



UFRJ

Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal e Bioprocessos

**Avaliação do potencial de recuperação da biomassa microalgácea
empregando biofloculantes e de seu impacto na extração de
bioprodutos**

Alenne Prince Junqueira de Moraes

Rio de Janeiro

2020

Alenne Prince Junqueira de Moraes

Avaliação do potencial de recuperação da biomassa microalgácea empregando biofloculantes e de seu impacto na extração de bioprodutos

Dissertação submetida como requisito para obtenção do grau de Mestre no curso de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal e Bioprocessos.

Orientador: Dr. Celso Luiz Salgueiro Lage

Co-orientadora: Dra. Cláudia Maria Luz Lapa Teixeira

Rio de Janeiro

2020

JJ95a Junqueira de Moraes, Alenne Prince
Avaliação do potencial de recuperação da biomassa
microalgácea empregando biofloculantes e de seu
impacto na extração de bioprodutos / Alenne Prince
Junqueira de Moraes. -- Rio de Janeiro, 2020.
106 f.

Orientador: Celso Luiz Salgueiro Lage.
Coorientadora: Cláudia Maria Luz Lapa Teixeira.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do
Rio de Janeiro, Decania do Centro de Ciências da
Saude, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia
Vegetal, 2020.

1. Haematococcus pluvialis. 2. Nannochloropsis
oculata. 3. Tanfloc SG. 4. Floculação alcalina. 5.
Reuso meio de cultivo. I. Lage, Celso Luiz
Salgueiro, orient. II. Teixeira, Cláudia Maria Luz
Lapa, coorient. III. Título.

Agradecimentos

Agradeço:

À minha família, principalmente meus pais, meu irmão, tia e vovó por todo apoio, carinho e dedicação à minha realização pessoal e profissional;

À minha sobrinha Clarice, por trazer tanto amor e luz em nossas vidas;

Ao meu namorado Hugo por todo amor, incentivo e parceria ao longo desses anos;

Aos meus amigos/irmãos Alessandra, Tuanny, Nara, Igor e Amanda pelas discussões científicas, apoio, torcida e por estarem sempre presentes em todos os momentos;

Aos colegas e amigos do LABIM pela parceria, conhecimentos compartilhados e por serem sempre solícitos;

Aos meus orientadores Celso Lage e Cláudia Teixeira por confiarem e acreditarem no trabalho realizado, estando sempre dispostos a ajudar. Em especial, à Cláudia, por acreditar em meu potencial desde o primeiro momento na entrevista da minha primeira bolsa do INT até o processo de seleção de mestrado e as conquistas ao longo deste período;

Ao programa de Pós-Graduação PBV, aos professores e amigos que fiz durante o curso;

Ao INT pela estrutura e oportunidade;

À CAPES pela bolsa concedida;

E a todos que direta ou indiretamente participaram deste trabalho,

Muito Obrigada!

.

RESUMO

Com o propósito de diminuir os custos associados aos processos de recuperação da biomassa de microalgas do meio de cultivo e, ao mesmo tempo, minimizar os impactos ambientais referentes a esse processo, neste trabalho foram estudados flocculantes orgânicos biodegradáveis para a recuperação da biomassa de *Haematococcus pluvialis* e *Nannochloropsis oculata*, modelo de espécie de água doce e marinha, respectivamente. Um planejamento fatorial completo 2^3 foi usado para avaliar os principais fatores envolvidos na eficiência de flocculação destas microalgas, e foram estudadas as variáveis: concentração de flocculante, tempo de sedimentação e pH do meio de cultura. Como flocculantes, foram avaliados: derivados de *Moringa oleifera*: pó de Semente (SM), Torta da Semente (TSM) e Extrato Salino da Semente (ESM), e o produto comercial derivado de tanino, Tanfloc SG (TSG). Os resultados evidenciaram alta eficiência de flocculação (98%) de *H. pluvialis* com a aplicação de TSG na concentração de $0,6 \text{ mg.L}^{-1}$, sem ajuste de pH da cultura (pH~8,9), em 15 minutos. Já para a espécie marinha, *N. oculata*, foi observada alta eficiência de flocculação com TSG (99%), na concentração de $1,2 \text{ mg.L}^{-1}$, sem ajuste de pH (pH~8,7); a flocculação alcalina, pela adição de NaOH (pH 10,5), e esta associada ao ESM na concentração de 500 mg.L^{-1} também apresentaram alta eficiência, superior a 97%, após 30 minutos. Ambas as microalgas flocculadas com TSG apresentaram uma redução em lipídios totais e carotenoides totais com relação às biomassas centrifugadas. No entanto, apesar desse menor teor obtido, quando comparados à literatura, os resultados foram considerados satisfatórios. A flocculação alcalina, e o flocculante ESM em meio alcalino, promoveram diminuição no teor em lipídios de *N. oculata*. Entretanto, a flocculação alcalina não causou alteração no teor em carotenoides totais de *N. oculata* e não houve diferença significativa ($p < 0,05$) comparada à biomassa centrifugada. Os meios de cultura residuais obtidos do processo de flocculação e de centrifugação suplementados promoveram o crescimento da microalga marinha, inclusive o meio residual obtido da flocculação com TSG sem suplementação de nutrientes. No cultivo de *H. pluvialis* apenas o meio residual obtido da centrifugação com suplementação promoveu o crescimento das células. Estes resultados são importantes para a diminuição dos custos associados à produção de biomassa de microalgas e garantindo maior sustentabilidade.

Palavras-chave: *Haematococcus pluvialis*, *Nannochloropsis oculata*, *Moringa oleifera*, Tanfloc SG, Flocculação Alcalina, Lipídios, Carotenoides, Reuso de meio de cultivo.

ABSTRACT

In order to reduce the costs associated with the recovery processes of microalgae biomass from the culture medium and, at the same time, to minimize the environmental impacts related to this process, in this work, biodegradable organic flocculants were applied for the recovery of *Haematococcus pluvialis* and *Nannochloropsis oculata*: freshwater and saltwater microalgae model. A complete factorial design 2^3 was used to refine the main factors involved in the flocculation efficiency of these microalgae, and the variables studied were: flocculant concentration, sedimentation time and pH of the culture medium. As flocculants, were evaluated: *Moringa oleifera* derivatives: Seed powder (SM), Seed Cake (TSM) and Saline Seed Extract (ESM), and the commercial product derived from tannin, Tanfloc SG (TSG). The results showed high flocculation efficiency (98%) of *H. pluvialis* with the application of TSG at a concentration of 0.6 mg.L^{-1} , without adjusting the culture pH (pH ~ 8.9), in 15 minutes. For the marine species, *N. oculata*, high flocculation efficiency was observed with TSG (99%), at a concentration of 1.2 mg.L^{-1} , without pH adjustment (pH ~ 8.7); alkaline flocculation, by adding NaOH (pH 10.5), and this associated with ESM at a concentration of 500 mg.L^{-1} also showed high efficiency, above 97%, after 30 minutes. Both TSG flocculated microalgae showed a reduction in total lipids and total carotenoids compared to centrifuged biomasses. However, despite this lower content, when compared to the literature, the results were considered satisfactory. Alkaline flocculation, as well as the use of ESM in an alkaline medium, reduced the lipid content of *N. oculata*. However, alkaline flocculation did not change the total carotenoid content of *N. oculata* and there was no significant difference ($p < 0.05$) compared to centrifuged biomass. The residual culture media obtained from the supplemented flocculation and centrifugation processes promoted the growth of marine microalgae, including the residual media obtained from the flocculation with TSG without nutrient supplementation. In the cultivation of *H. pluvialis*, only the residual medium obtained from centrifugation with supplementation promoted cell growth. These results are important for reducing associated costs in microalgae production and ensuring sustainability.

Keywords: *Haematococcus pluvialis*, *Nannochloropsis oculata*, *Moringa oleifera*, Tanfloc SG, Alkaline Flocculation, Lipids, Carotenoids, Reuse of culture medium.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

μE - MicroEinsten

ANOVA – Análise de Variância

DO - Densidade Óptica

ESM – Extrato Salino da Semente de *Moringa oleifera*

LED - Diodo Emissor de Luz

PC - Ponto central

pH - Potencial Hidrogeniônico

PSU - Practical Salinity Unit ou Unidade de Salinidade Prática

QM – Quadrados Médios

R^2 - Coeficiente de Determinação

rpm – Rotações por minuto

SM – Semente de *Moringa oleifera*

SQ – Soma dos Quadrados

sup - Suplementado

TSG – Tanfloc SG

TSM – Torta da Semente de *Moringa oleifera*

ν – Graus de liberdade

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fluxograma das etapas experimentais.	24
Figura 2: Sementes de <i>Moringa oleifera</i> : (A) Com casca e descascadas; (B) Preparo do pó de sua semente.	25
Figura 3: Extrato salino da semente de <i>Moringa oleifera</i> obtido após o tratamento ultrassônico e centrifugação.	26
Figura 4: Torta da semente de <i>Moringa oleifera</i> obtida por extração mecânica, cedida pelo grupo G-ÓLEO – UFLA.	27
Figura 5: Tanfloc SG em sua forma comercial líquida, cedido pela empresa TANAC.	27
Figura 6: Ensaios de avaliação da influência dos parâmetros na eficiência de floculação: (A) Ensaios de floculação de <i>Nannochloropsis oculata</i> ; (B) Ensaios de floculação de <i>Haematococcus pluvialis</i>	30
Figura 7: Inóculos na fase estacionária de crescimento, em mesa agitadora.	31
Figura 8: Suspensões celulares mantidas na estante em garrafas PET de 5L: (A) Suspensões celulares de <i>Haematococcus pluvialis</i> na fase inicial de cultivo; (B) Suspensões celulares de <i>Haematococcus pluvialis</i> na fase final de cultivo.	32
Figura 9: Suspensão celular resultante da união dos garrafões: (A) Suspensão celular de <i>Nannochloropsis oculata</i> ; (B) Suspensão celular de <i>Haematococcus pluvialis</i>	33
Figura 10: Suspensões celulares de <i>Haematococcus pluvialis</i> em cubas do Jar Test: (A) imediatamente após a adição dos agentes floculantes; (B) após o tempo de sedimentação.	34
Figura 11: Etapas do processo de extração de lipídios totais: (A) e (B) extratos de <i>Haematococcus pluvialis</i> ; (C) evaporação do clorofórmio em rotoevaporador; (D) e (E) extratos de <i>Nannochloropsis oculata</i> ; (F) filtração dos lipídios redissolvidos para remoção de sais; (G) evaporação do clorofórmio em rotaevaporador.	37
Figura 12: Extratos de pigmentos das espécies: (A) <i>Haematococcus pluvialis</i> , realizadas três extrações da mesma biomassa; (B) <i>Nannochloropsis oculata</i> , realizadas duas extrações da mesma biomassa.	39
Figura 13: Gráfico da eficiência de floculação de <i>Haematococcus pluvialis</i> , conforme matriz de planejamento, dos agentes floculantes: Semente de <i>Moringa oleifera</i> (SM), Torta da Semente de <i>Moringa oleifera</i> (TSM), Extrato Salino da Semente de <i>Moringa oleifera</i> (ESM) e Tanfloc SG (TSG).	41

Figura 14: Gráfico de Pareto para a eficiência de floculação de <i>Haematococcus pluvialis</i> utilizando Extrato Salino da Semente de <i>Moringa oleifera</i> (ESM), considerando a influência da concentração do floculante (1), tempo de sedimentação (2), pH (3) e a interação desses fatores, com nível de confiança de 95% ($p < 0,05$).	42
Figura 15: Gráfico de Pareto para a eficiência de floculação de <i>Haematococcus pluvialis</i> utilizando Tanfloc SG (TSG), considerando a influência da concentração do floculante (1), tempo de sedimentação (2), pH (3) e a interação desses fatores, com nível de confiança de 95% ($p < 0,05$).	43
Figura 16: Gráfico da eficiência de floculação de <i>Nannochloropsis oculata</i> , conforme matriz de planejamento, dos agentes floculantes: Semente de <i>Moringa oleifera</i> (SM), Torta da Semente de <i>Moringa oleifera</i> (TSM), Extrato Salino da Semente de <i>Moringa oleifera</i> (ESM) e Tanfloc SG (TSG).	46
Figura 17: Gráfico de Pareto para a eficiência de floculação de <i>Nannochloropsis oculata</i> utilizando Extrato salino da semente de <i>Moringa oleifera</i> (ESM), considerando a influência da concentração do floculante (1), tempo de sedimentação (2), pH (3) e a interação desses fatores, com nível de confiança de 95% ($p < 0,05$).	47
Figura 18: Gráfico de Pareto para a eficiência de floculação de <i>Nannochloropsis oculata</i> utilizando Tanfloc SG (TSG), considerando a influência da concentração do floculante (1), tempo de sedimentação (2), pH (3) e a interação desses fatores, com nível de confiança de 95% ($p < 0,05$).	48
Figura 19: Gráfico da eficiência de floculação de <i>Haematococcus pluvialis</i> , utilizando Extrato Salino da Semente de <i>Moringa oleifera</i> (ESM) e Tanfloc SG (TSG).	52
Figura 20: Gráfico da eficiência de floculação de <i>Nannochloropsis oculata</i> , utilizando Floculação alcalina (pH 10,5 induzido pela adição de NaOH), Extrato Salino da Semente de <i>Moringa oleifera</i> (ESM) e Tanfloc SG (TSG).	52
Figura 21: Gráfico do percentual de lipídios totais de <i>Haematococcus pluvialis</i> , das biomassas obtidas da Centrifugação (Controle) e da floculação com Tanfloc SG (TSG).	56
Figura 22: Gráfico do percentual de lipídios totais de <i>Nannochloropsis oculata</i> , das biomassas obtidas da Centrifugação (Controle), Floculação Alcalina, Extrato Salino da Semente de <i>Moringa oleifera</i> (ESM) e Tanfloc SG (TSG).	56
Figura 23: Gráfico da produção de carotenoides totais na biomassa de <i>Haematococcus pluvialis</i> , das biomassas obtidas da Centrifugação (Controle) e da floculação com Tanfloc SG (TSG).	59

Figura 24: Gráfico da produção de carotenoides totais na biomassa de <i>Nannochloropsis oculata</i> , das biomassas obtidas da Centrifugação (Controle), Floculação Alcalina, Extrato Salino da Semente de <i>Moringa oleifera</i> (ESM) e Tanfloc SG (TSG).	60
Figura 25: Culturas de <i>Nannochloropsis oculata</i> no último dia de cultivo em meios residuais - à esquerda duplicata com suplementação de nutrientes e, à direita duplicata sem suplementação de nutrientes. (A) Meio residual obtido após a Centrifugação (Controle). (B) Meio residual obtido após a Floculação Alcalina. (C) Meio residual obtido após floculação com Extrato Salino de Semente de <i>Moringa oleifera</i> (ESM). (D) Meio residual obtido após floculação com Tanfloc SG (TSG).	62
Figura 26: Crescimento das culturas de <i>Haematococcus pluvialis</i> em meio WC e em meio residual obtido da Centrifugação (Controle) com suplementação (nitrato e fosfato). Crescimento acompanhado por citometria de fluxo.....	63
Figura 27: Crescimento das culturas de <i>Nannochloropsis oculata</i> em meio F/2 e em meios residuais obtidos da: Centrifugação (Controle) com suplementação (nitrato e fosfato), da Floculação Alcalina com suplementação, da floculação com Extrato Salino da Semente de <i>Moringa oleifera</i> (ESM) com suplementação, da floculação com Tanfloc SG (TSG) com suplementação e sem suplementação. Crescimento acompanhado por citometria de fluxo.	63
Figura 28: Gráfico da probabilidade normal dos resíduos para a resposta eficiência de floculação do planejamento fatorial completo $2^3 + 3PC$ na floculação de <i>Haematococcus pluvialis</i> utilizando Extrato Salino da Semente de <i>Moringa oleifera</i> (ESM).	88
Figura 29: Gráfico dos valores observados versus preditos para a resposta eficiência de floculação do planejamento fatorial completo $2^3 + 3PC$ na floculação de <i>Haematococcus pluvialis</i> utilizando Extrato Salino da Semente de <i>Moringa oleifera</i> (ESM).	88
Figura 30: Gráfico da probabilidade normal dos resíduos para a resposta eficiência de floculação do planejamento fatorial completo $2^3 + 3PC$ na floculação de <i>Haematococcus pluvialis</i> utilizando Tanfloc SG (TSG).	89
Figura 31: Gráfico dos valores observados versus preditos para a resposta eficiência de floculação do planejamento fatorial completo $2^3 + 3PC$ na floculação de <i>Haematococcus pluvialis</i> utilizando Tanfloc (TSG).	89

Figura 32: Gráfico da probabilidade normal dos resíduos para a resposta eficiência de floculação do planejamento fatorial completo $2^3 + 3PC$ na floculação de <i>Nannochloropsis oculata</i> utilizando Extrato Salino da Semente de <i>Moringa</i> <i>oleifera</i> (ESM).....	90
Figura 33: Gráfico dos valores observados versus preditos para a resposta eficiência de floculação do planejamento fatorial completo $2^3 + 3PC$ na floculação de <i>Nannochloropsis oculata</i> utilizando Extrato Salino da Semente de <i>Moringa</i> <i>oleifera</i> (ESM).....	90
Figura 34: Gráfico da probabilidade normal dos resíduos para a resposta eficiência de floculação do planejamento fatorial completo $2^3 + 3PC$ na floculação de <i>Nannochloropsis oculata</i> utilizando Tanfloc SG (TSG).	91
Figura 35: Gráfico dos valores observados versus preditos para a resposta eficiência de floculação do planejamento fatorial completo $2^3 + 3PC$ na floculação de <i>Nannochloropsis oculata</i> utilizando Tanfloc SG (TSG).	91

LISTA DE TABELAS

Tabela I: Comparação da produtividade de óleo de diferentes matérias-primas para a produção de biodiesel. Adaptada de As et al. (2019); Mata; Martin; Caetano (2010).	7
Tabela II: Composição química da semente de <i>Moringa oleifera</i> . Adaptada de Gallão et al. (2006).....	17
Tabela III: Níveis codificados e não codificados das variáveis independentes utilizados nas avaliações dos flocculantes: Semente de <i>Moringa oleifera</i> (SM), Torta da semente de <i>Moringa oleifera</i> (TSM), Extrato salino da semente de <i>Moringa oleifera</i> (ESM) e Tanfloc SG (TSG).	28
Tabela IV: Matriz de níveis para análise fatorial 2^3 com três pontos centrais.	28
Tabela V: ANOVA para a resposta eficiência de floculação, com nível de confiança de 95% ($p < 0,05$), para o planejamento fatorial completo $2^3 + 3PC$, para o processo de floculação de <i>Haematococcus pluvialis</i> utilizando-se Extrato Salino da Semente de <i>Moringa oleifera</i> (ESM). $R^2 = 0,96127$; R^2 -ajustado = $0,95042$	44
Tabela VI: Tabela de efeitos e coeficientes para a resposta eficiência de floculação, com nível de confiança de 95% ($p < 0,05$), para o planejamento fatorial completo $2^3 + 3PC$, para o processo de floculação de <i>Haematococcus pluvialis</i> utilizando-se Extrato Salino da Semente de <i>Moringa oleifera</i> (ESM). $R^2 = 0,96127$; R^2 -ajustado = $0,95042$	44
Tabela VII: ANOVA para a resposta eficiência de floculação, com nível de confiança de 95% ($p < 0,05$), para o planejamento fatorial completo $2^3 + 3PC$, para o processo de floculação de <i>Haematococcus pluvialis</i> utilizando-se Tanfloc SG (TSG). $R^2 = 0,65752$; R^2 -ajustado = $0,56163$	45
Tabela VIII: ANOVA para a resposta eficiência de floculação, com nível de confiança de 95% ($p < 0,05$), para o planejamento fatorial completo $2^3 + 3PC$ na floculação de <i>Nannochloropsis oculata</i> utilizando Extrato Salino da Semente de <i>Moringa oleifera</i> (ESM). $R^2 = 0,96882$; R^2 -ajustado = $0,96009$	49
Tabela IIX: Tabela de efeitos e coeficientes para a resposta eficiência de floculação, com nível de confiança de 95% ($p < 0,05$), para o planejamento fatorial completo $2^3 + 3PC$ na floculação de <i>Nannochloropsis oculata</i> utilizando Extrato Salino da Semente de <i>Moringa oleifera</i> (ESM). $R^2 = 0,96882$; R^2 -ajustado = $0,96009$	49

Tabela X: ANOVA para a resposta eficiência de floculação, com nível de confiança de 95% ($p < 0,05$), para o planejamento fatorial completo $2^3 + 3PC$ na floculação de *Nannochloropsis oculata* utilizando Tanfloc SG (TSG). $R^2 = 0,92091$; R^2 -ajustado = $0,89876$ 50

Tabela XI: Tabela de efeitos e coeficientes para a resposta eficiência de floculação, com nível de confiança de 95% ($p < 0,05$), para o planejamento fatorial completo $2^3 + 3PC$ na floculação de *Nannochloropsis oculata* utilizando Tanfloc SG (TSG). $R^2 = 0,92091$; R^2 -ajustado = $0,89876$ 50

