



UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE GURUPI
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

LILIANA CARRILLO CARTAS

**ISOLAMENTO E CULTIVO DE MICROALGAS EM RESÍDUO
LÍQUIDO DO PROCESSAMENTO DA MANDIOCA: MANIPUEIRA**

Gurupi/TO
2018

LILIANA CARRILLO CARTAS

**ISOLAMENTO E CULTIVO DE MICROALGAS EM RESÍDUO
LÍQUIDO DO PROCESSAMENTO DA MANDIOCA: MANIPUEIRA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Tocantins como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol

Co-orientador: Prof. Dr. Júlio Cesar de Carvalho

Gurupi/TO
2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins

- C322i Cartas, Liliana Carrillo .
Isolamento e cultivo de microalgas em resíduo líquido do processamento da mandioca: Manipueira. / Liliana Carrillo Cartas. – Gurupi, TO, 2018.
81 f.
- Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade Federal do Tocantins – Câmpus Universitário de Gurupi - Curso de Pós-Graduação (Mestrado) em Biotecnologia, 2018.
Orientador: Carlos Ricardo Soccol
Coorientador: Júlio Cesar de Carvalho
1. Biotecnologia. 2. Microalgas. 3. Manipueira. 4. Isolamento. I. Título

CDD 660.6

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte. A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal.

Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Rua Badejós, Chácaras 69 e 72 - CEP: 77402-970 - Caixa Postal 66 | Gurupi/TO
(63) 3311-3549 | www.uft.edu.br/biotecnologia | ppgbiotec@uft.edu.br



Ata de Defesa nº 24/2017

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE LILIANA CARRILLO CARTAS DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS.

Aos 24 dias do mês de março do ano de 2017, às 09 horas da manhã, na sala 03, edifício Planta Piloto CENBAPAR, da Universidade Federal do Paraná, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Prof. Orientador Dr. CARLOS RICARDO SOCCOL da Universidade Federal do Paraná, Profª. Drª. SUSAN GRACE KARP da Universidade Federal do Paraná, Prof. Dr. JULIO CESAR DE CARVALHO da Universidade Federal do Paraná e Prof. Dr. GESSIEL NEWTON SCHEIDT da Universidade Federal do Tocantins, sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a arguição pública da DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de LILIANA CARRILLO CARTAS, intitulada "**Isolamento e cultivo de microalgas em resíduo líquido do processamento da mandioca Manipueira**". Após a exposição, o discente foi arguido oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo parecer favorável à aprovação, com as devidas correções apontadas pela banca, habilitando-o ao título de Mestre em Biotecnologia. Nada mais havendo a tratar, foi lavrada a presente ata, que, após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol
Universidade Federal do Paraná
Orientador

Profª Drª Susan Grace Karp
Universidade Federal do Paraná
1ª Examinadora

Prof. Dr. Gessiel Newton Scheidt
Universidade Federal do Tocantins
Coorientador e 2º Examinador

Prof. Dr. Júlio Cesar de Carvalho
Universidade Federal do Paraná
3º Examinador

Gurupi, 24 de março de 2017.

Prof. Dr. Gessiel Newton Scheidt
Coordenador do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia

*Dedico este trabalho a minha mãe,
Guadalupe Cartas, pela dedicação e por me
apoiar nas grandes decisões de minha vida, e
a minha filha, Denisse, por me dar forças para
sempre perseverar.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, saúde, proteção e por me amparar nestes anos para suportar a distância e a imensa saudade de todos.

Todo meu amor e gratidão à minha família, minha mãe por cuidar de mim com tanto amor, por sempre ficar por perto e nunca me deixar desistir na vida. Aos meus irmãos Mildred, Hector e José pelo carinho, apoio e incentivo. À minha filha, que mesmo sem entender as mudanças que aconteceram na sua vida, com seu sorriso me deu forças para sempre seguir em frente além das dificuldades. Família vocês são a minha base amo-os infinitamente.

Ao Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol, pela orientação, pelo estímulo, dedicação e, sobretudo, pela confiança e pelas oportunidades.

Ao Prof. Dr. Gessiel Newton Scheidt, pela oportunidade para formar parte do curso de mestrado em Biotecnologia (PPGB) da Universidade Federal do Tocantins.

Ao Prof. Dr. Júlio Cesar de Carvalho, pela contribuição na produção de conhecimentos, orientação, estímulo e pelas sugestões em diversas etapas do estudo.

A toda a equipe de professores do Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Universidade Federal do Paraná, que contribuíram direta ou indiretamente no desenvolvimento do trabalho.

Aos amigos e colegas do PPGBiotec, e a toda equipe de Microalgas, em especial Estefânia Garcia e Paulo Kirnev pelo convívio, amizade e companheirismo.

Meu agradecimento especial ao Conselho Nacional de Ciência e Tecnologia (CONACYT) pela bolsa concedida.

Ao Tecnológico Nacional do México (TECNM), pela oportunidade e confiança.

À Empresa Podium Alimentos pelo envio da manipueira.

RESUMO

Esta pesquisa teve como objetivo avaliar a viabilidade do uso da manipueira como meio de cultura para microalgas e determinar as melhores condições para o cultivo. As cepas avaliadas foram isoladas das lagoas de estabilização de manipueira da empresa Podium Alimentos LTDA. de Paranavaí, sendo identificadas morfológicamente como *Chlorella* sp., *Scenedesmus* sp. *Monoraphidium* sp. e *Golenkinia* sp. A presença de atividade amilolítica e a determinação da toxicidade do cianeto, composto presente no resíduo, foram avaliadas para cada uma das linhagens de microalgas isoladas. A presença de amilase foi identificada em *Monoraphidium* sp, *Golenkinia* sp. e *Scenedesmus* sp. quando inoculadas em meio sólido de ágar-amido a 0,2%. A tolerância ao cianeto foi avaliada simulando o ambiente cianogênio com adição de KCN no meio de cultivo autotrófico. As microalgas *Monoraphidium* sp. e a *Scenedesmus* sp. demonstraram capacidade para se desenvolver em meio contendo até 200ppm de KCN, enquanto as microalgas *Chlorella* sp. e a *Golenkinia* sp. suportaram concentrações máximas de 40 ppm. Para avaliação da sobrevivência das microalgas quando cultivadas no resíduo líquido do processamento da mandioca, foi utilizado como meio de cultura manipueira bruta não esterilizada, manipueira bruta estéril e manipueira pré-tratada (digestão anaeróbia) em diferentes concentrações. Os testes foram realizados em frascos Erlenmeyer de 125 mL, sob iluminação de 2500 Lux, fotoperíodo de 12 horas claro/escuro e temperatura de 25°C. As concentrações do inoculo iniciais foram de 0,2 g.L⁻¹. Nos experimentos conduzidos com a manipueira bruta não esterilizada, todas as microalgas mostraram desenvolvimento em concentrações de 10% v/v do resíduo (manipueira/água). Destacou-se a microalga *Monoraphidium* sp. que alcançou uma produtividade máxima de 0,014 dia⁻¹, apenas 5% menor que o alcançado quando cultivada em meio autotrófico. Já nos cultivos em manipueira bruta esterilizada as quatro linhagens de microalgas avaliadas apresentaram uma maior resistência ao meio de até 30% de resíduo. Observou-se a maior produtividade com a microalga *Monoraphidium* sp. e *Golenkinia* sp. que foi de 0,078 dia⁻¹ e 0,018 dia⁻¹ respectivamente, na concentração de 10% v/v de manipueira. Nos ensaios conduzidos em manipueira após digestão anaeróbia, foram suportadas concentrações de até 100% do resíduo, para o isolado de *Monoraphidium* sp., *Golenkinia* sp., e *Scenedesmus* sp., e de até 40% v/v para a microalga *Chlorella* sp. A maior velocidade específica de crescimento foi com a microalga *Monoraphidium* sp. na concentração de 40% de manipueira (v/v) sendo de 0,12 dia⁻¹. As microalgas *Golenkinia* sp. e a *Scenedesmus* sp. também mostraram eficiência quando cultivadas no efluente digerido, sendo que em concentrações de 20% v/v manipueira/água apresentam crescimento semelhante ao obtido no meio sintético. Os resultados obtidos mostraram que é possível o cultivo de microalgas em manipueira bruta, tratada e mesmo manipueira digerida. Porém tratamentos adequados devem ser identificados para se obter uma maior produtividade microalgal. As microalgas *Monoraphidium* sp. e *Scenedesmus* sp. demonstraram ser capazes de sobreviver e crescer melhor no cultivo em efluente digerido anaerobicamente, assim, a utilização da manipueira digerida como meio de cultivo mostra-se como uma forma eficiente de produzir grandes quantidades de biomassa microalgal.

Palavras-chave: Microalgas; manipueira; mandioca; meio de cultura; isolamento.

ABSTRACT

The objective of this research was to evaluate the viability of the cassava waste water as a culture medium for microalgae and to determine the best conditions for cultivation. The strains evaluated were isolated from the stabilization lagoons of the company Podium Foods LTDA. of Paranavaí, being morphologically identified as *Chlorella* sp., *Scenedesmus* sp. *Monoraphidium* sp. and *Golenkinia* sp. The presence of amylolytic activity and determination of cyanide toxicity, a compound present in the residue, were evaluated for each of the isolated microalgae strains. The presence of amylase was identified in *Monoraphidium* sp, *Golenkinia* sp. and *Scenedesmus* sp. when inoculated in 0.2% agar-starch solid medium. The cyanide tolerance was evaluated by simulating the cyanogen environment with addition of KCN in the autotrophic culture medium. The microalgae *Monoraphidium* sp. and *Scenedesmus* sp. demonstrated the capacity to develop in medium containing up to 200ppm of KCN, while the microalgae *Chlorella* sp. and *Golenkinia* sp. have sustained maximum concentrations of 40 ppm. In order to evaluate the survival of microalgae when cultivated in the liquid cassava processing residue, non-sterile cassava waste water handling, sterile manipulative cassava waste water and pre-treated cassava waste water (anaerobic digestion) were used in different concentrations. The tests were carried out in 125 mL Erlenmeyer flasks, under 2500 Lux illumination, 12-hour light/dark photoperiod and 25 °C temperature. Initial inoculum concentrations were 0.2 g.L⁻¹. In the experiments conducted with the non-sterilized raw cassava waste water, all microalgae showed development at concentrations of 10% v/v of the residue (cassava waste water/water). The microalga *Monoraphidium* sp. which reached a maximum productivity of 0.014 day⁻¹, only 5% lower than that achieved when cultivated in an autotrophic medium. Already in the crops in sterile cassava waste water, the four microalgae strains tested showed a higher resistance to the medium of up to 30% of the residues. The highest productivity was observed with the microalga *Monoraphidium* sp. and *Golenkinia* sp. which was 0.078 day⁻¹ and 0.018 day⁻¹ respectively at the 10% v/v concentration of cassava waste water. In the experiments carried out in cassava waste water after anaerobic digestion, concentrations up to 100% of the residue were supported for the isolate of *Monoraphidium* sp., *Golenkinia* sp., and *Scenedesmus* sp., and up to 40% v/v for the microalga *Chlorella* sp. The highest specific growth rate was with the microalga *Monoraphidium* sp. in the concentration of 40% of cassava waste water (v/v) being 0.12 day⁻¹. The microalgae *Golenkinia* sp. and *Scenedesmus* sp. also showed efficiency when cultivated in the digested effluent, and at concentrations of 20% v/v cassava waste water/water, presented growth similar to that obtained in the synthetic medium. The results showed that it is possible to cultivate microalgae in cassava waste water raw, treated and even digested cassava waste water. However, suitable treatments must be identified for increased microalgae productivity. The microalgae *Monoraphidium* sp. and *Scenedesmus* sp. demonstrated to be able to survive and grow better in anaerobically digested effluent cultivation, thus, the use of the digested cassava waste water as a culture medium is shown as an efficient way of producing large amounts of microalgae biomass.

Keywords: Microalgae; cassava waste water; manioc; culture medium; isolation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Evolução da produção de fécula no Brasil (ABAM, 2014).	18
Figura 2. Produção de fécula por estados brasileiros em 2013 (ABAM, 2014).	18
Figura 3. Fluxograma do processamento da mandioca. EMBRAPA, (2003).	20
Figura 4. Geração de cianeto a partir de glicosídeos cianogênicos na mandioca (CARVALHO et al. 2011)	25
Figura 5. Disposição das lagoas. 1,2: foram cobertas para funcionar como biodigestores; 3: lagoa que está funcionando como facultativa; 4, 5 e 6: lagoas aeróbias (GOOGLE MAPS)	29
Figura 6. Processo para o isolamento de microalgas das lagoas de estabilização da manipueira: a) Amostras coletadas nas lagoas de estabilização; b) Diluição em meio líquido das amostras coletadas; c) Primeiros isolamentos em placas com crescimento de diversos microrganismos; d) Incubação de placas com aparência de monoculturas de microalgas	30
Figura 7. Escalonamento de cultivos em condições autotróficas.	31
Figura 8. Curva padrão determinada para <i>Chlorella</i> sp. Cultivada em meio BG-11 (Blue Green Medium)	32
Figura 9. Curva padrão determinada para <i>Monoraphidium</i> sp. Cultivada em meio BBM (Bold Basal Medium)	33
Figura 10. Curva padrão determinada para <i>Scenedesmus</i> sp. Cultivada em meio BBM (Bold Basal Medium)	33
Figura 11. Curva padrão determinada para <i>Golenkinia</i> sp. Cultivada em meio BG-11 (Blue Green Medium)	34
Figura 12. a) Efluente de manipueira bruta (coletada antes do biodigestor à saída da centrífuga); b) Efluente de manipueira digerida (coletada na saída do biodigestor anaeróbio)	36
Figura 13. Determinação de amônia pelo método do fenol (KOROLEFF, 1976)	40
Figura 14. Aspecto das monoculturas em placas.	42
Figura 15. Micrografias (40x). a) <i>Chlorella</i> sp.; b) <i>Monoraphidium</i> sp.; c) <i>Scenedesmus</i> sp.; d) <i>Golenkinia</i> sp.	43
Figura 16. Cinética de crescimento em condições autotróficas das linhagens de microalgas isoladas	46
Figura 17. Crescimento celular da microalga de <i>Golenkinia</i> sp. durante um período de 10 dias em concentrações de 0 - 200 ppm de KCN.	47
Figura 18. Crescimento celular da microalga <i>Chlorella</i> sp. durante um período de 10 dias em concentrações de 0 - 200 ppm de KCN	48
Figura 19. <i>Chlorella</i> sp. cultivada em concentrações de 0 – 200 ppm de KCN (dia 0)	49
Figura 20. <i>Chlorella</i> sp. cultivada em concentrações de 0 – 200 ppm de KCN (dia 10)	49
Figura 21. Crescimento celular da microalga de <i>Monoraphidium</i> sp. durante um período de 10 dias em concentrações de 0 - 200 ppm de KCN	50
Figura 22. <i>Monoraphidium</i> sp. cultivada em concentrações de 0 – 200 ppm de KCN (dia 10)	50
Figura 23. Crescimento celular da microalga <i>Scenedesmus</i> sp. durante um período de 10 dias em concentrações de 0 - 200 ppm de KCN	51
Figura 24. Microalga <i>Scenedesmus</i> sp. cultivada em concentrações de 0 – 200 ppm de KCN (dia 10)	51
Figura 25. Produção de amilase em meio sólido (amido 0,2%) em microalgas a) <i>Chlorella</i> sp. b) <i>Monoraphidium</i> sp. c) <i>Golenkinia</i> sp. d) <i>Scenedesmus</i> sp.	53

- Figura 26. Curva de crescimento e sobrevivência dos quatro isolados de microalgas cultivadas em manipueira bruta não estéril, em condições de laboratório a 25°C, luminosidade média de 2.500 lux e fotoperíodo de 12h (claro/escuro). a) *Monoraphidium* sp.; b) *Chlorella* sp.; c) *Golenkinia* sp.; d) *Scenedesmus* sp. 57
- Figura 27. Curva de crescimento e sobrevivência dos quatro isolados de microalgas cultivadas em manipueira bruta estéril, em condições de laboratório a 25°C, luminosidade média de 2.500 lux e fotoperíodo de 12h (claro/escuro). a) *Monoraphidium* sp.; b) *Chlorella* sp.; c) *Golenkinia* sp.; d) *Scenedesmus* sp. 59
- Figura 28. Desenvolvimento da microalga *Chlorella* sp. em concentrações de 0-100% de manipueira. a) cultivo em manipueira bruta não esterilizada (dia 0); b) cultivo em manipueira bruta não esterilizada (dia 6); c) cultivo em manipueira bruta estéril (dia 0); d) cultivo em manipueira bruta estéril (dia 6). 60
- Figura 29. Desenvolvimento da microalga *Monoraphidium* sp. em concentrações de 0-100% de manipueira. a) cultivo em manipueira bruta sem esterilizar (dia 0); b) cultivo em manipueira bruta não esterilizada (dia 6); c) cultivo em manipueira bruta estéril (dia 0); d) cultivo em manipueira bruta estéril (dia 6). 61
- Figura 30. Desenvolvimento da microalga *Golenkinia* sp. em concentrações de 0-100% de manipueira. a) cultivo em manipueira bruta não esterilizada (dia 0); b) cultivo em manipueira bruta não esterilizada (dia 6); c) cultivo em manipueira bruta estéril (dia 0); d) cultivo em manipueira bruta estéril (dia 6). 61
- Figura 31. Curva de crescimento e sobrevivência dos quatro isolados de microalgas cultivadas em efluente de manipueira digerida não estéril, em condições de laboratório a 25°C, luminosidade média de 2.500 lux e fotoperíodo de 12h (claro/escuro). a) *Monoraphidium* sp.; b) *Chlorella* sp.; c) *Golenkinia* sp.; d) *Scenedesmus* sp. 63
- Figura 32. Curva de crescimento e sobrevivência dos quatro isolados de microalgas cultivadas em efluente de manipueira digerida estéril, em condições de laboratório a 25°C, luminosidade média de 2.500 lux e fotoperíodo de 12h (claro/escuro). a) *Monoraphidium* sp.; b) *Chlorella* sp.; c) *Golenkinia* sp.; d) *Scenedesmus* sp. 65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Esquema de classificação de grupos algais	13
Tabela 2. Produção mundial de mandioca - países selecionados (participação %).....	16
Tabela 3. Mandioca - principais produtores no brasil (área, produção e produtividade) 2013/2014	17
Tabela 4. Balanço de massa típico para farinha de mandioca e produção de amido a partir de 1000 kg de raízes.....	21
Tabela 5. Composição máxima e mínima da água residual do processamento de mandioca ..	24
Tabela 6. Teores de cianetos livres e totais presentes na manipueira.....	25
Tabela 7. Toxicidade de sais de cianeto para microalgas, segundo vários autores	26
Tabela 8. Velocidade específica de crescimento dos isolados cultivados em diferentes concentrações de cianeto (dia-1).....	52
Tabela 9. Composição físico-química da manipueira.	54
Tabela 10. Comparação da velocidade específica de crescimento inicial e velocidade específica de crescimento final, das quatro linhagens estudadas em manipueira bruta não estéril (dia-1).	56
Tabela 11. Comparação da velocidade específica de crescimento inicial e velocidade específica de crescimento final, das quatro linhagens estudadas em manipueira bruta estéril (dia-1).....	60
Tabela 12. Comparação da velocidade específica de crescimento inicial e velocidade específica de crescimento final, das quatro linhagens estudadas em manipueira digerida não estéril (dia-1).	62
Tabela 13. Comparação da velocidade específica de crescimento inicial e velocidade específica de crescimento final, das quatro linhagens estudadas em manipueira digerida não estéril (dia-1).	64

SUMÁRIO

<u>1</u>	<u>INTRODUÇÃO.....</u>	<u>8</u>
1.1	OBJETIVO.....	10
1.1.1	OBJETIVO GERAL	10
1.1.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	10
<u>2</u>	<u>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</u>	<u>11</u>
2.1	MICROALGAS.....	11
2.1.1	CLASSIFICAÇÃO DE MICROALGAS	12
2.1.2	MICROALGAS OBTIDAS EM SISTEMAS DE TRATAMENTO	13
2.2	CRESCIMENTO DE MICROALGAS	14
2.2.1	TEMPERATURA	15
2.2.2	LUZ	15
2.2.3	pH	15
2.2.4	AERAÇÃO	15
2.3	INDÚSTRIA DE MANDIOCA NO BRASIL	16
2.3.1	PRODUÇÃO DE AMIDO DE MANDIOCA	17
2.3.2	PROCESSO DE PRODUÇÃO DE AMIDO DE MANDIOCA	19
2.3.3	MANIPUEIRA	21
2.3.4	POLUIÇÃO E IMPACTO AMBIENTAL DA MANIPUEIRA	22
2.3.5	PRINCIPAIS USOS E TRATAMENTOS DA MANIPUEIRA	22
2.3.5.1	Tratamento biológico.....	23
2.3.6	COMPOSIÇÃO DA MANIPUEIRA	23
2.3.6.1	Cianeto	25
2.3.6.2	Amido	27
2.4	CULTIVO DE MICROALGAS EM MANIPUEIRA.....	28
<u>3</u>	<u>MATERIAL E MÉTODOS.....</u>	<u>29</u>
3.1	ETAPA 1. ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO.....	29
3.1.1	COLETA DE AMOSTRAS DO EFLUENTE	29
3.1.2	MEIOS DE CULTIVO INORGÂNICO	30
3.1.3	ISOLAMENTO EM PLACAS	30
3.1.4	IDENTIFICAÇÃO DAS CEPAS ISOLADAS	31
3.1.5	AValiação DO CRESCIMENTO DAS MICROALGAS ISOLADAS EM CONDIÇÕES AUTOTRÓFICAS	31

3.1.5.1	Curva padrão de crescimento para as linhagens de microalgas isoladas.....	32
3.2	ETAPA 2. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE AMIOLÍTICA E DA TOXICIDADE DO	
	CIANETO PARA AS MICROALGAS IDENTIFICADAS.....	34
3.2.1	AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO CIANETO PARA AS MICROALGAS	34
3.2.2	DIGESTÃO DO AMIDO PELAS MICROALGAS	35
3.3	ETAPA 3. ENSAIOS COM O RESÍDUO LÍQUIDO DO PROCESSAMENTO DA MANDIOCA	35
3.3.1	CONDIÇÕES DE CULTIVO	35
3.3.1.1	Manipueira bruta como meio de cultura.....	36
3.3.1.2	Efluente de manipueira digerida como meio de cultura.....	36
3.3.1.3	Parâmetros do cultivo.....	36
3.3.1.4	Determinação do crescimento das microalgas.....	37
3.3.2	DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DA MANIPUEIRA	37
3.3.2.1	DBO.....	37
3.3.2.2	DQO.....	38
3.3.2.3	Nitrato (NO ₃ ⁻).....	39
3.3.2.4	Amônio (NH ₄ ⁺).....	39
3.3.2.5	Sólidos suspensos totais (SST).....	40
3.3.2.6	Sólidos suspensos voláteis (SSV).....	40
3.3.2.7	Carbono orgânico total.....	41
3.3.2.8	Determinação e correção de pH.....	41
4	<u>RESULTADOS E DISCUSSÃO</u>	42
4.1	ETAPA 1. ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO.....	42
4.1.1	IDENTIFICAÇÃO DE MICROALGAS ISOLADAS DAS LAGOAS DE ESTABILIZAÇÃO DA MANIPUEIRA NA EMPRESA PODIUM ALIMENTOS	42
4.1.2	CULTIVOS UNIALGAIS ISOLADOS NAS LAGOAS DE ESTABILIZAÇÃO DA MANIPUEIRA EM MEIO SINTÉTICO	45
4.2	ETAPA 2. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE AMIOLÍTICA E DA TOXICIDADE DO	
	CIANETO PARA AS MICROALGAS IDENTIFICADAS.....	47
4.2.1	TOXICIDADE DO CIANETO PARA AS LINHAGENS DE MICROALGAS ISOLADAS	47
4.2.1.1	Ensaio de toxicidade com a microalga <i>Golenkinia</i> sp.....	47
4.2.1.2	Ensaio de toxicidade com <i>Chlorella</i> sp.....	48
4.2.1.3	Ensaio de toxicidade com a microalga <i>Monoraphidium</i> sp.	49
4.2.1.4	Ensaio de toxicidade com a microalga <i>Scenedesmus</i> sp.	50
4.2.2	DIGESTÃO DO AMIDO PELAS MICROALGAS ISOLADAS	52

4.3 ETAPA 3. ENSAIOS COM O RESÍDUO LÍQUIDO DO PROCESSAMENTO DA MANDIOCA (MANIPUEIRA).....	54
4.3.1 MANIPUEIRA COMO MEIO DE CULTIVO	54
4.3.2 SOBREVIVÊNCIA DAS MICROALGAS ISOLADAS USANDO MANIPUEIRA BRUTA COMO MEIO DE CULTURA	55
4.3.3 SOBREVIVÊNCIA DAS MICROALGAS ISOLADAS USANDO MANIPUEIRA BRUTA ESTÉRIL COMO MEIO DE CULTURA	58
4.3.4 SOBREVIVÊNCIA DAS MICROALGAS ISOLADAS USANDO O EFLUENTE DE MANIPUEIRA Digerido COMO MEIO DE CULTURA	61
4.3.5 SOBREVIVÊNCIA DAS MICROALGAS ISOLADAS USANDO O EFLUENTE DE MANIPUEIRA Digerido ESTÉRIL COMO MEIO DE CULTURA	64
<u>5 CONCLUSÃO.....</u>	<u>66</u>
<u>6. RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....</u>	<u>68</u>
<u>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS.....</u>	<u>69</u>

1 INTRODUÇÃO

Abrangendo desde microrganismos procarióticos como também eucarióticos, as microalgas são microrganismos que diferem muito umas das outras dependendo da espécie e assim como os outros microrganismos presentes na natureza, possuem uma vasta gama de rotas metabólicas, o que faz com que possam ser encontradas em ambientes diversos, onde predominam diferentes condições físicas como temperatura e luminosidade, e químicas como pH, salinidade e fontes de nutrientes (BARSANTI; GUALTIERI, 2014).

