEE, Y. K. Microalgal mass culture systems and methods: their limitations and potential. **Journal of Applied Phycology**, v. 13, n. 16, p. 307-315, 2001.

LEKANG, O. I. Aquaculture engineering. **Oxford**; Ames, Iowa: Blackwell pub, 2007. 308 p.

LEONEL, M.; SARMENTO, S. B. S.; CEREDA, M. P.; CÂMARA, F. L. A. Extração e caracterização de amido de jacatupé (*Pachyrhizus ahipa*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n. 2, p.362-365, 2003.

LI, X., HU, H.Y., GAN, K. Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp.. **Bioresour. Technology**, v. 101, n. 20, p. 5494–5500, 2010.

LI, Y.; CHEN, Y. F.; CHEP, P.; MIN, M.; ZHOU, W.; MARTINEZ, B.; ZHU, J.; RUAN, R. Characterization of a microalga *Chlorella* sp. well adapted to highly concentrated municipal wastewater for nutrient removal and biodiesel production. **Bioresour. Technology**, v. 102, n. 8, p. 5138 - 5144, 2011.

LIMA, E. E.; SILVA, A. S.; FIGUEIRÊDO, R. M. F.; QUEIROZ, A. J. M. Estudo das isotermas e calor isostérico de adsorção da farinha da coroa de frade. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 10, n. 2, p. 163-170, 2008.

LIMOUSIN, G.; GAUDET, J. P.; CHARLET, L.; SZENKNECT, S.; BARTHE'S, V.; KRIMISSA, M. Sorption isotherms: A review on physical bases, modeling and measurement. **Applied Geochemistry**, v. 22, n. 14, p. 249–275, 2007.

LIRA, RAFAEL DE ARAÚJO. DSc... UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA Agosto de 2011. Estudo do rendimento de biomassa da microalga nativa *Chlorella* sp.. Visando a obtenção de biocombustíveis. Tese de Doutorado.

LIU, X.; WANG, X.; YANGX. J.; LIU, S.; JIANG, L.; QU, Y.; HU, L.; OUYANG, Q.; TANG, C. Reliable cell cycle commitment in budding yeast is ensured by signal integration. **Journal List Elife**, v. 4, n.3, p. 1 - 19, 2015.

LORENZEN, C. J. Determination of chlorophyll and pheopigments: sp. ectrophotometric equations. **Limnology. Oceanography**, v. 12, n. 2, p. 343-346, 1967.

LOURENÇO, S. O. Cultivo de microalgas marinhas – princípios e aplicações. São Carlos: **RiMa**, 2006. 588 p.

LOURENÇO, S. O. et al. Distribution of intracellular nitrogen in marine microalgae: Calculation of new nitrogen-to-protein conversion factors. **European Journal of Phycology**, v. 39, n. 1, p. 17-32, 2004.

LU, N.; CHEN, J. H.; WEI, D.; CHEN, F.; CHEN, G. Global Metabolic Regulation of the Snow Alga *Chlamydomonas nivalis* in Response to Nitrate or Phosphate Deprivation by a Metabolome Profile Analysis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 5, p. 694 - 713, 2016.

LU, Q.; ZHOU, W.; MIN, M.; MA, X.; MA, Y.; CHEN, P.; ZHENG, H.; DOAN, Y. T. T.; LIU, H.; CHEN, C.; URRIOLOA, P. E.; SHURSON, G. C.; RUAN, R. Mitigating ammonia nitrogen deficiency in dairy wastewaters for algae cultivation. **Bioresource Technology**. v. 201, n. 3, p. 33 - 40, 2014.

MALCATA, F. X: Microalgae and biofuels: a promising partnership? **Trends Biotechnology**, v. 29, n. 15, p. 542–549, 2011.

MANANDHAR, S.; KALPANA.; MARK, H. "Development of flow cytometric procedures for the efficient isolation of improved lipid accumulation mutants in a *Chlorella sp.* microalga." **Journal of applied phycology**. v. 25.n. 6, p. 1643 - 1651, 2013.

MANSFELDT, C. B.; RICHTER, L. V.; AHNER, B.; COCHLAN, W. P.; RICHARDSON, R. E. Use of De Novo transcriptome libraries to characterize a novel oleaginous marine *Chlorella* species during the accumulation of triacylglycerols. **Plos one**, v. 11, n. 2, p. 2 -14, 2016.

MARQUES, L. G. Liofilização de frutas tropicais. 2008. 255p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, SP, 2008.

MARTIN, A.; FRANCESCO G. A Single-Step Method for Rapid Extraction of Total Lipids from Green Microalgae. **Plos one**, v. 9, n. 2, 43 - 64, 2014.

MATA, T.M., MARTINS, A.A. & CAETANO, N.S. 2010. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 6, p. 217-232.