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
JUSTIFICATIVA	2
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
Potencial biotecnológico das microalgas	3
Biocombustíveis	5
Tratamento de efluentes	8
Separação da biomassa de microalgas do meio de cultivo	9
Floculantes orgânicos biodegradáveis	13
Quitosana.....	13
Amidos	14
Taninos	14
<i>Moringa oleifera</i> Lam.	16
Reutilização do meio de cultivo.....	19
Microalgas	20
<i>Haematococcus pluvialis</i>	20
<i>Nannochloropsis oculata</i>	21
OBJETIVOS	23
Objetivo geral.....	23
Objetivos específicos.....	23
MATERIAIS E MÉTODOS	24
Manutenção das culturas de microalgas	24
Agentes floculantes.....	25
Semente de <i>M. oleifera</i> (SM)	25
Extrato Salino da Semente de <i>M. oleifera</i> (ESM).....	26
Torta da Semente de <i>M. oleifera</i> (TSM)	26

Tanfloc SG (TSG)	27
Avaliação da influência de variáveis no processo de floculação	27
Avaliação da eficiência de floculação em Jar Test	31
Avaliação da reutilização do meio residual para novo ciclo de cultivo.....	34
Quantificação celular	35
Citômetro de fluxo	35
Massa seca.....	35
Massa seca livre de cinzas.....	35
Extração e quantificação de lipídios totais.....	36
Extração e quantificação de carotenoides totais	38
Análise estatística	39
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
Avaliação da influência de variáveis no processo de floculação.....	40
<i>H. pluvialis</i>	40
<i>N. oculata</i>	45
Avaliação da eficiência de floculação em Jar Test	51
Avaliação da extração de Lipídios totais e de Carotenoides totais.....	55
Avaliação da reutilização do meio residual para novo ciclo de cultivo.....	60
CONCLUSÕES	64
Perspectivas Futuras	65
BIBLIOGRAFIA	66
APÊNDICES	85
Apêndice A - Protocolo de preparo do Meio WC modificado, segundo descrito por Guillard e Lorenzen (1972).....	85
Apêndice B - Protocolo de preparo do Meio F/2, segundo descrito por Guillard (1975).....	87
Apêndice C - Gráficos complementares das avaliações da influência de variáveis no processo de floculação de <i>Haematococcus pluvialis</i>	88

Apêndice D - Gráficos complementares das avaliações da influência de variáveis no processo de floculação de <i>Nannochloropsis oculata</i>	90
--	----

INTRODUÇÃO

As microalgas são reconhecidas como uma das mais antigas formas de vida e são a base da cadeia alimentar nos oceanos e rios, sendo extremamente importantes na manutenção da vida aquática (LOURENÇO, 2006). O termo microalga é desprovido de valor taxonômico e, sob esta denominação, estão incluídos organismos com dois tipos de estrutura celular: procariótica, com representantes nos grupos Cyanophyta (i.e. cianobactérias) e Prochlorophyta; e eucariótica, com representantes nos grupos Heterokontophyta (Bacillariophyceae, Crysoophyceae, Dictyochophyceae, Eustigmatophyceae, Raphidophyceae, Xantophyceae, Phaeophyceae, Pelagophyceae), Dinophyta, Chlorophyta, Charophyta, Euglenophyta, Rhodophyta, Haptophyta, Glaucophyta, Cryptophyta e Chlorarachniophyta (DERNER et al., 2006; HOEK; MANN; JAHNS, 1995; SCHOCH et al., 2019). Esses micro-organismos apresentam grande variabilidade metabólica quanto à utilização de fontes de energia e carbono, podendo utilizar o carbono nas formas orgânica e inorgânica. Os principais tipos de metabolismo são classificados em três grupos: fotoautotrófico, heterotrófico e mixotrófico. De forma geral, na fotoautotrofia a única fonte de energia é a luz, e a fonte de carbono deriva de compostos inorgânicos; em contraste com a heterotrofia, na qual a fonte de energia e carbono têm origens orgânicas. Já na mixotrofia, a principal fonte de energia é a luz, ainda que os compostos orgânicos e inorgânicos sejam essenciais (LOURENÇO, 2006).

A grande diversidade evolutiva e filogenética das microalgas implica também em grande diversidade na composição química, fazendo com que estes organismos sejam extremamente atrativos para bioprospecção e exploração comercial (KOLLER; MUHR; BRAUNEGG, 2014; MATA; MARTINS; CAETANO, 2010). As microalgas são ricas em compostos bioativos que desempenham atividades antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana, antifúngica e propriedades de inibição enzimática (BHUVANA; SANGEETHA; ANURADHA, 2019; HAMED, 2016). Diante disso, esses organismos vêm sendo empregados em diversas áreas incluindo as indústrias de nutracêuticos, farmacêutica e cosmética, na produção de biomateriais e nanoestruturas (APONE; BARBULOVA; COLUCCI, 2019; MATOS, 2017). Ademais, possuem grande potencial para uso em aquicultura, biorremediação e biofertilização (UYSAL; UYSAL; EKINCI, 2016; SIDDIQUI; MIRANDA; MOURADOV, 2018); e podem ser usadas como fonte de energia renovável através da produção de biocombustíveis (ARO,

2016). No entanto, apesar desse grande potencial de aplicação em diversos setores biotecnológicos, ainda existem muitos desafios para a viabilização econômica da produção desta matéria-prima em escala industrial para algumas finalidades, como por exemplo, produção de biocombustíveis. A colheita das microalgas é uma das etapas mais significativas no custo total de produção desta biomassa (GRIMA et al., 2003). Em plantas comerciais, a colheita é geralmente realizada por centrifugação e, embora este método seja eficaz, a despesa com o processamento para grandes volumes é bastante elevada e proibitiva para a produção de produtos de baixo valor comercial. Dessa forma, a centrifugação se mostra um processo ineficiente em termos energéticos e econômicos, quando utilizada isoladamente (ELDRIGE; HILL; GLADMAN, 2012). Uma alternativa para a redução dos custos é realizar uma separação prévia da biomassa, de forma eficiente, barata e que não interfira na qualidade do produto final. Neste contexto, a floculação se apresenta como um método promissor e de baixo custo, pois promove uma economia de energia e tempo no processo de colheita da biomassa, diminuindo o volume de cultura a ser processado e permitindo, desta forma, um tratamento rápido de grandes volumes de cultura de microalgas (TEIXEIRA; KIRSTEN; TEIXEIRA, 2012).

Os flocculantes podem ser inorgânicos ou orgânicos (GERARDO et al., 2015). Compostos de alumínio e ferro são os flocculantes inorgânicos mais utilizados em diferentes conceitos de tratamento de efluentes industriais (VAZ et al., 2010), mas normalmente resultam na produção de efluentes tóxicos e na contaminação da biomassa de microalgas por esses metais (KIRNEV et al., 2018; VANDAMME; FOUBERT; MUYLAERT, 2013). Com a crescente preocupação com questões ambientais, vêm sendo ampliados e intensificados os estudos de desenvolvimento de flocculantes orgânicos biodegradáveis derivados de matéria-prima renovável (LIMA; ABREU, 2018). Dessa forma, flocculantes orgânicos extraídos de plantas como a *Moringa oleifera* (TEIXEIRA; TEIXEIRA, 2017) e taninos vegetais modificados, como o Tanfloc® - produzido pela empresa brasileira TANAC (SELESU et al., 2016), demonstraram boa eficiência, nula toxicidade e baixo custo como agentes flocculantes no tratamento de águas com alta turbidez e possuem grande potencial de aplicação para a colheita da biomassa de microalgas.

JUSTIFICATIVA

A motivação para a realização do presente trabalho é resultante da escassez de estudos acerca da eficiência de bioflocculantes para a colheita da biomassa de

microalgas, principalmente marinhas e do aproveitamento do meio de cultura pós-colheita, para que o mesmo possa ser reutilizado ou descartado sem efeitos nocivos ao meio ambiente. Além de estudos sobre a eficiência desses flocculantes em diferentes espécies de microalgas, também é relevante a avaliação do efeito dos mesmos sobre a eficiência da extração de bioprodutos de interesse comercial da biomassa microalgácea, bem como a possibilidade de reutilização do meio residual para novos ciclos de cultivo.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Potencial biotecnológico das microalgas

O crescente interesse no estudo de microalgas deve-se à essencial importância destes micro-organismos nos ecossistemas e na possibilidade de aplicação comercial em distintas áreas, pois possuem versatilidade metabólica e capacidade de mitigação de dióxido de carbono, contribuindo no desenvolvimento de tecnologias limpas e permitindo a comercialização de créditos de carbono (YADAV; DUBEY; SEN, 2020). As microalgas são muito interessantes do ponto de vista biotecnológico e sintetizam uma imensa gama de compostos como polissacarídeos, esteróis, enzimas e uma valiosa fonte de quase todas as vitaminas essenciais (A, B1, B2, B6, B12, C, E, nicotinato, biotina, ácido fólico e ácido pantotênico) (DOMÍNGUEZ-BOCANEGRA et al., 2004; FELLER et al., 2017). Além disso, a maioria das espécies apresentam níveis acima de 50% de proteína em massa seca. Algumas proteínas, peptídeos e aminoácidos têm funções biológicas associadas a benefícios nutricionais e à saúde humana. Assim, estes biopolímeros podem ser incluídos em formulações funcionais de alimentos (JACOB-LOPES et al., 2019). Outros importantes constituintes são os pigmentos, como a clorofila, os carotenoides e as ficobilinas, sendo que estas são do grupo das proteínas e os dois primeiros do grupo dos lipídios (LOURENÇO, 2006). Aproximadamente 60 tipos diferentes de pigmentos são encontrados em microalgas e em cada espécie é possível encontrar de 5 a 10 tipos de pigmentos (DERNER et al., 2006).

A clorofila é um dos valiosos compostos bioativos que podem ser extraídos da biomassa de microalgas, com ampla aplicação nas indústrias farmacêutica, cosmética e alimentícia (usada como corante alimentar natural), possui propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e antimutagênicas (FERREIRA; SANT, 2017; HOSIKIAN et al., 2010). Os carotenoides, assim como as clorofilas, são pigmentos orgânicos encontrados nos cloroplastos e cromoplastos de algumas microalgas. São pigmentos naturais da

classe dos terpenos (tetraterpenoides com 40 átomos de carbono), que podem apresentar coloração vermelha, amarela ou laranja. Podem ser subdivididas em 2 classes: carotenos (hidrocarbonetos poliinsaturados; e.g. α -caroteno, β -caroteno, γ -caroteno, ζ -caroteno, licopeno, fitoflueno) e xantofilas (derivados oxigenados dos carotenos; e.g. β -criptoxantina, luteína, astaxantina, zeaxantina, violaxantina, capsantina e bixina) (UENOJO; MARÓSTICA JÚNIOR; PASTORE, 2007). Os carotenoides destacam-se pela sua ação na prevenção e no tratamento do envelhecimento celular, inflamações, doenças cardiovasculares e alguns tipos de câncer (BOROWITZKA, 2013). Sua maior aplicação no mercado, destacando-se o β -caroteno e a astaxantina, é na aquicultura, seguida pelas indústrias farmacêutica e alimentícia, devido às suas propriedades antioxidantes; e na indústria de cosméticos como corantes naturais (HAMED, 2016; SHAH et al., 2016). As ficobilinas ou ficobiliproteínas estão presentes em cianobactérias e nas microalgas do grupo Rhodophyta e Glaucophyta (SCHLUCHTER; BRYANT, 2002). Esses pigmentos possuem alto valor terapêutico como imunomoduladores e são frequentemente empregados em biologia molecular como marcadores fluorescentes, usados em imunoenaios e como corantes para microscopia (ALESSANDRO; ANTONIOSI, 2016; SEKAR, 2008).

Entre os principais produtos de valor agregado produzidos a partir de microalgas, a produção de ácidos graxos poliinsaturados (polyunsaturated fatty acids, PUFAs) ou ácidos graxos de cadeia longa, também são amplamente conhecidos por seus efeitos benéficos na saúde humana (KATIYAR; ARORA, 2020). O conteúdo lipídico de microalgas pode variar entre 1 a 40% do peso seco e, em certas condições de cultivo, pode alcançar até 85% (CHISTI, 2007). Os óleos são compostos por triacilglicerídeos (TAG), os quais são ésteres de ácidos graxos ligados ao glicerol (SOARES et al., 2013). Os mais relevantes do ponto de vista comercial são os PUFAs, os quais possuem duas ou mais duplas ligações, como o caso do ácido eicosapentaenóico (EPA, C20:5n-3; 5 ligações duplas) e ácido docosahexaenóico (DHA, C22:6n-3; 6 ligações duplas) (KATIYAR; ARORA, 2020). Os lípidos, especialmente das espécies de microalgas marinhas, contêm quantidades elevadas de ácidos graxos polinsaturados como o ácido araquidónico (AA – 20:4n-6), que é um ácido graxo ômega 6, EPA e DHA, ambos ácidos graxos ômega 3 (WANG et al., 2019). Ao EPA e DHA são atribuídas propriedades benéficas à saúde humana, sendo encontrados em quantidade elevada nos peixes marinhos, como: bacalhau, arenque, anchova, salmão e sardinha. Porém, a extração destes ácidos a partir destes organismos

pode apresentar vários problemas como, odor desagradável, contaminação por metais pesados, baixa estabilidade, presença de colesterol, produção variável e um complexo perfil de ácidos graxos (RYMER; GIBBS; GIVENS, 2006). As microalgas não apresentam estes pontos negativos e os ácidos graxos apresentam-se numa composição mais simples e seu processo de purificação é facilitado (DERNER et al., 2006; FELLER et al., 2017). Os PUFAs têm como função a prevenção e tratamento de uma série de doenças cardiovasculares, da arteriosclerose e da arritmia, da redução da pressão arterial, da redução dos níveis de colesterol e triglicerídeos no plasma, da artrite reumatoide e são essenciais no desenvolvimento cerebral (WARD; SINGH, 2005). Os ácidos linoleico (AL - 8:2n-6) e alfa-linolênico (AAL - 18:3n-3), também fazem parte dos ácidos graxos essenciais para o ser humano, e, por não serem produzidos pelo nosso organismo, é necessário incluí-los na nossa dieta através dos alimentos ou de suplementos nutricionais (Youdim; MARTIN; JOSEPH, 2000; YEHUDA et al., 2002).

Dessa forma, a constituição química da biomassa de microalgas tem um potencial de exploração em vários setores industriais. Exemplos de sucesso incluem a formulação de alimentos (LAFARGA, 2019), cosméticos e fármacos (APONE; BARBULOVA; COLUCCI, 2019), em aquicultura e ração animal (DINESHBABU et al., 2019) e produção de biofertilizantes (RONGA et al., 2019). Além do enfoque principal, voltado aos produtos bioquímicos, a utilização desses micro-organismos vem sendo foco de crescente pesquisa para a produção de biocombustíveis e no tratamento de águas residuais (JAVED et al., 2019).

Biocombustíveis

As fontes de energia são a principal mercadoria para o desenvolvimento da economia mundial e, até a presente data, a maioria das necessidades energéticas é obtida através de combustíveis fósseis não renováveis, como petróleo, carvão e gás natural (MATHIMANI; UMA; PRABAHARAN, 2015). Os biocombustíveis surgiram da crescente preocupação ambiental e necessidade de alternativas aos combustíveis convencionais (CALIXTO et al., 2018); podem ser classificados em diferentes categorias de acordo com a matéria-prima e a tecnologia de conversão utilizada para a sua produção, sendo denominados como de primeira, de segunda e de terceira geração. Essa classificação e denominação podem variar de acordo com alguns autores (SALADINI et al., 2020). Os biocombustíveis de primeira geração fazem uso da colheita agrícola para fins energéticos, ou seja, são produzidos a partir de culturas como

a soja, milho, cana-de-açúcar, mamona, dendê, entre outras (LEITE; LEAL, 2007). Contudo, sua produção compete com a produção de alimentos, causando uma contínua inflação dos preços no setor alimentício, além de necessitarem de grandes extensões de terreno arável para o cultivo das espécies (KOSINKOVA et al., 2015). A segunda geração de biocombustíveis surgiu como uma tentativa de solução dos problemas associados aos combustíveis de primeira geração e são produzidos à partir de culturas lignocelulósicas, principalmente à partir de resíduos florestais e agrícolas, e resíduos do petróleo e do óleo de cozinha (VASSILEV; VASSILEVA, 2016). No entanto, ainda assim, necessitam de extenso terreno arável e de tecnologias mais eficientes para o tratamento e conversão dos materiais lignocelulósicos, bem como de procedimentos que minimizem os gastos excessivos de energia com a coleta e transporte dos resíduos (ALALWAN; ALMINSHID; ALJAAFARI, 2019).

Já a terceira geração, compreende a utilização de micro-organismos fotossintéticos - as microalgas, que são consideradas fonte de biomassa com maior capacidade para atender às necessidades mundiais de energia (AMINUL; HEIMANN; BROWN, 2017; LEONG et al., 2018; CRUZ et al., 2013). À partir da biomassa microalgácea é possível obter óleo com produtividade superior àquela dos óleos extraídos de biomassas tradicionais (Tabela I). Além disso, esses micro-organismos possuem vantagens como: enorme disponibilidade por todo o planeta; alta taxa de crescimento da biomassa com elevado teor lipídico intracelular; no seu cultivo podem ser utilizadas água do mar, água salobra ou residuárias, o que reduz o uso de água potável; permitem colheita contínua durante todo o ano; podem ser cultivados em terras não férteis e, dessa forma, sua produção não compete com o plantio de alimentos e possuem ainda, capacidade de mitigação de dióxido de carbono e produção de coprodutos de alto valor agregado (AS et al., 2019; CHISTI, 2007; DEMIRBAS; DEMIRBAS, 2011; CRUZ et al., 2013; ELRAYIES, 2018).

Tabela I: Comparação da produtividade de óleo de diferentes matérias-primas para a produção de biodiesel. Adaptada de As et al. (2019); Mata; Martin; Caetano (2010).

Fonte	Conteúdo de óleo (% em massa seca)	Produção de óleo (L óleo.ha⁻¹.ano⁻¹)	Uso da terra (m² ano. kg⁻¹ biodiesel)	Produtividade em biodiesel (kg biodiesel.ha⁻¹.ano⁻¹)
Milho (<i>Zea mays</i> L.)	44	172	66	152
Soja (<i>Glycine max</i> L.)	18	636	18	562
Pinhão-manso (<i>Jatropha curcas</i> L.)	28	741	15	656
Canola (<i>Brassica napus</i> L.)	41	974	12	682
Girassol (<i>Helianthus annuus</i> L.)	40	1070	11	946
Mamona (<i>Ricinus communis</i>)	48	1307	9	1156
Óleo de palma (<i>Elaeis guineensis</i>)	36	5366	2	4747
Microalgas (baixo teor de óleo)	30	58.7	0.2	51.927
Microalgas (teor médio de óleo)	50	97.8	0.1	86.515
Microalgas (alto teor de óleo)	70	136.9	0.1	121.104

Além do biodiesel, a biomassa de microalgas, obtida ao fim do processo de cultivo, pode ser convertida em uma série de combustíveis por rotas termoquímicas e bioquímicas (BEHERA; BALASUBRAMANIAN, 2019). Os processos químicos compreendem a transesterificação de lipídios em biodiesel (PARK et al., 2014). Os processos bioquímicos incluem a fermentação de carboidratos para produzir bioetanol (HO et al., 2013), biohidrogênio (BATISTA et al., 2015) e digestão anaeróbica que gera biogás (PASSOS et al., 2014). Os processos termoquímicos compreendem a decomposição térmica da biomassa de algas em combustíveis líquidos e gasosos (CHIARAMONTI et al., 2016). No Brasil, os dois principais biocombustíveis líquidos utilizados são o etanol, produzido via fermentação de açúcares, gerado essencialmente através do processamento da cana de açúcar; e o biodiesel, obtido de óleos vegetais (majoritariamente da soja) e gordura animal convertidos em ésteres metílicos de ácidos

graxos (ANP, 2020). Ademais, o país se encontra em uma posição privilegiada para assumir a liderança no aproveitamento integral de biomassa microalgácea pelo fato de possuir condições ambientais favoráveis para sua produção, como intensa radiação solar, grande área costeira tropical, diversidade de clima, tem cerca de 12% das reservas de água doce mundial e pioneirismo na produção de biocombustíveis em larga escala (BRASIL; SILVA; SIQUEIRA, 2016).

O processo de produção de biomassa de microalgas em escala comercial para a produção de biocombustíveis encontra-se em estágio de desenvolvimento por ainda apresentar gargalos de produção que interferem na eficiência do processo industrial (CRUZ, SANTIAGO, PEREIRA., 2018). Os principais entraves são relacionados ao elevado custo de cultivo, recuperação da biomassa e seu processamento (GREENWELL et al., 2010). Por exemplo, para produzir 1 kg de biodiesel a partir de microalgas, são necessários 3.726 L de água, 0,33 kg de nitrogênio e 0,71 kg de fosfato (YANG et al., 2011). Dessa forma, uma das estratégias mais viáveis para a produção sustentável de biocombustíveis de microalgas, é a integração do seu cultivo com o tratamento de efluentes domésticos e industriais (DENG et al., 2018).