O crescimento das algas está relacionado diretamente às condições de cultivo, e entendendo essa relação é possível direcionar a produção. Dentre os fatores que podem influenciar no crescimento das células, pode-se citar: pH, salinidade, luminosidade, presença de contaminantes, temperatura, aeração, presença de íons bicarbonato, fonte de nitrogênio, tipo de biorreator, idade do inoculo e densidade populacional. O meio preparado para o cultivo influencia diretamente o crescimento celular, bem como na composição química da alga que está em estudo.

Os elementos nutritivos mais importantes são carbono, nitrogênio, fósforo, magnésio, potássio e cálcio. Microelementos como manganês e cobalto atuam favoravelmente em suas atividades vitais (LIMA et al., 2010). O dióxido de carbono é a fonte de carbono que contribui para o crescimento fotossintético e autotrófico das algas. Em alguns cultivos se faz necessária a adição de CO₂, pois no ar existem somente 0,03% de CO₂.

Os estudos sobre microalgas, hoje, visam mais que o conhecimento morfofisiológico dentro do ecossistema aquático, mas também sua possível aplicabilidade social e econômica. Mas, além disso, outras contribuições como produção de energia a partir da comunidade de microalgas vêm sendo avaliadas e aplicadas atualmente.

As microalgas têm se tornando valioso material de estudo na indústria biotecnológica devido a sua capacidade de produzir diversas biomoléculas com valor agregado e também, devido a sua composição em termos de matéria seca, muito rica em proteínas e lipídeos, são organismos atrativos na indústria de alimentos e biocombustíveis. Além disso, é mais vantajoso cultivar microrganismo do que plantas, uma vez que não são necessárias terras aráveis para seu desenvolvimento e seu crescimento é muito mais rápido comparado ao crescimento de plantas.

A importância do cultivo de microalgas baseia-se na variedade das suas aplicações. No entanto, quando são envolvidos cultivos de microalgas em resíduos agroindustriais, não se fala somente de produção de biomassa para obtenção de produtos com valor comercial, úteis

na alimentação humana e animal, na produção de energia química, fertilizantes e compostos de química fina, também tem-se uma diminuição de agentes poluentes contidos nos resíduos, o que pode contribuir na biorremediação de locais contaminados. Além disso, as microalgas possuem capacidade de obtenção de energia a partir do consumo de substratos orgânicos como o amido, na ausência de luminosidade em sistemas heterotróficos (FÁBREGAS et al., 1998).

A mandioca é uma matéria prima de elevada produção no Brasil, na média de 23 milhões de toneladas por ano segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2015). Seu processamento em farinha e fécula produz uma grande quantidade de resíduo líquido, até 60% da matéria prima, ocasionando um grande impacto ambiental principalmente nos recursos hídricos. Esse resíduo líquido denominado manipueira é altamente poluente, pela elevada carga orgânica, além da toxicidade pelo seu conteúdo de ácido cianídrico, porém a procura de alternativas para a utilização desse resíduo, nos últimos anos, tem sido o foco de muitas pesquisas.

Vários estudos têm visado o tratamento e aproveitamento do resíduo do processamento da mandioca. Já foram propostos tratamentos através da oxidação aeróbica e anaeróbica. O aproveitamento tem procurado utilizar todos os seus componentes, através da sua aplicação na agricultura como herbicida, nematicida e inseticida. Lagoas anaeróbicas são principalmente empregadas para o tratamento de águas residuais nas indústrias processadoras de mandioca gerando efluentes ricos em nutrientes tais como: nitrogênio, fósforo e gás metano, o qual é resultante da degradação microbiológica anaeróbia. O uso de microalgas como estratégia de tratamento de efluentes agroindustriais é uma técnica utilizada há algumas décadas. As microalgas têm a capacidade de assimilar a radiação solar e gás carbônico, e produzir o oxigênio requerido à degradação aeróbia da matéria orgânica. Além disso, atuam na assimilação de nutrientes, principalmente nitrogênio e fósforo, responsáveis pela eutrofização gerando biomassa com valor econômico e oferecendo uma valiosa alternativa para o tratamento de efluentes.

Visando melhorar o tratamento biológico da manipueira, foram definidos parâmetros tecnológicos para seu tratamento com microalgas isoladas das próprias lagoas de estabilização do resíduo líquido do processamento da mandioca.

A utilização de águas residuárias e outros poluentes são fatores extremamente limitantes ao crescimento de microalgas, principalmente sob altas concentrações de NH_3^+ e pH elevado (MUÑOZ; GUIEYSSE, 2006). É importante isolar microalgas a partir das lagoas de estabilização do resíduo que apresentem resistência ao meio e possam fornecer melhores

resultados, quando se tem por objetivo reduzir a poluição do efluente além de produzir biomassa com um elevado potencial para gerar produtos com valor comercial.

Sendo assim, o objetivo do presente trabalho foi desenvolver processos para obtenção de biomassa de microalgas isoladas do próprio efluente, e cultivadas na manipueira em diferentes condições, diluída em água sem adição de nutrientes, avaliando-se o crescimento das microalgas, a resistência ao cianeto, assim como a atividade amilolítica das microalgas estudadas.

1.1 OBJETIVO

1.1.1 Objetivo geral

Cultivar microalgas isoladas das lagoas de estabilização do resíduo líquido do processamento da mandioca, avaliando o crescimento e a formação de biomassa quando cultivadas em manipueira bruta e tratada.

1.1.2 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos do trabalho foram:

- a) Isolar novas cepas de microalgas obtidas em ecossistemas associados ao tratamento de efluente da indústria de processamento de mandioca;
- b) Identificar morfológicamente as microalgas isoladas;
- c) Determinar a toxicidade do cianeto presente na manipueira para as microalgas isoladas;
- d) Avaliar a digestibilidade de amido pelas microalgas;
- e) Identificar as melhores condições de cultivo para as linhagens isoladas, em meios contendo manipueira bruta e manipueira tratada por digestão anaeróbia.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 MICROALGAS

As microalgas apresentam vantagens de reprodução em condições autotróficas, mixotróficas e heterotróficas, já que possuem a capacidade de utilizar uma variedade de substratos orgânicos como fonte de carbono e energia, além do CO₂ e água (TANDEAU DE MARSAC; HOUMARD, 1988). As microalgas podem ser encontradas em uma grande variedade de ambientes, desde fontes de água doce até águas salgadas, assim como na superfície da neve ou sobre rochas e troncos ou ramos de árvores. A estimativa de espécies de algas existentes varia de um a dez milhões, sendo as microalgas a maioria (BARSANTI; GUALTIERI, 2014). Os oceanos, que cobrem cerca de 70% da superfície da Terra, contêm mais de cinco mil espécies de algas planctônicas microscópicas (*fitoplâncton*), que por sua vez compõem a base da cadeia alimentar marinha. Apesar dessa relação com a vida, o *fitoplâncton* algumas vezes pode ser o causador de mortes: quando sua população torna-se muito grande, num fenômeno conhecido como *bloom* e que ocorre graças à poluição (desequilíbrio causando excesso de nutrientes como nitrogênio e fosfato em seu habitat), a transparência da água é reduzida, prejudicando outros organismos fotossintéticos ou ainda, produzindo toxinas que provocam a morte de animais marinhos e aves (BARSANTI; GUALTIERI, 2014; JO; LEE, 2009).

As microalgas também possuem um alto conteúdo de proteínas, pigmentos e um metabolismo versátil. Motivo pelo qual, a sua composição bioquímica pode se modificar variando as condições do cultivo, como temperatura, pH, intensidade luminosa, fotoperíodo, salinidade e a idade da cultura (MALDONADO; MORALES; ROMERO, 2013), sendo de interesse para a produção de compostos com utilidade comercial, alimentar, agrícola, cosmética e farmacológica (FÁBREGAS et al., 1998).

Com o objetivo de melhorar o custo-benefício da produção industrial, uma grande diversidade de microalgas apresenta capacidade para serem cultivadas com substratos orgânicos como açúcares, aminoácidos, ácidos orgânicos e resíduos agroindustriais como fontes de carbono. O uso simultâneo de luz e substrato orgânico no crescimento mostra a capacidade mixotrófica das microalgas (FÁBREGAS et al., 1998; SÁNCHEZ-TORRES et al., 2008). Os cultivos mixotróficos podem produzir uma alta quantidade de biomassa em relação à biomassa obtida de cultivos autotróficos e heterotróficos, isso acontece devido ao aporte de energia luminosa e ao substrato orgânico (CAMARGO; ALONSO, 2006).

O uso de substratos com conteúdo de amido, os quais às vezes formam parte de resíduos das indústrias processadoras de produtos agrícolas, podem ser usados como fonte de compostos orgânicos para diminuir custos na produção de biomassa microalgal enriquecida com proteínas, lipídeos ou carboidratos e de outros compostos de interesse comercial, quando comparado com o uso de meios de cultura sintéticos ou de fertilizantes comerciais.

2.1.1 Classificação de microalgas

Existe uma grande variedade de microalgas com diferentes tamanhos, morfologias, entre outras características e, ao contrário de outros microrganismos, contêm clorofila. Em 1995, Hoek, Mann, e Jahns estabeleceram a divisão de microalgas de acordo com o tipo de estrutura da célula em dois grupos. Microalgas com estrutura celular procariótica: *Cyanophyta* e *Prochlorophyta*, e com estrutura celular eucariótica: *Chlorophyta*, *Euglenophyta*, *Rhodophyta*, *Prymnesiophyta*, *Cryptophytas* e *Dinophyta*, segundo a classificação de Montaña (2016).

No ano 2000, Graham e Wilcox, usando a classificação de Hoek, Mann e Jahns, propuseram uma nova classificação das algas em doze grandes grupos: *Cyanophyta*, *Prochlorophyta*, *Glaucophyta*, *Rhodophyta*, *Euglenophyta*, *Heterokontophyta*, *Cyanophyta*, *Haptophyta*, *Chlorarachniophyta*, *Chlorophyta*, *Dinophyta* e *Cryptophyta* (SHEATH; WEHR, 2015).

Hoje em dia não existe um sistema de classificação facilmente definível para este grupo de organismos, uma vez que a taxonomia está sob constante e rápida revisão a todos os níveis, seguindo novas evidências genéticas e ultraestruturais. Barsanti (2014), tendo em mente que a natureza polifilética do grupo algas é um tanto inconsistente com os grupos taxonômicos tradicionais, adota o esquema de classificação (Tabela 1) baseado principalmente nas classificações mais recentemente publicadas.

Tabela 1. Esquema de classificação de grupos algais

Reino	Divisão	Classe	
Procaryota	Cyanophyta	Cyanophyceae	
	Prochlorophyta	Prochlorophyceae	
Eukaryota	Glaucophyta	Glaucophyceae	
	Rhodophyta	Bangiophyceae	
		Florideophyceae	
	Heterokontophyta	Chrysophyceae	
		Xanthophyceae	
		Eustigmatophyceae	
		Bacillariophyceae	
		Raphidophyceae	
		Dictyochophyceae	
		Phaeophyceae	
		Haptophyta	Haptophyceae
		Cryptophyta	Cryptophyceae
		Dinophyta	Dynophyceae
	Euglenophyta	Euglenophyceae	
	Chlorarachniophyta	Chlorarachniophyceae	
	Chlorophyta	Prasinophyceae	
		Chlorophyceae	
		Ulvophyceae	
		Cladophorophyceae	
		Bryopsidophyceae	
Zygnematophyceae			
Trentepohliophyceae			
Klebsormidiophyceae			
Charophyceae			
	Dasycladophyceae		

Fonte: BARSANTI; GUALTIERI, (2014).

Os membros procarióticos desta assembleia são agrupados no domínio Bacteria, *phylum Cyanobacteria*. Já os membros eucarióticos são agrupados nos domínios *Plantae*, *Chromista* e *Protozoa* (BARSANTI; GUALTIERI, 2014).

2.1.2 Microalgas obtidas em sistemas de tratamento

As microalgas que são usadas nos sistemas de tratamento de águas residuais são capazes de suportar elevadas concentrações de nutrientes, apresentam atividade metabólica elevada, contribuir na oxidação bacteriana, resistência a variações ambientais e estratégias fisiológicas para um crescimento mixotrófico (GONZÁLEZ, 2006).

Alguns desses microrganismos são capazes de produzir exoenzimas degradadoras de compostos orgânicos em águas residuais, gerando substratos mais assimiláveis para seu crescimento e metabolismo, o que significa que a carga orgânica dos efluentes pode ser degradada pelas enzimas produzidas (PUERTA, 2010).

É importante o isolamento de linhagens de microalgas em sistemas de tratamentos, quando objetiva-se reduzir a poluição do efluente além de produzir biomassa com um elevado potencial para gerar produtos com valor comercial. As microalgas podem ser utilizadas na produção de biocombustíveis seguindo diferentes vias potenciais. Na produção de metano através de fermentação anaeróbica da biomassa (FRIGON et al., 2013); na produção de biohidrogênio por fermentação aeróbia/anaeróbia (CHEN et al., 2013) como fonte de óleos para a geração de biodiesel (CHEN et al., 2013; CHISTI, 2007; KAPDAN; KARGI, 2006; YEN et al., 2013) e produção de etanol (BAHADAR; BILAL KHAN, 2013; CHEN et al., 2013).

2.2 CRESCIMENTO DE MICROALGAS

As microalgas possuem requerimentos simples para seu crescimento, necessitando apenas de luz, uma fonte de carbono, uma fonte de nitrogênio (muito importante na produção de proteínas) e fontes inorgânicas de macro e micronutrientes, sendo as mais importantes: fosfato, sais de magnésio, potássio, manganês e cobalto que atuam favoravelmente em suas atividades vitais e podem alterar sua composição bioquímica (PARMAR et al., 2011; VAZ et al., 2016). Embora a maioria das microalgas cresça na presença de luz e utilizando apenas nutrientes inorgânicos, algumas são capazes de se desenvolver em completa escuridão, utilizando fontes orgânicas de nutrientes (STENGEL; CONNAN; POPPER, 2011).

Uma vez que são organismos capazes de realizar fotossíntese, são considerados produtores primários de matéria orgânica, e também responsáveis pelo sequestro de carbono presente na atmosfera e na liberação de oxigênio (PARMAR et al., 2011).

Seus requerimentos nutricionais simples, rápido crescimento, menor espaço físico requerido para seu cultivo e a geração de menos resíduos em comparação com a produção de vegetais, tornam as microalgas vantajosas na utilização industrial (BORGHETTI, 2009; RUFFING, 2011). Ainda, devido à sua capacidade de se adaptar aos mais diversos meios, é possível a utilização de meios alternativos, como por exemplo, esgoto doméstico, efluentes de suinocultura e laticínios, e resíduos industriais como a manipueira (BERTOLDI; SANT'ANNA; OLIVEIRA, 2008; DOS SANTOS et al., 2016; KUO et al., 2015; SYDNEY et al., 2011). As atividades metabólicas das microalgas podem ser intensamente afetadas pelas condições químicas e físicas do ambiente. Há vários fatores que podem tornar-se limitantes do crescimento algal, principalmente luz e temperatura.

2.2.1 Temperatura

A temperatura é um importante fator de regulação da velocidade de reações químicas nos processos biológicos, como a fotossíntese e a respiração. A velocidade de crescimento do fitoplâncton, portanto, também tende a aumentar com o aumento proporcional da temperatura (até 35° ou 40°C). A temperatura pode também alterar a morfologia das células. Por exemplo, algumas espécies cenobiais ou filamentosas (*Stichococcus*, *Scenedesmus*) podem desagregar-se em células solitárias sob temperaturas elevadas e outras podem alterar as dimensões das células (*Synechococcus*, *Desmidea*) (WOJCIECHOWSKI et al., 2013). Para Sakai et al. (1995), algumas algas, como a *Chlorella* sp., podem suportar uma temperatura de até 42°C.

2.2.2 Luz

As características mais importantes da luz para as algas são a intensidade luminosa (quantidade de fótons incidindo sobre uma determinada área) e a qualidade do espectro luminoso. Alguns comprimentos de onda são danosos ao aparelho fotossintético das algas, como o ultravioleta (UV e, principalmente, UVb), mas eles são em grande parte absorvidos pelo ozônio (O₃) atmosférico (WOJCIECHOWSKI et al., 2013).

A luz permite a realização da fotossíntese pelas algas. De acordo com Carioca (1984), a faixa de aproveitamento das radiações luminosas pelos vegetais situa-se entre 400 e 700 nm (radiações fotossinteticamente ativas). Elas correspondem a 50% da radiação solar, que se situa numa faixa de intensidade de 800 a 1.000 W/m².

2.2.3 pH

A maior parte dos ambientes aquáticos apresenta pH entre 6 e 9. As variações no pH modificam o estado químico de várias substâncias importantes para as algas, como o CO₂, fosfato, amônia, ferro e metais-traço. Além disso, o pH interfere diretamente no metabolismo algal, pois, juntamente com outros fatores, atua na permeabilidade da membrana, no transporte iônico e na velocidade das reações enzimáticas (WOJCIECHOWSKI et al., 2013).

2.2.4 Aeração

A aeração é um fator muito importante para a homogeneização dos nutrientes e das células de microalgas, assim como para a manutenção da temperatura e transferência de gases através da interface gás-líquido. A concentração de O₂ nos tanques de cultura representa um

bom parâmetro para se controlar a atividade fotossintética das microalgas, assim, quando se aumenta a atividade fotossintética, a concentração de O₂ pode aumentar rapidamente, inibindo o processo da fotossíntese, favorecendo a fotoxidação (RICHMOND, 2004) o que pode ocasionar danos na morfologia celular, bem como a morte da cultura em estudo.

Sendo assim, dependendo das condições de cultivo e do formato do fotobiorreator, pode ser necessário suplementar dióxido de carbono, por exemplo, numa proporção de 1% do volume de ar alimentado, garantindo ainda uma maior estabilidade quanto às mudanças no pH, graças ao balanço CO₂/HCO³⁻ na solução (BARSANTI; GUALTIERI, 2014; VONSHAK; RICHMOND, 1988).

2.3 INDÚSTRIA DE MANDIOCA NO BRASIL

A mandioca é uma das principais culturas de alimentos na dieta humana e de animais na maioria dos países tropicais. Destaque ao Brasil que, no ano de 1970, produziu cerca de 30 milhões de toneladas e participou com 30% da produção mundial, sendo nesse ano o maior produtor de mandioca no mundo. Na sequência perdeu a hegemonia para a Nigéria e mais tarde cedeu o 2º e 3º lugar para a Indonésia e a Tailândia. Atualmente o Brasil ocupa o quarto lugar na produção mundial conforme a Tabela 2 (SEAB, 2015).

Tabela 2. Produção mundial de mandioca - países selecionados (participação %)

Países	Produção mundial (milhões de toneladas) 2013	Participação mundial (%) 2013
Nigéria	53,0	19,5
Tailândia	30,2	10,9
Indonésia	23,9	8,6
Brasil	21,5	7,7

Fonte: SEAB (2015).

Segundo dados do IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística), a estimativa da produção de mandioca em 2016 alcançou 23,7 milhões de toneladas, aumento de 4,2% frente a 2015, processada para a produção de farinha e fécula principalmente, sendo a regiões norte e nordeste do Brasil as principais produtoras (Tabela 3) (IBGE, 2015).

Tabela 3. Mandioca - principais produtores no Brasil (área, produção e produtividade) 2013/2014

REGIÕES	ÁREA (1000 ha)	PRODUÇÃO (1000 t)	PRODUTIVIDADE (kg/ha)	PARTICIPAÇÃO (%)
NORDESTE	580	6.012	10.366	25,9
NORTE	520	7.836	15.069	33,7
SUDESTE	141	2.268	16.085	9,8
CENTRO-OESTE	74	1.352	18.270	5,8
SUL	274	5.778	21.088	24,8

Fonte: SEAB (2015).

Em relação a outras culturas, o cultivo de mandioca apresenta algumas vantagens como: boa rentabilidade, menor risco de perdas por adversidades climáticas e a possibilidade de colheita na época em que o produtor considerar mais conveniente. A mandioca contém cerca de 65% de água nas raízes, com aproximadamente 35% de fécula. Nas fábricas de farinha de mandioca, a prensagem da massa ralada produz cerca de 300 litros de líquido residual por tonelada de raiz e, nas fecularias, este valor aumenta para 600 litros de um efluente mais diluído, devido à adição de água durante sua produção. Durante a prensagem das raízes de mandioca ralada gera-se um líquido branco chamado de manipueira (FIORETTO, 2000; WOSIACKI; CEREDA, 2002).

2.3.1 Produção de amido de mandioca

Segundo dados da Associação Brasileira de Produtores de Amido (ABAM), a evolução da produção de fécula no Brasil, representada na Figura 1, mostrou um aumento considerável na última década. Na Figura 2 observa-se a produção de fécula pelos estados brasileiros, destaca-se o estado de Paraná com 70% da produção de amido.

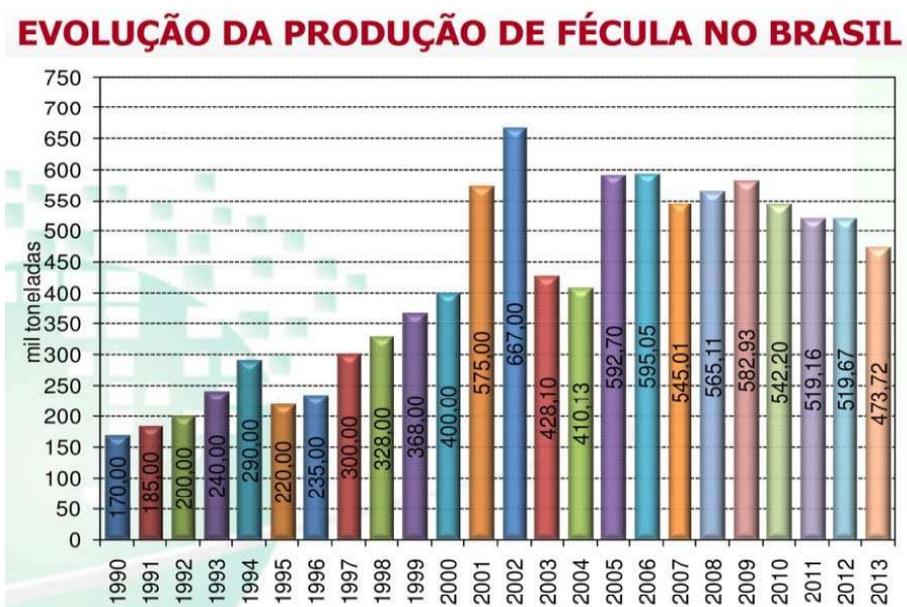


Figura 1. Evolução da produção de fécula no Brasil (ABAM, 2014).

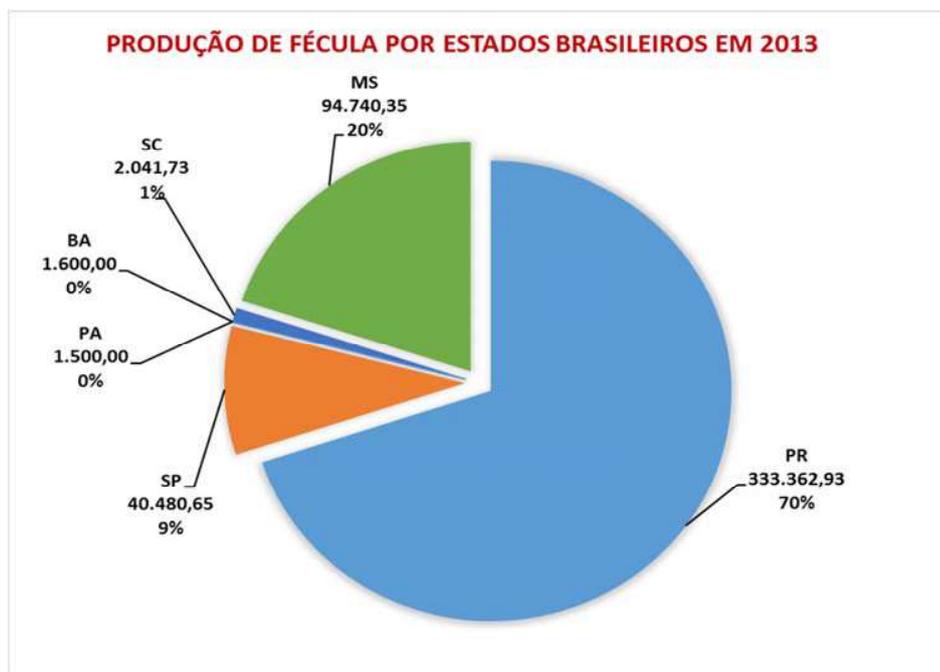


Figura 2. Produção de fécula por estados brasileiros em 2013 (ABAM, 2014).