MATHIAS, A. CHIA.; ANA. T. LOMBARDI.; MARIA, G. G. M. Growth and biochemical composition of *Chlorella vulgaris* in different growth media. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 85, n. 4, p. 1427-1438, 2013.

MATOS, A. P.; MORIOKA, L. R. I.; SAMT'ANNA, E. S.; FRANÇA, K. B. Protein and lipid contents from *Chlorella sp.* Cultivated in residual concentrated desalination. **Ciência Rural**, v. 10, n. 3, p. 1 - 7, 2015.

Matos, Ângelo Paggi Potencialidades de *Chlorella vulgaris* cultivada em meio à base de concentrado de dessalinização (dissertação) / Ângelo Paggi Matos; orientador, Ernani Sebastião Sant' Anna. Florianópolis, SC, 2012.

MAURYA, R.; PALIWAL, C.; CHOKSHI, K.; PANCHA, I.; GHOSH, I.; SATPATI, G. G.; PAL, R.; GHOSHA.; MISHRA, S. Hydrolysate of lipid extracted microalgal biomass residue: An algal growth promoter and enhancer. **Bioresource Technology**, v. 207, n. 16, p. 197 - 204, 2016

MCMINN, W. A. M.; MAGEE, T. A. Thermodynamic properties of moisture sorption of potato. **Journal of Food Engineering**, v. 60, n. 2, p. 157-165, 2003.

MEDIPALLY S. R.; YUSOFF F. M.; BANERJEE S.; SHARIFF M. Microalgae as Sustainable Renewable Energy Feedstock for Biofuel Production. Hindawi Publishing Corporation **BioMed Research International**, v. 5, n. 13, p. 1 - 13, 2015.

MENEZES, R. S.; LELES, M. I. G.; SOARES, A. T.; FRANCO, P. I. B. 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. 36, n. 1, p. 10-15, 2013.

MIAO, X. & WU, Q. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. **Bioresource Technology**, v.97, n. 19, p. 841-846, 2006.

MILLER, G. L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

Miranda, J. R. P. C. 2011. Produção de bioetanol a partir da microalga *Scenedesmus obliquus*. Caparica: FCT - Universidade Nova de Lisboa, 2011.

MIRÓN, A. S.; GOMEZ, A. C.; CAMACHO, F. G.; GRIMA, E. M.; CRISTI, Y. Comparative evaluation of compact photobioreactors for large-scale culture of microalgae. **Journal of Biotechnology**, v. 70, n. 6, p. 249-270, 1999.

MIZUNO, Y.; SATO, N.; ZACHLEDER, V.; WATANABE, K.; HIRATA, A.; TAKESHITA, T.; OTA, S.; SATO, N.; ZACHLEDER, V.; TSUZUKI, M.; KAWANO, S. Sequential accumulation of starch and lipid induced by sulfur deficiency in *Chlorella* and *Parachlorella* species. **Bioresource Technology**, v. 129, n. 1, p. 150 - 155, 2013.

MOHSENPOUR, S. F.; RICHARDS, B.; WILLOUGHBY, N. Spectral conversion of light for enhanced microalgae growth rates and photosynthetic pigment production. **Bioresour Technology**, v. 31, n. 125, p. 75 - 85, 2012.

GARCIA-MALEA, M. C.; ACIÉN, F. G.; RÍO E. D.; FERNÁNDEZ, J. M.; CERÓN, M. C.; GUERRERO M. G.; MOLINA-GRIMA, E. Production of astaxanthin by *Haematococcus plarialis*: Taking the one-step system outdoors. **Biotechnology Bioenergy** v. 102, n. 2, p. 651 - 658, 2009.

MORAIS, M. G. & COSTA, J. A. V. Biofixation of carbon dioxide by *Sp. irulina sp.* and *scenedesmus obliquus* cultivated in a three-stage serial tubular photobioreactor. **Journal. Biotechnology**, v. 129, n. 12, p. 439 - 445, 2007.

MORAIS, M. G., COSTA, J. A. V. Photo bioreactor tubular for removing or fixing of carbon dioxide, greenhouse gases using micro algae and cyan bacteria, involves reducing emissions of main gas responsible for global warming and other gases of greenhouse effect. Patent Number: BR200702736-A, 2008c.

MORIOKA, L. R. I.; MATOS, Â. P.; OLIVO, G.; SANT'ANNA, E. S. flocação de *Chlorella sp.* produzida em concentrado de salinização e estudos de extração de lipídeos intracelulares. **Química Nova**, v. 37, n. 1, p. 44-49, 2014.

MOSTERT, E. S.; GROBBELAAR, J. V. The influence of nitrogen and Phosphorus on algal cultures. **Biomass**, v. 13, n. 3, p. 219-233, 1987.