Tratamento de efluentes

As microalgas têm sido amplamente utilizadas em biotecnologia ambiental, especialmente para o tratamento de águas residuais de processos industriais, na descontaminação biológica e remoção de metais pesados bem como bioindicadores na detecção de nutrientes e substâncias tóxicas, como detergentes, herbicidas, etc (BHATIA et al., 2020; CHINNASAMY et al., 2009; SIDDIQUI; MIRANDA; MOURADOV, 2018). A integração de processos de biorremediação, através da utilização de efluentes domésticos e industriais, tem sido considerada como uma das abordagens mais importantes para a viabilidade econômica e sustentável da produção de biocombustíveis à partir de microalgas (HWANG et al., 2016). Desse modo, o uso de águas residuais como meio de cultivo, é uma maneira eficiente de contribuir com nutrientes para as culturas na produção de biomassa microalgácea para atender às crescentes demandas de energia, com os benefícios adicionais do tratamento dos efluentes (DENG et al., 2018; JACOB-LOPES et al., 2019).

Outra vantagem significativa do cultivo de microalgas, é seu potencial de mitigação de gases do efeito estufa (MOLAZADEH et al., 2019). Esses microorganismos são capazes de assimilar CO₂ como fonte de carbono para seu crescimento,

cerca de 1.6 a 2.0 kg de CO₂ podem ser capturados por cada quilograma de biomassa seca produzida (ALMOMANI et al., 2019; MOAZAMI et al., 2012). Embora seja promissora a capacidade de fixação de CO₂ atmosférico, este não é suficiente para suprir o requerimento de carbono necessário para altas taxas de crescimento da biomassa de microalgas. Assim, é essencial um aporte de carbono adicional à cultura, como inserção de CO₂ (ou ar comprimido) ou bicarbonatos, para a obtenção de maior produtividade (MUYLAERT et al., 2015). Dessa forma, a perspectiva de reutilizar benéficamente os fluxos de emissões ricos em CO₂ no cultivo de algas (para determinadas aplicações), como os gases de combustão provenientes da produção de combustíveis fósseis, também é bastante promissora (MOHLER ET AL., 2019). No entanto, ainda que as microalgas apresentem inúmeras vantagens em diversos setores industriais, outros obstáculos ainda precisam ser contornados, como a recuperação da biomassa do meio de cultivo. Por exemplo, o gasto energético envolvido, por vezes torna inviável sua produção em grande escala, sendo esta etapa responsável por cerca de 20 a 30% do custo total da produção de microalgas (GRIMA et al., 2003; SINGH; PATIDAR, 2018).

Separação da biomassa de microalgas do meio de cultivo

A separação da biomassa do meio de cultivo é um tema de alta relevância em Pesquisa e Desenvolvimento (P&D) em biotecnologia de microalgas, visto que esta etapa representa um dos gargalos para sua produção em escala comercial, devido ao pequeno tamanho das células (tipicamente entre 2 – 50 µm) e baixa concentração no meio de cultura (0.5 – 2 g.L⁻¹ em tanques abertos e cerca de 5 – 10 g.L⁻¹ em fotobiorreatores) (GRIMA et al., 2003). Devido à grande variabilidade das características das células microalgais, é difícil definir uma técnica de colheita de biomassa padrão para ser adotada em escala industrial para todas as espécies (BARROS et al., 2015). Desse modo, a escolha da técnica depende das características da espécie a ser colhida, tais como: tamanho e forma celular, motilidade, mas também depende da densidade, fase de crescimento, além do valor do produto desejado; levando-se em conta a energia requerida e o tempo de processamento que cada técnica apresenta (BRENNAN; OWENDE, 2010; GERDE et al., 2014; YIN et al., 2020). Os métodos convencionais mais utilizados para a colheita de microalgas incluem processos como a centrifugação, filtração, flotação, sedimentação e coagulação/floculação (SINGH; PATIDAR, 2018) e/ou uma abordagem integrada dessas técnicas.

A centrifugação é um método mecânico que utiliza a força centrífuga para a separação e apresenta alta eficiência para recuperar a biomassa de microalgas. Suas principais vantagens consistem no fato de ser um método rápido, de fácil utilização e aplicável a vários tipos de algas (MILLEDGE; HEAVEN, 2012). Porém, devido ao elevado consumo de energia, essa técnica necessita de alto investimento inicial e, além disso, a alta velocidade de centrifugação pode levar à ruptura das células (KNUCKEY et al., 2006). Já os processos de filtração e separação por membranas apresentam como uma de suas principais limitações, a deposição de microalgas na superfície da membrana ou nos seus poros, causando o declínio do fluxo do permeado do filtro (*fouling*) e diminuindo sua eficiência (BARROS et al., 2015). Além disso, trata-se de um método mais adequado para a colheita de microalgas filamentosas e relativamente grandes, como espécies dos gêneros *Coelastrum* e *Arthrospira*; não sendo eficiente para a colheita de espécies de algas que apresentam dimensões menores ($< 30 \mu\text{m}$), como *Scenedesmus*, *Dunaliella* e *Chlorella* (Mohn, 1980 *apud* YAAKOB et al., 2011).

O processo de flotação é baseado na geração de microbolhas de ar para aderir às partículas em suspensão, promovendo a elevação dos flocos de microalgas até a superfície do sistema (devido às suas baixas densidades), onde são acumulados e, então, removidos (LAAMANEN; ROSS; SCOTT, 2016). A flotação é classificada em quatro tipos: flotação por ar dissolvido (FAD); flotação por ar disperso (FADi); flotação eletrolítica; flotação dispersa por ozonização (FDO). Esses mecanismos de flotação, auxiliados por coagulação-floculação, apresentam grande eficiência na remoção de microalgas, porém, são considerados como uma técnica de custo elevado em escala comercial, pelo intenso consumo energético (MILLEDGE; HEAVEN, 2012). Outro método que tem a eficiência aumentada quando auxiliada pelo coagulação-floculação é o mecanismo de sedimentação. As microalgas, por apresentarem células de baixa densidade, geralmente não conseguem atingir boa eficiência de separação apenas por deposição gravimétrica. Dessa forma, a coagulação-floculação é um dos métodos mais utilizados para otimizar o tempo de sedimentação das células, uma vez que aumenta a densidade dos flocos, influenciando diretamente na velocidade de deposição da biomassa microalgácea (CHATSUNGNOEN; CHISTI, 2016).

O processo de coagulação-floculação é um dos métodos mais convenientes e de baixo custo para a recuperação de microalgas (OKORO et al., 2019). É uma técnica de duplo estágio, em que as células em suspensão são agregadas para formar flocos, a fim de facilitar a sedimentação ou a flotação dos flocos formados, diminuindo o volume de

cultura a ser processado. De modo geral, pode-se dividir os mecanismos de coagulação em: adsorção e neutralização de cargas, compressão da camada difusa, varredura e formação de pontes (VANDAMME; FOUBERT; MUYLAERT, 2013). Sendo assim, coagulação e floculação, ocorrem em estágios sucessivos de modo a ultrapassar as forças de estabilização das células suspensas, permitindo a colisão entre elas e promovendo o crescimento dos flocos (GUTIÉRREZ et al., 2015). Algumas espécies de microalgas floculam naturalmente em resposta a estímulos ambientais, como alterações do pH no meio de cultura, devido à depleção de CO_2 pelo consumo fotossintético (BILANOVIC; SHELEF; SUKENIK, 1988; SALES; ABREU, 2015), pela excreção de macromoléculas orgânicas ou pela associação entre microalga e bactéria (UDUMAN et al., 2010; VANDAMME et al., 2012), entre outros. Como a floculação pode ocorrer espontaneamente em algumas culturas de microalgas, quando o pH aumenta acima de 10 (SPILLING; SEPPÄLÄ; TAMMINEN, 2011), esse processo pode ser induzido pela adição de uma base forte, como o hidróxido de sódio (NaOH) ou hidróxido de cálcio (Ca(OH)_2), por exemplo; este aumento de pH promove a formação de precipitados de magnésio (Mg^{2+}) e/ou cálcio (Ca^{2+}) que, por terem carga positiva, podem interagir com a superfície carregada negativamente das células de microalgas e assim induzir a floculação por neutralização de cargas e/ou por varredura (KNUCKEY et al., 2006; ROSELET et al., 2017; UMMALYMA et al., 2017). Em sistemas de escala industrial, no entanto, essa floculação é geralmente imprevisível e sua eficiência tende a ser baixa, mesmo quando as condições parecem favoráveis (BEUCKELS et al., 2013; VANDAMME et al., 2016).

A adição de produtos químicos para induzir a floculação é uma prática comum como estágio de pré-tratamento em diversos processos de coagulação. Existem dois tipos de floculantes: inorgânicos e orgânicos (GERARDO et al., 2015). Floculantes inorgânicos, como o sulfato de alumínio ($\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$), o sulfato férrico ($\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$) e o cloreto férrico (FeCl_3) são eficientes e tradicionalmente utilizados em operações de floculação, principalmente no tratamento de efluentes industriais (VAZ et al., 2010; PIDOU et al., 2008). O sulfato de alumínio, em particular, vem sendo utilizado há mais de 100 anos em todo o mundo em diferentes conceitos de sistema de tratamento de água. Todavia, seu uso extensivo tem sido discutido devido à presença de alumínio remanescente na água tratada, muitas vezes em concentrações elevadas (CORAL; BERGAMASCO; BASSETTI, 2009). Danos causados ao organismo humano, em especial ao sistema nervoso, têm se tornado alvo crescente de pesquisas médicas e

exigido o controle rígido da presença de metais tanto na água tratada como na água dos mananciais (BHATTACHARJEE et al., 2014; FLATEN, 2001). Embora esses floclulantes sejam aplicados também para a colheita de microalgas (RAKESH; SAXENA; DHAR, 2014), seu uso resulta em altas concentrações de metais na biomassa colhida, e estes permanecem após a extração de lipídios e de carotenoides, produzindo uma biomassa comercialmente inviável para determinadas aplicações, como por exemplo, consumo humano (BARROS et al., 2015; RWEHUMBIZA; HARRISON; THOMSEN, 2012), além de ser um impedimento para a reutilização do meio de cultivo (KIRNEV et al., 2018).

Os floclulantes orgânicos podem ainda ser separados em polímeros sintéticos e naturais, sendo os catiônicos os mais eficazes para a colheita de microalgas (BILANOVIC; SHELEF; SUKENIK, 1988). A maioria dos polímeros sintéticos empregados comercialmente são à base de poliacrilamida (VANDAMME; FOUBERT; MUYLAERT, 2013), embora seja não tóxica na forma de polímero, pode conter traços de monômeros não polimerizados tóxicos e assim, contaminar a biomassa de microalgas, além do baixo grau de biodegradabilidade (BRATBY, 2006). Com a crescente preocupação com questões ambientais, vêm sendo ampliados e intensificados os estudos de desenvolvimento de floclulantes orgânicos biodegradáveis derivados de matéria-prima renovável (LIMA; ABREU, 2018). A utilização de polímeros naturais pode reduzir os custos do processo de recuperação, uma vez que esses polímeros podem ser obtidos e processados localmente com menor impacto ambiental (OLADOJA et al., 2017). Floclulantes orgânicos extraídos de plantas como a *Moringa oleifera* (TEIXEIRA; TEIXEIRA, 2017), *Margaritarea discoidea* (OLADOJA et al., 2017) e *Azadirachta indica* (ALI; MUSTAFA; SALEEM, 2019); quitosana (ZHU; LI; HILTUNEN, 2018); amidos catiônicos (HUANG et al., 2019) e taninos vegetais modificados, como o Tanfloc® (YANG; LI; WANG, 2019), demonstraram boa eficiência e nula toxicidade como agentes floclulantes no tratamento de águas com alta turbidez e possuem grande potencial de aplicação para a colheita da biomassa de microalgas.

Floculantes orgânicos biodegradáveis

Quitosana

A quitosana é um polieletrólito catiônico derivado da desacetilação alcalina da quitina, segundo biopolímero mais abundante no mundo (RENAULT et al., 2009; YANG et al., 2016), a qual é encontrada no exoesqueleto de crustáceos, na parede celular de fungos e em outros materiais biológicos (MATHUR; NARANG, 1990). Tem sido sugerida como um floculante natural para o tratamento de águas (KANGAMA et al., 2018; GUPTA et al., 2018) e para a colheita da biomassa de microalgas (CORRÊA; DUARTE; NOSEDA, 2019), por ser não-tóxica, não-corrosiva, biodegradável e possuir capacidade atrativa de adsorção e floculação. A presença de grupos amino na cadeia polimérica, permite que ele atue como polieletrólito catiônico em $\text{pH} < 6,5$, e devido à alta densidade de carga catiônica, a quitosana pode absorver fortemente as células de microalgas carregadas negativamente sobre sua superfície. Esse mecanismo pode ser via formação de ponte de polímeros e/ou neutralização de carga (ZHU; LI; HILTUNEN, 2018).

Embora a floculação usando quitosana tenha se mostrado eficiente para microalgas de água doce, resultados divergentes foram relatados quando aplicada para a floculação de microalgas marinhas. t'Lam et al. (2016) analisaram a floculação da microalga marinha *Neochloris oleoabundans* utilizando quitosana na concentração de 90 mg.L^{-1} e obtiveram eficiência inferior a 70% em $\text{pH} 7$. Os autores observaram, usando medições de potencial zeta, que as cargas catiônicas eram reduzidas pela alta força iônica do meio de cultivo, como foi sugerido por Bilanovic; Shelef; Sukenik (1988). Por outro lado, Blockx et al. (2018) relataram floculação eficiente da microalga marinha *Nannochloropsis oculata* usando quitosana na concentração 75 mg.L^{-1} , mas apenas em pH alto ($> 7,5 - 10$). A eficiência foi atribuída à precipitação da quitosana devido à desprotonação (parcial) dos grupos amina, induzindo à floculação por um mecanismo de varredura. Observações visuais e medidas de viscosidade de fato confirmaram a ocorrência de precipitação de quitosana em $\text{pH} > 7,5$. No entanto, apesar de resultados positivos na literatura da aplicação de quitosana para a floculação de microalgas, sua eficiência é altamente dependente do pH , além de apresentar alto custo (CHEN et al., 2013; WAN et al., 2015; XU; PURTON; BAGANZ, 2013).

Amidos

Apesar da grande variedade e larga distribuição do amido na natureza, o número das maiores fontes comerciais para sua produção industrial é comparativamente pequeno, sendo as principais fontes: o milho, batata, mandioca e o trigo (AZEVEDO et al., 2018). Os amidos podem ser utilizados como floculantes biodegradáveis; no entanto, devido às suas características, eles devem ser modificados através de reações químicas de cationização. Assim, os amidos catiônicos são produzidos por uma reação química entre o amido e reagentes contendo grupos amino, imino, amônio, sulfato e fosfato, sendo o grupo amino mais utilizado (ALCÁZAR-ALAY; ANGELA; MEIRELES, 2015). Vandamme; Foubert (2010) avaliaram o potencial do amido catiônico Greenfloc 120, aprovado para o tratamento de água potável, para a colheita de microalgas e obtiveram eficiência para a recuperação da biomassa de microalgas dulcícolas (*Parachlorella* e *Scenedesmus*). Outros autores relataram que o uso de amidos catiônicos são efetivos na floculação de microalgas e podem ser usados como uma alternativa interessante, uma vez que operam em uma faixa de pH mais ampla que a quitosana, por exemplo (GERDE et al., 2014). Além disto, apresentam vantagens pela baixa toxicidade quando comparados aos polímeros orgânicos sintéticos, como a poliacrilamida (LAMA et al., 2016; MUYLAERT et al., 2015). No entanto, embora esses polímeros tenham demonstrado eficiência e foram apontados como tendo efeitos colaterais relativamente menores, ainda assim podem ser muito custosos para determinadas aplicações da biomassa de microalgas (BEHERA; BALASUBRAMANIAN, 2019; VANDAMME; FOUBERT; MUYLAERT, 2013).

Taninos

Taninos são compostos polifenólicos encontrados em algumas espécies vegetais. Por serem obtidos de diferentes fontes, sua estrutura química não é a mesma para todas as espécies vegetais das quais são extraídos (HAMEED et al., 2016). Os taninos vegetais não apresentam naturalmente características catiônicas que os habilitem para a aplicação como coagulante. Dessa forma, buscando conferir esta característica à sua estrutura, ele é submetido a um processo de cationização, que geralmente envolve a reação de *Mannich*. Neste processo, um nitrogênio quaternário é adicionado à estrutura polifenólica do tanino pela sua reação com um aldeído e uma amina, produzindo um composto de peso molecular maior que o inicial (MANGRICH et al., 2014). Esta reação química confere caráter catiônico à matriz do tanino orgânico, de modo que as

principais características (como solubilidade, estabilidade em diferentes níveis de pH ou atividade quelante de metais pesados) são mantidas enquanto outras são adicionadas. As novas habilidades estão relacionadas com a atividade de coagulação, que podem provocar a neutralização de cargas (BELTRAN-HEREDIA; SÁNCHEZ-MARTÍN; DÁVILA-ACEDO, 2011). Além disso, apresenta comportamento anfotérico, devido à presença dos nitrogênios quaternários e dos agrupamentos fenólicos (HAMEED et al., 2016).

A empresa TANAC desenvolveu um coagulante/floculante comercial à base de tanino – o Tanfloc SG (utilizado neste trabalho). O tanino cationizado comercial - Tanfloc, é obtido por meio de um processo de lixiviação da casca da acácia negra (*Acacia mearnsii*), sendo principalmente constituído de estruturas flavonoides (taninos condensados) com um peso molecular médio de 1,7 kDa (TANAC, 2020). A *A. mearnsii* é uma espécie leguminosa de porte médio, nativa da Austrália e foi introduzida no Rio Grande do Sul, em 1918, por Alexandre Bleckmann. A cultura tem relevante importância no estado e foi cultivada, inicialmente, em função do aproveitamento da madeira tanto para geração de energia como para as indústrias de chapas e de celulose; e ao longo dos anos ganhou maior destaque pela qualidade do teor de tanino na casca, utilizado na indústria coureira (CALDEIRA et al., 1998). A espécie apresenta características multifuncionais e, além do aspecto socioeconômico, é utilizada para restauração de ambientes degradados e enriquecimento do solo pela fixação de nitrogênio atmosférico (CALDEIRA et al., 2000).

O Tanfloc começou a ser exportado a partir de 2002 para empresas terceirizadas especializadas no tratamento de água potável da Inglaterra, França, Alemanha, Espanha, Itália e Portugal, e vem sendo utilizado por indústrias químicas e petroquímicas para o tratamento de lodos industriais (CASTRO, 2002). Além disso, tem mostrado eficiência na remoção das microalgas de efluentes (SELESU et al., 2016) e apresenta um custo de aquisição relativamente baixo (R\$ 10,00 kg) (HESSE, 2016). Gutiérrez et al. (2015) trabalharam com a recuperação da biomassa microalgácea através de floculação com Tanfloc na concentração de 50 mg.L⁻¹, e os autores constataram que nenhum impacto negativo em termos de pH e biodegradabilidade anaeróbia afetou o processo de produção de biocombustíveis. Ou seja, não foram observadas mudanças nas características da biomassa que pudessem afetar seu uso na produção de substâncias de interesse comercial, demonstrando que o Tanfloc seria adequado para a colheita de biomassa de microalgas de águas residuais. Hesse et al. (2017), também empregaram o

Tanfloc SG para a colheita da microalga *Acutodesmus obliquus* de águas residuais de suínos e obtiveram eficiência de floculação superior a 90% com a concentração de 125 mg.L⁻¹ em pH 8. Os autores destacaram ainda a possibilidade de reutilização do meio residual para novos ciclos de cultivo sem efeitos negativos sobre a produtividade em biomassa e de seu conteúdo lipídico. Resultados promissores que foram corroborados por De Moraes et al. (2020), os quais utilizaram Tanfloc SG para a colheita da microalga dulcícola *Chlorella vulgaris* e obtiveram eficiência de floculação de 99% com a concentração de 1,175 mg.L⁻¹ do floculante. Os autores avaliaram ainda o conteúdo lipídico e o perfil de ácidos graxos da biomassa floculada, bem como da biomassa colhida pós-cultivo em meio residual reutilizado e demonstraram a possibilidade de reciclá-las sem efeitos negativos à biomassa, o que é um passo importante para reduzir a pegada hídrica e o custo do processo de produção da biomassa de microalgas.

***Moringa oleifera* Lam.**

O gênero *Moringa*, incluído na família *Moringaceae*, é constituído por quatorze espécies, e dentre as espécies descritas para o gênero destaca-se a *Moringa oleifera* Lam. (ANWAR et al., 2007). Consiste em uma árvore de crescimento rápido e altamente adaptável, originária do noroeste indiano, é amplamente distribuída nas regiões tropicais e subtropicais do planeta. Conhecida como “a árvore milagrosa”, mostra múltiplas aplicações envolvendo produtos farmacêuticos (ANEY et al., 2009), cosméticos (KLEIMAN; ASHLEY; BROWN, 2008), alimentares (OYEYINKA; OYEYINKA, 2016) e na área ambiental (SANTANA et al., 2020). Foi demonstrado que raiz, caule, folhas, flores, frutos e sementes são ricas fontes de proteínas, minerais (cálcio, sódio, potássio e magnésio) e ácidos graxos. Vale salientar a presença das vitaminas A, B, C e E, assim como ácido linolênico e ácido fólico nas folhas (SHIH et al., 2011; SINGH; ARULANANTHAM; PARISIPOGULA, 2018). As sementes também produzem um excelente óleo, comparado ao azeite de oliva, que pode ser usado na alimentação, na fabricação de cosméticos e fármacos (WARRA, 2015) e para a produção de biodiesel (ESMAEILI; YEGANEH; ESMAEILZADEH, 2019; NIJU et al., 2019). Todas estas aplicações fizeram com que ao longo dos milhares de anos a espécie fosse levada para vários países (FAHEY, 2005).