2.3.2 Processo de produção de amido de mandioca

O processamento das raízes de mandioca começa com a coleta, transporte e recepção da matéria-prima na indústria processadora. Do depósito, segue a pré-limpeza, sendo que equipamentos especializados possibilitam a lavagem e descascamento das raízes simultaneamente. No processo é retirado somente o tênue, que constitui a pele (casca marrom), evitando perdas de teor de amido (EMBRAPA, 2003).

A trituração ou ralação tem função de padronizar o tamanho das raízes em 2 a 3 cm, para depois serem desintegradas. A desintegração é feita através do contato entre as raízes trituradas e um cilindro rotativo, com lâminas dentadas na superfície que ralam a mandioca, causando rompimento celular e conseqüente liberação do amido. O material ralado (massa) é bombeado para peneiras cônicas rotativas, constituindo-se numa mistura mandioca-água (EMBRAPA, 2003).

A extração tem como finalidade separar o amido das fibras da mandioca. A extração é feita em peneiras cônicas rotativas onde a água entra em contracorrente para melhor separar o amido. Este líquido que vem da extração segue para a purificação. A polpa resultante é canalizada para a rede de tratamento de efluentes, ou opcionalmente poderá seguir processo de secagem para fabricação de rações (EMBRAPA, 2003).

Na purificação o "leite" de amido obtido após a extração é purificado com a adição de água e centrifugado para a retirada dos amidos solúveis e partículas. Posteriormente segue para uma peneiração, processo usado para eliminar a popa fina, servindo como melhorador na qualidade do produto. Em seguida, a mistura de amido com água segue para a concentração, em centrifuga de pratos e bicos, cuja finalidade é concentrar o amido até 20 a 22 °Bé. A água separada do amido é canalizada para a rede de tratamento de efluentes da fábrica. O amido concentrado segue por gravidade e/ou bombeamento a um tanque especial de homogeneização cujo equipamento dispõe de um mecanismo que permite a mistura constante (mexedor) do produto concentrado, para evitar a decantação (EMBRAPA, 2003).

Na desidratação o amido concentrado é bombeado do tanque especial para um desidratador a vácuo, conhecido por filtro a vácuo que, na prática, trata-se de uma tela cilíndrica, perfurada e coberta por tecidos, removível a cada oito horas em média. O desidratador leva o amido a uma umidade de 45%, para que seja posteriormente secado (EMBRAPA, 2003).

Na secagem o amido desidratado a vácuo segue para uma válvula rotativa que o dosa para um secador pneumático. O produto é conduzido e seco por uma corrente de ar quente. A

separação do ar e amido é feita em ciclones. O ar quente atinge 150°C e apresenta, na saída da tubulação, um produto final com umidade entre 12 a 13%, em forma de pó e com temperatura média de 58°C, seguindo para um silo que irá resfriá-lo, estocá-lo temporariamente e conduzi-lo posteriormente para o ensacamento. Os passos descritos anteriormente são ilustrados na Figura 3 (EMBRAPA, 2003).

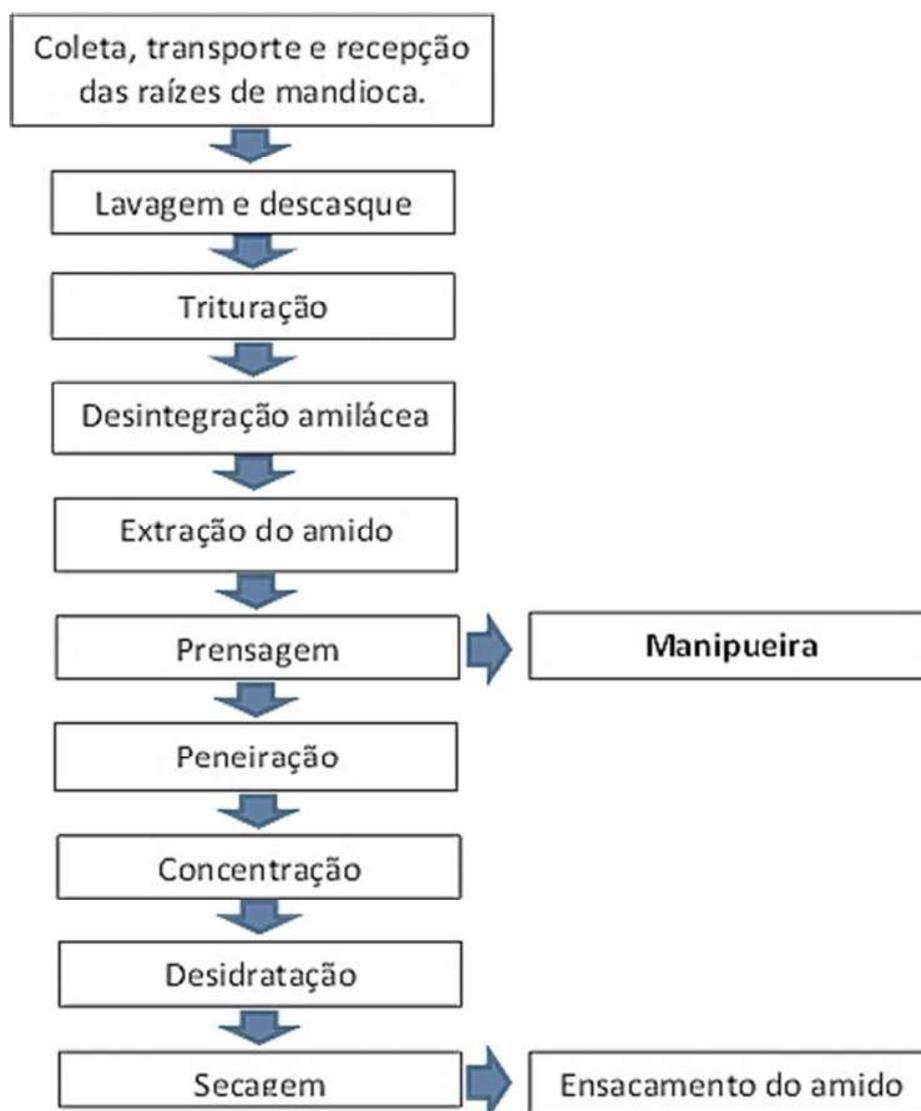


Figura 3. Fluxograma do processamento da mandioca. EMBRAPA, (2003).

O processamento da mandioca gera resíduos sólidos e líquidos, pois para uma tonelada de raízes de mandioca com 40% de sólidos, são gerados de 50 – 100 kg de bagaço e na média de 200-300L de resíduo líquido (Tabela 4). Durante o processamento para a produção de

amido, a quantidade de água residual pode ser até dez vezes maior, embora a carga orgânica seja semelhante, sendo que a separação do amido é altamente eficiente e as águas residuais da lavagem do amido são reutilizadas para lavagem das raízes antes do processamento (CARVALHO et al., 2011).

Tabela 4. Balanço de massa típico para farinha de mandioca e produção de amido a partir de 1000 kg de raízes

<i>Componente</i>	<i>Produção de farinha de mandioca (kg)</i>	<i>Teor de sólidos (%)</i>	<i>Produção de amido (kg)</i>	<i>Teor de sólidos (%)</i>
Águas residuais da lavagem das raízes	1000	99,9	Passado da lavagem de amido	0,5
Cascas	50	40	50	40
Fibra (bagaço de mandioca)	0	40	317	40
Manipueira	217	0	2950	0,4
Vapor de água	316	0	410	0
Produto	417	88	271	88

Fonte: Carvalho et al. (2011).

2.3.3 Manipueira

A manipueira é um resíduo líquido resultante do processamento da mandioca pela fabricação de farinha e fécula (amido). A manipueira é de aspecto leitoso, tem grande potencial poluente decorrente de seu elevado conteúdo em matéria orgânica. Quimicamente, apresenta-se como uma mistura de amido, glicose e outros açúcares, proteínas e derivados cianogênicos dentre outras substâncias orgânicas e sais minerais (LIMA, 2010). Uma tonelada de raízes de mandioca pode conter em média 60% de umidade. Na prensagem cerca de 20 a 30% dessa água é eliminada. O resíduo líquido da mandioca destaca-se pelo conteúdo de sólidos totais, além da alta demanda bioquímica de oxigênio (DBO) de 55.000 mg.L⁻¹ e alta toxicidade devido à presença de ácido cianídrico. O cianeto presente na manipueira, cerca de 450mg.L⁻¹, causa impacto negativo ao meio ambiente e riscos à saúde pública pela sua toxicidade, em especial quando esse efluente é lançado diretamente nos recursos hídricos de água doce (WOSIACKI; CEREDA, 2002).

2.3.4 Poluição e impacto ambiental da manipueira

A manipueira tem sido estudada por sua característica poluidora principalmente dos recursos hídricos. Para Fioretto (2000), o principal problema que a manipueira traz ao meio ambiente deve-se à poluição conferida pelo teor de carboidratos que tem presente e também à toxicidade conferida pela presença da linamarina, glicosídeo cianogênico encontrado em todas as partes da matéria-prima, mas sobretudo nas folhas e na entrecasca das raízes. A disposição desse efluente industrial, energeticamente não esgotado e de elevada toxicidade, em águas fluviais acarreta prejuízos de ordem ambiental, pois causa a diminuição da disponibilidade aquática de oxigênio provocando danos à vida aeróbia (BARANA, 2000). Na busca de alternativas para a diminuição do impacto ambiental gerado pela manipueira, as indústrias têm usado como tratamento para o efluente, nos últimos anos, lagoas anaeróbias, porém a contaminação pode chegar aos lençóis freáticos. Pesquisas têm demonstrado que o tratamento adequado deste resíduo pode contribuir para a redução da poluição ambiental bem como permitir a valorização econômica dele, o que faz de grande interesse a procura por desenvolver técnicas de tratamento adequadas para o efluente.

2.3.5 Principais usos e tratamentos da manipueira

Muitos estudos foram realizados com o objetivo de dar um uso sustentável para a manipueira, ao mesmo tempo em que ela é tratada. Na agricultura principalmente o resíduo líquido do processamento da mandioca é reaproveitado como adubo foliar (INOUE et al., 2011; SARAIVA et al., 2007; VIEITES, 1998), biofertilizante (DOS SANTOS et al., 2010; INOUE, 2008), produção de biogás (BARANA, 2000; BARBOSA et al., 2010b; INOUE, 2008), inseticida (PRATIS et al., 2013), fertirrigação (CARDOSO; PAULA; AMANTE, 2004; PINTO, 2008), nematicida (BARBOSA et al., 2010a) e substrato para fermentação (BORGHETTI, 2009; CASSONI, 2008; LEONEL; CEREDA, 1995; PÁSKOVÁ; MUNK, 2010). O tratamento de águas residuais pode ser feito por processos físicos, químicos e biológicos. As operações físicas consistem em operações de separação ou mistura. Os processos químicos são aqueles em que a remoção de contaminantes ocorre via atividade química. Exemplos comuns dessa categoria são: a precipitação química (floculação), transferência gasosa, adsorção, troca iônica e eletrodialise. Os processos biológicos, por sua vez, são representados pelos métodos em que o tratamento de resíduos e contaminantes se

desenvolve por atividade biológica de bactérias, fungos filamentosos, leveduras, protozoários, entre outros (LIMA, 2010).

2.3.5.1 Tratamento biológico

O tratamento biológico para águas residuais baseia-se num processo em que populações mistas de microrganismos utilizam os nutrientes contidos nos resíduos para o seu crescimento. No caso da manipueira que tem um elevado conteúdo orgânico é preferida a lagoa anaeróbica por apresentar um balanço energético mais favorável em relação aos processos aeróbios convencionais, como baixo consumo de energia, baixa produção de lodo e a possibilidade de recuperação e utilização do metano como gás combustível. Porém, Barana (2000) afirma que o principal interesse por processos de digestão anaeróbia é devido à necessidade, cada vez maior, de se preservar o meio ambiente, e sua viabilidade não é mais medida em termos de produção de combustível, mas em capacidade de estabilização de resíduos.

O método de digestão anaeróbia é o mais utilizado pelas indústrias processadoras de fécula de mandioca para tratarem os resíduos produzidos. Ubalua (2007) relatou que esses processos requerem grandes tanques ou biorreatores e tempos de retenção longos, de 20-25 dias. No processo de digestão anaeróbia a matéria orgânica é convertida em dióxido de carbono e metano, e o nitrogênio orgânico é convertido em amônia. Geralmente, a amônia é reciclada como fertilizante ou removida através de nitrificação em sistemas de tratamento; alternativamente poderia ser recuperado e catalisado, convertido em hidrogênio, fornecendo assim combustível adicional (BABSON et al., 2013). A importância do tratamento da mandioca com métodos anaeróbios é que se pode obter ao final do tratamento um produto final que é rico em biomassa microbiana e que pode ser utilizado como fertilizante agrícola (CARDOSO; PAULA; AMANTE, 2004; FIORETTO, 2000; INOUE, 2008; INOUE et al., 2011; SARAIVA et al., 2007), além de um produto gasoso (biogás, gás de esgoto) que pode conter mais do que 50% de metano, e que pode contribuir para a maioria ou a totalidade das necessidades de energia do processo de tratamento (BARANA, 2000; BARBOSA et al., 2010b; INOUE, 2008; UBALUA, 2007).

2.3.6 Composição da manipueira

A manipueira é composta pela água de lavagem durante a prensagem da mandioca, mais o líquido que constitui a raiz. Apresenta coloração amarelo-claro, aspecto leitoso e contém

açúcares, gomas, proteínas, sais, linamarina, derivados cianogênicos e outras substâncias (LIMA, 2010). A composição química da manipueira pode ser vista na Tabela 5 a seguir:

Tabela 5. Composição máxima e mínima da água residual do processamento de mandioca

Parâmetros	Mínimo	Máximo
pH	3,8	5,2
DQO (mgL⁻¹)	6.280	51.200
DBO (mgL⁻¹)	1.400	34.300
Sólidos totais (mgL⁻¹)	5.800	56.400
Sólidos solúveis (mgL⁻¹)	4.900	20.460
Sólidos em suspensão (mgL⁻¹)	950	1.600
Sólidos fixos (mgL⁻¹)	1.800	20.460
Matéria orgânica (mgL⁻¹)	1.500	30.000
Açúcares redutores totais (mgL⁻¹)	2.800	8.200
Fosfato total (mgL⁻¹)	155	598
Nitrogênio total (mgL⁻¹)	140	1.150
Cinzas (mgL⁻¹)	350	800
Sólidos sedimentáveis (mgL⁻¹)	11	33
HCN (mgL⁻¹)	22,0	27,1

Fonte: LAMO e MENEZES, (1979) apud (PINTO, 2008).

Contudo, a manipueira e seu conteúdo cianogênico são um problema socioambiental. A linamarina é um glicosídeo cianogênico tóxico que quando hidrolisada pela linamarase (enzima presente na própria raiz da planta) pode liberar ácido cianídrico (HCN), bastante tóxico e volátil, tornando a manipueira um problema ambiental (DOS SANTOS et al., 2010; GONZAGA; SOUZA; RIBIEIRO, 1907). A concentração de cianetos presentes na manipueira varia de acordo com as condições de crescimento das raízes de mandioca (EHIAGBONERE et al., 2009). Os teores de cianetos livres e totais encontrados na manipueira, segundo diversos autores, podem ser vistos na Tabela 6.

Além desse problema com a liberação de cianetos, a manipueira é prejudicial ao meio ambiente devido à sua alta demanda bioquímica de oxigênio (DBO) e elevados teores de potássio, magnésio, cálcio e fósforo (BRANCO, 1967).

Tabela 6. Teores de cianetos livres e totais presentes na manipueira

CN ⁻ (mg/L)	Cianetos totais	Fonte
42,5	604 mg/L	(PONTE, 1995)
22-27,1	463,76 mg/L	(CEREDA, 2002)
	444 mg/kg	(BRITO et al., 2009)
	83,86 mg/kg	(BARANA, 2000)
	114,2 mg/kg	(CAMILI, 2007)

2.3.6.1 Cianeto

Os cianetos são uma família de compostos que contêm o ânion cianeto altamente reativo, os mais encontrados na natureza são o cianeto de potássio (KCN) e o cianeto de hidrogênio. A mandioca pertence ao grupo de plantas cianogênicas por apresentar glicosídeos cianogênicos em sua composição. De acordo com Cereda et al. (2002), tais glicosídeos, conhecidos como linamarina e lotaustralina (proporção de 93:7 no tubérculo), após ruptura da estrutura celular da raiz, entram em contato com as enzimas presentes (linamarases) degradando estes compostos, liberando ácido cianídrico (HCN)(Figura 4), que é o princípio tóxico da mandioca e cuja ingestão ou mesmo inalação, representa sério perigo à saúde, podendo ocorrer casos extremos de envenenamento.

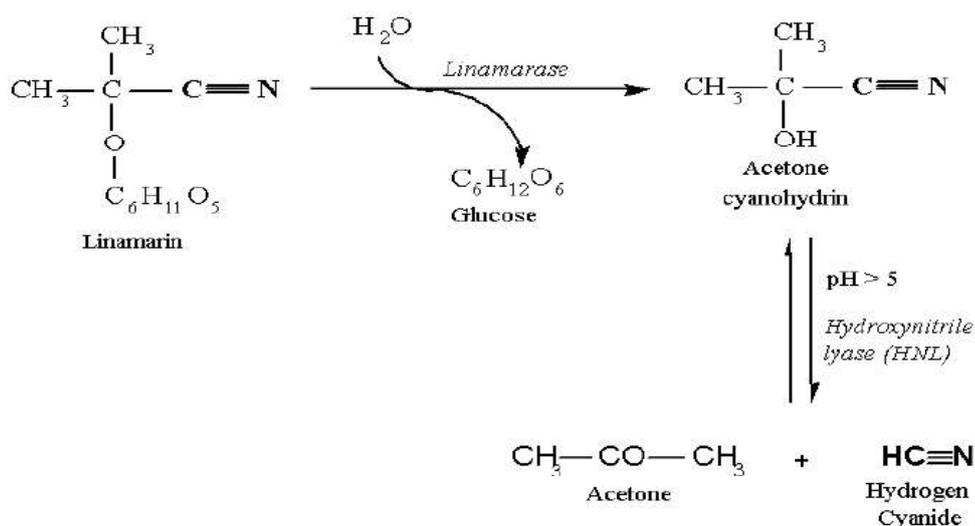


Figura 4. Geração de cianeto a partir de glicosídeos cianogênicos na mandioca (CARVALHO et al. 2011)

Segundo Cereda (2002), a liberação do cianeto da mandioca se dá no momento em que o tecido vegetal é dilacerado, então a linamarina é hidrolisada enzimaticamente por β -glicosidase (linamarase), a qual é separada do glicosídeo no tecido intacto, por ser localizada em lugar distinto da célula. A clivagem produz glicose e α -hidroxinitrilas. Esta última, quando catalisada por uma hidroxinitrila-liase, transforma-se espontaneamente em HCN e nas cetonas correspondentes.

Unung et al. (2006) citam que, no processamento tradicional das raízes de mandioca, os compostos cianogênicos diminuem substancialmente em teor, no entanto, os níveis continuam acima do reconhecido seguro.

Em meio altamente básico, os cianetos se encontram na forma iônica – cerca de 90% de CN^- em pH 10,2, enquanto que em pH mais baixo, encontra-se na forma de ácido cianídrico – cerca de 90% de HCN em pH 8,4. O problema de se trabalhar com pH baixo e consequentemente o cianeto na forma de HCN é o fato do HCN possuir pressão de vapor alta (100 kPa a 26°C) o que o torna altamente volátil, causando, além perda de cianetos na solução, um maior risco de contaminação.

Devido à sua presença na composição da manipueira, é importante que haja um conhecimento prévio de quanto é suportado pelas culturas de microalgas, uma vez que estas serão cultivadas em meios contendo altas concentrações de manipueira. A concentração suportada de sais cianetos por diferentes espécies de microalgas, de acordo com vários autores, pode ser vista na Tabela 7.

Tabela 7. Toxicidade de sais de cianeto para microalgas, segundo vários autores

Espécie	Sais	Intervalo testado	Concentração suportada	pH	Fonte
<i>Chroococcus</i> sp.	KCN	5 -150 mg/L	>30 mg/L	-	(NAGHAVI et al., 2012)
<i>Arthrospira maxima</i>	NaCN	50 - 100 mg/L	<50 mg/L	10,3	(GURBUZ et al., 2004)
<i>Chlorella</i> sp.	NaCN	50 - 100 mg/L	>50 mg/L	10,3	
<i>Scenedesmus obliquus</i>	NaCN	50 - 400 mg/L	>400 mg/L	10,3	(GURBUZ et al., 2009)
<i>Entomoneis paludosa</i>	BrCN	0.0001 - 0,01 mg/L	0,002 mg/L	-	(VANELSLANDER et al., 2012)
<i>Entomoneis paludosa</i>	NaCN	0.0001 - 0,01 mg/L	>0,04 mg/L	-	
<i>Scenedesmus</i> sp	CN-		>25 mg/L	9,5	(PATIL, 2012)
<i>Scenedesmus</i> sp	NaCN		>10 mg/L	9,5	
<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> .	KCN		< 1 mg/L	-	(CHOI; BERGES; YOUNG, 2012)
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	KCN		<2 mg/L	-	
<i>Navicula pelliculosa</i>	KCN		<0.5 mg/L	-	
<i>Synura petersenii</i>	KCN		< 1 mg/L	-	

2.3.6.2 Amido

A fonte de carbono orgânico presente na manipueira é principalmente o amido, motivo pelo qual deve ser avaliada sua digestibilidade pelas microalgas. O amido é composto por unidades de glicose, organizadas em dois homopolissacarídeos, a amilose e a amilopectina. A amilose praticamente não apresenta ramificações, sendo que as unidades de glicose são conectadas por ligações glicosídicas do tipo α (1,4) e a porcentagem de ramificações α (1,6) é menor do que 1% (BALL; VAN DE WAL; VISSER, 1998). A amilopectina, uma das maiores biomoléculas conhecidas, é altamente ramificada e possui cadeias de resíduos de glicose ligados entre si por ligações glicosídicas do tipo α (1,4) com aproximadamente 5% de ramificações α (1,6) (MYERS et al., 2000). Dependendo da origem, o amido possui diferentes proporções de amilose e de amilopectina.

Muitas enzimas, a maioria delas hidrolases, estão envolvidas na hidrólise do amido. As cadeias de glicose podem ser atacadas de forma endo (no centro da molécula) ou exo, isto é na porção terminal não redutora da molécula (AMARAL et al., 2007). O ataque endo é efetuado pela α -amilase, responsável pela quebra de ligações do tipo α (1,4) internas ao polissacarídeo. Esta é a enzima que ataca o grânulo de amido intacto. Em seguida, os oligossacarídeos (maltodextrinas) formados pela ação da α -amilase são atacados pelas exo-glucanases. O amido também pode ser atacado por uma exo-enzima, a β -amilase, que libera unidades de maltose a partir do final não redutor do glucano e α (1,6)-glucanases específicas atacam os oligossacarídeos ramificados (não atacados pela α -amilase) liberando maltose. Este dissacarídeo é finalmente hidrolisado a glicose pela α -glucosidase (BECK; ZIEGLER, 1989).

A produção de enzimas extracelulares, como amilase, protease, lipase, celulase e fosfatase é uma propriedade avaliada em microalgas e cianobactérias; são utilizadas também com carácter taxonômico, para identificação de espécies (CADORET; CONRAD; BLOCK, 2002).

A capacidade de produção de exoenzimas pelas microalgas pode ser usada como ferramenta para induzir uma maior eficiência na degradação de compostos orgânicos presentes nas águas residuais. As enzimas extracelulares ou ectoenzimas ficam na superfície da célula e as de forma livre como as exoenzimas são absorvidas dentro das substâncias poliméricas extracelulares (EPS) do lodo no tratamento de águas residuais (PUERTA, 2010); as hidrolases são importantes principalmente na velocidade da hidrólise na digestão anaeróbia.

2.4 CULTIVO DE MICROALGAS EM MANIPUEIRA

A elevada eficiência fotossintética das microalgas torna-as os principais produtores primários em ambientes aquáticos, estes microrganismos são responsáveis por cerca de 40-50% da fixação de carbono e da produção de oxigênio no planeta. Seu tamanho pequeno e estrutura simples são parcialmente responsáveis por seu rápido crescimento: as microalgas crescem mais rápido do que a maioria das plantas em ecossistemas naturais. Embora adaptadas para o crescimento autotrófico, algumas espécies de microalgas são capazes de crescer heterotroficamente, utilizando fontes de carbono, tais como glicose ou acetato. Portanto, as microalgas são capazes de crescer em algumas águas residuais (CARVALHO et al., 2011).