MOURA NETO, L. G.; ROCHA, E. M. F.; AFONSO, M. R.; COSTA, J. M. C. Adsorption isotherms of hog plum (*Spondias mombin* L.) pulp powder obtained by spray dryer. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 37, n. 2, p. 273-277, 2015.

MUZAFFAR, K.; KUMAR, P. Moisture sorption isotherms and storage study of spray dried tamarindo pulp powder. **Powder Technology**, v. 291, p. 322–327, 2016.

MYERS, J.; BURR, G. O. Studies on photosynthesis some effects of light of high intensity on *Chlorella*. **Journal of General Physiology**. v. 24 n. 1, p. 45 – 67, 1940.

NAOKO, K.; ERIC, A. N.; AUSTIN, B.; JULIAN, R.; CONCETA, D.; PAUL, B.; GEORGE, A. O. A. Rapid detection and quantification of triacylglycerol by HPLC–ELSD in *Chlamydomonas reinhardtii* and *Chlorella* strains. **Lipids**, v. 48, n. 8, p. 1035–1049, 2013.

NAYAK, M.; THIRUNAVOUKKARASU, M.; MOHANTY, R. Cultivation of freshwater microalga *Scenedesmus* sp. using a low-cost inorganic fertilizer for enhanced biomass and lipid yield. **Journal General and Applied microbiology**, v. 62, n. 1, p. 7 – 13, 2016.

NDIKUBWIMANA, T.; ZENG, X.; MURWANASHYAKA, T.; MANIRAFASHA, E.; HE, N.; SHAO, W.; LU, Y. Harvesting of freshwater microalgae with microbial bioflocculant: a pilot-scale study. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, n. 47, p. 1 – 11, 2016.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Princípios de Bioquímica de Lehninger. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011. 1302 p.

NGANGKHAM, M., RATHA, S. K., PRASANNA, R.; SAXENA, A. K.; DHAR, D. W.; SARIKA, C.; NARAYANA, R. B. Biochemical modulation of growth, lipid quality and productivity in mixotrophic cultures of *Chlorella sorokiniana*. **Journal Springer Plus**, v. 1, n. 33, p. 1 - 13, 2012.

NGUYEN, H. M.; CUINÉ, S.; ADRIANO, A. B.; LÉGERET, B.; BILLON, E.; AUROY, P.; BEISSON, F.; PELTIER, G.; BEISSON, Y. L. The Green Microalga *Chlamydomonas reinhardtii* Has a Single ν -3 Fatty Acid Desaturase That Localizes to the Chloroplast and Impacts Both Plastidic and Extrplastidic Membrane Lipids. **Plant Physiology**, v. 163, n. 10, p. 914–928, 2013.

NIELS, H.; INGOLF, P.; FRANK, B. Biomass productivity and productivity of fatty acids and amino acids of microalgae strains as key characteristics of suitability for biodiesel production. **Journal applied Phycology**, v. 24, n. 6, p. 1407 – 1418, 2012.

NONHEBEL, M. A.; MOSS, A. A. H. *Drying of solids in the chemical industry*. **London**: Butterworth & Co. 1971, 299 p.

OLIVEIRA, E. G.; ROSA, G. S.; MORAES, M. A.; PINTO, L. A. A. Characterization of thin layer drying of *Spirulina platensis* utilizing perpendicular air flow. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 1297–1303, 2009b.

OLIVEIRA, E. G.; ROSA, G. S.; MORAES, M. A.; PINTO, L. A. A. Moisture sorption characteristics of microalgae *Spirulina platensis*. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 26, n. 1, p. 189-197, 2009a.

ÖRDÖG, V.; STIRK, W. A.; BÁLINT, P.; AREMU, O.; OKEM, A.; LOVÁSZ, C.; MOLNÁR, Z.; STADEN, J. Effect of temperature and nitrogen concentration on lipid productivity and fatty acid composition in three *Chlorella* strains. **Algal Research**. v. 16, n. 9, p. 141 - 149, 2016.

ORTIZ, N.; Estudo da utilização de magnetita como material adsorvedor dos metais Cu_2^+ , Pb_2^+ , Ni_2^+ e Cd_2^+ em solução. São Paulo, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, USP, 2000. Tese de doutorado, 176 p.

OTSUKI, T.; SHIMIZU, K.; MAEDA, S. Changes in arterial stiffness and nitric oxide production with *Chlorella*-derived multicomponent supplementation in middle-aged and older individuals. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, v. 57, n. 3, p. 228 - 232, 2015.

PARK, K. B.; PARK K.; ALONSO, L. F. T.; CORNEJO, F. E. P.; FABBROS, I. M. D. SECAGEM: FUNDAMENTOS E EQUAÇÕES. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.16, n.1, p.93-127, 2014.