A espécie foi introduzida no Brasil como planta ornamental por volta de 1950, e se adaptou especialmente à região Nordeste, em virtude de suas características, como

pouca exigência hídrica e nutricional (CASTRO, 2017; SILVA; SOUTO; SANTOS, 2019). Desde então tem sido amplamente cultivada no país. As sementes de *M. oleifera* contêm proteínas que agem como polieletrólitos catiônicos quando solubilizadas em água (GHEBREMICHAEL et al., 2005; NDABIGENGESERE; NARASIAH; TALBOT, 1995) e possuem substância antimicrobiana, que no processo de purificação da água pode reduzir a carga bacteriana em até 97% em pouco tempo (NISHA et al., 2017). De acordo com Gallão; Damasceno; Brito (2006) e Garza et al. (2017), a proteína é o composto encontrado em maior quantidade nas sementes desta planta, em torno de 40% (Tabela II), e seu mecanismo de coagulação é representado pela adsorção e neutralização de cargas superficiais (SANTANA et al., 2010).

Tabela II: Composição química da semente de *Moringa oleifera*. Adaptada de Gallão et al. (2006).

Composição	Semente
Umidade (%)	6,3
Açúcares solúveis (g/100g)	3,14
Oligossacarídeos (g/100g)	3,31
Amido (g/100g)	6,02
Proteínas (g/100g)	39,3
Lipídios (g/100g)	18,8

Na literatura, vários estudos foram realizados sobre o desempenho de sementes de *M. oleifera* como um agente coagulante alternativo ou coagulante auxiliar no tratamento de água e sua eficiência foi comparada à obtida pelo sulfato de alumínio, com as vantagens de reduzir o volume de lodo e não alterar as propriedades da água tratada (DEGHANI; ALIZADEH, 2016). Dessa forma, se apresenta como um substituto eficiente aos coagulantes convencionais; além disto, é sustentável, de baixo custo e de nula toxicidade (PRITCHARD et al., 2010; SHAABAN et al., 2019). O uso dessas sementes como agente coagulante é uma opção pragmática para fornecer acesso à água potável segura para comunidades rurais de países em desenvolvimento em todo o mundo, auxiliando no cumprimento dos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS: “gerenciamento sustentável da água”) (OKUDA; ALI, 2019).

Além da viabilidade como coagulante de águas com alta turbidez, foram atribuídas às sementes de *M. oleifera* alta eficiência e baixo custo como agente coagulante na colheita de microalgas (TEIXEIRA; KIRSTEN; TEIXEIRA, 2012). ALI;

MUSTAFA; SALEEM (2019) analisaram diferentes coagulantes naturais como: torta da semente de *Jatropha curcas* e sementes de *M. oleifera*, *Conocarpus erectus* e *Azadirachta indica* em comparação com sulfato de alumínio ($\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$), para obter custo-efetividade de cada coagulante na colheita de microalgas de águas residuais domésticas. O menor custo foi obtido com sementes de *M. oleifera* (US\$/L 0.0052) seguida por *A. indica* (US\$/L 0.0068) e maiores custos com o sulfato de alumínio (US\$/L 0.0091), semente de *C. erectus* (US\$/L 0.0095) e torta de semente de *J. curcas* (US\$/L 0.0103). Essa relação foi baseada no preço de mercado por quilograma de coagulante. Portanto, verificou-se que as sementes de *M. oleifera* e *A. indica* apresentaram melhores resultados em comparação com os outros coagulantes em termos de viabilidade econômica do processo. Teixeira; Kirsten; Teixeira (2012) foram os primeiros autores a publicar artigo científico evidenciando a aplicabilidade das sementes de *M. oleifera* para a colheita da biomassa de microalgas (*Chlorella vulgaris*), alcançando eficiência de 89%, utilizada na concentração de 1 g.L^{-1} em pH 9.2. Estes estudos foram continuados por Teixeira; Teixeira (2017), que obtiveram resultados de eficiência de floculação de *C. vulgaris* de 79% a 96% usando sementes de *M. oleifera* também em outras formas, como extrato salino e torta, como estratégia para redução de custos, uma vez que a torta da semente é um resíduo da extração do óleo (a ser utilizado para a produção de biodiesel) e o uso de extratos pode representar uma economia de massa de floculante. Neste último trabalho, os autores concluíram que a maior eficiência foi alcançada com extratos preparados em solução de NaCl 0.6 M. Resultados corroborados por Okuda et al. (1999), que utilizaram sementes de *M. oleifera* extraídas em solução de NaCl 1 M em águas com alta turbidez e verificaram que a capacidade de floculação aumentou 7,4 vezes em relação ao floculante extraído apenas com água destilada. Isso pode ser explicado pelo incremento da força iônica, aumentando a solubilidade dos compostos ativos.

Diversos autores comprovaram a eficiência de sementes de *M. oleifera* como agente floculante para a recuperação de biomassa microalgácea (HAMID et al., 2016; BARRADO-MORENO; BELTRAN-HEREDIA; MARTÍN-GALLARDO, 2016a; ENDUT et al., 2016; HAUWA et al., 2018; SHAABAN et al., 2019). No entanto, poucos autores avaliaram a influência desse biofloculante e/ou de seus derivados nas extrações de compostos de interesse comercial a partir da biomassa floculada. De Moraes et al (2020), Moreti et al. (2015) e Yang et al. (2016) avaliaram a eficiência de floculação do pó de sementes de *M. oleifera* em *C. vulgaris*; *Anabaena flos-aquae* e *C.*

vulgaris; e *Scenedesmus obliquus* e *C. vulgaris*, respectivamente, e verificaram a composição de ácidos graxos acumulados na biomassa colhida. Os autores observaram que, embora o óleo de microalgas seja bem conhecido por seu alto teor de ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) (SCHENK et al., 2008), a biomassa colhida com o pó de sementes de *M. oleifera* apresentou maiores proporções de ácido oleico (C18: 1) e uma diminuição significativa do conteúdo de PUFAs. Esses resultados são esperados, uma vez que após o processo de floculação, a biomassa obtida é composta pelas células de microalgas misturadas ao floculante. De fato, a composição de ácidos graxos é claramente influenciada pela composição de ácidos graxos das sementes de *M. oleifera*, caracterizada por alta porcentagem de ácido oleico (C18: 1, 74 - 79%) e menor conteúdo de ácidos palmítico (C16: 0, 6 - 7%), beênico (C22: 0, 4-7%), linoléico (C18: 2, 0,7 - 2%) e linolênico (C18: 3, n - 0,2%) (ANWAR et al., 2007). De Moraes et al (2020) avaliaram também a recuperação de *C. vulgaris* utilizando sementes de *M. oleifera* nas formas de extrato salino e torta, obtendo eficiência superior a 95% e resultados da biomassa colhida com a torta semelhantes aos obtidos com o pó das sementes de *M. oleifera* - rica em lipídios, principalmente ácido oleico. Este é um fator de grande relevância, pois implica na não-necessidade de remoção dos floculantes da biomassa colhida.

Reutilização do meio de cultivo

O aumento de resíduos líquidos em processos industriais está diretamente relacionado ao crescente desenvolvimento econômico e industrial (GIORDANO, 2004). Dessa forma, tem-se buscado alternativas para contornar essa problemática de modo a evitar o seu desperdício e/ou descarte tóxico nos corpos hídricos. Na produção de microalgas, além dos desafios da colheita da biomassa, outra problemática está relacionada ao elevado consumo de água e custo de nutrientes, que são essenciais para o cultivo. A grande demanda de água para o processo faz com que se busquem alternativas sustentáveis para reduzir o custo, como o reaproveitamento do meio de cultura nos cultivos subsequentes e, dessa forma, reciclar os nutrientes não absorvidos nos cultivos anteriores. O reciclo do meio de cultivo após a colheita da biomassa pode representar uma economia de até 84% de água e 55% de nutrientes essenciais (FAROOQ et al., 2015). Portanto, não somente beneficia o meio ambiente, reduzindo a poluição e o desperdício, mas também funciona como uma potencial fonte de nutrientes para a produção de biomassa a um custo reduzido.

Nesse sentido, Farooq et al. (2015) avaliaram a recuperação da biomassa de *C. vulgaris* por centrifugação e por floculação usando FeCl_3 e $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$. Os autores obtiveram boa eficiência de recuperação das células e avaliaram o reuso do meio residual para novos ciclos de cultivo. O reuso do meio proveniente da floculação com $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ inibiu o crescimento das células devido à toxicidade do alumínio residual. Já os meios obtidos dos processos de centrifugação e da floculação com FeCl_3 alcançaram crescimento das células de microalgas até o quarto ciclo. No entanto, mesmo com o bom resultado de crescimento em meio residual proveniente da floculação com FeCl_3 , foi necessária a adição de uma etapa de remoção de ferro da biomassa recuperada. Assim, estudos de biofloculantes são muito pertinentes para que se desenvolvam métodos que minimizem a contaminação da biomassa e do meio de cultura, buscando a viabilidade econômica e sustentável da produção de microalgas em escala industrial. De Moraes et al. (2020) obtiveram resultados promissores com o reuso do meio residual obtido da floculação de *C. vulgaris* utilizando biofloculantes (Sementes de *M. oleifera* e Tanfloc SG), e observaram que a biomassa obtida dos meios reciclados apresentaram um teor em lipídios totais próximos ao obtido da biomassa em meio estéril. Resultados muito interessantes, uma vez que no processo de recuperação da biomassa de microalgas com a aplicação desses floculantes naturais, além de não haver contaminação do meio de cultivo, não houve a necessidade de remoção do floculante da biomassa recuperada.

Microalgas

Haematococcus pluviialis

O gênero *Haematococcus* está inserido na família Haematococcaceae, ordem Chlamydomonadales, classe Chlorophyceae (ALGAEBASE, 2020), é considerado cosmopolita e ocorre principalmente em corpos d'água temporários de água doce, como piscinas de chuva efêmeras, piscinas artificiais e lagoas naturais (BURCHARDT et al., 2006; CHEKANOV et al., 2014). Esta espécie pode sintetizar grande quantidade de astaxantina, associadas a respostas às condições de estresse no ambiente, acumulando até 5% do seu peso seco (LORENZ; CYSEWSKI, 2000). Assim, ocorrem alterações ultraestruturais durante o seu ciclo de vida, que consistem em quatro tipos de morfologias celulares distinguíveis: macrozoóides (zoósporos), microzoóides, palmella e hematocistos (aplanósporos) (HAZEN, 1899 *apud* SHAH et al., 2016). Os três

primeiros estágios, geralmente, chamados de "fase vegetativa verde", onde as células possuem mais clorofila (*a* e *b*) e menos carotenoides e quando expostas a condições de estresse, acumulam carotenoides no citoplasma, e o conteúdo de clorofila total diminui drasticamente (KAMATH et al., 2005) formando os hematocistos, referidos como "fase encistada acumulada de astaxantina" não móvel (BOUSSIBA, 2000; SUN et al., 2017). Por isso, se torna necessário usar sistemas em duas fases de cultivo para produzir este composto. A primeira fase serve para assegurar o máximo crescimento da microalga e uma segunda fase para permitir a produção e acúmulo da astaxantina (carotegênese) (WANG et al., 2014). A indução da carotenogênese ocorre quando as células são expostas a condições de estresse derivadas da alta intensidade luminosa, privação de nutrientes (nitrogênio e fósforo), alta salinidade e/ou a combinação destes (KHOO et al., 2019). A intensidade da luz e a subsequente privação de nutrientes são os fatores mais importantes a influenciar o ciclo celular e indução de carotenogênese em *H. pluvialis* (MA et al., 2018).

O grande interesse econômico no cultivo de *H. pluvialis* se baseia, principalmente, na obtenção de astaxantina - considerada o antioxidante natural mais potente conhecido pelo Homem (SHAH et al., 2016). A espécie possui diversas aplicações, principalmente em aquicultura, sendo utilizada no preparo de dietas de organismos aquáticos com a função de aumentar a pigmentação em espécies de camarões e de peixes como trutas, salmões e espécies ornamentais (CHIEN; SHIAU, 2005). Esse carotenoide e outros compostos presentes nessas microalgas como: ácidos graxos, proteínas, carboidratos e minerais, têm grande importância para as indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética, devido às suas numerosas atividades biológicas (anti-inflamatória, melhoria da resposta imune, prevenção de doenças cardiovasculares, potencial anticancerígeno, entre outras) (HAMED, 2016). No metabolismo humano, por exemplo, a astaxantina é importante também para a proteção da pele contra a foto-oxidação induzida por raios ultravioleta, e pode ser utilizada em cosméticos naturais como filtro solar (KOLLER; MUHR; BRAUNEGG, 2014).

Nannochloropsis oculata

Hibberd (1981) descreveu o gênero *Nannochloropsis*, família Monodopsidaceae, ordem Eustigmatales, classe Eustigmatophyceae (ALGAEBASE, 2020), o qual pode ser encontrado em habitats marinhos e de água doce (ANDERSEN et al., 1998). A espécie é unicelular, com forma esférica e tem cerca de 2 – 8 µm de diâmetro (HU; GAO,

2003). Possui parede celular rígida composta de polissacarídeos; a estrutura química do seu produto de reserva não é conhecida, mas sabe-se que não se trata do amido (LOURENÇO, 2006). Caracteriza-se por possuir um cloroplasto com clorofila *a* (especificamente carece de clorofila *b* e *c*), presença de β -caroteno e uma grande variedade de xantofilas, como: violaxantina, vaucheraxantina, cantaxantina, astaxantina, neoxantina, zeaxantina, antheraxantina e luteína (SCHOCH ET AL., 2019; HAMIDI; YANUHAR; WARDANA, 2014). *Nannochloropsis* possui alto teor de ácidos graxos polinsaturados (PUFAs) e é considerada como a cepa mais proeminente na produção comercial de ácido eicosapentaenóico (EPA C20:5n3) (ZITTELLI et al., 1999). O elevado teor de PUFAs, proteínas e vitamina B12, associados à sua alta tolerância às mudanças ambientais e velocidade de crescimento acentuado, faz com que esta espécie seja amplamente utilizada em aquicultura como alimento para diversos organismos aquáticos nas fases iniciais de cultivo (SARKER et al., 2018). Também são aplicadas na produção de fármacos e como suplementos nutricionais (BHUVANA et al., 2019; BOROWITZKA, 2013). Ainda têm sido consideradas como uma potencial fonte de lipídios para a produção de biocombustíveis (MOAZAMI et al., 2012).

OBJETIVOS

Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi avaliar uso de flocculantes orgânicos biodegradáveis para a recuperação da biomassa de *Haematococcus pluvialis* e *Nannochloropsis oculata*: modelo de microalga de água doce e marinha, suas implicações na extração de produtos de interesse comercial da biomassa produzida e estimar o reuso do meio de cultura.

Objetivos específicos

- Avaliar o processo de separação da biomassa microalgácea utilizando-se preparados a partir de *Moringa oleifera* (pó da semente, extrato salino do pó da semente e torta da semente) e o produto comercial Tanfloc SG, em duas diferentes espécies de microalgas – *Nannochloropsis oculata* e *Haematococcus pluvialis*;
- Analisar a influência dos flocculantes na composição da biomassa microalgácea, quanto aos lipídios totais e carotenoides totais;
- Avaliar a possibilidade de reutilização do meio de cultura após a recuperação da biomassa para um novo ciclo de cultivo.

MATERIAIS E MÉTODOS

As principais etapas realizadas no presente trabalho estão apresentadas na Figura 1.

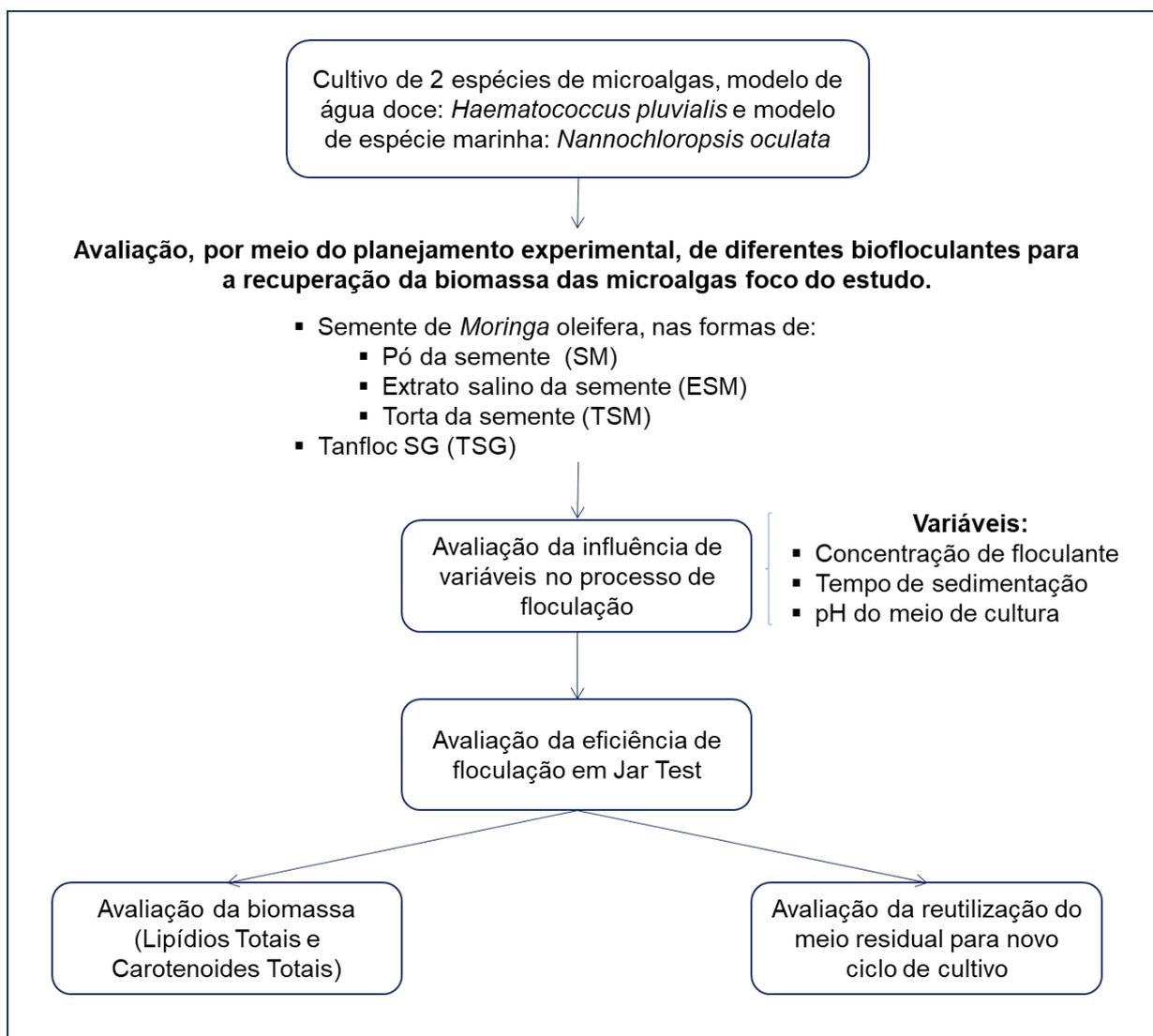


Figura 1: Fluxograma das etapas experimentais.

Manutenção das culturas de microalgas

A manutenção das culturas-estoque das espécies estudadas foi realizada em tubos de ensaio com 5 mL de meio de cultura, mantidas em câmara de germinação a 21°C, sob 20 $\mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, sendo agitados manualmente a cada 48h e as células repicadas a cada 20 dias, a fim de mantê-las saudáveis e viáveis. A cepa da microalga marinha *Nannochloropsis oculata* utilizada neste estudo foi gentilmente cedida pelas professoras Sonia Giancesella e Flavia Saldanha-Correa do Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo (IOUSP); no LABIM é mantida em meio F/2 segundo

descrito por Guillard (1975) (Apêndice A). A cepa da microalga dulcícola *Haematococcus pluvialis* utilizada neste estudo foi gentilmente doada por MSc. Alessandro Claudino dos Santos da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), sendo mantida em meio WC proposto por Guillard; Lorenzen (1972) modificado (Apêndice B).

Agentes flocculantes

Os agentes flocculantes estudados foram: *Moringa oleifera* em diferentes formas (pó da semente, extrato salino do pó da semente e torta da semente) e o produto comercial Tanfloc SG.

Semente de *M. oleifera* (SM)

As sementes de *M. oleifera* foram coletadas no estado de Sergipe e fornecidas gentilmente pelo Prof. Gabriel Francisco Silva, da Universidade Federal de Sergipe (UFS). Inicialmente, as sementes foram selecionadas conforme uniformidade, tamanho e coloração (Figura 1A), suas cascas retiradas e as sementes foram trituradas manualmente com um pistilo (Figura 1B) e peneiradas (peneiras de poro 860 μm e 420 μm) para obtenção de um pó fino e homogêneo. O material resultante foi reservado para os ensaios de floculação.