Diversos estudos têm demonstrado que as microalgas podem crescer empregando rotas nutricionais alternativas à tradicional com obtenção de carbono a partir do CO₂ atmosférico. Sendo assim, compostos orgânicos oriundos dos mais variados substratos, principalmente na forma de alguns tipos de resíduos e efluentes industriais, encontram aplicação (WALTER, 2011). Porém, como já testado por Zhang et al (1999), uma cultura mixotrófica ou heterotrófica pode não produzir os resultados esperados em termos de crescimento celular e produção de determinadas moléculas de valor no mercado devido às concentrações de carbono orgânico presentes ou à baixa luminosidade provocada por uma maior turbidez no meio de cultivo.

Borghetti (2009) relata que a substituição ou complementação do meio de cultivo com um resíduo orgânico pode ser explorada como forma de diminuir os custos de produção aliados à manutenção do meio inorgânico para o crescimento de *Chlorella minutissima*. O autor utilizou em ensaios laboratoriais o resíduo líquido do processamento da mandioca (manipueira), avaliando o crescimento desta microalga, alcançando uma produtividade máxima de 0,540 g.L⁻¹. dia⁻¹.

Muñoz e Guieysse (2006) ressaltam que a utilização de águas residuárias e outros poluentes são fatores extremamente limitantes ao crescimento de microalgas, principalmente sob altas concentrações de NH₃⁺ e pH elevado. Por outro lado, um processo de seleção de cepas, aclimatação a altas concentrações de poluente ou o isolamento de micro-organismos pré-existentes naquele meio pode apresentar melhores resultados.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Para alcançar os objetivos o trabalho foi dividido em etapas: a primeira etapa foi o isolamento e identificação morfológica das linhagens isoladas; a segunda etapa consistiu na determinação de atividade amilolítica para as microalgas identificadas e avaliação da toxicidade do cianeto para as microalgas; e a terceira etapa foram os ensaios com a manipueira em diferentes condições.

3.1 ETAPA 1. ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO

3.1.1 Coleta de amostras do efluente

Neste trabalho as amostras líquidas foram coletadas nas lagoas de estabilização da manipueira na empresa Podium Alimentos – Comercial Ltda. localizada em Paranaíba-PR. O sistema de estabilização do resíduo é formado por seis lagoas em série, das quais duas lagoas funcionam como biodigestores, uma lagoa é facultativa, e as três últimas são lagoas aeróbias (Figura 5). As amostras foram coletadas à flor d'água e em profundidade de 10 cm em diferentes pontos das lagoas aeróbias em frascos de plástico de 500mL com *headspace* de 50%, as amostras foram conservadas sob refrigeração.



Figura 5. Disposição das lagoas. 1,2: foram cobertas para funcionar como biodigestores; 3: lagoa que está funcionando como facultativa; 4, 5 e 6: lagoas aeróbias (GOOGLE MAPS)

3.1.2 Meios de cultivo inorgânico

Os meios de cultivo selecionados para os isolamentos foram Blue Green Medium (STANIER et al., 1971), Bold Basal Medium (BISCHOFF; BOLD, 1963), Volvox Medium e Zarrouk Medium (SAG, 2008). Além dos meios clássicos foi preparado meio com a própria manipueira.

3.1.3 Isolamento em placas

Para ter acesso à maior diversidade possível de microrganismos do local, foram inoculadas as amostras coletadas em diferentes meios de cultura previamente preparados, além de diluições do próprio efluente com *soft-ágar* a 1,2%. Posteriormente, as culturas foram isoladas em placas pela técnica de esgotamento usando alça microbiológica, as placas foram mantidas em temperatura controlada de 25°C e fotoperíodo de 12 horas claro / 12 horas escuro (Figura 6).

Após a identificação de colônias bem formadas, foram feitas réplicas das colônias selecionadas, o repique foi feito em meio de cultivo do mesmo tipo. Após essa etapa as colônias foram sucessivamente isoladas por esgotamento em superfície, até aparência de monocultura em placa e os repiques finais foram feitos em tubos com meio líquido para escalonamento e avaliação do crescimento.

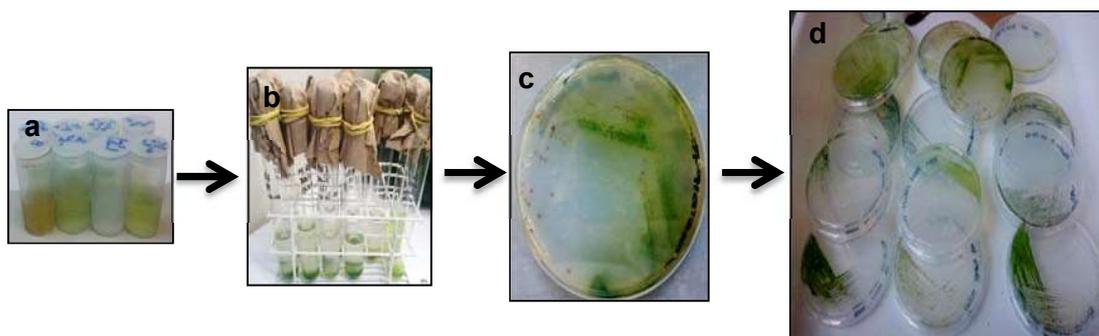


Figura 6. Processo para o isolamento de microalgas das lagoas de estabilização da manipueira: a) Amostras coletadas nas lagoas de estabilização; b) Diluição em meio líquido das amostras coletadas; c) Primeiros isolamentos em placas com crescimento de diversos microrganismos; d) Incubação de placas com aparência de monoculturas de microalgas

3.1.4 Identificação das cepas isoladas

As microalgas isoladas foram fotografadas e medidas através da observação em microscópio ótico. A identificação morfológica foi feita seguindo chaves taxonômicas de bibliografia especializada (BARSANTI; GUALTIERI, 2014; PRESCOTT; PRESCOTT, 1978)

3.1.5 Avaliação do crescimento das microalgas isoladas em condições autotróficas

Foram utilizados os mesmos meios em que as microalgas foram isoladas (BG-11 e BBM), o inóculo foi retirado das placas quando apresentavam colônias bem formadas e não mostraram crescimento bacteriano, na sequência foram escalonados a volumes suficientes para desenvolver os cultivos até 5000 mL. Foram utilizados frascos de vidro de 125, 500 e 5000 mL de volume total.

Para obtenção de curvas de crescimento foram necessárias leituras de absorbância a 640nm com espectrofotômetro. As leituras dos valores de absorbância foram efetuadas em todas as amostras, sem qualquer preservação, imediatamente após a retirada de uma alíquota de cada amostra foram transferidas para a cubeta do espectrofotômetro. O equipamento foi calibrado com o “branco” representado pelo próprio meio de cultivo, sem o inóculo algáceo. Os cálculos de peso seco foram feitos por filtração com membranas de fibra de vidro com porosidade de 0,7 μ m, sendo amostradas diariamente durante o período de avaliação de cada experimento. Os experimentos foram conduzidos em estantes de fotoperíodo, conforme a Figura 7, com temperatura controlada de 25°C, irradiância de aproximadamente 2500 Lux em fotoperíodo de 12 horas claro / 12 horas escuro.

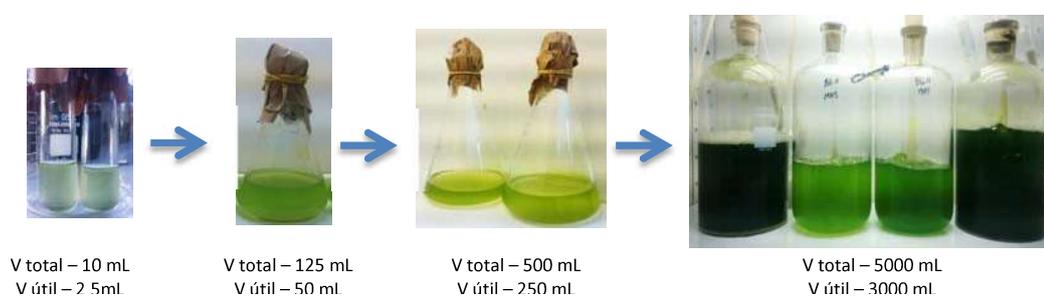


Figura 7. Escalonamento de cultivos em condições autotróficas.

3.1.5.1 Curva padrão de crescimento para as linhagens de microalgas isoladas

Para este estudo foram feitas diluições sucessivas de um volume fixo de massa celular das microalgas isoladas das lagoas de estabilização da manipueira, cultivadas em meio sintético, concomitantemente à leitura em espectrofotômetro a 640 nm. Foi traçada a curva-padrão absorvância x biomassa (g.L^{-1}) e absorvância x concentração celular (cél/mL.día), através das quais, com posterior regressão linear, foram obtidas as equações de correlação.

Os experimentos com a microalga isolada *Chlorella* sp. apresentaram a seguinte equação de absorvância x biomassa: $y = (1,0886x^2 + 0,4656x + 0,021)$ e $R^2 = 0,995$ e a equação para absorvância x concentração celular: $y = 1E+06x^2 + 635850x + 447,04$ e $R^2 = 1$ (Figura 8), onde x representa a absorvância e y a concentração celular.

Para o isolado de *Monoraphidium* sp. obteve-se a equação de absorvância x biomassa: $y = -0,0101x^2 + 0,456x + 0,0092$ e $R^2 = 0,995$ e a equação para absorvância x concentração celular: $y = 311957x + 13383$ e $R^2 = 0,977$ (Figura 9). Com a microalga isolada *Scenedesmus* sp. obteve-se a equação de absorvância x biomassa: $y = 0,3279x^2 + 0,0577x + 0,0604$ e $R^2 = 0,993$ e a equação para absorvância x concentração celular: $y = 398288x^2 + 882197x + 9556,3$ e $R^2 = 1$ (Figura 10).

Para a microalga *Golenkinia* sp. obteve-se a equação de absorvância x biomassa: $y = 0,3475x^2 + 0,1674x + 0,0218$ e $R^2 = 0,986$ e a equação para absorvância x concentração celular: $y = 145079x^2 + 567343x - 10524$ e $R^2 = 1$ (Figura 11).

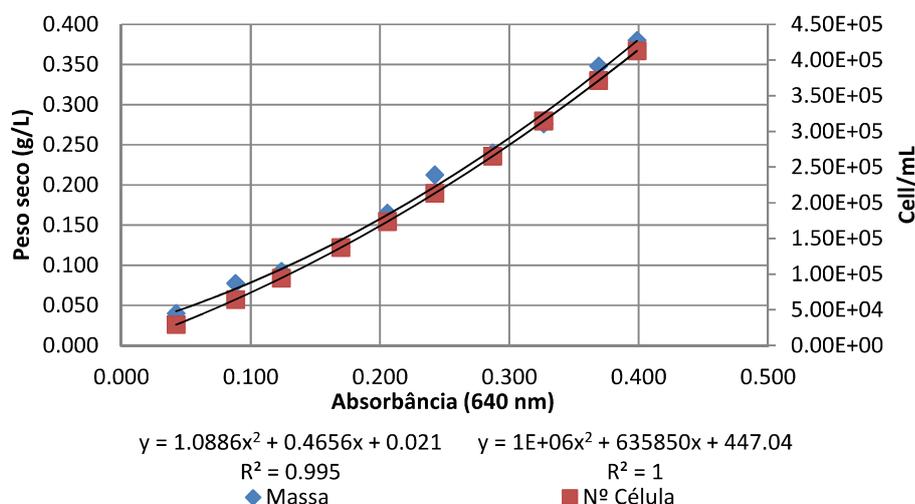


Figura 8. Curva padrão determinada para *Chlorella* sp. Cultivada em meio BG-11 (Blue Green Medium)

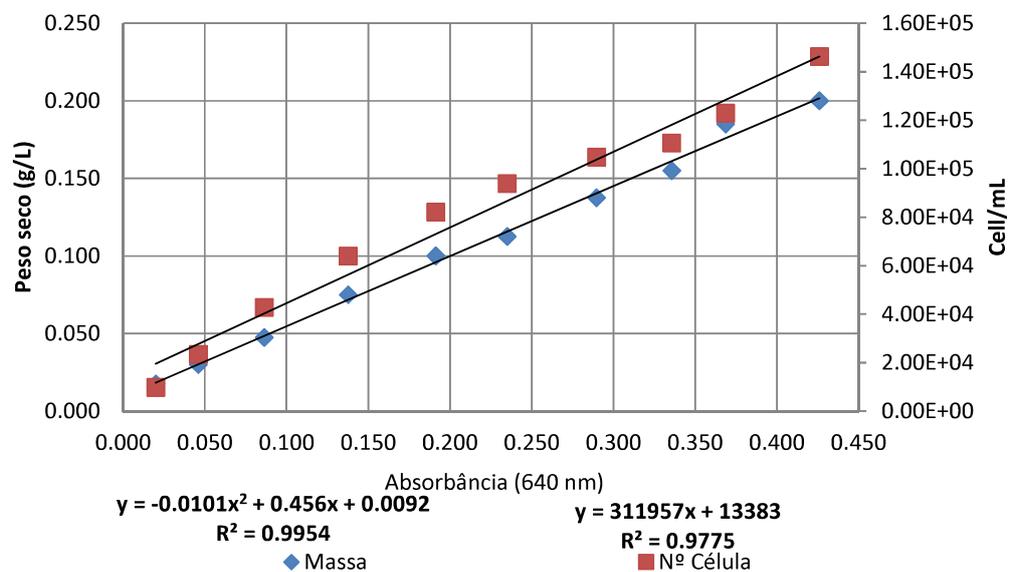


Figura 9. Curva padrão determinada para *Monoraphidium* sp. Cultivada em meio BBM (Bold Basal Medium)

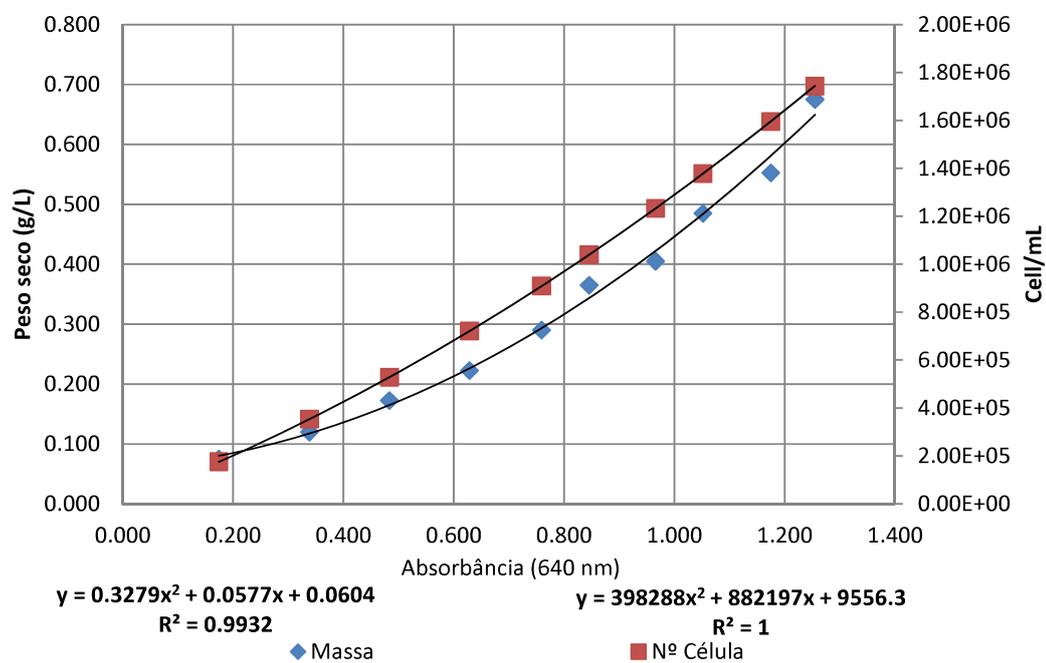


Figura 10. Curva padrão determinada para *Scenedesmus* sp. Cultivada em meio BBM (Bold Basal Medium)

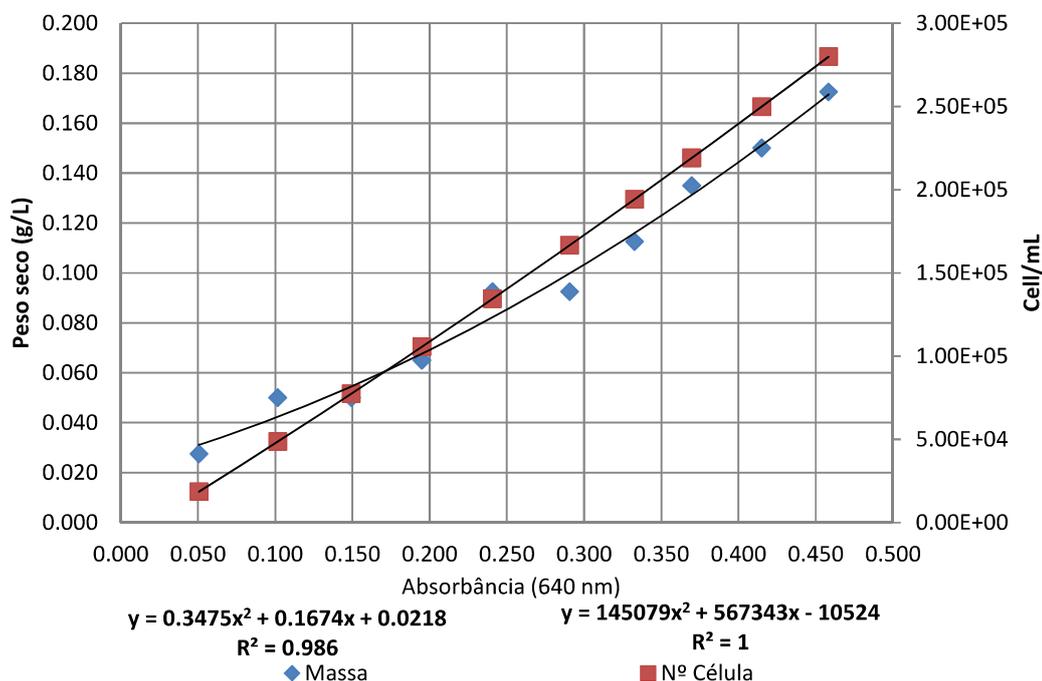


Figura 11. Curva padrão determinada para *Golenkinia* sp. Cultivada em meio BG-11 (Blue Green Medium)

3.2 ETAPA 2. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE AMIOLÍTICA E DA TOXICIDADE DO CIANETO PARA AS MICROALGAS IDENTIFICADAS

3.2.1 Avaliação da toxicidade do cianeto para as microalgas

No processo de avaliação da toxicidade do cianeto presente na manupueira para as microalgas, inicialmente foi utilizado meio sintético com adição de cianeto em diferentes concentrações para determinar a faixa de tolerância ao cianeto pelas microalgas. Posteriormente foi avaliada a toxicidade usando como meio o próprio efluente (manupueira).

Os experimentos foram conduzidos com cada uma das microalgas isoladas, e soluções de KCN com concentrações de 0 – 200 ppm variando de 40 em 40 ppm em cada tubo. Para cada tubo de ensaio foi inserida uma solução contendo KCN (solução estoque com concentração de KCN igual a 1000ppm) e meio BBM para *Monoraphidium* sp. e *Golenkinia* sp., e meio BG-11 para *Chlorella* sp. e *Scenedesmus* sp., e quantidade suficiente de inóculo para manter a concentração inicial em $0,2 \text{ g.L}^{-1}$, totalizando um volume final de 20 mL. O pH foi ajustado a 10,3 de acordo com Gurbuz et al. (2009), com uma solução de 1M de NaOH, por questões de segurança, mantendo o cianeto na forma CN^- . Foram realizadas duplicatas de

cada concentração. O controle foi submetido às mesmas condições físicas de crescimento, porém na ausência de KCN.

Para melhor determinar o crescimento das microalgas em meio contendo cianeto, foi utilizada espectrofotometria ótica para leitura de absorbância com comprimento de onda de 640 nm para os ensaios com as diferentes linhagens de microalgas.

3.2.2 Digestão do amido pelas microalgas

A presença de exoenzimas (amilases) nas microalgas pode indicar a efetividade do cultivo das mesmas em resíduos amiláceos como é a manipueira. Neste trabalho a produção de enzimas amilolíticas foi avaliada pelo método do amido (0,2%) em meio sólido. Em placas de ágar-amido foram feitos 4 poços usando bastão de vidro estéril de 1cm de diâmetro aproximadamente, removendo o ágar, depois foram inoculadas as microalgas aproximadamente 0,5 mL de suspensão em cada poço. O experimento foi conduzido em temperatura controlada a 25°C durante três dias.

Após incubação foi colocada sobre o ágar uma solução alcoólica de iodo a 2%. A hidrólise do amido, onde ocorre, manifesta-se pela aparição de um halo claro ao redor de cada poço de crescimento, enquanto que o resto da placa cora-se de azul escuro. A atividade amilolítica é tanto maior quanto maior é a zona clara (MALDONADO; MORALES; ROMERO, 2013; PUERTA, 2010)

3.3 ETAPA 3. ENSAIOS COM O RESÍDUO LÍQUIDO DO PROCESSAMENTO DA MANDIOCA

3.3.1 Condições de cultivo

Para avaliação da viabilidade do uso de microalgas para o reaproveitamento da manipueira assim como para diminuição da poluição que o resíduo gera, foram feitos ensaios com as microalgas isoladas nas lagoas de estabilização e inoculadas no resíduo sob diferentes condições, visando identificar a faixa de tolerância que cada microalga tem ao resíduo.

Foi utilizado como meio de cultivo o resíduo líquido do processamento da mandioca em diferentes condições: manipueira bruta, coletada à saída das centrífugas, antes de ir para tratamento de efluentes, e manipueira digerida coletada na saída do biodigestor instalado na empresa Podium Alimentos (Figura 12).

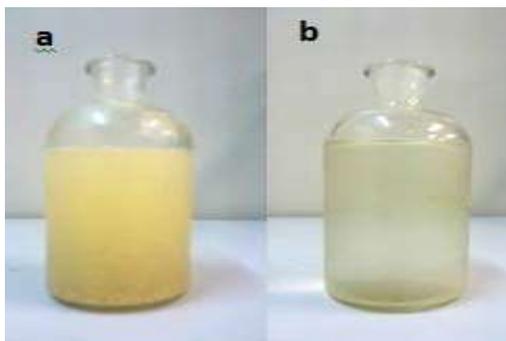


Figura 12. a) Efluente de manipueira bruta (coletada antes do biodigestor à saída da centrífuga); b) Efluente de manipueira digerida (coletada na saída do biodigestor anaeróbico)

3.3.1.1 Manipueira bruta como meio de cultura

Para determinar a faixa de tolerância das microalgas ao efluente, os cultivos foram conduzidos com manipueira bruta esterilizada e com a manipueira sem esterilizar como forma de estudo para reproduzir as condições reais de cultivo. Os cultivos foram feitos variando as concentrações de 0 -100 % de manipueira diluída em água, além de um controle preparado com meio sintético e com inóculo para cada condição de $0,2 \text{ g.L}^{-1}$. Cabe ressaltar que em algumas dessas situações a cinética de crescimento não foi estudada, já que os estudos não apontaram um bom desenvolvimento das culturas.

3.3.1.2 Efluente de manipueira digerida como meio de cultura

Neste caso, o meio de cultivo foi o efluente tratado anaerobicamente, obtido na saída do biodigestor instalado na empresa Podium Alimentos PR. Nos experimentos foram seguidas as mesmas bases do experimento anterior, em concentrações de 0- 100 % do efluente, diluído em água e inoculados na concentração de $0,2 \text{ g.L}^{-1}$ para cada linhagem de microalga (*Chlorella* sp., *Scenedesmus* sp., *Golenkinia* sp. e *Monoraphidium* sp.) em cada concentração. O cultivo de controle foi com meio sintético, sendo o meio em que cada uma das microalgas foram isoladas.

3.3.1.3 Parâmetros do cultivo

Os experimentos em laboratório foram conduzidos em frascos Erlenmeyer de 125 mL, com um volume útil de 70 mL com inóculo de $0,2 \text{ g.L}^{-1}$. O sistema de cultivo foi em ambiente com temperatura controlada a 25°C , fotoperíodo de 12 horas claro/ 12 horas escuro. Todas as

condições foram avaliadas por triplicata, os frascos utilizados nos cultivos foram vedados com algodão, recobertos com papel para a esterilização em autoclave a 121°C por 15 minutos, e levados à estufa para secagem completa antes da adição de meio.

3.3.1.4 Determinação do crescimento das microalgas

Inicialmente diferentes concentrações de manipueira bruta (10%, 20%, 30% 40%, 50%, 60%, 70%, 80% 90% e 100%), e manipueira digerida em concentrações de (20%, 40%, 60%, 80% e 100%), v/v (manipueira/água), foram adotadas com o objetivo de verificar em que condição o crescimento algal teria melhor resultado como alternativa para um eventual tratamento e destinação deste resíduo.