PEREDA, J. A. O.; RODRÍGUEZ, M. I. C.; ÁLVAREZ, L. F.; SANZ, M. L. G.; MINGUILLÓN, G. D. G. F.; PERALES, L. H.; CORTECERO, M. D. S. 66 *Tecnologia de alimentos: componentes dos alimentos e processos*. Porto Alegre: **Artmed**, 2005. v. 1, 294p.

PIRT, S. J. The thermodynamic efficiency (quantum demand) and dynamics of photosynthetic growth. **New phytologist**, v. 5, n 102, p. 3-37, 1986.

PRESCOTT, L. M.; KLEIN, D. A.; HARLEY, J. P. Microbiology; 5th Edition, Mcgraw-Hill; production forecasts. **Energy Policy**, v. 37, n. 11, p. 4761-4770, 2002

PULZ, O. Photobioreactors: Production systems for phototrophic microorganisms. **Applied microbiology and Biotechnology**, v. 57, n. 2, p. 287-293, 2001.

PULZ, O.; GROSS, W. Valuable products from biotechnology of microalgae. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.65, n. 14, p.635-648, 2004.

PUTRI, E. V.; DIN, M. F. M. D.; AHMED, Z.; JANALUDDIN, H.; CHELLIAPANS, S. Investigation of Microalgae for High Lipid Content using Palm Oil Mill Effluent (Pome) as Carbon Source 2011 International Conference on Environment and Industrial Innovation **IPCBEI**, v. 12, n. 9, p. 25 - 45, 2011.

RADMANN, E. M.; COSTA, A. V. Conteúdo lipídico e composição de ácidos graxos de microalgas expostas aos gases CO₂ SO₂ e NO **Quimica. Nova**, v. 31, n. 7, p. 1609 1612, 2008.

RADZUN K. A.; WOLF J.; JACOB G.; ZHANG E.; STEPHENS E.; ROSS L.; HANKAMER B. Automated nutrient screening system enables high-throughput optimisation of microalgae production conditions. **Biotechnology for Biofuels**, v. 8, n. 65, 15 - 36, 2015.

RAOOF, B.; KAUSHIK, B. D.; PRASANNA, R. Formulation of low-cost medium for mass production of *Sp. irulina* biomass and bioenergy, v. 30, n. 13, p. 537-542, 2006.

REZAEI, H.; KULKARNI, S. D.; SAPTARSHI, P. G. Study of Physical Chemistry on Biosorption of Nickel by using *Chlorella pyrenoidosa*. **African Journal of Pure and Applied Chemistry**, v. 5, n. 14, p, 474 - 485, 2011.

REZANKA T., VIDEN I., GO J.V., DOR I., Dembitsky V.M., Polar lipids and fatty acids of three wild cyanobacterial strains of the genus *Chroococciopsis*. **Folia Microbiology**, v. 48, n. 16, p. 781-786, 2003.

RIBEIRO, L. C.; COSTA, J. M. C.; AFONSO, M. R. A. Hygroscopic behavior of lyophilized acerola pulp powder. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 20, n. 3, p. 269-274, 2016.

RICHMOND, A. Handbok of microalgal culture: biotechnology and applied phycology. **Oxford**: Black Well Science, 2004. 566p.

RODRIGUES, L. H. R.; ARENZON, A.; RAYA-RODRIGUEZ, M. T.; FONTOURA, N. F. (2003). Avaliação da Sensibilidade de *Raphidocelis subcapitata* Chlorococcales, Chlorophyta) ao Sulfato de Cobre e Sulfato de Zinco através de ensaios de toxicidade crônica. **Biociências**, v. 11, n. 21, p. 137 - 144, 2003.

RODRIGUES, M. A.; TEIXEIRA, R. S. S.; LEITÃO, V. S. F.; BON, E. P. F. Untreated *Chlorella homosphaera* biomass allows for high rates of cell wall glucan enzymatic hydrolysis when using exoglucanase-free cellulases. **Biotechnology for Biofuels**, v. 8, n. 25, p. 1 - 16, 2015.

ROGERS SO, BENDICH AJ (1994) Extraction of total cellular DNA from plants, algae and fungi. In: Gelvin SB, Schilperoort RA (eds) Plant molecular biology manual. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. 8p.

ROSENBERG, J. N.; NAOKO, K.; AUSTIN, B.; ERIC, A. N.; MICHAEL, J. B.; GEORGE, A. O. Comparative Analyses of Three *Chlorella* Species in Response to Light and Sugar Reveal Distinctive Lipid Accumulation Patterns in the Microalga *C. sorokiniana*. **PLOS ONE**, v. 9, n. 4, 46 - 59, 2014.

RYCKEBOSCH, E.; MUYLAERT, K.; EECKHOUT, M.; RUYSSSEN, T.; FOUBERT, I. Influence of drying and storage on lipid and carotenoid stability of the microalga

Phaedactylum tricornutum. **Journal Agriculture Food Chemical**, v. 20, n. 26, p. 26 - 59, 2011.