Figura 2: Sementes de *Moringa oleifera*: (A) Com casca e descascadas; (B) Preparo do pó de sua semente.

Extrato Salino da Semente de *M. oleifera* (ESM)

Para o preparo do extrato da semente de *M. oleifera*, o pó da semente (descrito no item anterior: **Semente de *M. oleifera* (SM)**) foi adicionado à solução de NaCl 0,6M numa proporção de 50 gramas para cada litro. Esta mistura foi submetida ao tratamento ultrassônico (USC 2500, Unique) por 15 minutos e centrifugada (centrífuga refrigerada Nova Técnica NT825) a 3.500 rpm (2607 g) durante 15 minutos, o sobrenadante foi reservado para os ensaios de floculação (Figura 2).



Figura 3: Extrato salino da semente de *Moringa oleifera* obtido após o tratamento ultrassônico e centrifugação.

Torta da Semente de *M. oleifera* (TSM)

A torta da semente de *M. oleifera* foi cedida gentilmente por Rafael Peron Castro, do grupo de estudos G-ÓLEO da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Esta torta corresponde ao material residual obtido após processo de extração do óleo, representando um coproduto da produção do biodiesel produzido a partir destas sementes. No presente trabalho foi utilizada a torta proveniente da extração mecânica, a qual foi peneirada (peneiras de poro 860 μm e 420 μm) para obtenção de um pó fino e homogêneo (Figura 3).



Figura 4: Torta da semente de *Moringa oleifera* obtida por extração mecânica, cedida pelo grupo G-ÓLEO – UFLA.

Tanfloc SG (TSG)

O produto Tanfloc SG foi cedido pela empresa TANAC, na sua forma comercial líquida, apresentando coloração escura (Figura 4) e massa específica de aproximadamente $1,20 \text{ kg.L}^{-1}$.



Figura 5: Tanfloc SG em sua forma comercial líquida, cedido pela empresa TANAC.

Avaliação da influência de variáveis no processo de floculação

Um planejamento fatorial 2^k (2^3) com 3 repetições no ponto central foi utilizado para rastrear os principais fatores envolvidos na eficiência de floculação dos 4 agentes flocculantes para as microalgas focos do estudo. As variáveis independentes do planejamento fatorial foram: a concentração do flocculante, o tempo de sedimentação e o pH (Tabela III). A matriz de planejamento foi construída fazendo-se todas as combinações possíveis entre os níveis dos três fatores seguindo o modelo recomendado por Box, Hunter e Hunter (1987), resultando na configuração de experimentação

indicada na Tabela IV. Para validação dos resultados obtidos no planejamento, este conjunto de experimentos foi repetido três vezes. Os fatores e níveis utilizados foram definidos de acordo com estudos prévios realizados por nosso grupo de estudos (LABIM/INT).

Tabela III: Níveis codificados e não codificados das variáveis independentes, utilizados nas avaliações dos floclantes: Semente de *Moringa oleifera* (SM), Torta da semente de *Moringa oleifera* (TSM), Extrato Salino da semente de *Moringa oleifera* (ESM) e Tanfloc SG (TSG).

Níveis	X ₁ (SM e TSM)	X ₁ (ESM)	X ₁ (TSG)	X ₂	X ₃
	Concentração do floclante (g.L ⁻¹)	Concentração do floclante (g.L ⁻¹)	Concentração do floclante (mg.L ⁻¹)	Tempo de sedimentação (min)	pH
- 1	0,0	0,00	0,0	30	6,5
0	0,5	0,25	0,6	60	8,5
+1	1,0	0,50	1,2	90	10,5

Tabela IV: Matriz de níveis para análise fatorial 2³ com três pontos centrais.

Ensaio	X ₁	X ₂	X ₃
1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1
3	-1	+1	-1
4	+1	+1	-1
5	-1	-1	+1
6	+1	-1	+1
7	-1	+1	+1
8	+1	+1	+1
9 (PC)	0	0	0
10 (PC)	0	0	0
11 (PC)	0	0	0

Nesta primeira etapa, os experimentos de avaliação a influência das variáveis na eficiência de floclação foram realizados em provetas de 25 mL (Figura 5). Para a obtenção do volume de suspensão celular necessário para estas avaliações, foram realizados cultivos em erlenmeyers de 500 mL contendo 300 mL de cultura, os quais foram mantidos em mesa agitadora sob agitação constante de 150 rpm, em sala de

cultivo com temperatura mantida a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ (Figura 6). As espécies foram cultivadas em batelada simples até sua fase estacionária. *N. oculata* foi cultivada por 20 dias sob $300 \mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e a espécie *H. pluvialis* foi cultivada por 12 dias sob $80 \mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e 13 dias sob $160 \mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, sendo utilizadas para a iluminação lâmpadas LED tubulares de 40 W. Antes dos ensaios de floculação, o conteúdo dos erlenmeyers foi homogeneizado em um béquer e os valores de pH foram ajustados, com o auxílio do potenciômetro (Digimed), conforme a matriz de planejamento (Tabelas III e IV), usando-se soluções de hidróxido de sódio (NaOH) 1M ou ácido clorídrico (HCl) 1M. Após os ajustes de pH, as suspensões foram adicionadas a erlenmeyers contendo os respectivos agentes floculantes e agitadas por 15 minutos a 100 rpm em mesa agitadora de frascos e, então, foram retiradas alíquotas para medidas de densidade óptica em 730 nm ($\text{DO}_{730\text{nm}}$), utilizando o espectrofotômetro Spectrum (SP-1105). Este momento foi determinado como tempo inicial e, em seguida, as suspensões foram vertidas em provetas de 25 mL para acompanhamento da sedimentação. Após o tempo determinado pela matriz de planejamento, uma alíquota foi retirada do meio da coluna da suspensão para medidas de $\text{DO}_{730\text{nm}}$. O parâmetro avaliado foi a eficiência de floculação, medida por meio da capacidade de diminuição de turbidez (% Diminuição $\text{DO}_{730\text{nm}}$), calculada de acordo com a Equação (1):

$$\text{Equação 1: \%Dim DO} = [(\text{DO}_{\text{inicial}} - \text{DO}_{\text{final}}) / \text{DO}_{\text{inicial}}] \times 100$$

Onde, $\text{DO}_{\text{inicial}}$ corresponde ao valor de densidade óptica da alíquota retirada após a adição do floculante e agitação vigorosa; DO_{final} corresponde ao valor de densidade óptica da alíquota retirada após o tempo de sedimentação avaliado.

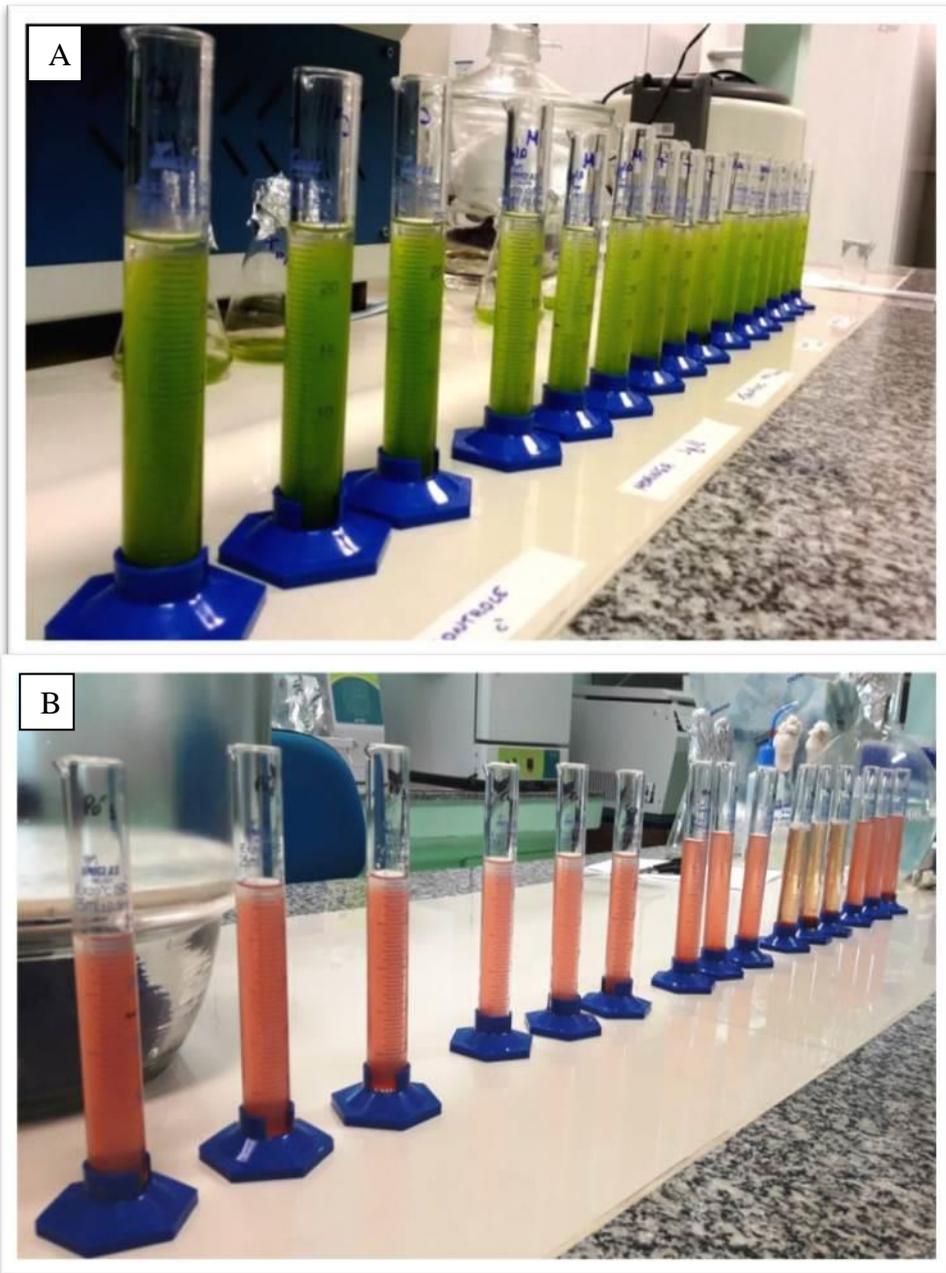


Figura 6: Ensaio de avaliação da influência dos parâmetros na eficiência de floculação: (A) Ensaio de floculação de *Nannochloropsis oculata*; (B) Ensaio de floculação de *Haematococcus pluvialis*.



Figura 7: Inóculos na fase estacionária de crescimento, em mesa agitadora.

Para o tratamento estatístico dos resultados, utilizou-se o *software Statistica 7.0* (*StatSoft*®), especificamente o módulo de Análise e Planejamento de Experimentos, baseado no planejamento padrão Box, Hunter e Hunter $2^{(k-p)}$. Foi realizada análise do gráfico de Pareto para investigar os fatores significativos e suas interações na eficiência de floculação. A qualidade do modelo da análise foi avaliada com base na análise de variância (ANOVA), levando-se em consideração o nível de confiança de 95% ($p < 0,05$), e o tipo de erro escolhido para a ANOVA foi o erro puro por terem sido consideradas três réplicas autênticas na definição do tamanho da amostra.

Avaliação da eficiência de floculação em Jar Test

Após terem sido estabelecidas as condições e flocculantes que levaram ao aumento da eficiência de floculação para cada espécie de microalga estudada, foram conduzidas avaliações em Jar Test (Nova Ética, Modelo 218-6 LDB), também em triplicata. O dispositivo usual de Jar Test consiste em seis frascos igualmente agitados, onde é possível variar a rotação dos agitadores de acordo com o gradiente de velocidade correspondente às etapas de mistura rápida e mistura lenta. Esses parâmetros foram definidos de acordo com estudos prévios realizados por nosso grupo de estudos (LABIM/INT). Para a obtenção do inóculo, os cultivos foram realizados em frascos erlenmeyers de 500 mL contendo 300 mL de cultura, mantidos sob condições

controladas, conforme descrito no item anterior (**Avaliação da influência de variáveis no processo de floculação**). O inóculo obtido foi transferido para garrafas do tipo PET de cristal de 5 L contendo 4 L de cultura, sendo mantidas sob condições controladas de temperatura à $25 \pm 2^\circ\text{C}$, aeração constante e sob densidade de fluxo fotônico, fornecida por plafon de LED branco 25 W, de $300 \mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ para *N. oculata* por 20 dias e a espécie *H. pluviialis* sob $200 \mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ por 5 dias e mais 8 dias sob $400 \mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (Figura 7). Foi realizado rodízio de posição das garrafas na estante a fim de garantir maior homogeneidade de intensidade de luz entre as culturas ao longo dos dias de cultivo.

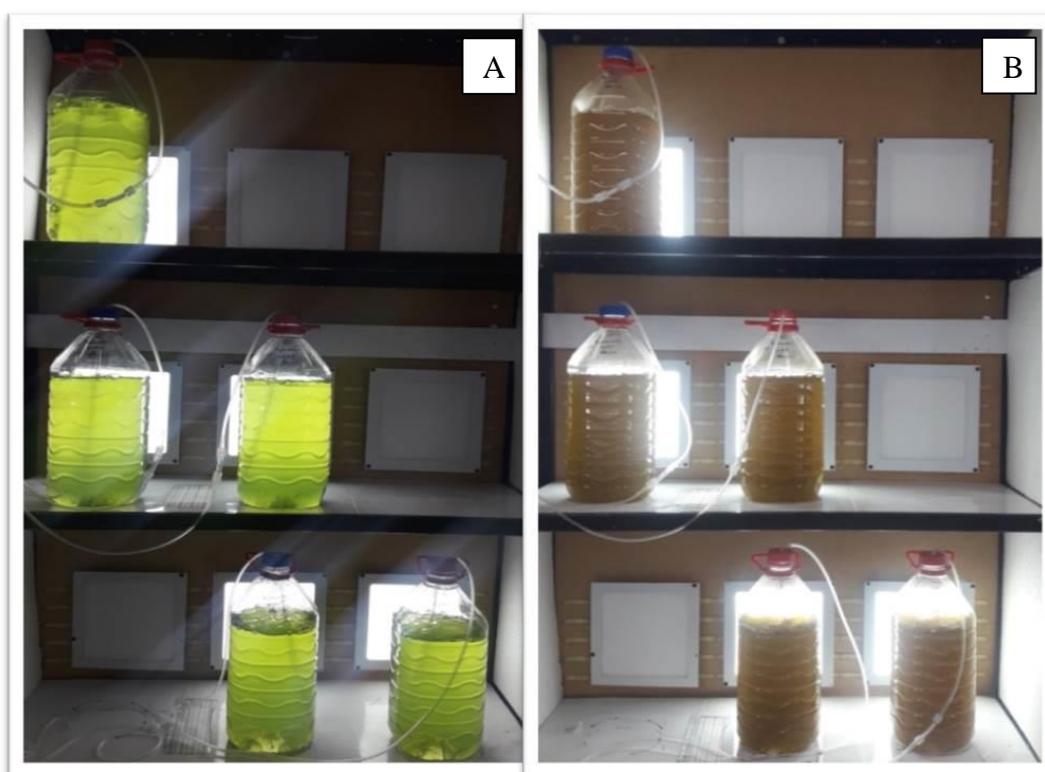


Figura 8: Suspensões celulares mantidas na estante em garrafas PET de 5L: (A) Suspensões celulares de *Haematococcus pluviialis* na fase inicial de cultivo; (B) Suspensões celulares de *Haematococcus pluviialis* na fase final de cultivo.

As suspensões celulares, provenientes dos garrafões foram reunidas num balde (Figura 8) e homogeneizadas para a retirada de alíquotas para a realização de medidas de densidade óptica ($\text{DO}_{730\text{nm}}$). O pH da suspensão foi medido e ajustado conforme resultados obtidos no item **Avaliação da influência de variáveis no processo de floculação**. Foram acrescentados em cada cuba do Jar Test 2L de suspensão celular e, então adicionados os agentes floculantes exceto numa das cubas (controle). As culturas

foram mantidas sob agitação de 200 rpm por 2 min (agitação vigorosa), permitindo dessa forma que a biomassa microalgácea fosse misturada com o coagulante (Figura 9A). Após a agitação vigorosa, foi retirada alíquota para medida de DO_{730nm} , momento este determinado como tempo inicial. Em seguida, iniciou-se uma agitação lenta (30 rpm por 30 min), para promover o aumento dos flocos, e, na sequência, repouso para avaliação da sedimentação (Figura 9B), após o qual, foi retirada alíquota na região correspondente à metade da altura do líquido, para medidas de DO_{730nm} e pH. A eficiência do processo foi calculada por meio da capacidade de diminuição de turbidez (%Diminuição DO_{730nm}), conforme Equação 1.

Para a recuperação da biomassa sedimentada do meio de cultura, foi descartado 50% do volume sobrenadante (através da abertura do orifício localizado na metade da altura da jarra) de cada cuba do Jar Test e o restante foi coletado e centrifugado a 3.500 rpm, durante 15 min, a 4°C. O sobrenadante obtido após a centrifugação foi reservado para novo ciclo de cultivo, e o *pellet* foi congelado, liofilizado (Enterprise II, Terroni) e estocado a 4°C para análises posteriores.

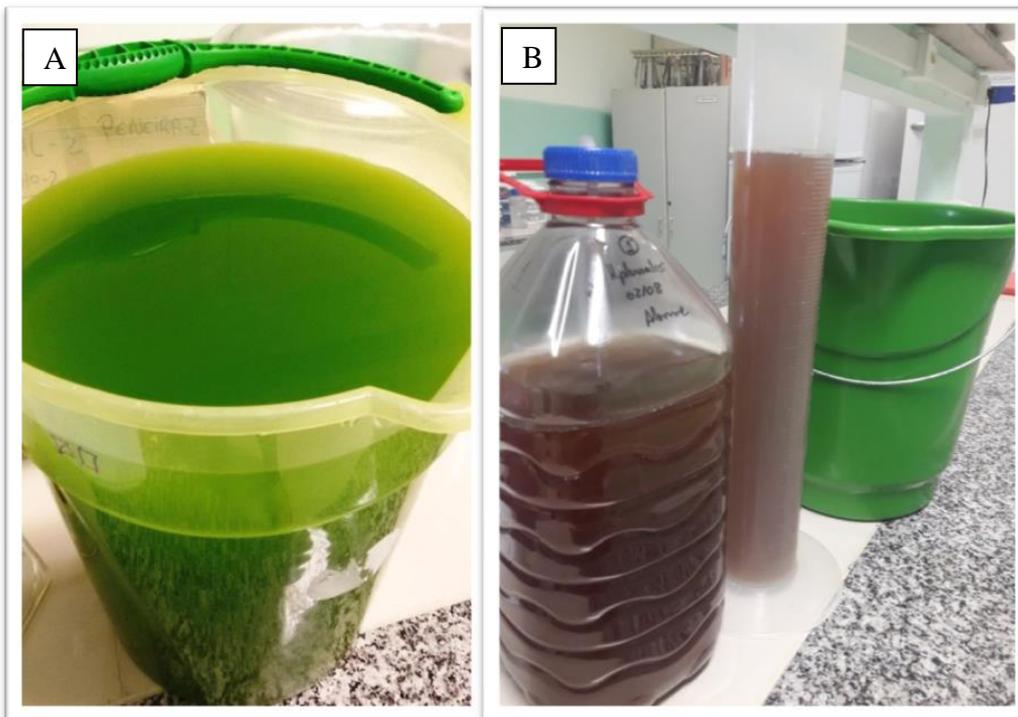


Figura 9: Suspensão celular resultante da união dos garrafões: (A) Suspensão celular de *Nannochloropsis oculata*; (B) Suspensão celular de *Haematococcus pluvialis*.