As amostras foram avaliadas por contagem celular em câmara de Fuchs-Rosenthal em microscópio ótico, sendo amostradas a cada três dias, durante um período de dez dias. A espécie cultivada e sua produtividade, velocidade específica de crescimento e biomassa nas diferentes condições propostas foram determinadas e comparadas.

3.3.2 Determinação dos parâmetros físico-químicos da manipueira

A manipueira foi gentilmente cedida pela empresa Podium Alimentos – Comercial Agrícola Anhumai Ltda localizada em Paranaíba-PR e armazenada em frascos de plástico de 5L, estocados em *freezer* (-10°C), para uma melhor conservação de sua composição química. A caracterização físico-química do resíduo foi feita quanto aos parâmetros de DBO, DQO, carbono orgânico total, nitrogênio, fósforo e sólidos suspensos totais e sólidos suspensos voláteis, todos os testes baseados no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (2005). O pH foi medido através de leitura direta da amostra em pHmetro digital.

3.3.2.1 DBO

A determinação da DBO neste trabalho foi feita com diluições para a manipueira bruta de 100 vezes, e para a manipueira digerida de 10 vezes com água de diluição previamente preparada com solução tampão de fosfato e soluções de sulfato de magnésio, cloreto de cálcio e cloreto férrico em concentrações de 1mL.L⁻¹ para cada solução. As diluições com as amostras e um branco, sendo somente água de diluição, foram transferidas para frascos de DBO enchendo-os até transbordar. Após 15 minutos foi determinada a concentração de

Oxigênio Dissolvido inicial (ODi), com sensor de OD marca LUTRON modelo DO-5519 e incubadas por 5 dias a 20 °C. Durante esse período ocorre a redução da concentração de OD na água, consumido por microrganismos aeróbios nas reações bioquímicas de decomposição de compostos orgânicos biodegradáveis (APHA, 1999). Após o período de incubação foi determinada a concentração de Oxigênio Dissolvido final (ODf), para cada amostra incubada usando a equação 1.

$$DBO_5, \frac{mg}{L} = \frac{(ODi - ODf) \times V}{T} \quad (1)$$

Onde:

ODi = Concentração de oxigênio dissolvido inicial

ODf = Concentração de oxigênio dissolvido final

V = Volume do frasco de DBO

T = mL tomados da amostra para a diluição

3.3.2.2 DQO

O conteúdo de matéria orgânica foi oxidado usando um agente químico forte ($K_2Cr_2O_7$) em meio ácido (H_2SO_4) usando um catalisador ($AgSO_4$) para facilitar a oxidação de alguns tipos de compostos orgânicos. A determinação de DQO foi conduzida pelo método colorimétrico de refluxo fechado. Em tubos de borossilicato de 15 mL com tampa, foram colocados 2 mL de amostra previamente diluída 100 vezes para manipueira bruta e sem diluição para a manipueira digerida, e adicionados 3 mL de solução de ácido sulfúrico (H_2SO_4) + sulfato de prata ($AgSO_4$) e 1 mL de solução de dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$) preparado com sulfato de mercúrio ($HgSO_4$). Os tubos foram fechados e agitados vigorosamente, e colocados num *termoreaktor* marca MERCK modelo tr 300 a 140 °C durante 2 horas. Após da digestão foi medida a absorvância de cada tubo em espectrofotômetro a 600 nm. Com o valor da absorvância, e a curva de calibração previamente obtida, foi calculada a DQO ($mg.L^{-1}$) (Equação 2).

$$DQO \left(\frac{mg}{L} \right) = (Abs_{600nm} \times 3204,5135) - 5,88447 \quad (2)$$

Onde:

Abs 600: Absorvância da amostra medida a 600 nm.

3.3.2.3 Nitrato (NO_3^-)

A determinação de nitrato NO_3^- foi feita por colorimetria, segundo o método de Ácido Salicílico descrito por Cataldo et al. (1975). Primeiramente foi feita uma curva padrão com uma solução estoque de concentração conhecida de NO_3^- . Para a determinação de nitrato nas amostras de manípueira, foram pipetados em tubos de ensaio 0,2 mL de amostra e misturados com 0,8 mL de solução ao 5% (m/v) de ácido salicílico (AS) e ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4). Nessas condições, o nitrato é reduzido a amônia. Após 20 minutos à temperatura ambiente foram adicionados 19 mL de hidróxido de sódio (NaOH) 2N, para elevar o pH acima de 12.

As amostras foram esfriadas à temperatura ambiente, e a determinação de NO_3^- foi feita por absorvância em espectrofotômetro no comprimento de onda de 410 nm. A concentração foi calculada comparando as leituras com a curva padrão.

3.3.2.4 Amônio (NH_4^+)

A concentração de amônio NH_4^+ presente no resíduo foi determinada pelo método do fenol (KOROLEFF, 1976). A metodologia baseia-se na reação do NH_3 em solução alcalina contendo fenol, a qual produz uma cor azul na presença de um agente oxidante como o hipoclorito (Figura 13).

A metodologia consiste em colocar em tubos de ensaio 10 mL de amostra e adicionar 0,4 mL de solução de fenol, 0,4 mL de nitroferricianeto e 1mL da solução oxidante previamente preparadas. Os tubos foram homogeneizados e deixados em repouso durante três horas na escuridão em temperatura ambiente. Após o período de incubação foram feitas leituras de absorvância a 630 nm em espectrofotômetro.

Para os cálculos de NH_4^+ (mg.L^{-1}), previamente foi traçada uma curva padrão. A concentração foi calculada comparando as leituras de absorvância da amostra com a curva padrão.



Figura 13. Determinação de amônia pelo método do fenol (KOROLEFF, 1976)

3.3.2.5 Sólidos suspensos totais (SST)

Para a determinação de sólidos totais foram usados filtros de fibra de vidro de 47mm de diâmetro com porosidade de 0,2 μ m os quais foram secados em estufa a 105°C por 2 horas e esfriados até temperatura ambiente num dessecador e pesados imediatamente. Aliquotas homogeneizadas de volume conhecido de amostra foram filtradas a vácuo e colocadas em estufa a 105 °C por 2 horas, esfriadas e pesadas novamente até peso constante. Os cálculos para determinação de SST foram feitos como indicado na equação 3.

$$SST, \left(\frac{mg}{L}\right) = \frac{(P_2 - P_1) \times 1000}{V} \quad (3)$$

Onde:

SST= Sólidos suspensos totais (mg.L⁻¹)

P2= Peso do filtro mais o resíduo após da secagem a 105°C (mg)

P1= Peso do filtro seco (sem amostra)

V= Volume de amostra filtrado (mL)

3.3.2.6 Sólidos suspensos voláteis (SSV)

Para determinação de sólidos voláteis foram usados filtros de fibra de vidro e filtradas amostras de volume conhecido de manueira. Em seguida, foram colocados em mufla a 550 \pm 50°C durante 1 hora, esfriados em dessecador até temperatura ambiente e pesados.

$$SSF, \left(\frac{mg}{L}\right) = \frac{(P_3 - P_1) \times 1000}{V} \quad (4)$$

$$SSV, \left(\frac{mg}{L}\right) = SST - SSF \quad (5)$$

Onde:

SSF= Sólidos suspensos fixos (mg.L^{-1})

SSV= Sólidos suspensos voláteis (mg.L^{-1})

SST= Sólidos suspensos totais (mg.L^{-1})

P3= Peso do filtro mais o resíduo calcinado a 550°C (mg)

P1= Peso do filtro seco (sem amostra)

V= Volume de amostra filtrado (mL)

3.3.2.7 Carbono orgânico total

As concentrações de carbono orgânico total foram determinadas conforme a metodologia descrita por Kiehl (1985), em que se divide o valor obtido na análise da concentração de sólidos voláteis por 1,724 (fator de Waskman), constituindo uma estimativa da concentração do carbono orgânico total na amostra.

3.3.2.8 Determinação e correção de pH

A determinação do pH do resíduo foi realizada através de leitura direta na amostra em pHmetro digital (da marca Hanna, HI9321). O pH da manipueira é de aproximadamente 4,4 dependendo da origem do resíduo. Para este estudo, não houve a correção de pH a fim de analisar a resistência das microalgas ao meio utilizado.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ETAPA 1. ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO

4.1.1 Identificação de microalgas isoladas das lagoas de estabilização da manipueira na empresa Podium Alimentos

Nas lagoas de estabilização do resíduo líquido do processamento da mandioca na indústria farinheira Podium Alimentos Ltda. localizada em Paranaíba-PR observou-se a presença de microalgas. Ao final do processo de isolamento, conseguiu-se isolar e manter em condições de laboratório quatro cepas de microalgas. Todas cresceram em meio sólido e líquido, nos meios BBM e BG-11 (Figura 14).



Figura 14. Aspecto das monoculturas em placas.

A caracterização morfológica das cepas de microalgas isoladas foi feita com microscópio óptico. Todas as microalgas foram fotografadas e medidas, até as possibilidades que o equipamento permite, para facilitar a sua identificação.

Embora nas amostras em frasco fossem observadas pelo menos seis microalgas aparentemente diferentes, só se conseguiu isolar em meio sólido culturas unialgais dos gêneros *Chlorella* sp., *Monoraphidium* sp., *Scenedesmus* sp. e *Golenkinia* sp. (Figura 15).

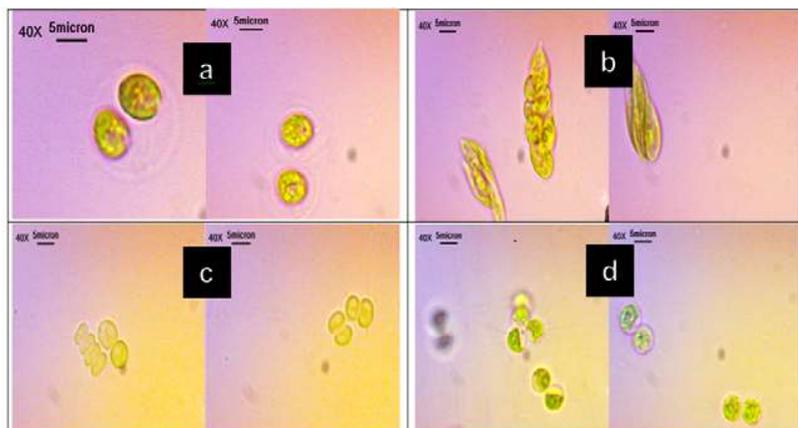


Figura 15. Micrografias (40x). a) *Chlorella* sp.; b) *Monoraphidium* sp.; c) *Scenedesmus* sp.; d) *Golenkinia* sp.

A identificação foi feita seguindo chaves taxonômicas propostas por Bicudo et al. (2006), descritas a seguir.

***Chlorella* Beijerinck 1890** (Figura 15-a). Indivíduos sempre solitários e de vida livre. A célula é, em geral, esférica, elipsoidal ou ovoide, mas também pode ser reniforme ou um pouco assimétrica. A parede celular é bem distinta, porém, delgada. O cloroplastídio é único na maioria das vezes, raramente ocorrem dois. Quando único, tem a forma de taça e quando em número de dois cada um tem a forma de uma calota rasa e aberta. Pirenoide nem sempre presente.

Os representantes deste gênero são habitantes principalmente do plâncton de sistemas de águas paradas ou quase, dos tipos lagos e reservatórios, mas também podem ser coletados do solo, de ambientes subaéreos, do interior de protozoários ciliados e de outros componentes da microfauna (BICUDO; MENEZES, 2006).

***Monoraphidium* Komárková-Legnerová 1969** (Figura 15-b). Células em geral solitárias, raramente reunidas por curto intervalo de tempo em pares ou tétrades resultantes do processo de reprodução. As células são mais ou menos fusiformes, às vezes cilíndricas, várias a muitas vezes mais longas que o próprio diâmetro, podendo ser tanto retas quanto encurvadas ou até sigmoides. Quando a célula afila gradualmente para as extremidades, os polos são agudos e quando o faz repentinamente, os polos podem ser mais ou menos arredondados. O único cloroplastídio é parietal, localiza-se lateralmente na célula e tem a forma de uma lâmina que reveste internamente toda a parede celular. Com a idade, este plastídio se afasta dos polos e da região mediana da célula. Mesmo nas células jovens, existe uma reentrância lateral

mediana do plastídio, em que se aloja o núcleo da célula. Em algumas espécies ocorre um pirenoide situado mais ou menos na parte central da célula.

O gênero é dos mais cosmopolitas entre as clorococcales. Inclui atualmente 21 espécies que já foram coletadas do plâncton e do metafiton de ambientes oligo a mesotróficos de quase todo o mundo, principalmente Áustria, Cuba, Dinamarca, Egito, Índia, Inglaterra, Iugoslávia, Noruega, República da Eslováquia, República Tcheca, Suécia e Ucrânia. É quase impossível realizar uma coleta de material do plâncton que não contenha exemplares de *Monoraphidium* (BICUDO; MENEZES, 2006).

***Scenedesmus* Meyen 1829** (Figura 15-c). Indivíduos coloniais que vivem flutuando na água. A colônia sempre plana é formada, em geral, por 2, 4, 8, 16 ou, mais raramente, 32 células dispostas lado a lado, com seus eixos mais longos paralelos entre si. Mais comum é a disposição em linha das células que ora se dispõem, exatamente, uma ao lado da outra numa só série, ora em duas séries graças à alternância das células que se postam, sucessivamente, uma mais para cima e a outra mais para baixo. Também existem, entretanto, colônias formadas por duas séries superpostas de células que lhes conferem a aparência de um disco. As células podem ser elipsoides, ovoides, fusiformes ou lunadas e podem ser todas iguais no mesmo cenóbio ou as extremas serem de uma forma e as internas de outra. A parede celular é lisa na maioria das espécies, mas também pode ser ornada com diminutas verrugas ou ter uma crista mediana bastante evidente. Em muitas espécies ocorrem espinhos de comprimentos variados nos polos só das células extremas da colônia, às vezes também na face livre das mesmas células extremas e, outras vezes, também em um ou em ambos os polos das células internas da colônia. O cloroplastídio é único por célula, localiza-se parietalmente e preenche toda a superfície interna da célula. Há sempre um pirenoide mais ou menos central em cada célula.

Scenedesmus é, sem dúvida, o mais comum e cosmopolita dos gêneros de algas verdes. Seus indivíduos são extremamente comuns em qualquer coleta de água que se faça, seja ela oligo, meso ou eutrófica, mas, principalmente, desta última. Além disso, são dos primeiros a colonizar um ambiente. Por isso, qualquer chafariz ou tanque de água de jardim público apresenta mais de uma espécie deste gênero e sempre um vasto número de exemplares que demonstra a variação morfológica dentro de cada espécie (BICUDO; MENEZES, 2006).

***Golenkinia* Chodat 1894** (Figura 15-d). Indivíduos unicelulares e geralmente isolados, cuja célula é esférica e revestida por um grande número de espinhos longos e delicados que afilam gradualmente para a extremidade livre. Raramente, os indivíduos-filhos

mantêm-se juntos pelos espinhos que se emaranham uns nos outros, formando o que a literatura chama de falsas colônias. Existe uma tênue camada de mucilagem envolvendo a base dos espinhos. O cloroplastídio é único por célula, do tipo urceolado e possui um pirenoide mais ou menos reniforme (BICUDO; MENEZES, 2006).

Alguns dos gêneros identificados nas lagoas de estabilização concordam com os reportados em águas residuais industriais, agrícolas e domésticas de acordo com diversos autores (TORRES; CASSINI; GONÇALVES, 2014).

4.1.2 Cultivos unialgais isolados nas lagoas de estabilização da manipueira em meio sintético

Foi realizado previamente um experimento de cultivo para cada isolado em meio sintético com aeração sob condições laboratoriais para se obter a curva de crescimento e assim identificar o período de produção máxima das microalgas. Para melhor comparar o crescimento entre os quatro isolados, os inóculos iniciais foram de $0,2 \text{ g.L}^{-1}$ para todas as microalgas (*Chlorella* sp., *Monoraphidium* sp., *Scenedesmus* sp., e *Golenkinia* sp.). Conforme a cinética de crescimento (Figura 16) observou-se que todas as microalgas cresceram em cultivos autotróficos (meio BBM e BG-11). Os resultados mostram uma positiva relação linear entre o peso seco, densidade celular e a absorvância, apresentando um bom coeficiente de correlação (R^2). Sendo assim, estas curvas foram utilizadas de modo a fornecer estimativa rápida sobre a concentração de inóculo e ajuste para os experimentos.

O cultivo de *Monoraphidium* sp. apresentou uma velocidade específica de crescimento (μ_x) de $0,055 \text{ dia}^{-1}$, com uma concentração celular $4,05\text{E}+04 \text{ cél.mL}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ considerando os 30 dias de cultivo. O cultivo de *Scenedesmus* sp. apresentou uma produtividade celular no valor de $2,09\text{E}+05 \text{ cél.mL}^{-1}.\text{dia}^{-1}$, e uma velocidade específica de crescimento de $0,102 \text{ dia}^{-1}$. Analisando a curva de crescimento da *Monoraphidium* sp., verifica-se que no 10º dia de cultivo começa a fase exponencial, porém, não é atingida a fase estacionária. As células de *Scenedesmus* sp. apenas atingiram o seu máximo de produtividade celular ao fim de 28 dias de cultivo, o que significa que a partir deste ponto, as células diminuíram sua velocidade para se multiplicar, no entanto elas continuaram a crescer, verificando-se assim um crescimento gradual, tanto em quantidade de células como em massa.

A microalga *Chlorella* sp. apresentou uma taxa específica de crescimento de $0,03\text{dia}^{-1}$, com uma produtividade celular de $3,29\text{E}+04 \text{ cél.mL}^{-1}.\text{dia}^{-1}$, enquanto *Golenkinia* sp.

apresentou uma produtividade celular no valor de $4,18E+04$ cél.mL⁻¹.dia⁻¹, e uma taxa específica de crescimento de 0,03 dia⁻¹. Para estas duas linhagens obtiveram-se concentrações menores que as alcançadas com as linhagens de *Monoraphidium* sp. e *Scenedesmus* sp., no entanto, como observado na curva de crescimento, a fase exponencial começou após o 12º dia de cultivo e não foi atingida a fase estacionária, porém, reduziu-se a velocidade de multiplicação das células.

Prabakaran e Ravindran (2012) reportaram uma concentração em biomassa seca de 0,38 g.L⁻¹ ao fim de 18 dias de cultivo fotoautotrófico da microalga *Scenedesmus* sp., em frasco de 2 L, com meio BBM, a 24 °C e com injeção de ar. No estudo presente, a mesma microalga apresentou uma concentração de cerca de 0,814 g.L⁻¹ em biomassa, após 18 dias de cultivo. Ou seja, conseguiu-se cerca do dobro da concentração, o que demonstra que as condições de cultivo utilizadas neste estudo, foram melhores para o desenvolvimento da biomassa de *Scenedesmus* sp.

Morais (2014) reportou uma taxa específica de crescimento para a microalga *Monoraphidium* sp. de 0,306 dia⁻¹ considerando 21 dias de cultivo, enquanto que o cultivo de *Scenedesmus* sp. apresentou uma taxa específica de crescimento de 0,142 dia⁻¹. A autora reporta produtividades maiores que as obtidas neste estudo.

Considerando que microalgas do gênero *Chlorella* sp. são muito estudadas devido à sua resistência às condições de cultivo, a linhagem descrita neste trabalho não teve um bom desenvolvimento, inclusive nos cultivos em condições de laboratório. Como observado na curva, foi a que apresentou menor produtividade.

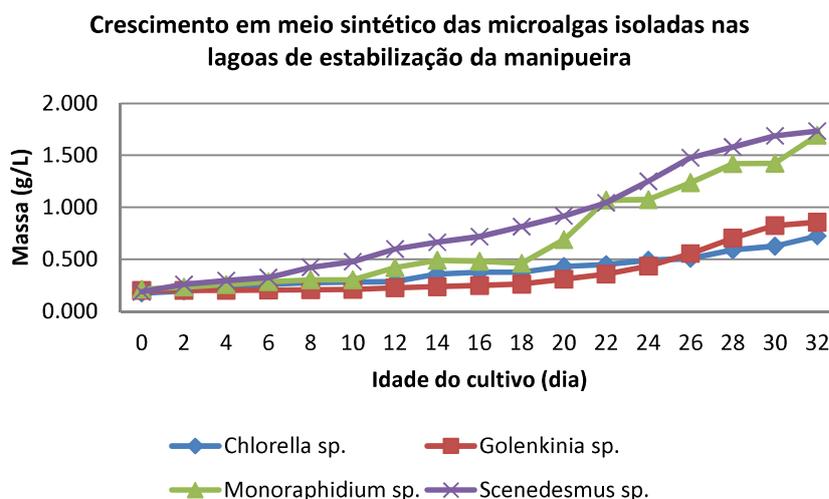


Figura 16. Cinética de crescimento em condições autotróficas das linhagens de microalgas isoladas.

4.2 ETAPA 2. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE AMIOLÍTICA E DA TOXICIDADE DO CIANETO PARA AS MICROALGAS IDENTIFICADAS

4.2.1 Toxicidade do cianeto para as linhagens de microalgas isoladas

4.2.1.1 Ensaios de toxicidade com a microalga *Golenkinia* sp.

A Figura 17 ilustra o crescimento celular da microalga identificada como *Golenkinia* sp. durante um período de dez dias. Nela pode-se notar que houve crescimento celular apenas no controle e na concentração de 40ppm de KCN, já na concentração de 80 ppm foi inibido o crescimento. Na absorbância das amostras com alto teor de cianeto, acima de 120 ppm, foi possível observar decréscimo nas leituras devido à morte celular. Observou-se na curva de crescimento que no meio contendo 40 ppm de KCN não teve diferença quando comparada com o crescimento em meio sintético.

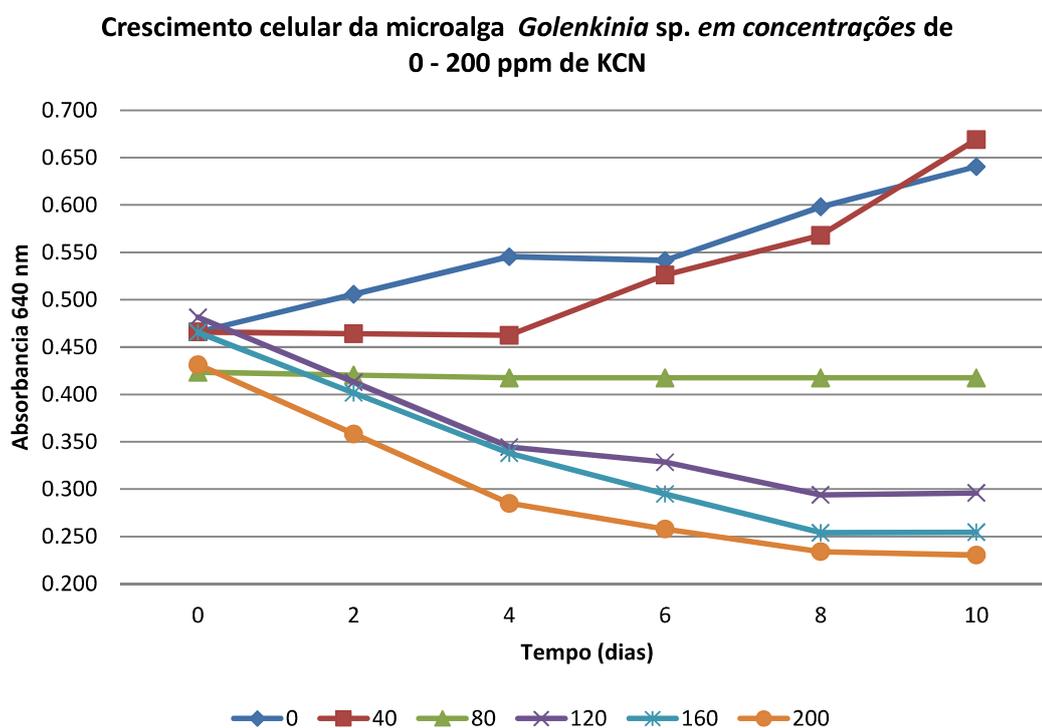


Figura 17. Crescimento celular da microalga de *Golenkinia* sp. durante um período de 10 dias em concentrações de 0 - 200 ppm de kcn.

4.2.1.2 Ensaios de toxicidade com a microalga *Chlorella* sp.

A Figura 18 ilustra o crescimento celular da microalga identificada como *Chlorella* sp. durante um período de 10 dias. Nela pode-se notar que houve crescimento celular em concentrações de até 120 ppm. Além do decréscimo na absorbância nas amostras com alto teor de cianeto, foi possível observar a morte celular devido à perda da coloração esverdeada presente em cultivos saudáveis e ausente em cultivos com algum problema. A Figura 19 e a Figura 20 mostram a mudança de coloração devido à morte celular em um período de 10 dias. Os experimentos conduzidos em concentrações de 40 e 80 ppm de KCN no meio, como observado na curva, apresentaram uma fase de adaptação, e a partir do quarto dia de cultivo alcançaram uma velocidade específica de crescimento de $0,031 \text{ dia}^{-1}$ e $0,026 \text{ dia}^{-1}$ respectivamente.