SALIN, S.; BOSMA, R.; MARIAN, H.; WIJFFELS, R. H. Harvesting of microalgae by bio-flocculation **Journal Applied Phycology**, v. 23, n. 3, p. 849 - 855, 2011,

SANCHEZ T, E. L.; GONZALEZ, M. T. G.; CANTÚ, V. A. TAVEIRA, I. D. C. J.; MONTES, A. L. Estudio cinético e isoterma de adsorción de Ni (II) y Zn (II) utilizando biomasa del alga *Chlorella sp.* **Inmovilizada. Ciencia UANL**, v. 5, n. 2, p. 168 - 176. 2008.

SANGWOO, K.; HANUL, K.; DONGHWI, K.; YASUYO, Y.; MASUMI, O.; MAKI, K. Y.; TOSHIKI, I.; HEE, M. O.; IKUO, N.; YONGHUA, L. B.; YOUNGSOOK, L. Rapid Induction of Lipid Droplets in *Chlamydomonas reinhardtii* and *Chlorella vulgaris* by Brefeldin A. **PLOS ONE**, v. 8, n. 12, p. 19 - 38, 2013.

SASSONO, C. E. N.; GIOIELLI, L. A.; ALMEIDA, K. A.; SATO, S.; PEREGO, P.; COVERTI, A.; CARVALHO, J. C. M. Cultivation of *Spirulina Platensis* by continuous process. Using ammonium Chloride as nitrogen source. **Biomass and bioenergy**, v. 31, n. 22, p. 593-598, 2007.

SCHAAP, A.; ROHRLACK,.; BELLOUARD, Y. Optical classification of algae species with a glass lab-on-a-chip. **Lab Chip**, v. 8, n. 5, p. 12 - 21, 2012.

SCHENK, P. M. S. R.; THOMAS-HALL, E.; STEPHENS, U. C.; MARX, J. H.; MUSSGUNG, C.; POSTEN, O.; KRUSE B. H. Second Generation Biofuels: High-Efficiency Microalgae for Biodiesel Production. **Bioenergy Research**, v. 1, n. 1, p. 20-43. 2008.

Segali, Alexandra M. Donadon Lusser desempenho de *Ankistrodesmus gracilis* (Reisch) Korsikov (Chlorophyta) cultivada em três meios de cultura em laboratório, (Dissertação) Alexandra M. Donadon Lusser Segali Dr^a Lúcia Helena Sipaúba Tavares, Jaboticabal, SP, 2014.

SHEN, P. L.; WANG, H. T.; PAN, Y. F.; MENG, Y. Y.; WU, P. C.; XUE, S. Identification of Characteristic Fatty Acids to Quantify Triacylglycerols in Microalgae. **In Plant Science**, v. 7, n. 162, p. 1 – 7, 2016.

SHI, P.; PANDEY, K.; FRANZ, A. K.; DENG, H.; JEANNOTTE, R. *Chlorella vulgaris* production enhancement with supplementation of synthetic medium in dairy manure wastewater. **AMB EXPRESS**, v. 5, n. 6, p. 1 - 9, 2016.

SHOW, K. Y.; LEE, D. J.; CHANG, J. S. Algal biomass dehydration. **Bioresour Technology**, v. 1, n. 2, p. 14 - 31, 2012.

SHUHUAN, L.; JIANGXIN, W.; QIAN, M.; JIE Y.; XIA, L.; YING, J. Y. Phospholipid Metabolism in an Industry Microalga *Chlorella sorokiniana*: The Impact of Inoculum Sizes. **PLOS ONE**, v. 8, n. 8, p. 70 - 82, 2013.

SILVA FILHO, EDMILSON DANTAS DA. Obtenção e avaliação da qualidade da polpa da manga CV. Haden em pó, pelo método de secagem em camadas de espuma / Edmilson Dantas da Silva Filho - Campina Grande, 2012. 190f.; Il. col. Tese (Doutorado em engenharia Agrícola) - Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Tecnologia e Recursos Naturais.

SILVA, R. N. G.; FIGUEIRÊDO, R. M. F.; QUEIROZ, A. J. M.; FEITOSA, R. M. Isotermas de adsorção de umidade do umbu-cajá em pó. **Educação Agrícola Superior**, v. 30, n. 1, p. 33-36, 2015.

SILVA, S. F.; LEMOS, D. M.; DA SILVA, F. B.; FIGUEIRÊDO, R. M. F.; SOUSA, E. P. ISOTERMAS DE ADSORÇÃO DE ÁGUA DA FARINHA DAS FIBRAS RESIDUAIS SECAS DE MANGA. Centro de Eventos do Ceará - Fortaleza - CE 15 a 18 de setembro de 2015. Congresso Técnico Científico da Engenharia e da Agronomia CONTECC' 2015.