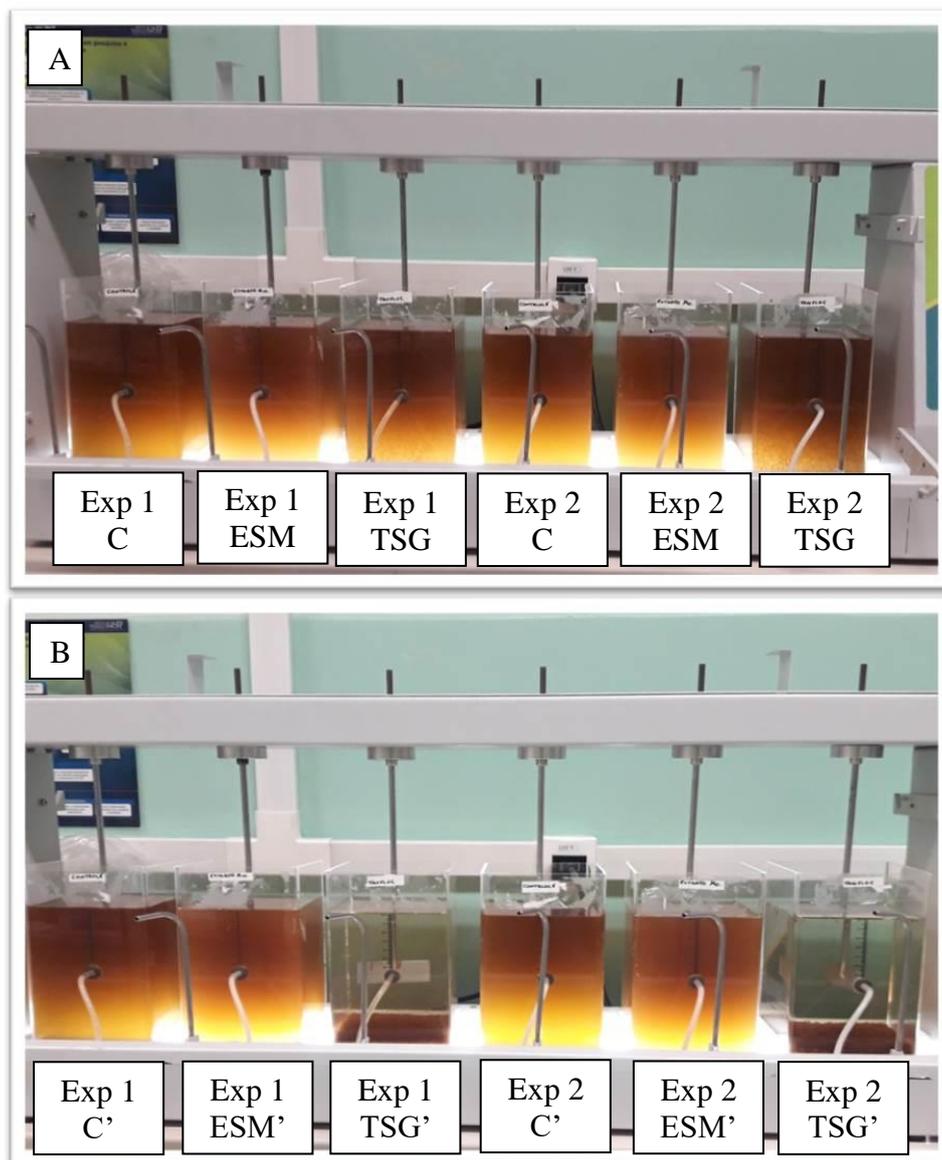


Figura 10: Suspensões celulares de *Haematococcus pluvialis* em cubas do Jar Test: (A) imediatamente após a adição dos agentes flocculantes; (B) após o tempo de sedimentação.

Avaliação da reutilização do meio residual para novo ciclo de cultivo

Os meios de cultura residuais, obtidos conforme descrito no item anterior (**Avaliação da eficiência de floculação em Jar Test**), foram utilizados para novo ciclo de cultivo sem terem passado por qualquer tipo de esterilização. Os cultivos foram realizados em duplicata, em frascos erlenmeyers de 500 mL contendo 300 mL de cultura; sendo uma duplicata com adição de nutrientes - para *H. pluvialis*: NaNO_3 e K_2HPO_4 (conforme concentrações do meio WC); para *N. oculata*: NaNO_3 e $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (conforme concentrações do meio F/2). Para efeito comparativo, foi utilizada outra duplicata sem a adição dos nutrientes. Foram empregadas as mesmas

condições de cultivo do inóculo, descritas no item **Avaliação da influência de variáveis no processo de floculação**.

Quantificação celular

Citômetro de fluxo

O acompanhamento do crescimento das suspensões celulares foi realizado com o auxílio do citômetro de fluxo (Muse® cell analyzer).

Massa seca

Para determinar a concentração em massa seca ao final dos cultivos de *Haematococcus pluvialis* foi realizada a filtração a vácuo de 30 mL de suspensão celular, utilizando-se membrana de fibra de vidro (poro 0,7 – 1,4 µm, GF/P, Sartorius®), pesada previamente em balança analítica de precisão (Shimadzu - AY220). As membranas com as células filtradas foram secas em uma balança determinadora de umidade (MB 45, OHAUS), a 105°C, e após seu resfriamento foram pesadas novamente em balança analítica de precisão, uma vez que a balança determinadora de umidade não tem a precisão necessária para esta medição. A massa seca foi obtida a partir da subtração da massa da membrana com a biomassa seca pela massa da membrana. A partir da massa seca, foi calculada a concentração em biomassa seca (C) da cultura, de acordo com a Equação (2):

$$\text{Equação 2: } C = \frac{(M_f - M_i) \times 1000}{V}$$

Onde, M_f corresponde à massa final da membrana seca (g) após a filtração, M_i é a massa inicial da membrana (g) e V é o volume de cultura utilizado na filtração (mL), sendo o resultado expresso em g.L^{-1} .

Massa seca livre de cinzas

Para a espécie de microalga marinha, *Nannochloropsis oculata*, fez-se necessária a determinação da massa seca livre de cinzas para eliminar a interferência da massa dos sais do meio de cultura. Primeiramente, fez-se a pré-combustão das membranas de fibra de vidro (poro 0,7 – 1,4 µm, GF/P, Sartorius®). Para isso, cada membrana a ser utilizada foi colocada em um cadinho de porcelana e os mesmos foram submetidos à temperatura de 540°C por 2 horas na mufla. A pré-combustão foi realizada para que

possíveis compostos orgânicos da membrana pudessem volatilizar antes das mesmas serem utilizadas no processo de filtração das amostras. Decorrido o tempo necessário, os cadinhos foram retirados da mufla e armazenados em dessecador até o seu completo resfriamento. As suspensões celulares foram filtradas utilizando-se estas membranas, e as mesmas foram secas em balança determinadora de umidade. Em seguida, foram colocadas em seus respectivos cadinhos e os mesmos foram pesados em balança analítica de precisão. Os cadinhos com as membranas secas após a filtração foram encaminhados para a mufla, onde permaneceram por 4 horas a 540 °C. Nesta etapa, a matéria orgânica da biomassa microalgácea foi volatilizada, enquanto a inorgânica transformou-se em cinzas. Após 4 horas, os cadinhos foram retirados da mufla e armazenados em dessecador até o seu completo resfriamento e pesados em balança analítica de precisão (Shimadzu - AY220). A massa seca livre de cinzas foi calculada a partir da subtração da massa seca pela massa das cinzas, obtendo-se assim somente a massa da matéria orgânica.

Extração e quantificação de lipídios totais

Foram utilizadas para estas determinações as biomassas liofilizadas recuperadas do processo de floculação seguido da centrifugação e as biomassas liofilizadas recuperadas apenas por centrifugação (controle). A extração de lipídios totais foi realizada a partir do método Folch et al. (1957) modificado por Santos (2013), em triplicata de cada amostra dos Experimentos 1, 2 e 3. A biomassa seca (0,1 g) foi ressuspenso em 18 mL de solução clorofórmio:metanol (2:1) e submetida a 20 minutos de tratamento em banho ultrassônico. Em seguida, a solução foi centrifugada a 3500 rpm por 8 minutos à 4°C. O sobrenadante (fração líquida) foi transferido para um tubo de ensaio, e a biomassa residual submetida a uma nova extração, adicionando-se 5 mL da solução clorofórmio:metanol (2:1) e centrifugada novamente por 8 minutos, a 3500 rpm. O sobrenadante foi transferido para o tubo de ensaio contendo o extrato da primeira extração, e a esta foram adicionados 4 mL de solução de KCl (0.88%), formando duas fases. Após o descarte da fase superior, foram adicionados à outra fase 3 mL da solução de clorofórmio:metanol:água (3:48:47), sendo feito o descarte da fase superior. Este procedimento foi repetido mais duas vezes. A fase orgânica final foi transferida para um balão de fundo redondo de 50 mL e submetida à evaporação em rotaevaporador (Fisatom) a 40°C e 85 rpm, para evaporação do solvente (Figura 10) e, em seguida, mantido em estufa com circulação de ar a 45°C por 12 h. Após o

resfriamento em dessecador, a massa de lipídios totais foi determinada por pesagem em balança analítica, e o percentual em lipídios totais foi obtido à partir Equação (3):

$$\text{Equação 3: } \%LT = \frac{(Mf - Mi) \times 100}{Mb}$$

Onde, Mf é a massa final (g) do balão volumétrico após a evaporação do solvente, Mi é a massa inicial (g) do balão volumétrico e Mb (g) é a quantidade de biomassa utilizada para a extração de lipídios.

O método de extração de lipídios totais usado neste trabalho não foi, originalmente, desenvolvido para amostras com alto teor de sal. Desta forma, para a biomassa de *N. oculata*, foi introduzida uma etapa após a evaporação do solvente, conforme Mesquita (2018), onde o resíduo presente no fundo do balão foi redissolvido em 10 mL de clorofórmio e filtrado em papel de filtro com dobradura pregueada (Figura 10F), a fim de remover resquícios de sais inorgânicos que poderiam comprometer a quantificação dos lipídios totais. E então, a fase orgânica final foi submetida novamente à evaporação e às etapas subsequentes, conforme procedimento descrito anteriormente.

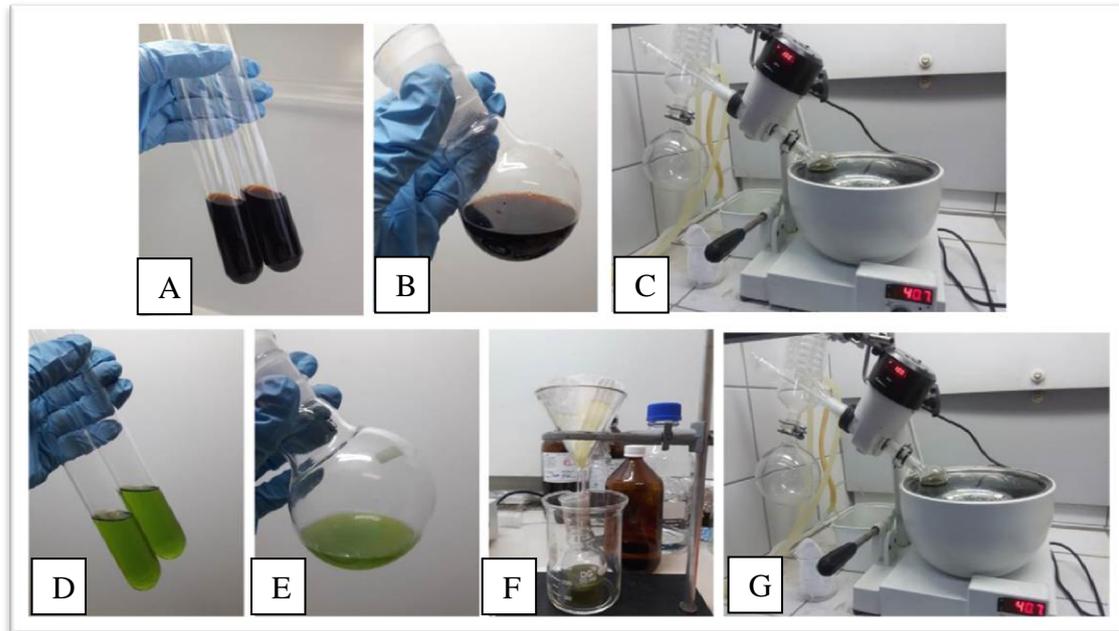


Figura 11: Etapas do processo de extração de lipídios totais: (A) e (B) extratos de *Haematococcus pluvialis*; (C) evaporação do clorofórmio em rotoevaporador; (D) e (E) extratos de *Nannochloropsis oculata*; (F) filtração dos lipídios redissolvidos para remoção de sais; (G) evaporação do clorofórmio em rotoevaporador.

Extração e quantificação de carotenoides totais

Foram utilizadas para estas determinações as biomassas liofilizadas recuperadas do processo de floculação seguido da centrifugação e as biomassas liofilizadas recuperadas apenas por centrifugação (controle). A extração e quantificação de carotenoides totais foi realizada em triplicata de cada amostra dos experimentos 1 e 2; para as quais, 20 mg de biomassa seca foram pesadas em balança analítica e a esta foram adicionados 10 mL de Acetona PA 100%, em seguida o tubo contendo a biomassa com solvente foi agitada em vórtex por cerca de 15 segundos, e, então mantido em congelador por 2 horas. Decorrido este tempo, o tubo contendo o extrato foi levado para centrifugação a 4.500 rpm por 20 minutos a 4°C; ao finalizar, o sobrenadante foi recolhido com o auxílio de pipeta Pasteur com algodão na sua ponta (atuando como filtro). Foram realizadas mais duas extrações para a espécie *H. pluvialis* e mais uma extração para *N. oculata* (Figura 11), adicionando-se 10 mL de solvente ao *pellet*, e, então levando o tubo para agitação em vórtex e, posteriormente, para centrifugação. Os extratos obtidos foram analisados em espectrofotômetro (Genesys, modelo UV-Vis) em varredura dos comprimentos de onda de 470 a 730 nm, em um ambiente escuro para evitar a degradação dos pigmentos por foto-oxidação. Com o resultado das absorvâncias, foi possível determinar a concentração de carotenoides totais, a partir das equações desenvolvidas por Lichtenthaler (1987), que se encontram a seguir:

$$\text{Equação 4: } Cl_a = (11,24 * A_{661,6} - 2,04 * A_{644,8}) * dl$$

$$\text{Equação 5: } Cl_b = (20,13 * A_{644,8} - 4,19 * A_{661,6}) * dl$$

$$\text{Equação 6: } Car = \frac{(1000 * A_{470} * dl) - (1,90 * Cl_a - 63,14 * Cl_b)}{214}$$

$$\text{Equação 7: } Car = \frac{(1000 * A_{470} * dl) - (1,90 * Cl_a)}{214}$$

$$\text{Equação 8: } Car_{biomassa} = \frac{(\sum Car) * Vs}{M}$$

Onde, Cl_a é a concentração de clorofila *a* no extrato; Cl_b é a concentração de clorofila *b* no extrato; Car é a concentração de carotenoides totais no extrato, em mg.L⁻¹

¹; A_λ é a absorvância observada no comprimento de onda λ ; dl é a diluição do extrato; $Car_{biomassa}$ é a concentração de carotenoides totais na biomassa em $mg.g^{-1}$; V_s é o volume (L) de solvente (Acetona PA); M é a massa (g) usada na extração.

É importante destacar que a metodologia de extração usada nesta etapa não foi otimizada para cada espécie de microalga foco do estudo. Os cálculos foram realizados de acordo com cada espécie, sendo que *H. pluviialis* apresenta clorofila *a* e *b* e *N. oculata* apresenta apenas clorofila *a*.

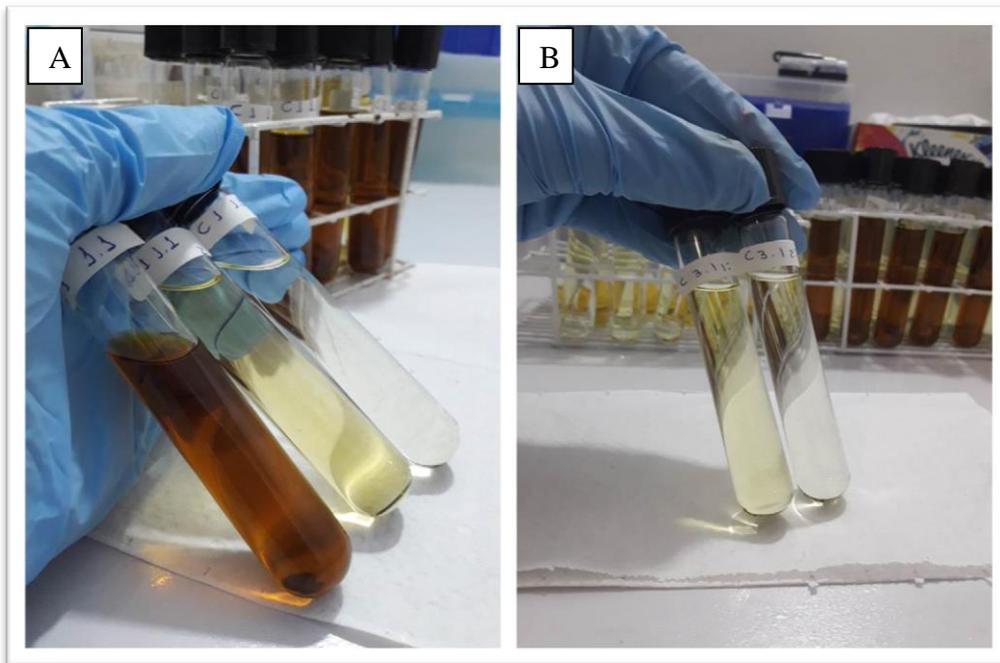


Figura 12: Extratos de pigmentos das espécies: (A) *Haematococcus pluviialis*, realizadas três extrações da mesma biomassa; (B) *Nannochloropsis oculata*, realizadas duas extrações da mesma biomassa.

Análise estatística

Os resultados obtidos foram avaliados através dos softwares *Statistica 7.0* (StatSoft ®) e *GraphPad Prism 8.0.1*, quando as premissas de normalidade dos dados não eram obedecidas utilizou-se o Teste de Kruskal-Wallis e Teste de Dunn, com o nível de significância adotado de 95% ($p < 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Avaliação da influência de variáveis no processo de floculação

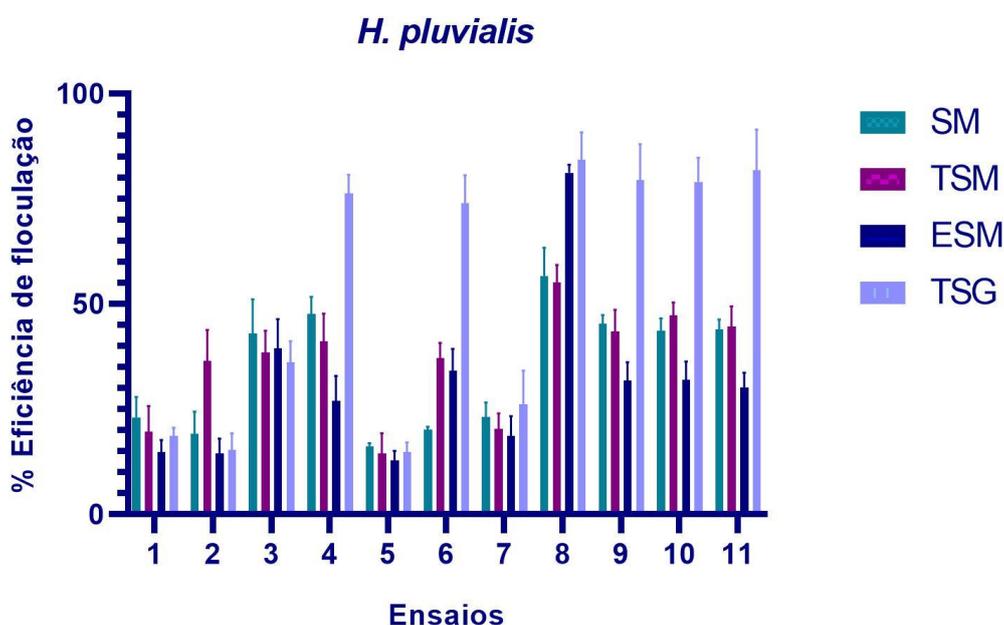
Através do planejamento fatorial 2^k pode-se indicar as principais tendências e determinar uma direção promissora para as experimentações subsequentes (MONTGOMERY, 1991). Esta técnica foi aplicada com sucesso por diversos autores para otimizar as condições de floculação de microalgas como, por exemplo, Garzon-Sanabria; Davis; Nikolov (2012), os quais usaram uma análise fatorial completa como um experimento de triagem para determinar o efeito do flocculante $AlCl_3$ para a colheita de *Nannochloris oculata* e testaram dosagem do flocculante, concentração celular, força iônica e pH do meio de cultivo. Roselet et al. (2017), usaram uma análise fatorial completa 2^4 para determinar os efeitos da salinidade, pH, concentração de biomassa e dosagem de Tanfloc na eficiência de floculação de *N. oculata*. No presente estudo, com o intuito de avaliar as variáveis - concentração do flocculante, tempo de sedimentação e pH na eficiência de floculação de *H. pluvialis* e *N. oculata* utilizando-se Semente *M. oleifera* (SM), Extrato Salino da Semente de *M. oleifera* (ESM), Torta da Semente *M. oleifera* (TSM) e Tanfloc SG (TSG), foi realizado um planejamento fatorial 2^3 com triplicata no ponto central. A eficiência do processo foi estimada por meio da capacidade de diminuição da turbidez e a porcentagem de redução de DO730nm foi utilizada para a avaliação desses resultados. Os ensaios foram repetidos 3 vezes para efeito comparativo.