Gurbuz et al. (2004) relataram que *Chlorella* sp. tem a capacidade de detoxificar cianeto em meios contendo 50 mg/L deste composto. O fato de ter a capacidade de crescer em meios contendo cianeto e ter a capacidade de degradar o composto faz com que esta microalga seja objeto de estudo para tratamento de resíduos tal como a manipueira, resíduo que na sua composição apresenta um elevado teor de compostos cianogênicos.

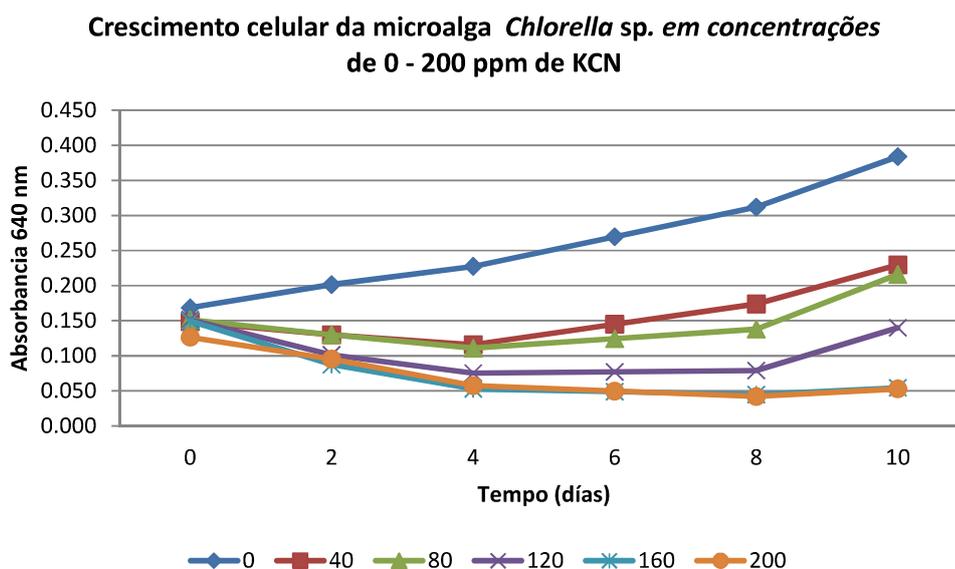


Figura 18. Crescimento celular da microalga *Chlorella* sp. durante um período de 10 dias em concentrações de 0 - 200 ppm de KCN.



Figura 19. *Chlorella* sp. cultivada em concentrações de 0 – 200 ppm de KCN (dia 0)



Figura 20. *Chlorella* sp. cultivada em concentrações de 0 – 200 ppm de KCN (dia 10)

4.2.1.3 Ensaio de toxicidade com a microalga *Monoraphidium* sp.

A Figura 21 ilustra o crescimento celular de *Monoraphidium* sp. durante um período de 10 dias. Nela pode-se notar que houve crescimento celular em todas as concentrações de cianeto estudadas (Figura 22). Comparando-se com o cultivo em meio BBM sem adição de KCN, como observado nas curvas, os meios contendo cianeto apresentaram uma fase de adaptação, sendo que a partir do quarto dia de cultivo alcançaram a fase exponencial. O fato de ter uma resistência maior ao cianeto faz com que esta seja uma microalga viável para tratamentos de resíduos.

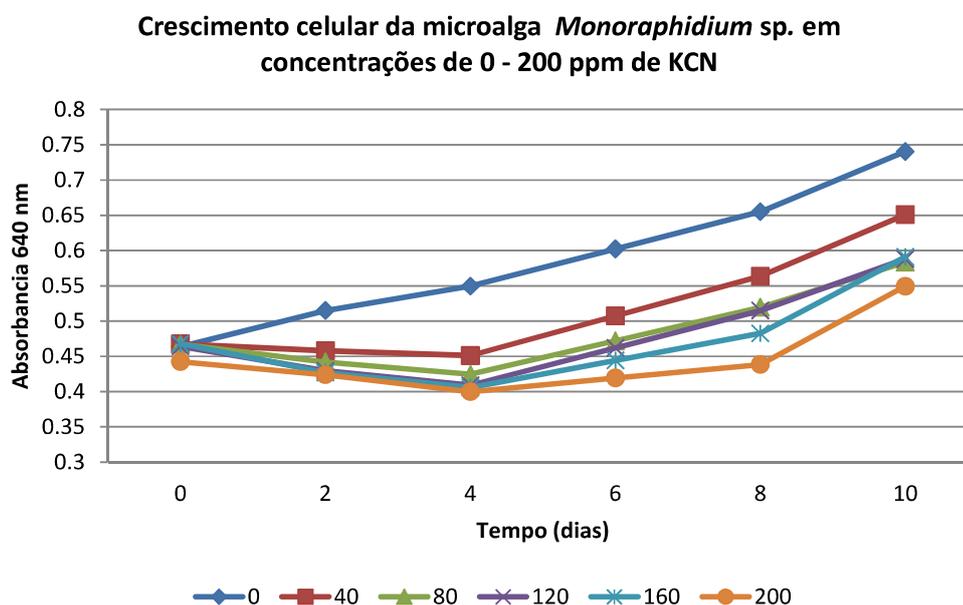


Figura 21. Crescimento celular da microalga de *Monoraphidium* sp. durante um período de 10 dias em concentrações de 0 - 200 ppm de KCN



Figura 22. *Monoraphidium* sp. cultivada em concentrações de 0 – 200 ppm de KCN (dia 10)

4.2.1.4 Ensaio de toxicidade com a microalga *Scenedesmus* sp.

A Figura 23 ilustra os resultados obtidos num período de dez dias de cultivo, onde se observa crescimento celular apenas no controle. Em meios contendo cianeto, as microalgas não apresentaram morte celular no período avaliado (Figura 24), porém foi inibido o crescimento.

Trabalhos anteriores reportaram microalgas do gênero *Scenedesmus* sp. com capacidade para degradar compostos cianogênicos na faixa de 10 – 50 ppm (GURBUZ et al., 2004; PATIL, 2012). Como observado nas curvas, a espécie estudada neste trabalho não

demonstrou resistência ao meio contendo cianeto na faixa de concentração e no período avaliado.

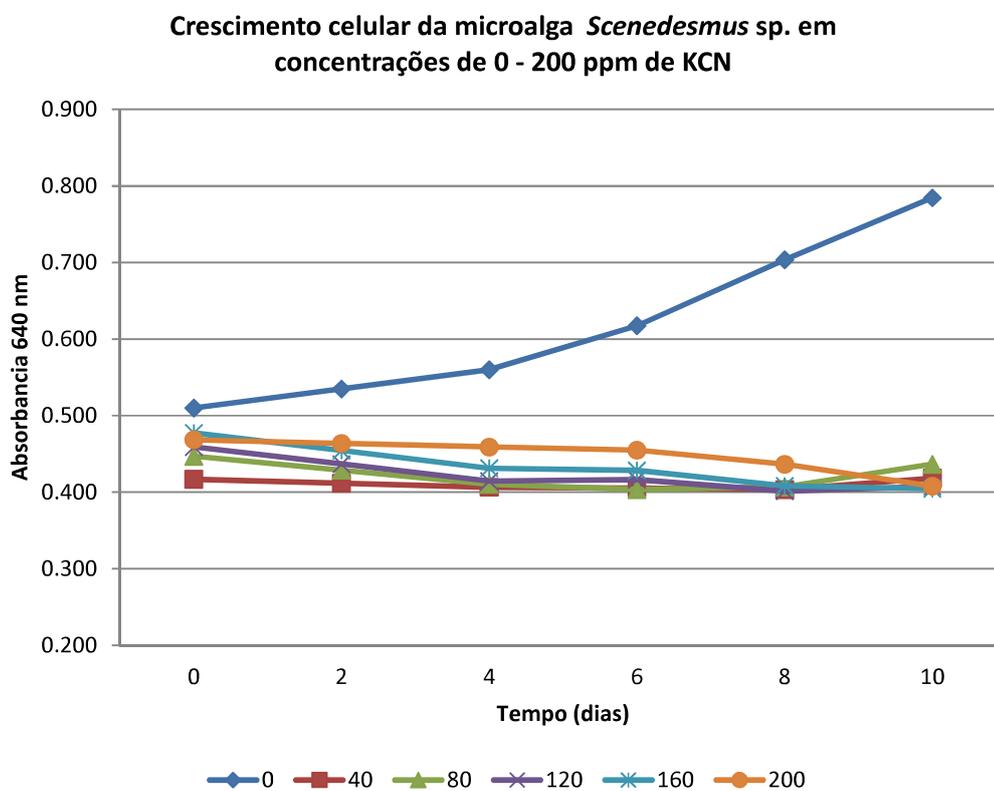


Figura 23. Crescimento celular da microalga *Scenedesmus* sp. durante um período de 10 dias em concentrações de 0 - 200 ppm de KCN



Figura 24. Microalga *Scenedesmus* sp. cultivada em concentrações de 0 – 200 ppm de KCN (dia 10)

A partir dos resultados obtidos nos ensaios realizados, é possível concluir que o cianeto é tolerável pelas quatro espécies de microalgas em determinadas concentrações para cada linhagem avaliada. A microalga *Golenkinia* sp. suporta concentrações de até 40 ppm

com uma velocidade específica de crescimento maior que a observada no meio sem adição de KCN. Para *Chlorella* sp. a concentração de 80 ppm é a máxima suportada por esta microalga. *Monoraphidium* sp conseguiu se desenvolver em concentrações de até 200 ppm. A microalga *Scenedesmus* sp. não mostrou crescimento em nenhuma das concentrações de KCN avaliadas. Os cálculos de velocidades de crescimento para as microalgas estudadas são comparados na Tabela 8. Destacam-se as microalgas *Chlorella* sp. e *Golenkinia* sp., as quais apresentaram as maiores velocidades de crescimento na concentração de 40ppm de KCN no meio.

Tabela 8. Velocidade específica de crescimento dos isolados cultivados em diferentes concentrações de cianeto (dia^{-1})

<i>Microalga</i>	<i>Concentração de KCN (ppm)</i>					
	0	40	80	120	160	200
<i>Chlorella</i> sp.	0,102	0,048	0,039	-0,008	-0,084	-0,069
<i>Monoraphidium</i> sp.	0,045	0,032	0,021	0,023	0,022	0,021
<i>Scenedesmus</i> sp.	0,056	0,0004	-0,002	-0,012	-0,017	-0,014
<i>Golenkinia</i> sp.	0,044	0,050	-0,002	-0,059	-0,070	-0,070

O meio sintético utilizado para simular o resíduo (manipueira) também é um fator que pode gerar resultados que divergem da realidade, portanto experimentos específicos devem ser conduzidos, utilizando a manipueira como meio de cultivo. Portanto, é de interesse deste estudo realizar ensaios com a manipueira como substrato.

4.2.2 Digestão do amido pelas microalgas isoladas

A presença da enzima amilase foi estudada em todas as cepas de microalgas isoladas, as quais apresentaram capacidade mixotrófica para usar compostos orgânicos, tal como o amido, como substrato para a assimilação de glucose. A microalga *Golenkinia* sp. foi a que apresentou maior halo claro de $1,8 \pm 0,1$ cm, enquanto as linhagens de *Monoraphidium* sp. e *Scenedesmus* sp. apresentaram um halo de $1,3 \pm 0,1$ cm. A microalga que apresentou menor atividade amilolítica foi a *Chlorella* sp., revelando um halo de $1,1 \pm 0,1$ cm (Figura 25).

Os testes para detecção de amilase nas microalgas em cultivos com meio sólido não mostraram presença de crescimento de bactérias, pelo que se determinou que a atividade expressa da enzima (amilase) foi pela atividade intrínseca de cada microalga. A presença de amilases nestas microalgas isoladas de águas residuais com elevado teor de amido é de grande

importância para o desenho de inóculos produtores de enzimas hidrolíticas que possam ajudar no processo de remoção de matéria orgânica.

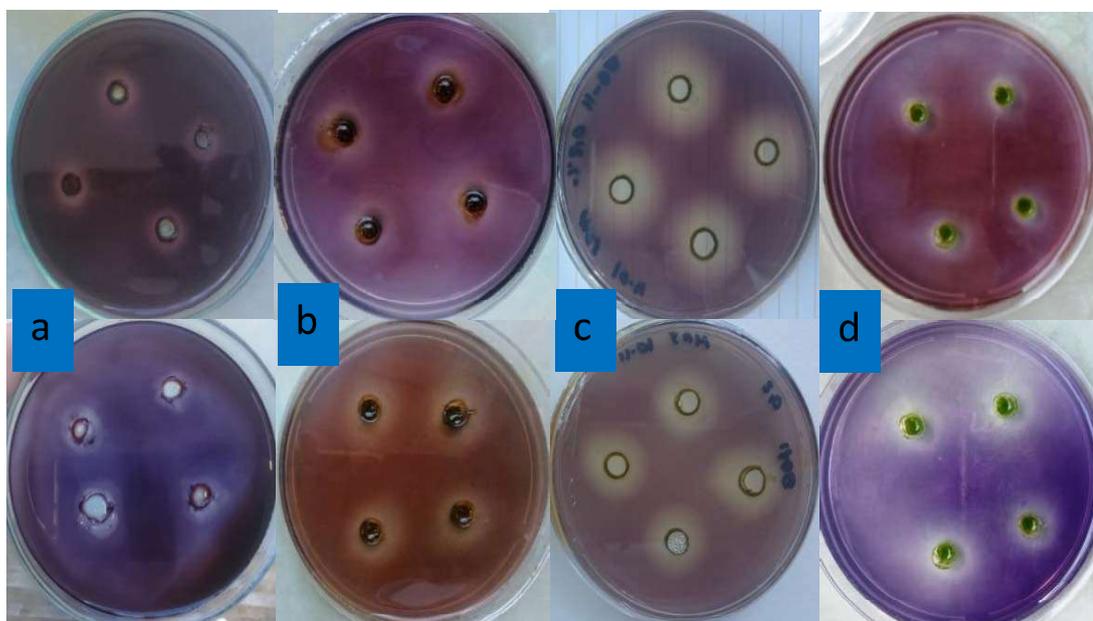


Figura 25. Produção de amilase em meio sólido (amido 0,2%) em microalgas a) *Chlorella* sp. b) *Monoraphidium* sp. c) *Golenkinia* sp. d) *Scenedesmus* sp.

Puerta (2010) identificou a presença de amilase em microalgas isoladas de lagoas de estabilização de uma planta extratora de óleo de palma, sendo *Chlorella* sp. e *Scenedesmus* sp. alguns dos gêneros isolados. O tamanho do halo reportado pelo autor para a microalga *Chlorella* sp. foi de $6,29 \pm 0,16$ cm e para a microalga *Scenedesmus* sp. foi de $3,18 \pm 1,42$ cm. Ou seja, atividade maior que a observada neste estudo.

Maldonado et al. (2013) avaliaram a produtividade de amilase com a microalga *Chlorella emerssonii*, porém, em presença de substratos amiláceos. Os autores reportaram a maior atividade com um halo claro de 2,167cm. Quando comparado com a literatura, o presente estudo determinou uma atividade amilolítica baixa em relação à obtida por outros pesquisadores, principalmente com a microalga *Chlorella* sp., que neste estudo foi a que apresentou menor atividade.

Cabe mencionar que os experimentos para determinação de atividade amilolítica foram conduzidos com as microalgas cultivadas em meio sintético. Estima-se que o cultivo em meios com presença de amido pode induzi-las a gerar uma atividade enzimática ainda maior.

4.3 ETAPA 3. ENSAIOS COM O RESÍDUO LÍQUIDO DO PROCESSAMENTO DA MANDIOCA (MANIPUEIRA)

4.3.1 Manipueira como meio de cultivo

Foram selecionadas as microalgas *Chlorella* sp., *Monoraphidium* sp., *Scenedesmus* sp. e *Golenkinia* sp. isoladas previamente das lagoas de estabilização da manipueira, as quais mostraram atividade amilolítica e resistência a determinadas concentrações de cianeto. O presente estudo visou avaliar as concentrações de manipueira suportadas pelas microalgas usando manipueira bruta coletada antes da entrada nas lagoas de estabilização, e manipueira digerida anaerobicamente coletada na saída do biodigestor instalado na empresa Podium Alimentos. Os experimentos foram conduzidos sob concentrações de 0 - 100% do resíduo diluído em água e inoculados com concentrações de biomassa de 0,2 g.L⁻¹ para cada linhagem de microalga.

A composição físico-química da manipueira bruta e digerida é apresentada na Tabela 9. A avaliação química do resíduo foi conduzida em função das análises realizados no laboratório do PPGBiotec da Universidade Federal do Paraná.

Tabela 9. Composição físico-química da manipueira.

Parâmetros	Unidade	Manipueira Bruta	Manipueira Digerida
DBO	mg O ₂ /L	24.400	nc
DQO	mg O ₂ /L	15.817,41	235,46
pH	-	6,0 ± 0,5	7,5 – 0,5
NO ₃ ⁻	mg/L	15,07	0,6
NH ₄ ⁺	mg/L	8,7	129,5
Sólidos suspensos totais	mg/L	2.590	<0,05
Sólidos voláteis	mg/L	2.560	<0,05
Carbono orgânico	mg/L	1.488,7	<0,05

Fonte: A autora; “nc”- não calculado

Colin et al (2007) também afirmam que as características físico-químicas da manipueira variam dependendo da forma de processamento das raízes, principalmente em relação à matéria orgânica e potencial tóxico. Outro fator que influencia nas características da manipueira é a junção deste efluente com a água de lavagem das raízes, que é originária dos lavadores e descascadores de mandioca e carrega em suspensão a terra e as cascas que podem ser separadas por decantação e peneiramento (WOSIACKI; CEREDA, 2002).

Por este motivo, a caracterização da manipueira deve ser feita para cada estoque de resíduo coletado, podendo ter variações entre um e outro, mesmo sendo da mesma fecularia.

4.3.2 Sobrevivência das microalgas isoladas usando manipueira bruta como meio de cultura

Nos experimentos conduzidos com a manipueira, visou-se identificar a capacidade de sobrevivência de cada um dos isolados. Foram avaliadas duas condições: manipueira estéril, avaliando-se condições de laboratório, e manipueira bruta sem esterilizar, visando reproduzir as condições reais do cultivo quando objetiva-se o uso de microalgas como tratamento para águas residuais numa escala industrial. Avaliaram-se os experimentos por contagem de células, amostradas a cada três dias durante o cultivo.

Cada uma das linhagens de microalgas isoladas foi inoculada em concentrações de manipueira de 0–100%, e comparadas usando um meio sintético de controle identificado como 0%. Nos experimentos conduzidos com manipueira bruta não esterilizada, todas as microalgas apresentaram maior crescimento no meio sintético, porém, suportaram concentrações de 10, 20 e 30 % de resíduo. Na Figura 26 mostra-se o crescimento das microalgas em concentrações de 0-30% já que os estudos em concentrações maiores não apontaram um bom desenvolvimento das culturas (Figura 28, Figura 29 e Figura 30).

Para a microalga *Monoraphidium* sp., a máxima concentração celular foi de $8,13E+03$ cél.mL⁻¹.dia⁻¹, em meio sintético, e de $6,02E+03$ cél.mL⁻¹.dia⁻¹ na concentração 10% (10% manipueira + 80% água + inóculo), já na concentração de 20% e 30% de manipueira observou-se morte celular como observado na Figura 26-a.

Nos ensaios com a microalga *Chlorella* sp., não se observou diminuição na concentração celular nas concentrações de 10 e 20% de manipueira, porém, houve baixa produtividade em relação ao meio sintético. Para a concentração de 10% a velocidade específica de crescimento nos primeiros quatro dias de cultivo foi de $1,53E-01$ dia⁻¹, que apresentou um aumento a partir do sexto dia de cultivo alcançando uma velocidade específica

de $8,04E-02 \text{ dia}^{-1}$. Em concentrações de 20% de resíduo no meio, ocorreu morte celular nos primeiros quatro dias de cultivo, porém, a microalga conseguiu se adaptar, alcançando uma velocidade específica de crescimento de $4,58E-02 \text{ dia}^{-1}$ a partir do sexto dia de cultivo. Concentrações maiores não tiveram um bom desenvolvimento de cultivo (Figura 26-b).

Scenedesmus sp. e *Golenkinia* sp. suportaram concentrações de 10 e 20% de manipueira bruta não esterilizada, não sendo identificado decréscimo na densidade celular, porém, não apresentaram crescimento. Ainda que o resíduo não tenha ocasionado morte celular, a mudança de meio pode ter causado choque nas culturas inibindo o crescimento (Figura 26-c; Figura 26-d).

Na pode-se observar uma comparação entre as velocidades de crescimento para cada uma das linhagens estudadas. Pode-se observar a velocidade específica inicial, calculada nos primeiros quatro dias de cultivo, e a velocidade específica final após o sexto dia de cultivo. As velocidades foram determinadas como inicial e final uma vez que foi observada uma fase de adaptação. Destaca-se a concentração de 10%, em que as microalgas *Chlorella* sp., *Monoraphidium* sp. e *Golenkinia* sp. conseguiram se adaptar e desenvolver. Para a concentração de 20 % a microalga *Chlorella* sp. foi a que teve maior velocidade específica de crescimento final.

Tabela 10. Comparação da velocidade específica de crescimento inicial e velocidade específica de crescimento final, das quatro linhagens estudadas em manipueira bruta não estéril (dia^{-1}).

<i>Microalga</i>	<i>Concentração de manipueira bruta no meio de cultivo (%)</i>							
	0%		10%		20%		30%	
	μ_i	μ_f	μ_i	μ_f	μ_i	μ_f	μ_i	μ_f
<i>Chlorella</i> sp.	0,153	0,080	-0,043	0,046	-0,050	0,043	-0,108	-0,034
<i>Monoraphidium</i> sp.	-0,008	0,089	0,017	0,062	-0,011	-0,013	-0,079	0,014
<i>Scenedesmus</i> sp.	0,062	0,067	-0,008	-0,007	-0,006	-0,040	-0,172	-0,030
<i>Golenkinia</i> sp.	0,013	0,081	-0,057	0,044	-0,046	0,014	-0,147	-0,062

μ_i : Velocidade específica de crescimento inicial; μ_f : Velocidade específica de crescimento final;

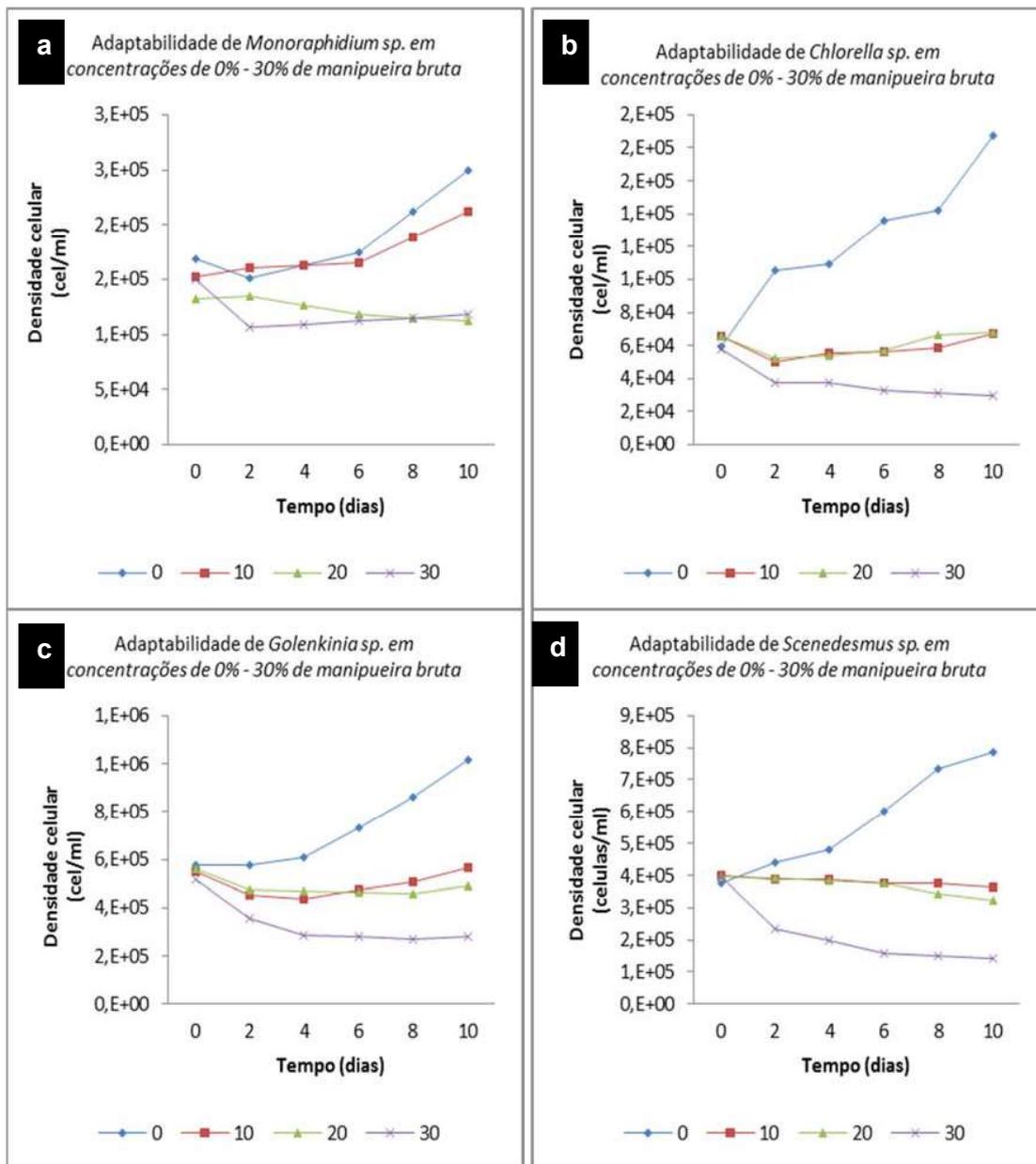


Figura 26. Curva de crescimento e sobrevivência dos quatro isolados de microalgas cultivadas em manipueira bruta não estéril, em condições de laboratório a 25°C, luminosidade média de 2.500 lux e fotoperíodo de 12h (claro/escuro). a) *Monoraphidium sp.*; b) *Chlorella sp.*; c) *Golenkinia sp.*; d) *Scenedesmus sp.*

4.3.3 Sobrevivência das microalgas isoladas usando manipueira bruta estéril como meio de cultura

Os ensaios com manipueira bruta estéril seguiram as mesmas condições do teste anterior os resultados das curvas de crescimento são observados na Figura 27.