SLOCOMBE, S. P.; ZHANG, Q.; ROSS, M.; ANDERSON, A.; THOMAS, N. J.; LAPRESA, A.; MENÉNDEZ, C. R.; CAMPBELL, C. N.; BLACK, K. D.; STANLEY M.

S.; DAY, J. G. Unlocking nature`s treasure-chest: screening for oleaginous algae. **Scientific Reports**, v. 5, n. 7, p. 694 - 703, 2015.

SOROKIN, C.; MYERS. The course of resp.iration during the cycle of *Chlorella* cells. **Journal of General Physiology**. v. 40, n. 4, p, 579 – 592, 1957.

SPADA, J. C. et al. Water adsorption isotherms of microcapsules with hydrolyzed Pinhão (Araucária angustifólia seeds) Starch a wall moisture. **Journal of food Engineering**, v. 114, n. 1, p. 64-69, 2013.

SPIES, J. R. Determination of tryptophan in proteins. **Analytical Chemists**, Arlington, v. 39, n. 10, p. 1412-1415, 1967.

SPOLAORE, P.; CASSAN, C. J.; DURAN, E.; ISAMBERT, A. Commercial applications of microalgal. **Journal of Bioscience and Bioenginnening**. v. 101, n.2, p. 87-96, 2006.

SU, Z.; KANG, R.; SHI, S.; CONG, W.; COI, Z. **Bioprocess Biosystems. Engineering**, v. 31, n, 3, 641 - 645. 2008

SUALI, E. & R. SARBATRY. Conversion of microalgae to biofuel. *Renewable & suatinnable Energy Reviews*, v. 16, n. 23, p. 36 - 95, 2012.

SUNJA, C.; LEE, D.; LUONG, T. T.; PARK, S.; OH, Y. K.; LEE, T. Effects of Carbon and Nitrogen Sources on Fatty Acid Contents and Composition in the Green Microalga, *Chlorella sp.*. 227. **Journal. Microbiology. Biotechnology**, v. 21, n. 10, p. 1073–1080, 2011.

SYRETT, P.J. Nitrogen assimilation. In:**Physiology and Biochemistry of Algae**. New York: Academic, 1992. p.171-183.

TAKESHITA, T.; OTA, S.; YAMAZAKI, T.; HIRATA, A.; ZACHLEDER, V.; KAWANO, S. Starch and lipid accumulation in eight strains of six *Chlorella* species under

comparatively high light intensity and aeration culture conditions. **Bioresour Technology**, v. 158, n. 4, p. 127 - 139, 2014.

TANADUL, O. U.; VENDERGHEYNST, J. S.; BECKLES, D. M.; POWELL, A. L. T.; LABAVITCH, J. M. The impact of elevated CO₂ concentration on the quality of algal starch as a potential biofuel feedstock. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 111, n. 7, p. 1323 – 1331 2014.

TASTAN, B. E.; DUYGU, E.; ILBAS, M.; DÖNMEZ. Enhancement of microalgal biomass production and dissolved inorganic C fixation from actual coal flue gas by exogenous salicylic acid and 1-triacontanol growth promoters. **Energy**, v. 103, n. 10, p. 598 - 604, 2016

Thompson, P. A.; Guo, M.; **Journal. Phycology**. v. 28, n. 2, p 481. 1992.

TOMASELLI, L. The microalgal cell. In: Richmond, A. (ed.) Handbook of microalgal culture: Biothechnology and applied phycology, **Oxford**: Blackwell Publishing, 2004 – p 3-19.

TREDICI, M. R. Mass production of microalgae: Photobioreactors. In: Richmond, A. (editor). Handbook of microalgal culture: **biotechnology and Applied Phycology**, v. 2, n. 1, p. 178-212, 2004.

Trevizani, Tailise Hoppe Bioacumulação de metais pesados e avaliação da biomagnificação na biota da baía do almirantado, Ilha do Rei George, Antártica (Dissertação) / Tailise Hoppe Trevizani; orientador, Dr. Rubens Cesar Lopes Figueira. São Paulo, SP, 2014.

UQUICHE, E.; ANTILAF, I.; MILLAO. Enhancement of pigment extraction from *B. braunii* pretreated using CO₂ rapid depressurization. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 10, p. 497-505.

VARFOLOMEEV, S.D.; WASSERMAN, L.A. Microalgae as Source of Biofuel, Food, Fodder and Medicines. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 47, n.9, p. 789-807, 2011.

Viêgas, Carolina Vieira extração e caracterização dos lipídeos da microalga *Chlorella pyrenoidosa*, visando a produção de ésteres graxos (Dissertação) / Carolina Vieira Viêgas; orientador, Dr. Marcelo Gonçalves Montes D'Oca. Rio Grande, RS, 2010.