H. pluvialis

Os experimentos foram realizados na fase estacionária de crescimento de *H. pluvialis* em cultura com concentração em massa seca de $0,31 \pm 0,03 \text{ g.L}^{-1}$. Os resultados apontados no gráfico da eficiência de floculação (Figura 12) indicaram que apenas os agentes flocculantes Extrato Salino da Semente de *M. oleifera* (ESM) e Tanfloc SG (TSG) atingiram eficiência de floculação próxima e/ou superior a 80%. Aplicando-se o agente flocculante ESM, verificou-se que o melhor resultado ocorreu nas condições experimentais do ensaio **8** (concentração de 500 mg.L^{-1} , tempo de sedimentação de 90 min e pH 10,5) alcançando uma eficiência de $81,15 \pm 1,95\%$. Com o uso de TSG, foram obtidos resultados satisfatórios em mais de uma condição experimental, com destaque para os resultados obtidos nos ensaios **8** (concentração de $1,2 \text{ mg.L}^{-1}$, tempo de sedimentação de 90 min e pH 10,5) e na triplicata do ponto central

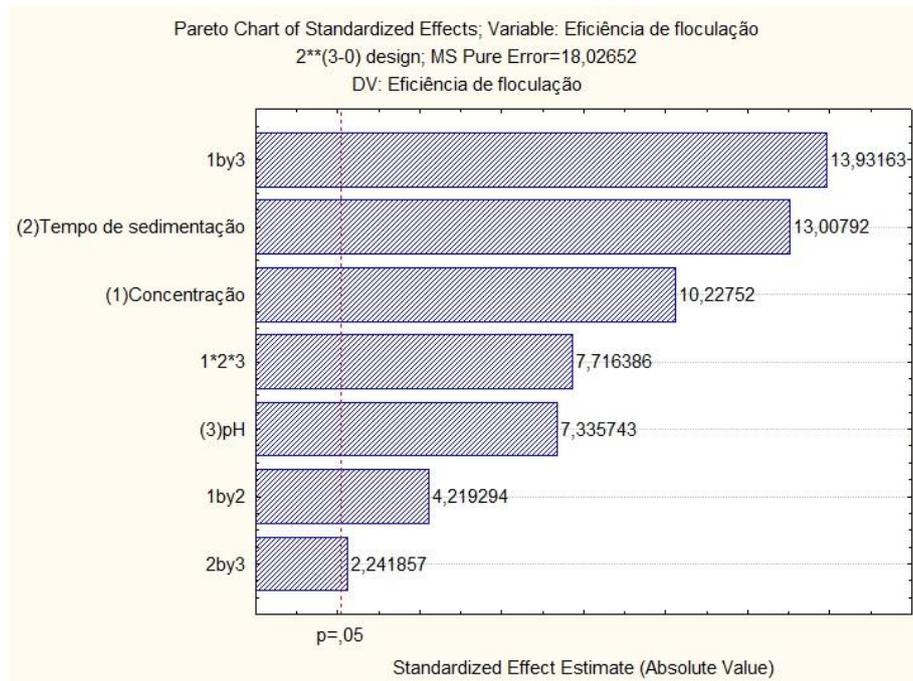
(9-11) (concentração de $0,6 \text{ mg.L}^{-1}$, tempo de sedimentação de 60 min e pH 8,5) cujas eficiências foram de $84,24 \pm 6,54\%$ e $80,03 \pm 1,51\%$, respectivamente. Dessa forma, foram escolhidos os agentes floculantes ESM e TSG para dar prosseguimento às avaliações do processo de colheita de células de *H. pluvialis*.

Figura 13: Gráfico da eficiência de floculação de *Haematococcus pluvialis*, conforme matriz de planejamento, dos agentes floculantes: Semente de *Moringa oleifera* (SM), Torta da Semente de *Moringa oleifera* (TSM), Extrato Salino da Semente de *Moringa oleifera* (ESM) e Tanfloc SG (TSG).



Com a aplicação de ESM, foi possível observar no Gráfico de Pareto (Figura 13), que todas as variáveis independentes e as interações entre elas foram significativas na eficiência de floculação de *H. pluvialis*, principalmente a interação entre a concentração do floculante e pH (1 by 3), e o tempo de sedimentação (2) que apresentaram maiores efeitos (maior valor em módulo), indicando que o aumento no valor destas variáveis promove o aumento da resposta (eficiência de floculação). Evidenciando, portanto, que a condição para melhor eficiência de floculação com ESM foram os valores máximos das variáveis, conforme condição experimental do ensaio 8 (Figura 12).

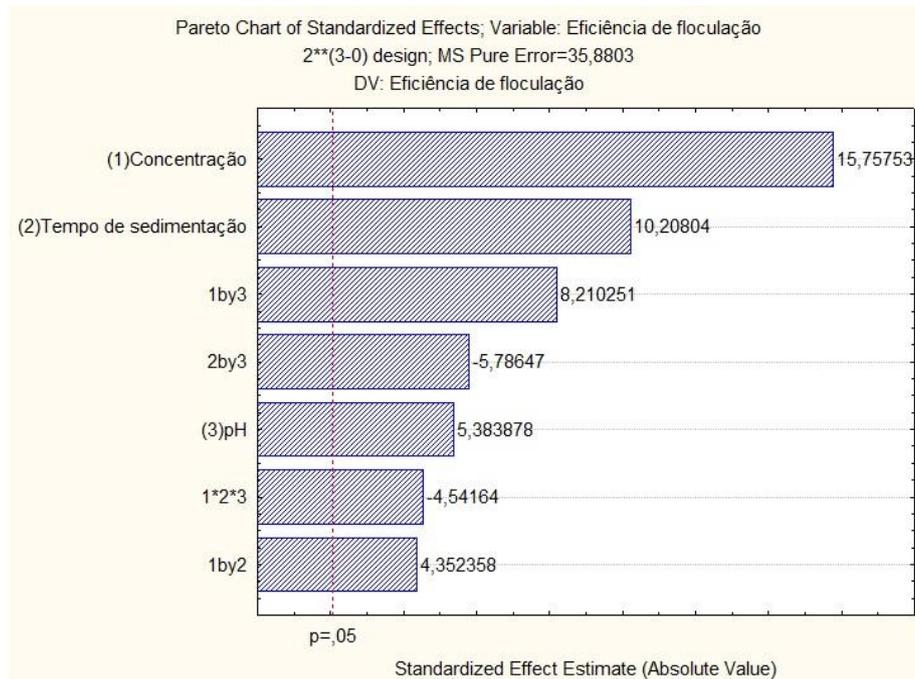
Figura 14: Gráfico de Pareto para a eficiência de floculação de *Haematococcus pluvialis* utilizando Extrato Salino da Semente de *Moringa oleifera* (ESM), considerando a influência da concentração do floculante (1), tempo de sedimentação (2), pH (3) e a interação desses fatores, com nível de confiança de 95% ($p < 0,05$).



Fonte: Autora, 2020. Gráfico gerado no software *Statistica 7.0* (StatSoft®).

Na floculação mediada por TSG, verificou-se no Gráfico de Pareto, representado na Figura 14, que as variáveis independentes e as interações entre elas também foram significativas na eficiência de floculação. A variável de maior efeito foi a concentração do floculante (1); além disso, outro resultado obtido está relacionado com a combinação dos fatores: tempo de sedimentação e pH (2 *by* 3), e das 3 variáveis independentes (1*2*3), que pelo gráfico apresentaram grau de significância negativa, o que sugere que o aumento simultâneo das mesmas provoca um decréscimo na eficiência de floculação. Dessa forma, considerando que a floculação mediada por TSG gerou resultados satisfatórios nas diferentes condições de pH testados e o pH ao final do cultivo aproxima-se ao valor do ponto central (em torno de 8,9), considerou-se como melhor estratégia o não ajuste de pH da suspensão celular para os ensaios de floculação; além disto o uso do floculante na concentração mínima ($0,6 \text{ mg.L}^{-1}$) e no menor tempo de sedimentação (30 min). A escolha do tempo foi justificada por análises visuais realizadas durante os experimentos.

Figura 15: Gráfico de Pareto para a eficiência de floculação de *Haematococcus pluvialis* utilizando Tanfloc SG (TSG), considerando a influência da concentração do floculante (1), tempo de sedimentação (2), pH (3) e a interação desses fatores, com nível de confiança de 95% ($p < 0,05$).



Fonte: Autora, 2020. Gráfico gerado no software *Statistica 7.0* (StatSoft®).

A significância estatística da equação do modelo foi analisada pelo teste F para análise de variância (ANOVA), os valores de $p < 0,05$ implicam que as variáveis foram significativas, conforme exposto na Tabela V para a floculação com ESM. O coeficiente de determinação (R^2) obtido foi de 0,96127 e o R^2 -ajustado de 0,95042, isto mostra que 96,13% das variações na resposta podem ser explicadas pelo modelo. A tabela de efeitos e coeficientes da eficiência de floculação de ESM (Tabela VI), evidenciam que a equação reproduziu os resultados experimentais e foi possível prever o comportamento da resposta através de uma correlação entre os coeficientes das variáveis significativas, representado pela Equação (9):

$$\text{Equação 9: } Y = 30,56 + 8,86_{(1)} + 11,27_{(2)} + 6,36_{(3)} - 3,66_{(1 \text{ by } 2)} - 12,07_{(1 \text{ by } 3)} + 1,94_{(2 \text{ by } 3)} - 6,69_{(1*2*3)}$$

O experimento teve como variável dependente a eficiência de floculação (Y) e como variáveis independentes: a concentração do floculante (1), tempo de sedimentação (2) e pH (3). (1), (2) e (3) são os termos lineares enquanto, (1 by 2), (1 by 3) e (2 by 3) são os termos de interação de segunda ordem entre as variáveis independentes e (1*2*3) é o termo de interação de terceira ordem envolvido no processo.

Tabela V: ANOVA para a resposta eficiência de floculação, com nível de confiança de 95% ($p < 0,05$), para o planejamento fatorial completo $2^3 + 3PC$, para o processo de floculação de *Haematococcus pluvialis* utilizando-se Extrato Salino da Semente de *Moringa oleifera* (ESM). $R^2 = 0,96127$; R^2 -ajustado = $0,95042$.

Fator	SQ	v	QM	F	p-valor
(1) Concentração	1885,61	1	1885,614	104,60	0,0000
(2) Tempo de sedimentação	3050,20	1	3050,196	169,21	0,0000
(3) pH	970,06	1	970,063	53,81	0,0000
(1 by 2)	320,92	1	320,916	17,80	0,0003
(1 by 3)	3498,77	1	3498,771	194,09	0,0000
(2 by 3)	90,60	1	90,600	5,02	0,0345
(1*2*3)	1073,35	1	1073,346	59,54	0,0000
Erro Puro	432,64	24	18,027		
Total SQ	11328,27	32			

Tabela VI: Tabela de efeitos e coeficientes para a resposta eficiência de floculação, com nível de confiança de 95% ($p < 0,05$), para o planejamento fatorial completo $2^3 + 3PC$, para o processo de floculação de *Haematococcus pluvialis* utilizando-se Extrato Salino da Semente de *Moringa oleifera* (ESM). $R^2 = 0,96127$; R^2 -ajustado = $0,95042$.

Parâmetros	Efeito	Coefficiente	Teste-t	p-valor
Intercepto	30,56	$30,56 \pm 0,74$	41,35	0,0000
(1) Concentração	17,73	$8,86 \pm 0,87$	10,23	0,0000
(2) Tempo de sedimentação	22,55	$11,27 \pm 0,87$	13,01	0,0000
(3) pH	12,72	$6,36 \pm 0,87$	7,34	0,0000
(1 by 2)	7,31	$3,66 \pm 0,87$	4,22	0,0003
(1 by 3)	24,15	$12,07 \pm 0,87$	13,93	0,0000
(2 by 3)	3,89	$1,94 \pm 0,87$	2,24	0,0345
(1*2*3)	13,38	$6,69 \pm 0,87$	7,72	0,0000

Na Tabela VII, são apresentados os resultados da análise de variância da aplicação de TSG, e os valores de $p < 0,05$ observados demonstram que as variáveis foram significativas. No entanto, obteve-se um coeficiente de determinação (R^2) de $0,65752$ e o R^2 -ajustado de $0,56163$, isto mostra que $65,75\%$ das variações na resposta (eficiência de floculação) podem ser explicadas pelo modelo. Assim, não foi possível prever o comportamento da resposta através de uma correlação entre os coeficientes das variáveis significativas, mas ainda podemos concluir, pelos fatores altamente significativos, de como as alterações nos valores das variáveis independentes estão

associadas a alterações no valor da variável resposta, como observado no gráfico de Pareto (Figura 14) e na Tabela da análise de variância para aplicação de TSG.

Tabela VII: ANOVA para a resposta eficiência de floculação, com nível de confiança de 95% ($p < 0,05$), para o planejamento fatorial completo $2^3 + 3PC$, para o processo de floculação de *Haematococcus pluvialis* utilizando-se Tanfloc SG (TSG). $R^2 = 0,65752$; R^2 -ajustado = $0,56163$.

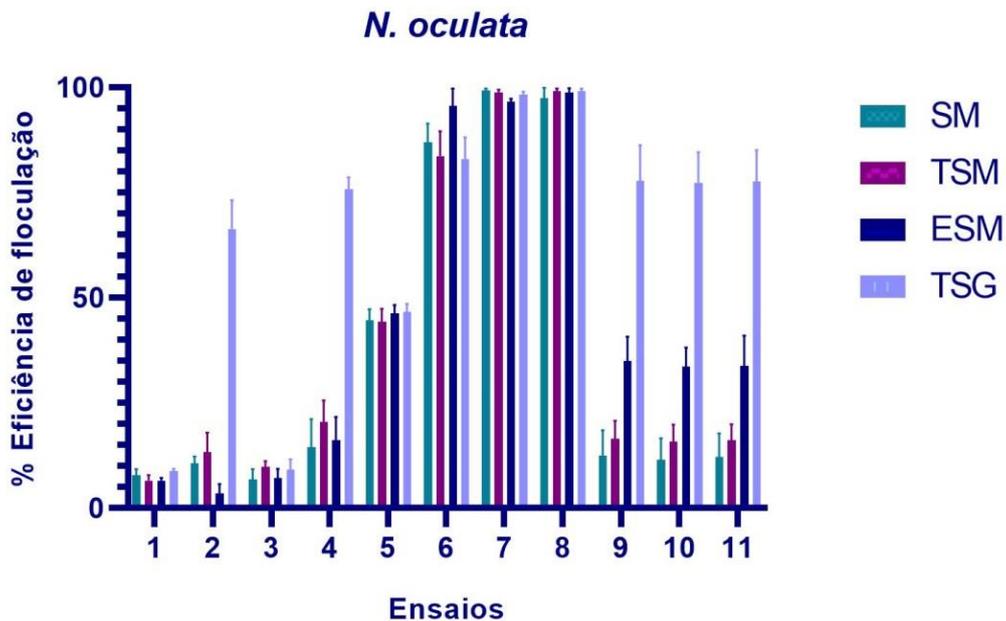
Fator	SQ	v	QM	F	p-valor
(1) Concentração	8909,07	1	8909,066	248,30	0,0000
(2) Tempo de sedimentação	3738,88	1	3738,877	104,20	0,0000
(3) pH	1040,03	1	1040,032	28,99	0,0000
(1 by 2)	679,68	1	679,681	18,94	0,0002
(1 by 3)	2418,63	1	2418,627	67,41	0,0000
(2 by 3)	1201,39	1	1201,387	33,48	0,0000
(1*2*3)	740,08	1	740,083	20,63	0,0001
Erro Puro	861,13	24	35,880		
Total SQ	28482,29	32			

No anexo C são apresentados os Gráficos da Probabilidade Normal dos Resíduos e dos Valores Observados x Preditos, provando que o modelo referente ao ESM possui boa qualidade de ajuste. E o modelo referente ao TSG, apresentou a presença de *outliers* distantes da reta identidade.

N. oculata

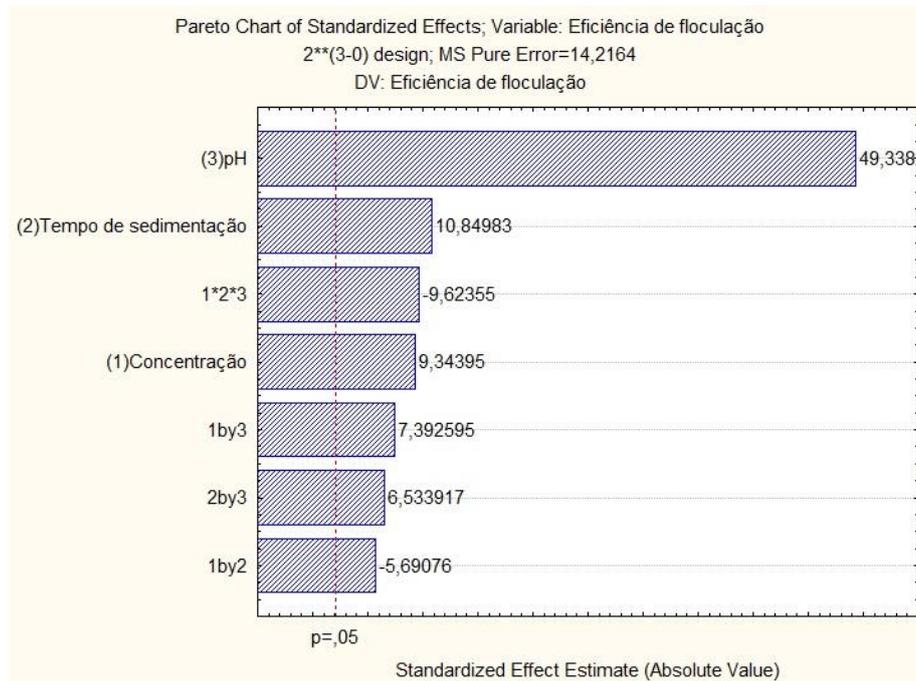
Os ensaios foram realizados na fase estacionária de crescimento da microalga marinha em cultura com concentração em massa seca de $0,73 \pm 0,06 \text{ g.L}^{-1}$. Os resultados obtidos (Figura 15) indicaram que a eficiência de floculação alcançou valores superiores a 96% após 90 minutos, quando o pH foi ajustado para 10,5 pela adição de NaOH a 1M, sem a adição de flocculantes (ensaio 7). Os flocculantes à base de sementes de *M. oleifera* (SM, TSM e ESM) atingiram uma eficiência de floculação de $87 \pm 4,37\%$, $83,66 \pm 5,91\%$ e $95,57 \pm 4,14\%$, respectivamente, nas condições experimentais do ensaio 6. Com a aplicação do agente TSG, foram obtidos resultados satisfatórios em mais de uma condição experimental. Com base nesses resultados, foram escolhidos os agentes flocculantes ESM e TSG para dar prosseguimento às avaliações do processo de colheita de células de *N. oculata*, comparando-os com a floculação alcalina que gerou melhor resposta (ensaio 7).

Figura 16: Gráfico da eficiência de floculação de *Nannochloropsis oculata*, conforme matriz de planejamento, dos agentes floculantes: Semente de *Moringa oleifera* (SM), Torta da Semente de *Moringa oleifera* (TSM), Extrato Salino da Semente de *Moringa oleifera* (ESM) e Tanfloc SG (TSG).



Pelas análises dos ensaios da eficiência de floculação, pode-se inferir que o pH exerceu a maior influência na resposta de floculação de *N. oculata* e a floculação alcalina, sem a adição de floculantes, garantiu alta eficiência de recuperação das células, conforme condição experimental do ensaio 7. De acordo com as análises dos Gráficos de Pareto com a aplicação de ESM e TSG, representados nas Figuras 16 e 17, respectivamente, o pH também se mostrou como o fator de maior efeito na eficiência de ambos os floculantes, principalmente no caso do ESM, no qual o pH obteve maior valor em módulo, indicando que o aumento desta variável associado ao floculante resulta em um aumento nas taxas de floculação. Isso evidencia, portanto, que a condição para se obter melhor eficiência de floculação com ESM foram os valores máximos das variáveis pH (10,5) e concentração do floculante (500 mg.L^{-1}) associado ao menor tempo de sedimentação (30 mim). Este tempo é justificado pelo grau de significância negativa observado no modelo entre as 3 variáveis ($1*2*3$) e entre concentração do floculante e tempo de sedimentação ($1 \text{ by } 2$).

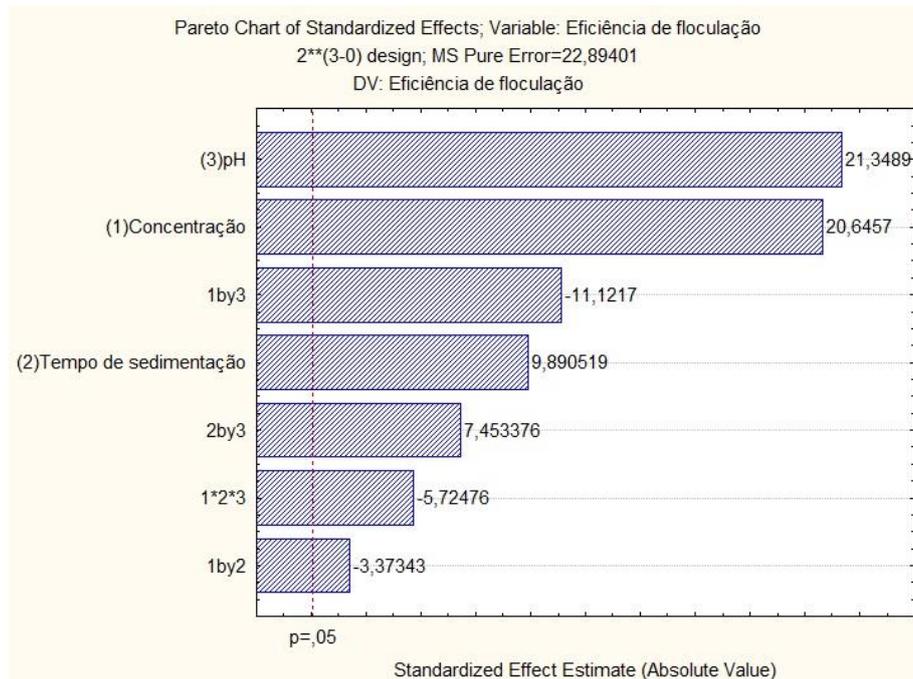
Figura 17: Gráfico de Pareto para a eficiência de floculação de *Nannochloropsis oculata* utilizando Extrato salino da semente de *Moringa oleifera* (ESM), considerando a influência da concentração do floculante (1), tempo de sedimentação (2), pH (3) e a interação desses fatores, com nível de confiança de 95% ($p < 0,05$).