No cultivo de *Monoraphidium* sp. em manipueira estéril, foi observado um aumento enquanto na concentração suportada, mostrando uma velocidade específica de crescimento de $6,68E-02 \text{ dia}^{-1}$ e $1,18E-02 \text{ dia}^{-1}$ em concentrações de 10 e 20 % de manipueira respectivamente, porém, na concentração de 30 % de manipueira ocorreu morte celular.

Para *Chlorella* sp. não foi verificado crescimento em nenhuma das concentrações de manipueira avaliadas, apresentando apenas crescimento no meio sintético como observado na Figura 27-b.

Scenedesmus sp. quando cultivada no resíduo estéril conseguiu se adaptar alcançando uma velocidade máxima de crescimento de $3,10E-02 \text{ dia}^{-1}$ e $6,90E-03 \text{ dia}^{-1}$ durante os 10 dias de cultivo nas concentrações de 10 e 20% respectivamente. A microalga *Golenkinia* sp. alcançou uma velocidade específica de crescimento de $5,35E-02 \text{ dia}^{-1}$ e $1,94E-02 \text{ dia}^{-1}$, também nas concentrações de 10 e 20 % de manipueira respectivamente. Quando comparada com o meio sintético a microalga *Scenedesmus* sp. teve um crescimento 67% menor na concentração de 10% de manipueira (Figura 27-d). Já o isolado de *Golenkinia* sp. na condição de 10% de manipueira apresentou uma produtividade 9% menor quando comparado com o meio sintético (figura 27-c).

Na Tabela 11 pode-se observar que a microalga *Monoraphidium* sp., na concentração de 10% de resíduo, teve uma velocidade de crescimento inicial maior que a observada no meio sintético, porém a velocidade chegou a estabilização a partir do 8º dia de cultivo (Figura 27-a). As microalgas *Scenedesmus* sp. e *Golenkinia* sp. tiveram uma fase de adaptação com velocidade de crescimento relativamente baixa, porém, alcançaram velocidades de crescimento finais próximas as observadas no meio sintético.

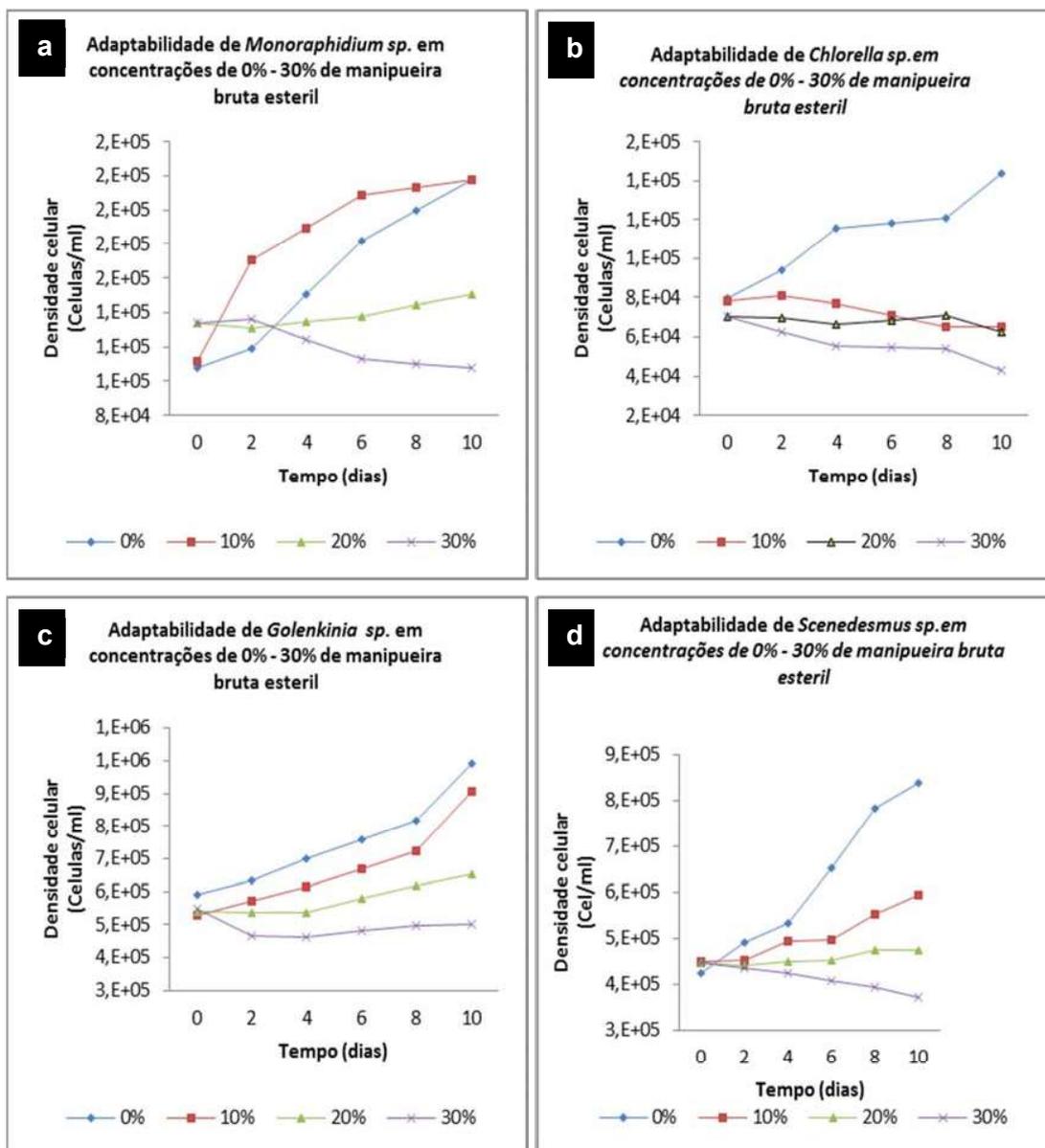


Figura 27. Curva de crescimento e sobrevivência dos quatro isolados de microalgas cultivadas em manipueira bruta esteril, em condições de laboratório a 25°C, luminosidade média de 2.500 lux e fotoperíodo de 12h (claro/escuro). a) *Monoraphidium sp.*; b) *Chlorella sp.*; c) *Golenkinia sp.*; d) *Scenedesmus sp.*

Tabela 11. Comparação da velocidade específica de crescimento inicial e velocidade específica de crescimento final, das quatro linhagens estudadas em manipueira bruta estéril (dia^{-1}).

Microalga	Concentração de manipueira bruta no meio de cultivo (%)							
	0%		10%		20%		30%	
	μ_i	μ_f	μ_i	μ_f	μ_i	μ_f	μ_i	μ_f
<i>Chlorella sp.</i>	0,093	0,049	-0,004	-0,023	-0,014	-0,024	-0,061	-0,059
<i>Monoraphidium sp.</i>	0,083	0,045	0,132	0,011	0,002	0,022	-0,018	-0,011
<i>Scenedesmus sp.</i>	0,062	0,067	0,027	0,049	0,002	0,013	-0,013	-0,028
<i>Golenkinia sp.</i>	0,043	0,067	0,038	0,076	-0,001	0,031	-0,041	0,011

μ_i : Velocidade específica de crescimento inicial; μ_f : Velocidade específica de crescimento final.

A capacidade de sobreviver de cada uma das linhagens de microalgas isoladas foi mensurada pelo cálculo de velocidade máxima de crescimento e densidade celular. Os resultados apresentados na Figura 26 e Figura 27 demonstraram que *Monoraphidium sp.* apresentou melhor adaptação de crescimento no efluente de manipueira bruta, conseguindo-se multiplicar sem interferências ou possíveis limitações presentes no efluente não esterilizado, tais como competitividade por nutrientes e predadores.

Embora os quatro isolados tenham sido obtidos de efluente do tratamento de manipueira, condições adversas podem inibir ou não favorecer o seu crescimento. Neste trabalho observou-se baixa competitividade da microalga *Chlorella sp.* em cultivos com manipueira bruta, passando a predominar ao longo do cultivo a microalga *Monoraphidium sp.* apresentando uma elevada capacidade de adaptação aos meios em comparação as demais linhagens isoladas.

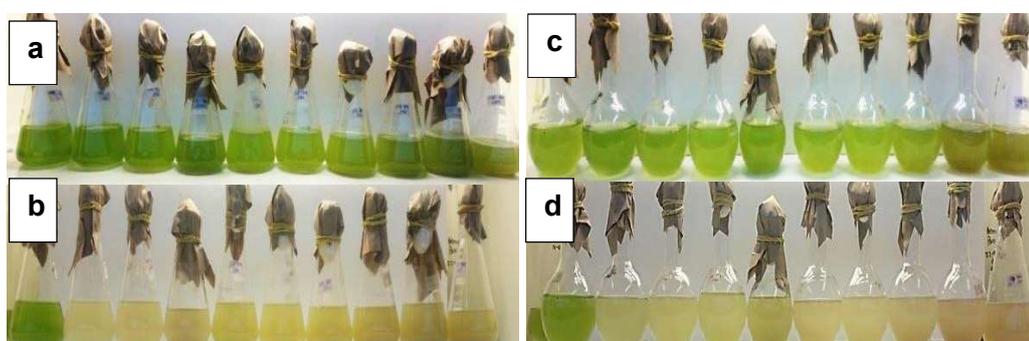


Figura 28. Desenvolvimento da microalga *Chlorella sp.* em concentrações de 0-100% de manipueira. a) cultivo em manipueira bruta não esterilizada (dia 0); b) cultivo em manipueira bruta não esterilizada (dia 6); c) cultivo em manipueira bruta estéril (dia 0); d) cultivo em manipueira bruta estéril (dia 6).

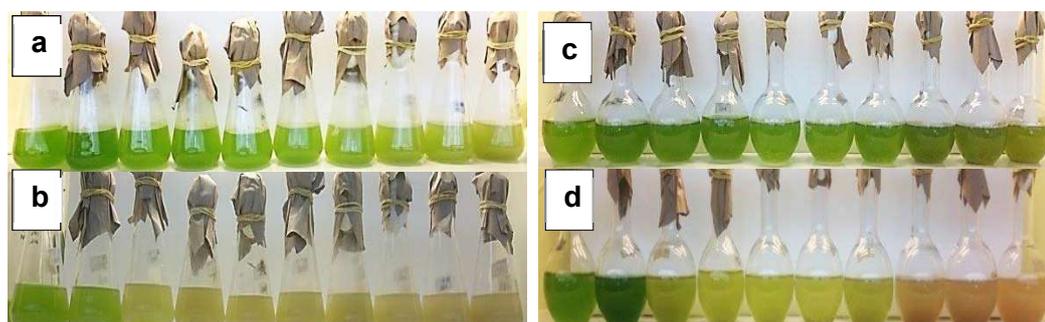


Figura 29. Desenvolvimento da microalga *Monoraphidium* sp. em concentrações de 0-100% de manureira. a) cultivo em manureira bruta sem esterilizar (dia 0); b) cultivo em manureira bruta não esterilizada (dia 6); c) cultivo em manureira bruta estéril (dia 0); d) cultivo em manureira bruta estéril (dia 6).

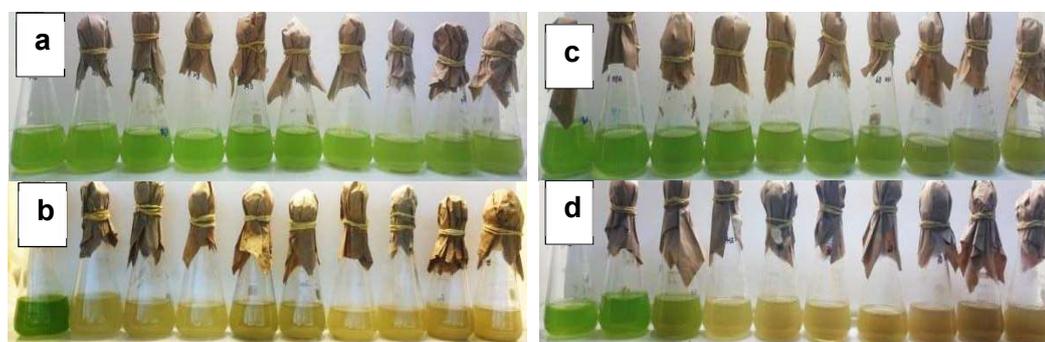


Figura 30. Desenvolvimento da microalga *Golenkinia* sp. em concentrações de 0-100% de manureira. a) cultivo em manureira bruta não esterilizada (dia 0); b) cultivo em manureira bruta não esterilizada (dia 6); c) cultivo em manureira bruta estéril (dia 0); d) cultivo em manureira bruta estéril (dia 6).

4.3.4 Sobrevivência das microalgas isoladas usando o efluente de manureira digerido como meio de cultura

As curvas de crescimento dos isolados, quando cultivados em efluente digerido de manureira, foram avaliadas em condições de laboratório com o efluente não estéril (Figura 31), visando reproduzir as condições reais do cultivo. Avaliaram-se os experimentos por contagem de células, amostradas a cada três dias durante os 10 dias de duração que tiveram os ensaios. Cada uma das linhagens de microalgas isoladas foi inoculada em concentrações de 0-100 % de efluente além de um controle sendo o meio sintético, identificado como 0% para os cálculos.

A microalga *Monoraphidium* sp. cultivada em meio com manureira digerida nas concentrações de 20 e 40%, alcançou produtividades de $1,48E+04 \text{ dia}^{-1}$ e $1,57E+04 \text{ dia}^{-1}$ respectivamente, ainda maiores que a produtividade alcançada quando cultivadas no meio

sintético que ficou em $8,39E+03$ dia. Porém, concentrações entre 60% e 100% foram suportadas por esta linhagem.

Para o isolado de *Chlorella* sp., concentrações de até 40% de manipueira digerida foram suportadas pela microalga, sendo que em concentrações maiores não houve um bom desenvolvimento da cultura. No gráfico (Figura 31-b) pode-se observar que em concentrações de 20% de efluente digerido a microalga *Chlorella* sp. teve uma produtividade maior que no meio sintético, na concentração de 40% apresentou crescimento, porém, muito menor ao obtido no controle. Já em concentrações acima de 60% ocorreu morte celular devido à toxicidade.

A microalga *Golenkinia* sp., como observado na Figura 31-c, teve crescimento apenas na concentração de 20% de resíduo, alcançando uma velocidade específica máxima de crescimento de $3,03E-02$ dia⁻¹. Nas concentrações de 40 e 60% mostrou crescimento nos primeiros 6 dias de cultivo, após desse período apresentou morte celular acelerada. Já nas concentrações de 80 e 100%, esta linhagem não teve um bom desenvolvimento quando cultivada em efluente digerido.

Tabela 12. Comparação da velocidade específica de crescimento inicial e velocidade específica de crescimento final, das quatro linhagens estudadas em manipueira digerida não estéril (dia⁻¹).

Microalga	Concentração de manipueira digerida não estéril no meio de cultivo (%)											
	0%		20%		40%		60%		80%		100%	
	μ_i	Mf	μ_i	μ_f								
<i>Chlorella</i> sp.	0,028	0,120	0,074	0,073	-0,019	-0,001	-0,034	0,032	-0,23	-0,20	-0,10	-0,20
<i>Monoraphidium</i> sp.	0,049	0,041	0,047	0,093	0,072	0,071	0,042	0,013	0,03	0,03	0,02	0,00
<i>Scenedesmus</i> sp.	0,106	0,069	0,066	0,103	0,036	0,194	0,053	0,139	0,05	0,13	0,06	0,06
<i>Golenkinia</i> sp.	0,060	0,085	0,035	0,005	0,038	-0,002	0,014	-0,028	-0,01	-0,03	-0,02	0,03

μ_i : Velocidade específica de crescimento inicial; μ_f : Velocidade específica de crescimento final.

Para *Scenedesmus* sp. foi identificado crescimento em todas as concentrações avaliadas, destacando-se a concentração de 40%, para a qual a partir do 6º dia de cultivo, foi observada uma fase exponencial com uma velocidade específica de crescimento de $1,94E-01$ dia⁻¹. Na Tabela 12 apresentam-se as velocidades específicas de crescimento das quatro linhagens de microalgas quando cultivadas em manipueira digerida sem esterilizar. Destaca-se a microalga *Scenedesmus* sp. que teve um bom desenvolvimento em concentrações de até

80%. A microalga *Monoraphidium* sp., em concentrações de 20 e 40%, apresentou crescimento semelhante ao observado com o meio sintético.

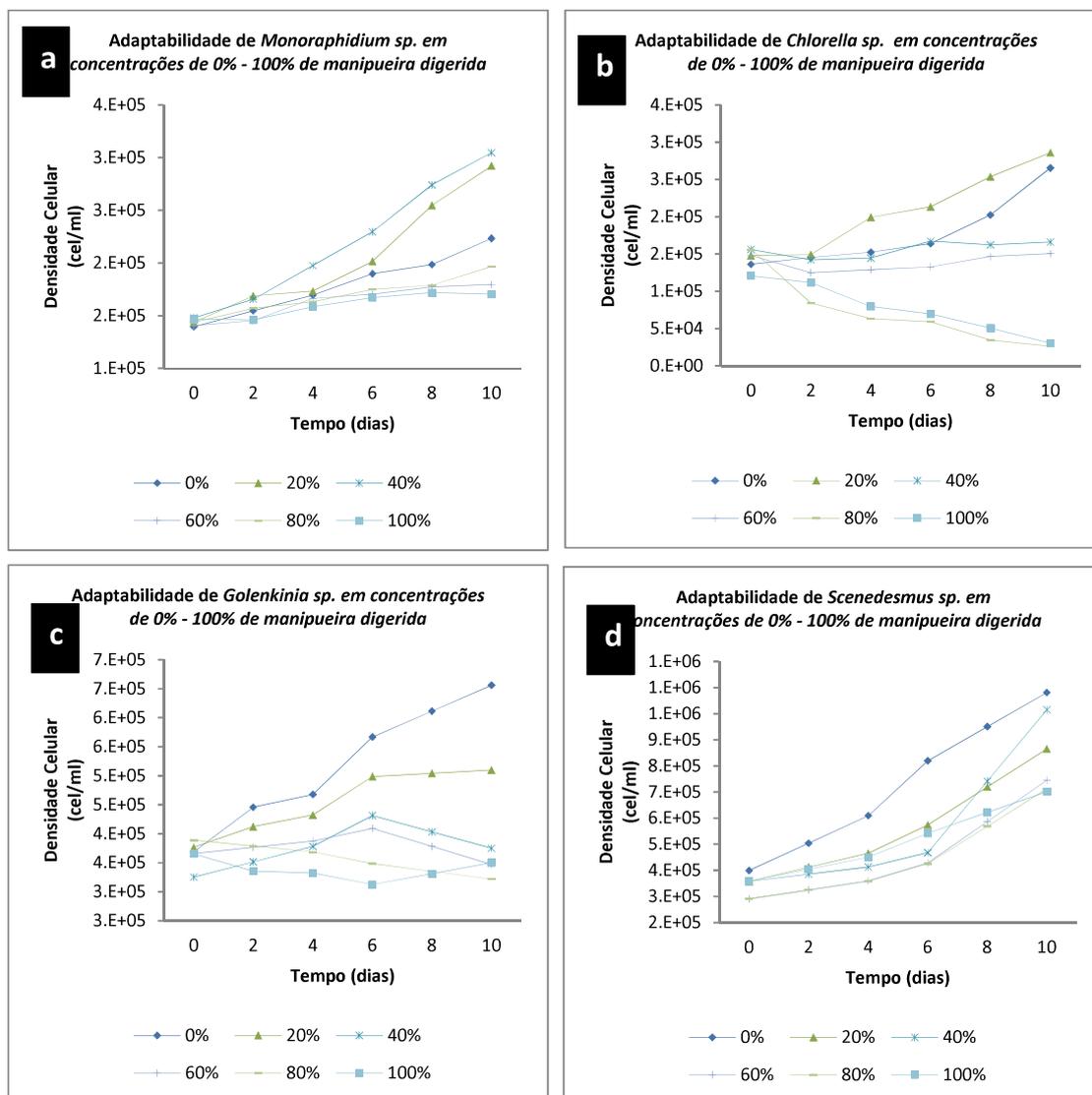


Figura 31. Curva de crescimento e sobrevivência dos quatro isolados de microalgas cultivadas em efluente de manureira digerida não estéril, em condições de laboratório a 25°C, luminosidade média de 2.500 lux e fotoperíodo de 12h (claro/escuro). a) *Monoraphidium* sp.; b) *Chlorella* sp.; c) *Golenkinia* sp.; d) *Scenedesmus* sp.

4.3.5 Sobrevivência das microalgas isoladas usando o efluente de manipueira digerido estéril como meio de cultura

As quatro linhagens de microalgas foram cultivadas em efluente digerido estéril (Figura 32) seguindo as mesmas condições do experimento com efluente digerido sem esterilizar. Avaliaram-se os experimentos por contagem de células, amostradas a cada três dias durante o cultivo.

Registrou-se que *Chlorella* sp., em concentrações de 20 e 40%, consegue se desenvolver alcançando velocidade específica de crescimento de $1,22E-01 \text{ dia}^{-1}$ e $4,16E-02 \text{ dia}^{-1}$, respectivamente. Em concentrações acima de 60% observou-se morte celular. *Golenkinia* sp. apresentou maior resistência ao meio suportando concentrações de até 80%, porém, a maior velocidade específica de crescimento foi de $5,15E-02 \text{ dia}^{-1}$ na concentração de 20% de efluente. Os isolados de *Monoraphidium* sp. e *Scenedesmus* sp. na concentração de 20% apresentaram uma velocidade máxima de crescimento de $3,04E-02 \text{ dia}^{-1}$ e $9,29E-02 \text{ dia}^{-1}$ respectivamente. A velocidade de crescimento para estas microalgas diminuiu gradualmente conforme a concentração de efluente no meio aumentava, porém os dois isolados suportaram concentrações de até 100% de manipueira digerida, o que as torna objeto de estudos mais específicos sobre cultivos de microalgas em resíduos agroindustriais.

Sendo que as quatro linhagens de microalgas avaliadas apresentaram crescimento em determinadas concentrações de efluente digerido, o cálculo das velocidades de crescimento inicial e final são apresentadas na

Tabela 13, onde as microalgas *Monoraphidium* sp. e *Scenedesmus* sp apresentaram crescimento maior em comparação ao meio sintético. A *Chlorella* sp., em concentração de 20%, teve um bom desenvolvimento alcançando velocidades maiores que em meio sintético, como observado na Tabela 13.

Tabela 13. Comparação da velocidade específica de crescimento inicial e velocidade específica de crescimento final, das quatro linhagens estudadas em manipueira digerida não estéril (dia^{-1}).

Microalga	Concentração de manipueira digerida não estéril no meio de cultivo (%)											
	0%		20%		40%		60%		80%		100%	
	μ_i	μ_f	μ_i	μ_f	μ_i	μ_f	μ_i	μ_f	μ_i	μ_f	μ_i	μ_f
<i>Chlorella</i> sp.	0,111	0,049	0,124	0,123	0,038	0,020	-0,069	-2,672	-0,10	-2,78	-0,10	-2,71
<i>Monoraphidium</i> sp.	0,018	0,015	0,025	0,039	0,015	0,048	0,019	0,016	0,04	0,02	0,07	0,04
<i>Scenedesmus</i> sp.	0,105	0,027	0,036	0,166	0,032	0,116	0,044	0,075	0,02	0,09	0,01	0,17
<i>Golenkinia</i> sp.	0,092	0,064	0,033	0,049	0,055	-0,006	0,037	0,026	0,00	0,03	-0,01	-0,01

μ_i : Velocidade específica de crescimento inicial; μ_f : Velocidade específica de crescimento final.