VONLANTHEN, S.; DAUVILLÉE, D.; PURTON, S. Evaluation of novel starch – deficient mutants of *Chlorella sorokiniana* for hyper – accumulation of lipids. **Algal Research**, v. 12, n. 9, p. 109 – 118, 2015.

WANG, B.; WANG, J.; ZHANG, W.; MELDRUM, D. R. Application of synthetic biology in cyanobacteria and algae. **Front Microbiology**, v. 3, n. 10, 33 - 44, 2012.

WATANABE, A. List of algal strains in collection at the Institute of applied microbiology University of Tokyo. **Journal of General and Applied Microbiology**, v. 6, n. 3, p. 1-4, 1960.

WEWETZER, S. J.; KUNZE, M.; LADNER, T.; LUCHTERHAND, B.; ROTH, S.; RAHMEN, N.; KLOB, R.; SILVA, A. C.; REGESTEIN, L.; BUCHS, J. Parallel use of shake flask and microtiter plate online measuring devices (RAMOS and BioLector) reduces the number of experiments in laboratory-scale stirred tank bioreactors. **Journal of Biological Engineering**, v. 9, n. 9, p. 1 - 18, 2015

WEISSMAN, J. C.; GOEBEL, R. P. Photobioreactor design: Mixing, Carbon utilization, and oxygen accumulation. **Biotechnology and bioengineering**, v. 31, n. 1, p. 336-344. 1988.

WHITE, J. A.; HART, R. J.; FRY, J. C. An evaluation of the waters Pico-Tag System for the aminoacids analysis of food materials. **Journal of Automatic Chemistry**, London, v. 8, n. 4, p. 170-177, 1986.

WIRTH R.; LAKATOS G.; MAROTI G.; BAGI Z.; MINAROVICS J.; NAGY K.; KONDOROSI E.; RAKHELY G.; KOVACS K. L. Exploitation of algal-bacterial associations in a two-stage biohydrogen and biogas generation process. **Biotechnology for Biofuels**, v. 8, n. 59, p. 13 - 68, 2015.

XIAO, Y.; LU, Y.; DAÍ, J.; WU, Q. industrial fermentation of *Auxenochlorella protothecoides* for production of biodiesel and its application in vehicle diesel engines. **Frontiers in bioengineering and biotechnology**, v. 3, n. 164, p. 1 - 10, 2015.

XU, H.; MIAO, X. L.; WU, Q. Y. High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. **Journal. Biotechnology**, v. 126, n. 9, p. 499–507, 2006.

XU, L.; WEATHERS, J. P.; XIONG.; XUE, R.; LIU C. Z. Review. microalgal bioreactors: challenges and opportunities. *Eng. life Science*, v. 9, n. 3, p. 178 - 189. 2009

YAO, C.; AI, J.; CAO, X.; XUE, S.; ZHANG, W. Enhancing starch production of a Marin Green microalgal *Tetraselmis subiformis* through nutrientes limitation. **Bioresource Technology**. v 118, n. 17, p. 438 - 444, 2012.

YEN, H. W.; HU, I. C.; CHEN, C. Y.; HO, S. H.; LEE, D. J.; CHANG, J. S. Microalgae – based biorefinery – From biofuels to natural products. **Bioresour Technology**, v. 1, n. 3, p.10 - 16, 2012.

ZACHARIASOVAA, M. S.; KASTANEKB, P.; DZUMANA, Z.; RUBERTA, J.; GODULAA, M.; HAJSLOWA, J. Bioprospecting of microalgae: Proper extratction followed by highperformance liquid chromatographic – high resolution mass spectrometric fingerprinting as key tools for successful metabolom characterization. **Journal of Chromatography B**, v. 11, n. 30, p. 22 – 33, 2016.

ZHAN, J.; HONG, Y.; HU, H. Effects of nitrogen sources and C/N ratios on lipid-producing potential of *Chlorella sp. HQ*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 10, n. 3, p. 1 - 13, 2016.

ZHANG, Q. H.; WU, X.; XUE, S.Z.; WANG, Z.H.; YAN, C. H.; CONG, W. Hydrodynamic characteristics and microalgae cultivation in a novel flat plate photobioreactor. **BiotechnologyProgress**, v. 29, n. 1, p.127 - 134, 2012.

ZHU, J. & RUAN, R. 2011. Characterization of a microalga *Chlorella sp.* well adapted to highly concentrated municipal wastewater for nutrient removal and biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 8, p. 5138 - 5144, 2011.

ZHU, S.; WANG, Y.; HUANG, W.; XU, J.; WANG, Z.; XU, J.; YUAN, Z. Enhanced accumulation of carbohydrate and starch in *Chlorella zofingiensis* induced by nitrogen starvation. **Bioresource Biotechnology**, v. 174 p. 2435 – 2445, 2014.

ZHUKOVA, N.V.; AIZDAICHER, N.A. Fatty acid composition of 15 species of marine microalgae. **Phytochemistry**, v.39, n. 2, p.351-356, 1995.

APÊNDICE A

Tabela A.1 - Dados da luminosidade nos biorreatores durante o cultivo da *Chlorella* sp.

Tratamento	Luminosidade (lux x 100)	Luminosidade (lux x 100)	Luminosidade (lux x 100)
TC	405	530	422
	790	845	804
	803	865	812
	764	843	806
	687	773	734
	721	902	845
	774	961	825
	785	990	815
T ₁	557	998	425
	654	971	702
	675	982	664
	623	986	628
	648	879	672
	714	852	568
	359	622	287
	644	735	636
T ₂	709	843	736
	669	561	594
	632	894	651
	658	941	687
	345	926	644
	674	945	589
	655	873	547
	681	829	716
T ₃	702	907	724
	648	973	732
	667	933	651
	651	927	678
	453	952	649
	478	983	734
	705	671	728
	709	934	762
T ₄	657	946	563
	632	978	579
	700	985	755
	625	992	648
	635	937	956
	679	982	573
	592	893	589
	573	875	572
T ₅	642	937	628
	726	967	647
	765	974	683
	708	985	690
	445	669	561
	392	653	578
	723	988	625
	748	973	644
T ₅	721	981	672
	654	978	685
	672	895	591
	592	903	538
	604	872	566

Tabela A.2 - Dados da temperatura nos biorreatores durante o cultivo da *Chlorella* sp.

Tratamento	Temperatura (°C)	Temperatura (°C)	Temperatura (°C)
TC	27	30	27
	25	31	26
	28	30	27
	26	31	25
	24	29	26
	25	30	27
	28	31	25
	27	30	26
T ₁	25	31	27
	27	32	28
	24	30	29
	26	31	29
	26	31	28
	27	32	29
	25	29	27
	27	32	28
T ₂	25	28	26
	26	30	27
	27	31	28
	27	31	28
	24	29	27
	25	30	27
	26	29	28
	27	32	28
T ₃	27	32	28
	25	31	27
	25	29	27
	26	31	28
	27	31	28
	25	29	27
	25	29	26
	26	30	27
T ₄	27	32	28
	27	30	27
	24	29	26
	24	28	26
	26	31	28
	26	30	28
	25	29	26
	27	32	28
T ₅	26	30	28
	27	31	28
	26	30	27
	25	29	27
	26	31	27
	27	32	27
	25	29	27
	27	31	27
T ₅	27	31	26
	27	30	26
	26	30	26
	26	31	27
	27	32	27
	25	29	27
	25	29	27
	27	31	27
T ₅	27	31	26
	27	30	26
	26	30	26
	26	31	27
	27	32	27
	25	29	27
	25	29	27
	27	31	27

Tabela A.3 - Dados do Ph nos biorreatores durante o cultivo da *Chlorella* sp.

Tratamento	pH Manhã	pH Meio dia	pH Tarde
TC	8,10	8,13	8,11
	8,11	8,14	8,12
	8,09	8,17	8,10
	8,15	8,22	8,23
	8,21	8,39	8,41
	8,35	8,55	8,62
	8,56	8,67	8,77
	8,78	8,99	8,91
T1	8,02	8,13	8,06
	8,05	8,25	8,14
	8,10	8,42	8,22
	8,15	8,53	8,29
	8,19	8,69	8,35
	8,26	8,82	8,44
	8,59	8,94	8,50
	8,72	9,02	8,67
8,85	9,09	8,81	
T2	8,10	8,19	8,07
	8,16	8,42	8,18
	8,28	8,57	8,33
	8,38	8,64	8,41
	8,47	8,75	8,52
	8,56	8,89	5,68
	8,78	9,04	8,76
	8,83	9,18	8,85
8,94	9,26	8,92	
T3	8,11	8,25	8,15
	8,21	8,48	8,23
	8,32	8,65	8,34
	8,47	8,76	8,41
	8,55	8,94	8,59
	8,69	9,05	8,68
	8,78	9,13	8,76
	8,91	9,24	8,85
9,04	9,35	8,90	
T4	8,04	8,12	8,05
	8,16	8,20	8,14
	8,22	8,36	8,25
	8,32	8,41	8,30
	8,47	8,57	8,51
	8,59	8,68	8,64
	8,67	8,83	8,72
	8,77	8,96	8,89
8,80	9,13	8,96	
T5	8,15	8,20	8,12
	8,29	8,32	8,21
	8,38	8,46	8,35
	8,46	8,57	8,52
	8,59	8,73	8,64
	8,68	8,88	8,70
	8,75	8,98	8,83
	8,86	9,11	8,92
8,94	9,21	8,97	