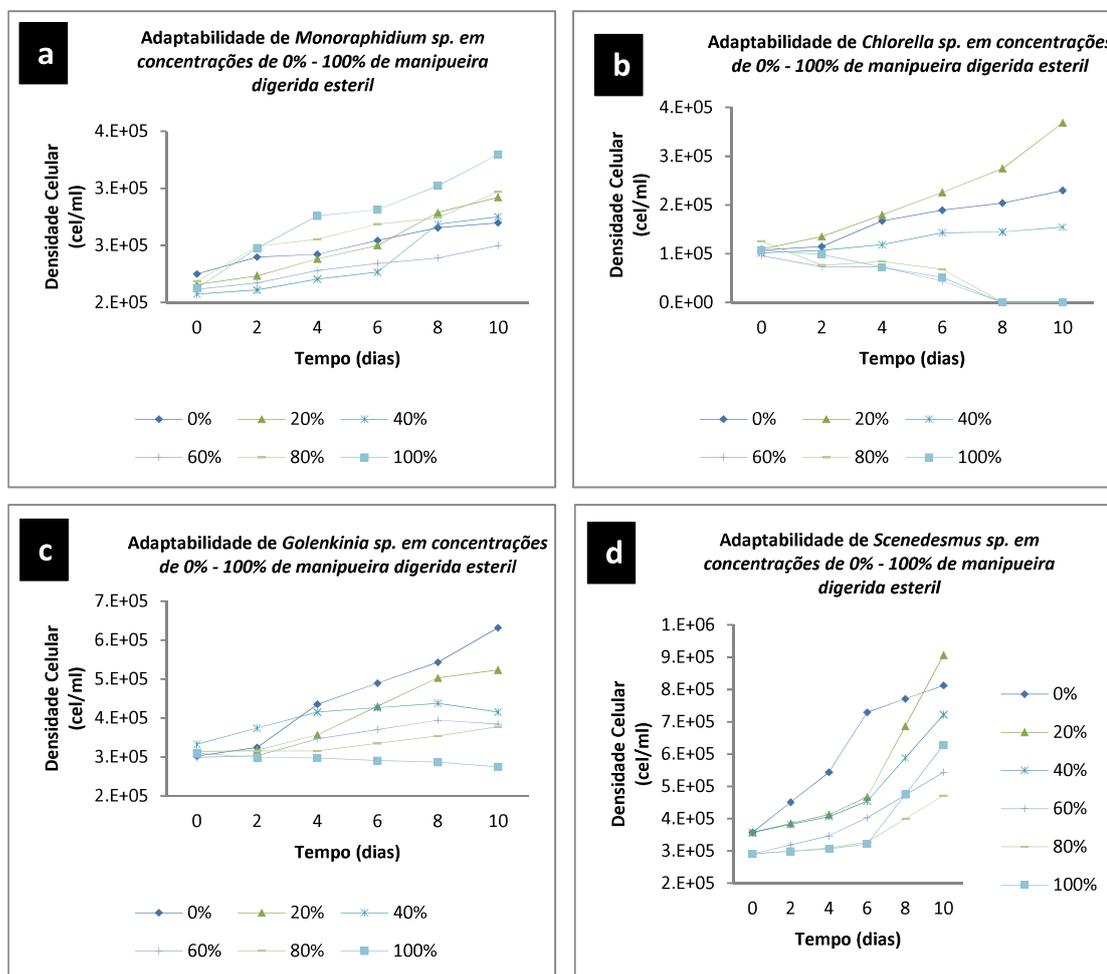


Figura 32. Curva de crescimento e sobrevivência dos quatro isolados de microalgas cultivadas em efluente de manueira digerida esteril, em condições de laboratório a 25°C, luminosidade média de 2.500 lux e fotoperíodo de 12h (claro/escuro). a) *Monoraphidium sp.*; b) *Chlorella sp.*; c) *Golenkinia sp.*; d) *Scenedesmus sp.*

O resultado da capacidade das microalgas isoladas nas lagoas de estabilização da manueira para se desenvolver eficientemente usando como meio de cultura efluente digerido não esterilizado é de grande importância, considerando sua possível utilização como inóculo em cultivos de larga escala, dispensando custos com possíveis desinfecções do efluente antes do cultivo.

5 CONCLUSÃO

No sistema de lagoas de estabilização da manipueira na empresa Podium Alimentos – LTDA localizada em Paranaíba-PR, foram isoladas quatro microalgas. As microalgas isoladas foram identificadas como *Chlorella* sp.; *Monoraphidium* sp.; *Scenedesmus* sp.; e *Golenkinia* sp.

A utilização da manipueira como meio de cultura para microalgas é uma alternativa promissora para reduzir custos no preparo de meios de cultivo para microalgas, além de se obter biomassa com valor nutricional. Porém, tratamentos adequados devem ser identificados para se obter uma maior produtividade microalgal.

A produção de exoenzimas, presentes em determinadas microalgas, permite sua implementação em cultivos mixotróficos o que viabiliza a sua utilização para se tratar resíduos amiláceos como a manipueira. O isolamento de microalgas obtidas dos sistemas de tratamento de águas residuais é importante para se obter microrganismos com capacidade de crescer em cultivos mixotróficos.

Através de observações e análises foi possível determinar condições que diminuem os custos de produção com relação à fonte de carbono, pois a manipueira é rica em amido, fonte de carbono, que foi diluída em água servindo de meio de cultura.

O efeito dos experimentos propostos por este trabalho sobre a eficiência do crescimento algal em condições laboratoriais, tendo como base a ação de microalgas isoladas do próprio efluente, foram avaliados. Em um período de 10 dias as quatro linhagens avaliadas mostraram a capacidade metabólica de converter fontes orgânicas de carbono em biomassa e a viabilidade da utilização desta para produção de metabólitos de interesse comercial.

A maior produção de biomassa nos experimentos foi obtida com a microalga *Monoraphidium* sp. quando cultivada em Erlenmeyer, utilizando-se meio de manipueira bruta estéril na concentração de 10%, (10% de manipueira, 80% de água e 10% de inóculo) com uma concentração celular máxima de $1,06E+04$ cél.mL⁻¹.dia⁻¹. O resultado alcançado foi superior ao obtido nos cultivos em meio sintético.

A velocidade específica máxima de crescimento nos quatro cultivos foi obtida na condição manipueira digerida não estéril (40% de manipueira – 50% de água – 10% de inóculo) com a microalga *Scenedesmus* sp. que foi de $1,94E-01$ dia⁻¹.

Os resultados nos ensaios de sobrevivência dos isolados usando manipueira bruta como meio de cultura demonstraram que tanto a elevada carga orgânica como os microrganismos de acompanhamento, como bactérias e fungos, não propiciaram um bom

desenvolvimento das culturas, suportando no máximo 20% do resíduo no meio. Uma adaptação prévia das microalgas pode favorecer os cultivos em concentrações maiores.

Nos ensaios em efluente digerido, as microalgas *Monoraphidium* sp. e a *Scenedesmus* sp. demonstraram maior tolerância ao efluente, indicando serem mais adaptadas que os demais isolados de microalgas em relação a competição por nutrientes no efluente.

6. RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- a) Estudar o potencial para produção de biodiesel, hidrogênio, gás metano e etanol utilizando microalgas.
- b) Estudar a composição elementar das microalgas isoladas de sistemas de tratamento quando cultivadas em diferentes meios de cultivo com resíduos agroindustriais.
- c) Estudar o cultivo de *Monoraphidium* sp. em meio complementado com manipueira em condições ambientais não controladas
- d) Estudar consórcios microbianos a fim de formular inóculos altamente eficientes que acelerem a velocidade de remoção em águas residuais visando sua aplicabilidade na indústria.
- e) Criar e testar outros modelos de biorreatores

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABAM. **Estatísticas Produção -Associação Brasileira dos Produtores de Amido de Mandioca**. Disponível em: <<http://www.abam.com.br/estatisticas-producao.php>>. Acesso em: 1 mar. 2017.
- AMARAL, L. et al. Novo método enzimático rápido e sensível de extração e dosagem de amido em materiais vegetais. **Hoehnea**, v. 34, n. 4, p. 425–431, 2007.
- APHA. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. **Standard Methods**, p. 541, 1999.
- ARAGÃO, M.; PONTE, J. DA. O uso da manipueira - extrato líquido das raízes de mandioca - como adubo foliar. **Ciência Agrônômica**, v. 26, n. 1/2, p. 45–48, 1995.
- BABSON, D. M. et al. Anaerobic digestion for methane generation and ammonia reforming for hydrogen production: Athermodynamic energy balance of a model system to demonstrate net energy feasibility. **Biomass and Bioenergy**, v. 56, p. 493–505, 2013.
- BAHADAR, A.; BILAL KHAN, M. Progress in energy from microalgae: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 27, p. 128–148, nov. 2013.
- BALL, S. G.; VAN DE WAL, M. H. B. J.; VISSER, R. G. F. Progress in understanding the biosynthesis of amylose. **Trends in Plant Science**, v. 3, n. 12, p. 462–467, 1998.
- BARANA, A. C. Avaliação De Tratamento De Manipueira Em Biodigestores Fase Acidogênica E Metanogênica. **Tesis - UNESP**, p. 95, 2000.
- BARBOSA, L. DA F. et al. USO DE PRODUTOS ALTERNATIVOS NO CONTROLE DE NEMATÓIDES NA CULTURA DO INHAME (*Dioscorea* sp). **Revista Raízes Amidos Tropicais**, v. 6, p. 241–247, 2010a.
- BARBOSA, M. et al. Avaliação da produção de biogás e redução de DBO 5 através do tratamento de manipueira em reator UASB. **Anais CONNEPI 2010**, n. 1, p. 8, 2010b.
- BARSANTI, L.; GUALTIERI, P. Algae: Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology. **Algae Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology**, p. 1–15, 2014.
- BECK, E.; ZIEGLER, P. Biosynthesis and Degradation of Starch in Higher Plants. **Metabolism Clinical And Experimental**, p. 95–117, 1989.
- BERTOLDI, F.; SANT'ANNA, E.; OLIVEIRA, J. Revisão: Biotecnologia de Microalgas. **B. Ceppa**, v. 26, n. 1, p. 9–20, 2008.
- BICUDO, C. E. D. M.; MENEZES, M. Chave para Identificação e descrições. **Gêneros de Algas de Águas Continentais do Brasil**, p. 502, 2006.
- BISCHOFF, H. W.; BOLD, H. C. Some soil algae from enchanted rock and related algae species. **Phycological studies**, v. 44, n. 1, p. 1–95, 1963.
- BORGHETTI, I. A. Avaliação do Crescimento da Microalga *Chlorella minutissima* Em meio

- de Cultura Com Diferentes Concentrações de Manipueira. **Dissertação Mestrado - UFPR**, p. 103, 2009.
- BRANCO, S. M. A Dinamica De Populações Microbiológicas na Estabilização Aeróbia de Resíduos Orgânicos de Fecularias de Mandioca. **Revista de Saude Publica**, v. 1, n. 2, p. 126–140, 1967.
- BRITO, V. H. S. et al. Colorimetric Method for Free and Potential Cyanide Analysis of Cassava Tissue. **Gene Conserve**, v. 8, n. 34, p. 841–852, 2009.
- CADORET, A.; CONRAD, A.; BLOCK, J. C. Availability of low and high molecular weight substrates to extracellular enzymes in whole and dispersed activated sludges. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, n. 1–2, p. 179–186, 2002.
- CAMARGO, J. A.; ALONSO, Á. Ecological and toxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystems: A global assessment. **Environment International**, v. 32, n. 6, p. 831–849, ago. 2006.
- CAMILI, E. A. Tratamento da manipueira por processo de flotação sem o uso de agentes químicos. p. 78, 2007.
- CARDOSO, E.; PAULA, M. M. DA S.; AMANTE, E. R. Uso da Manipueira Diluída (Efluente Líquido Resultante do Processamento da Mandioca) em fertirrigação:Avaliação do Efeito da Disposição Deste Efluente Sobre o Solo e às Águas Subterrâneas. **Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia em Resíduos e Desenvolvimento Sustentável**, 2004.
- CARVALHO, J. C. DE et al. Microalgae production in cassava wastewater. **Advances in Bioprocesses in the Food Industry**, 2011.
- CASSONI, V. Valorização De Resíduo De Processamento De Farinha De Mandioca (Manipueira) Por Acetificação Valorização De Resíduo De Processamento De Farinha. **Dissertação Mestrado - UNESP**, 2008.
- CATALDO, D. A. et al. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid 1. **Communications in Soil Science & Plant Analysis**, v. 6, n. 1, p. 71–80, 1975.
- CHEN, C. Y. et al. Microalgae-based carbohydrates for biofuel production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 78, n. September, p. 1–10, 2013.
- CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 3, p. 294–306, maio 2007.
- CHOI, C. J.; BERGES, J. A.; YOUNG, E. B. Rapid effects of diverse toxic water pollutants on chlorophyll a fluorescence: Variable responses among freshwater microalgae. **Water Research**, v. 46, n. 8, p. 2615–2626, 2012.
- COLIN, X. et al. Anaerobic treatment of cassava starch extraction wastewater using a horizontal flow filter with bamboo as support. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 8, p. 1602–1607, maio 2007.
- DOS SANTOS, M. H. V. et al. Uso da manipueira como fonte de potássio na cultura da alface

- (lactuca sativa L.) cultivada em casa-de-vegetação. **Acta Scientiarum - Agronomy**, v. 32, n. 4, p. 729–733, 2010.
- DOS SANTOS, R. R. et al. Cultivation of *Spirulina maxima* in medium supplemented with sugarcane vinasse. **Bioresource Technology**, v. 204, p. 38–48, mar. 2016.
- EHIAGBONERE, J. E. et al. Effect of cassava effluent on *Okada Denizens*. **Scientific Research & Essay**, v. 4, n. 4, p. 310–313, 2009.
- EMBRAPA. Processamento da Mandioca. **Empresa Brasileira De Pesquisa Agropecuaria Série Agronegócios**, 2003.
- FÁBREGAS, J. et al. Germinated *Solanum tuberosum*: An agricultural product for marine microalgae culture. **Bioresource Technology**, v. 66, n. 1, p. 19–24, 1998.
- FIORETTO, R. A. Uso direto da manipueira em fertirrigação. **Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas. Tratamento de subprodutos da Industrialização da Mandioca**, v. 4, p. 67–79, 2000.
- FRIGON, J.-C. et al. Screening microalgae strains for their productivity in methane following anaerobic digestion. **Applied Energy**, v. 108, p. 100–107, ago. 2013.
- GONZAGA, A. D.; SOUZA, S. G. A. DE; RIBIEIRO, J. D. Potencial de manipueira de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) no controle de pulgão preto de citros (*Toxoptera citricida* Kirkaldy, 1907). **Resumos do V CBA - Manejo de Agroecossistemas Sustentáveis**, v. 2, n. 2, p. 646–650, 1907.
- GONZÁLEZ, M. Aplicación e importancia de las microalgas en el tratamiento de aguas residuales. **Laboratorio de Microbiología Ambiental e Tratamiento de Aguas Residuales**, v. 59, p. 64–70, 2006.
- GURBUZ, F. et al. Microbial detoxification of cyanide solutions: A new biotechnological approach using algae. **Hydrometallurgy**, v. 72, n. 1–2, p. 167–176, 2004.
- GURBUZ, F.; CIFTCI, H.; AKCIL, A. Biodegradation of cyanide containing effluents by *Scenedesmus obliquus*. **Journal of Hazardous Materials**, v. 162, n. 1, p. 74–79, 2009.
- IBGE. Indicadores IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE**, p. 14–49, 2015.
- INOUE, K. R. A. Produção de Biogas, Caracterização e Aproveitamento Agrícola do Biofertilizante obtido na Digestão da Manipueira. **Dissertação Mestrado - UFViçosa**, p. 158, 2008.
- INOUE, K. R. A. et al. Concentração de nutrientes em plantas de milho, adubadas com biofertilizantes, obtidos na digestão anaeróbia da manipueira. **Engenharia na agricultura**, v. 19, n. 3, p. 236–243, 2011.
- JO, J.; LEE, D. Turn-On Fluorescence Detection of Cyanide in Water : Activation of Latent Fluorophores through Remote Hydrogen Bonds That Mimic Peptide -Turn Motif. n. 19, p. 16283–16291, 2009.

- KAPDAN, I. K.; KARGI, F. Bio-hydrogen production from waste materials. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, n. 5, p. 569–582, mar. 2006.
- KOROLEFF, F. Colorimetric Determination of Ammonium (NH_4^+) in Solution. **Methods of Seawater Analysis**, n. 3, p. 12–14, 1976.
- KUO, C.-M. et al. Cultivation of *Chlorella* sp. GD using piggery wastewater for biomass and lipid production. **Bioresource Technology**, v. 194, p. 326–333, out. 2015.
- LEONEL, M.; CEREDA, M. P. Manipueira como substrato na biossíntese de ácido cítrico por *Aspergillus niger*. **Scientia Agricola**, v. 52, n. 2, p. 299–304, 1995.
- LIMA, R. A. Tratamentos de efluentes líquidos de unidades produtoras de farinha de mandioca. p. 76, 2010.
- LIMA, M. A. DE et al. Emissões de Gases de Efeito Estufa na Queima de Resíduos Agrícolas. **Embrapa**, p. 64, 2010.
- MALDONADO, E.; MORALES, E.; ROMERO, P. Evaluacion de la Capacidad Mixotrófica *Graesiella emersonii* (*Chlorella emersonii*) con sustratos amiláceos. p. 10, 2013.
- MONTAÑO, S. A. Clasificación taxonómica de microalgas presentes en un consorcio microbiológico que biorremedia el efluente de una planta de sacrificio de bovinos y porcinos. **Trabajo de Grado - UNIVERSIDAD DE LOS ANDES**, n. May, p. 39, 2016.
- MORAIS, C. S. F. Escalonamento do Cultivo e Extração de Óleo das Microalgas *Monoraphidium* sp . e *Scenedesmus* sp . para a Produção de Biodiesel. **Dissertação Mestrado - Engenharia Biológica**, 2014.
- MUÑOZ, R.; GUIEYSSE, B. Algal–bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: A review. **Water Research**, v. 40, n. 15, p. 2799–2815, ago. 2006.
- MYERS, A M. et al. Recent progress toward understanding biosynthesis of the amylopectin crystal. **Plant physiology**, v. 122, n. 4, p. 989–997, 2000.
- NAGHAVI, N. S.; MAZROUEI, B.; AFSHARZADEH, S. Analisis of Cyanide Bioremediation Using Cyanobacterium; *Chroococcus* Isolated from Steel Manufacturing Industrial. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 53, n. 9, p. 1689–1699, 2012.
- PARMAR, A. et al. Cyanobacteria and microalgae: A positive prospect for biofuels. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 22, p. 10163–10172, nov. 2011.
- PÁSKOVÁ, J.; MUNK, V. Estudo Da Remoção De Compostos Cianogênicos Da Manipueira Quando Da Utilização Da Mesma Como Substrato Em Processo Fermentativo. **Folia Microbiologica**, v. 8, n. 6, p. 378–380, 2010.
- PATIL, Y. Biotechnological Strategy for the Management of Industrial Waste with Concurrent Mitigation of Global Warming – A Feasibility Study Using Microalgae Yogesh. n. March 2016, 2012.
- PINTO, P. H. M. Tratameto de Manipueira de Fecularia em Biodigestor Anaeróbio para

- Disposição em corpo Receptor, rede pública ou uso em Fertirrigação. **Dissertação Mestrado - UNESP**, v. 9, 2008.
- PRABAKARAN, P.; RAVINDRAN, A. D. *Scenedesmus* as a potential source of biodiesel among selected microalgae. **Current Science**, v. 102, n. 4, p. 616–619, 2012.
- PRATIS, S. B. Q. et al. Aplicação de Manipueira no Controle da Cochonilha-da-raiz (*Dysmicoccus* sp.). 2013.
- PRESCOTT, W.; PRESCOTT, G. W. The fresh-water algae. **How To Know**, p. 224, 1978.
- PUERTA, S. M. R. Evaluación de microalgas y de bacterias asociadas productoras de exoenzimas para tratamiento de aguas residuales de una extractora de aceite de palma. **Trabajo de Grado - UNIVERSIDAD DEL ZULIA**, p. 1–154, 2010.
- RICHMOND, A. Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology/edited by Amos Richmond. **Orton.Catie.Ac.Cr**, p. 472, 2004.
- RUFFING, A. M. Engineered cyanobacteria: Teaching an old bug new tricks. **Bioengineered Bugs**, v. 2, n. 3, p. 136–149, 2011.
- SAG. Maintenance of Cultures. **Algae**, p. 1–3, 2008.
- SAKAI, N. et al. Chlorella strains from hot springs tolerant to high temperature and high CO₂. **Energy Conversion and Management**, v. 36, n. 6–9, p. 693–696, jun. 1995.
- SÁNCHEZ-TORRES, H. et al. Producción de la microalga *Nannochloropsis oculata* (Droop) en medios enriquecidos con ensilado biológico de pescado. **Ecología Aplicada**, v. 7, n. 1–2, p. 149–158, 2008.
- SARAIVA, F. Z. et al. Uso de manipueira no desenvolvimento vegetativo do milho. n. 45, p. 30–36, 2007.
- SEAB. **Análise da Conjuntura Agropecuária - Mandioca Safra 2014/2015**. Disponível em:
<http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/mandioca_2014_15.pdf>. Acesso em: 8 mar. 2016.
- SHEATH, R.; WEHR, J. D. Ecology and Classification. **Freshwater Algae of North America**, p. 246, 2015.
- STANIER, R. et al. BG11 (Blue-Green Medium). **Culture Collection of Algae and Protozoa**, v. 11, n. 1, p. 559001, 1971.
- STENGEL, D. B.; CONNAN, S.; POPPER, Z. A. Algal chemodiversity and bioactivity: Sources of natural variability and implications for commercial application. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 5, p. 483–501, 2011.
- SYDNEY, E. B. et al. Screening of microalgae with potential for biodiesel production and nutrient removal from treated domestic sewage. **Applied Energy**, v. 88, n. 10, p. 3291–3294, out. 2011.

- TANDEAU DE MARSAC, N.; HOUMARD, J. Complementary chromatic adaptation: Physiological conditions and action spectra. **Methods in Enzymology**, v. 167, n. 1983, p. 318–328, 1988.
- TORRES, H. S. DE J.; CASSINI, S. T. A.; GONÇALVES, R. F. Isolamento, Sobrevivência e caracterização da Biomassa de Microalgas Cultivadas em Efluente de Tratamento de Esgoto Sanitário Visando a Produção de Biocombustíveis. **Simposio Internacional de Qualidade Ambiental**, 2014.
- UBALUA, A O. Cassava wastes : treatment options and value addition alternatives. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, n. 18, p. 2065–2073, 2007.
- UNUNG, J. E.; AJAYI, O. A.; BOKANGA, M. Effect of local processing methods on cyanogen content of cassava. **Tropical Science**, v. 46, n. 1, p. 20–22, 2006.
- VANELSLANDER, B. et al. Daily bursts of biogenic cyanogen bromide (BrCN) control biofilm formation around a marine benthic diatom. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 7, p. 2412–2417, 2012.
- VAZ, B. DA S. et al. Microalgae as a new source of bioactive compounds in food supplements. **Current Opinion in Food Science**, v. 7, p. 73–77, fev. 2016.
- VIEITES, R. L. Efeitos da adubação com manipueira sobre o rendimento e qualidade dos frutos de tomate. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 33, n. 8, p. 1239–1243, 1998.
- VONSHAK, A.; RICHMOND, A. Mass production of the blue-green alga *Spirulina*: An overview. **Biomass**, v. 15, n. 4, p. 233–247, 1988.
- WALTER, A. Estudo do Processo Biotecnológico para Obtenção de Ficocianina a Partir da Microalga *Spirulina platensis* Sob Diferentes Condições de Cultivo. **Dissertação Mestrado - UFPR**, p. 1–133, 2011.
- WOJCIECHOWSKI, J. et al. Microalgas. **Isolamento E Cultivo De Microalgas**, p. 85, 2013.
- WOSIACKI, G.; CEREDA, M. P. Valorização de resíduos do processamento de mandioca. **Agrarian Science and Engineering**, v. 8, n. 1, p. 27–43, 2002.
- YEN, H.-W. et al. Microalgae-based biorefinery – From biofuels to natural products. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 166–174, maio 2013.
- ZHANG, X.-W.; ZHANG, Y.-M.; CHEN, F. Application of mathematical models to the determination optimal glucose concentration and light intensity for mixotrophic culture of *Spirulina platensis*. **Process Biochemistry**, v. 34, n. 5, p. 477–481, jul. 1999.