Fonte: Autora, 2020. Gráfico gerado no software *Statistica 7.0 (StatSoft®)*.

Com a aplicação de TSG, conforme observado na Figura 17, todas as variáveis e suas interações também foram significativas e, além da variável pH (3), a concentração do floculante (1) também apresentou maior efeito na eficiência de floculação. Outro resultado obtido foi a interação entre elas (1 by 3) que apontou alto grau de significância negativa, o que sugere que o aumento simultâneo das mesmas provoca um decréscimo na variável resposta. Dessa forma, como o TSG gerou boa eficiência de floculação nas diferentes condições de pH testados e levando-se em conta a alta salinidade do meio de cultura (35 PSU), considerou-se como melhor estratégia o não ajuste de pH da suspensão celular (pH ao final do cultivo aproxima-se ao valor do ponto central, em torno de 8,7), pois para o ajuste é necessária a aplicação de maior concentração de base, devido aos efeitos de tamponamento do meio marinho. Isto posto, como o modelo apresentou alto grau de significância negativa entre as variáveis concentração do floculante e pH (1 by 3), entre a concentração do floculante e tempo de sedimentação (1 by 2), e entre as 3 variáveis (1*2*3), considerou-se como a melhor condição de concentração do floculante, a aplicação da concentração máxima ($1,2 \text{ mg.L}^{-1}$) e tempo de sedimentação mínimo (30 min).

Figura 18: Gráfico de Pareto para a eficiência de floculação de *Nannochloropsis oculata* utilizando Tanfloc SG (TSG), considerando a influência da concentração do flocculante (1), tempo de sedimentação (2), pH (3) e a interação desses fatores, com nível de confiança de 95% ($p < 0,05$).



Fonte: Autora, 2020. Gráfico gerado no *software Statistica 7.0 (StatSoft®)*.

De acordo com a ANOVA da floculação utilizando ESM (Tabela VIII), todos os fatores foram altamente significativos ($p < 0,01$). O coeficiente de determinação (R^2) obtido nos experimentos foi de 0,96882 e o R^2 -ajustado de 0,96009, isto mostra que 96,88% das variações na resposta podem ser explicadas pelo modelo, o que significa que os resultados fornecidos pelo *software* utilizando o modelo estimado estão de acordo e próximos aos resultados obtidos pelos experimentos. Assim, foi possível prever o comportamento da resposta através de uma correlação entre os coeficientes das variáveis significativas (Tabela IX), representado pela Equação (10):

$$\text{Equação 10: } Y = 42,99 + 7,19_{(1)} + 8,35_{(2)} + 37,97_{(3)} - 4,38_{(1 \text{ by } 2)} + 5,69_{(1 \text{ by } 3)} + 5,03_{(2 \text{ by } 3)} - 7,41_{(1*2*3)}$$

O experimento teve como variável dependente a eficiência de floculação (Y) e como variáveis independentes: a concentração do flocculante (1), tempo de sedimentação (2) e pH (3). (1), (2) e (3) são os termos lineares, enquanto (1 by 2), (1 by 3) e (2 by 3) são os termos de interação de segunda ordem entre as variáveis independentes e (1*2*3) é o termo de interação de terceira ordem envolvido no processo.

Tabela VIII: ANOVA para a resposta eficiência de floculação, com nível de confiança de 95% ($p < 0,05$), para o planejamento fatorial completo $2^3 + 3PC$ na floculação de *Nannochloropsis oculata* utilizando Extrato Salino da Semente de *Moringa oleifera* (ESM). $R^2 = 0,96882$; R^2 -ajustado = $0,96009$.

Fator	SQ	v	QM	F	p-valor
(1) Concentração	1241,23	1	1241,23	87,31	0,0000
(2) Tempo de sedimentação	1673,54	1	1673,54	117,72	0,0000
(3) pH	34606,38	1	34606,38	2434,26	0,0000
(1 by 2)	460,40	1	460,40	32,38	0,0000
(1 by 3)	776,93	1	776,93	54,65	0,0000
(2 by 3)	606,93	1	606,93	42,69	0,0000
(1*2*3)	1316,62	1	1316,62	92,61	0,0000
Erro Puro	341,19	24	14,22		
Total SQ	41991,24	32			

Tabela IX: Tabela de efeitos e coeficientes para a resposta eficiência de floculação, com nível de confiança de 95% ($p < 0,05$), para o planejamento fatorial completo $2^3 + 3PC$ na floculação de *Nannochloropsis oculata* utilizando Extrato Salino da Semente de *Moringa oleifera* (ESM). $R^2 = 0,96882$; R^2 -ajustado = $0,96009$.

Parâmetros	Efeito	Coefficiente	Teste-t	p-valor
Intercepto	42,99	$42,99 \pm 0,66$	65,49	0,0000
(1) Concentração	14,38	$7,19 \pm 0,77$	9,34	0,0000
(2) Tempo de sedimentação	16,70	$8,35 \pm 0,77$	10,85	0,0000
(3) pH	75,94	$37,97 \pm 0,77$	49,34	0,0000
(1 by 2)	-8,76	$-4,38 \pm 0,77$	-5,69	0,0000
(1 by 3)	11,38	$5,69 \pm 0,77$	7,39	0,0000
(2 by 3)	10,06	$5,03 \pm 0,77$	6,53	0,0000
(1*2*3)	-14,81	$-7,41 \pm 0,77$	-9,62	0,0000

Os resultados da floculação utilizando TSG, indicam que todos os fatores foram altamente significativos, como observado na tabela da análise de variância (Tabela X). O coeficiente de determinação (R^2) obtido foi de 0,92091 e o R^2 -ajustado de 0,89876, expressando que 92,09% das variações na resposta podem ser explicadas pelo modelo. Dessa forma, foi possível prever o comportamento da resposta através de uma correlação entre os coeficientes das variáveis significativas (Tabela XI), representado pela Equação (11):

$$\text{Equação 11: } Y = 65,41 + 20,16_{(1)} + 9,66_{(2)} + 20,85_{(3)} - 3,29_{(1 \text{ by } 2)} - 10,87_{(1 \text{ by } 3)} + 7,27_{(2 \text{ by } 3)} - 5,59_{(1*2*3)}$$

O experimento teve como variável dependente a eficiência de floculação (Y) e como variáveis independentes: a concentração do floculante (1), tempo de sedimentação (2) e pH (3). (1), (2) e (3) são os termos lineares, enquanto (1 by 2), (1 by 3) e (2 by 3) são os termos de interação de segunda ordem entre as variáveis independentes e (1*2*3) é o termo de interação de terceira ordem envolvido no processo.

Tabela X: ANOVA para a resposta eficiência de floculação, com nível de confiança de 95% (p < 0,05), para o planejamento fatorial completo 2³ + 3PC na floculação de *Nannochloropsis oculata* utilizando Tanfloc SG (TSG). R² = 0,92091; R²-ajustado = 0,89876.

Fator	SQ	v	QM	F	p-valor
(1) Concentração	9758,45	1	9758,45	426,24	0,0000
(2) Tempo de sedimentação	2239,55	1	2239,55	97,82	0,0000
(3) pH	10434,53	1	10434,53	455,78	0,0000
(1 by 2)	260,53	1	260,53	11,38	0,0025
(1 by 3)	2831,80	1	2831,80	123,69	0,0000
(2 by 3)	1271,83	1	1271,83	55,55	0,0000
(1*2*3)	750,30	1	750,30	32,77	0,0000
Erro Puro	549,46	24	22,89	79,34	
Total SQ	29912,91	32			

Tabela XI: Tabela de efeitos e coeficientes para a resposta eficiência de floculação, com nível de confiança de 95% (p < 0,05), para o planejamento fatorial completo 2³ + 3PC na floculação de *Nannochloropsis oculata* utilizando Tanfloc SG (TSG). R² = 0,92091; R²-ajustado = 0,89876.

Parâmetros	Efeito	Coefficiente	Teste-t	p-valor
Intercepto	65,41	65,41 ± 0,83	78,53	0,0000
(1) Concentração	40,33	20,16 ± 0,98	20,64	0,0000
(2) Tempo de sedimentação	19,32	9,66 ± 0,98	9,89	0,0000
(3) pH	41,70	20,85 ± 0,98	21,35	0,0000
(1 by 2)	-6,59	-3,29 ± 0,98	-3,37	0,0025
(1 by 3)	-21,72	-10,87 ± 0,98	-11,12	0,0000
(2 by 3)	14,56	7,27 ± 0,98	7,45	0,0000
(1*2*3)	-11,18	-5,59 ± 0,98	-5,72	0,0000

No anexo D são apresentados os Gráficos da Probabilidade Normal dos Resíduos e dos Valores Observados x Preditos. Os gráficos ilustram que os valores reais

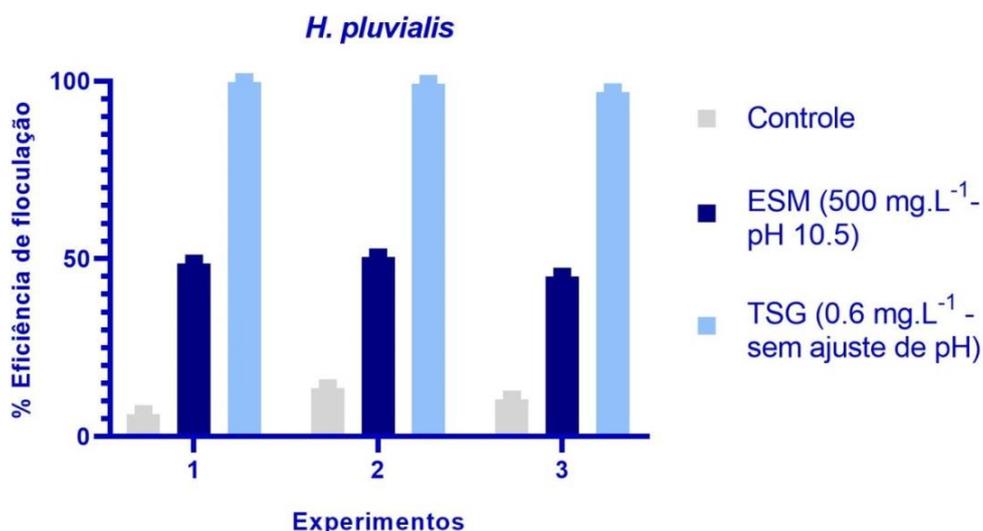
foram distribuídos próximos à reta identidade, indicando que os modelos correspondem aos valores medidos. Dessa forma, essas parcelas mostram concordância suficiente entre os dados reais e os valores obtidos nos modelos.

Avaliação da eficiência de flocculação em Jar Test

As análises do planejamento experimental indicaram que para o flocculante ESM, a mais alta concentração do flocculante e o mais alto valor de pH geraram os melhores resultados em ambas espécies de microalgas, sendo aplicados na concentração de 500 mg.L⁻¹ e em pH 10,5. No entanto, foram aplicados com tempo de sedimentação diferentes, sendo de 90 min para *H. pluvialis* e 30 min para *N. oculata*. Já os ensaios de flocculação com TSG foram realizados em pH 8,9, com a concentração do flocculante de 0,6 mg.L⁻¹ para *H. pluvialis* e as avaliações de *N. oculata* foram realizadas em pH 8,7 com a concentração do flocculante de 1,2 mg.L⁻¹, ambas com tempo de sedimentação de 30 min. Os experimentos foram realizados em Jar Test, em triplicata, denominados: 1, 2 e 3. Os resultados das repetições dos experimentos de ambas espécies de microalgas não apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$), apresentando boa reprodutibilidade.

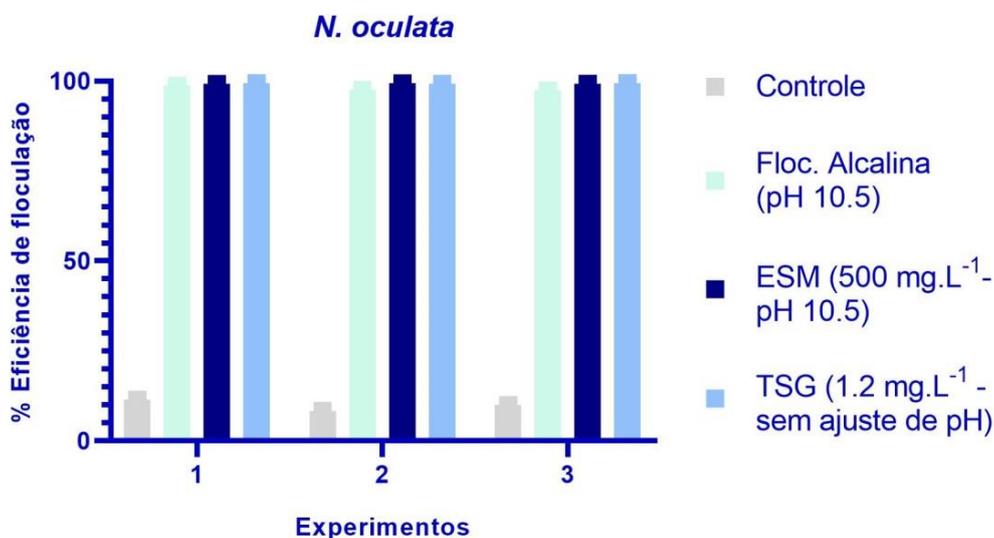
Os ensaios de flocculação de *H. pluvialis* (Figura 18), realizados na fase estacionária de crescimento (concentração final em massa seca de $0,33 \pm 0,02$ g.L⁻¹), evidenciaram que apenas o agente flocculante TSG foi eficaz, atingindo eficiência de $98,64 \pm 1,56\%$ em menor tempo de sedimentação - 15 min. Já o flocculante ESM não alcançou eficiência superior a 50% mesmo após 90 min.

Figura 19: Gráfico da eficiência de floculação de *Haematococcus pluvialis*, utilizando Extrato Salino da Semente de *Moringa oleifera* (ESM) e Tanfloc SG (TSG).



Os ensaios da espécie marinha, *N. oculata* (Figura 19), realizados na fase estacionária de crescimento (concentração final em massa seca de $0,94 \pm 0,09 \text{ g.L}^{-1}$), demonstraram alta eficiência de floculação no tempo de sedimentação de 30 min, atingindo $97,95 \pm 0,77\%$ pela floculação alcalina (pH $\sim 10,5$) com tendência de aumento da eficiência quando associada ao agente floculante ESM, alcançando $99,27 \pm 0,09\%$. Com a utilização de TSG os valores de eficiência de floculação foram de $99,40 \pm 0,07\%$.

Figura 20: Gráfico da eficiência de floculação de *Nannochloropsis oculata*, utilizando Floculação alcalina (pH 10,5 induzido pela adição de NaOH), Extrato Salino da Semente de *Moringa oleifera* (ESM) e Tanfloc SG (TSG).



Como pode ser observado, nem todas as espécies de microalgas flocculam pela indução do pH (CASTRILLO et al., 2013). A eficiência varia de espécie para espécie, por faixa de pH, fase de crescimento, compostos presentes no meio de cultivo, entre outros fatores (BRACHARZ et al., 2018; UDUMAN et al., 2010; VANDAMME et al., 2012). Isso implica na necessidade de estabelecer um protocolo distinto para diferentes espécies de microalgas para avaliar seu potencial de autofloculação. Com base nos resultados do presente estudo e na literatura pertinente, foi possível inferir que para a espécie marinha, a flocculação alcalina é um método eficiente (BESSON; GUIRAUD, 2013; SALES; ABREU, 2015) e de baixo custo (Schlesinger et al., 2012). Principalmente a flocculação induzida por NaOH, uma vez que o hidróxido de sódio é uma base comumente usada para o ajuste de pH de meios de cultura microalgácea (UMMALYMA et al., 2017; KNUCKEY et al., 2006). Em condições alcalinas, alguns íons do meio precipitam junto com a biomassa e ajudam no processo de colheita. Dois efeitos principais são decisivos na separação líquido-sólido quando o pH é aumentado: a precipitação do hidróxido de magnésio ($Mg(OH)_2$) e a precipitação do carbonato de cálcio ($CaCO_3$) (SIRIN et al., 2012; VANDAMME et al., 2012). A precipitação de magnésio começa em pH 9.5, aproximadamente, e torna-se significativa em pH acima de 10.5. Ao aumentar o pH da cultura para pH 11 começa a formação de precipitados de $CaCO_3$ (SEMERJIAN; AYOUB, 2003). A precipitação do hidróxido de magnésio atua promovendo a coagulação das células microalgais pelo mecanismo de varredura e neutralização de carga, conforme observado por Wu et al. (2012). Os autores analisaram o meio de cultivo e, observaram as concentrações dos cátions metálicos multivalentes antes e depois da flocculação e verificaram que a concentração de Mg^{2+} diminuiu consideravelmente, indicando seu papel importante no processo de flocculação. Como a presença de cálcio e, principalmente, magnésio são fundamentais para que ocorra a flocculação alcalina, a maior disponibilidade destes íons tem impacto direto na eficiência (SIRIN et al., 2012; VANDAMME et al., 2012). Dessa forma, o uso de água marinha natural, além de promover a redução de custos do cultivo e da demanda por água doce, pode ser uma fonte de magnésio e cálcio para melhorar a eficiência da flocculação alcalina. Além disso, nossa hipótese de promover a colheita de microalgas na fase estacionária de crescimento, período em que ocorre naturalmente um aumento de pH, implica no uso de uma menor concentração de base para o ajuste de pH, e ainda existe um ganho importante em teor em lipídios, visto que é maior o acúmulo destas biomoléculas nesta fase do crescimento.

Associados à floculação alcalina, polímeros orgânicos podem ser usados para tornar o processo ainda mais eficiente. Como observado por Knuckey et al. (2006), que aplicaram com sucesso um polímero não iônico derivado de poliacrilamida (Magnafloc), após um ajuste de pH da cultura entre 10 e 10,6 usando NaOH, foi alcançada eficiência de floculação próxima a 80% para as microalgas: *Chaetoceros calcitrans*, *C. muelleri*, *Thalassiosira pseudonana*, *Attheya septentrionalis*, *Nitzschia closterium*, *Skeletonema sp.*, *Tetraselmis suecica* e *Rhodomonas salina*. Sales e Abreu (2015) também obtiveram alta eficiência da floculação alcalina associada ao polímero orgânico Flopam (derivado de poliacrilamida) para a colheita de *N. oculata* na faixa de pH entre 10,4 – 10,7. Nesse sentido, o uso de sementes de *M. oleifera*, que vem sendo muito discutido na literatura com resultados promissores na colheita de microalgas, como evidenciado por Kandasamy; Shaleh (2018) na colheita de *Nannochloropsis sp.* e por Teixeira; Teixeira (2017) e De Moraes et al. (2020) na colheita de *C. vulgaris*. No presente estudo, *M. oleifera* foi aplicada na forma de Extrato Salino da Semente (ESM) também associada à floculação alcalina para a recuperação de células de *H. pluvialis* e *N. oculata*. Apesar de ter atingido resultados satisfatórios na primeira fase de testes, alcançando eficiência superior a outras formas de uso da semente (SM e TSM). O ESM quando aplicado em Jar Test não alcançou o mesmo nível de eficiência de floculação da espécie dulcícola, mesmo após o tempo de sedimentação de 90 minutos. E quando aplicado à espécie marinha promoveu apenas um pequeno aumento em relação à floculação alcalina isolada.

A aplicação de Tanfloc SG (TSG), por outro lado, promoveu bons resultados para ambas espécies e demonstrou eficiência independente do pH da suspensão celular, mesmo em cultura com alta salinidade (35 PSU). Estes resultados são considerados muito promissores, principalmente pelo bom desempenho em meio marinho e por não ser necessário o ajuste de pH, pois para este ajuste é necessária maior concentração de base devido aos efeitos de tamponamento do meio contendo sal. O Tanfloc tem uma alta densidade de carga catiônica característica, conforme demonstrado por Barrado-Moreno; Beltran-Heredia; Martín-Gallardo (2016b), e por ser um polímero orgânico natural de cadeia longa, este flocculante pode interagir simultaneamente com muitas células microalgais por meio da neutralização de cargas e um mecanismo de ponte (HAMEED et al., 2016). A título de comparação do comportamento geral, outros autores comprovaram a eficiência do uso de Tanfloc para a colheita de microalgas, como estudos desenvolvidos por Roselet et al. (2017), que alcançaram resultados em

torno de 98% de eficiência de floculação de *N. oculata* aplicando 10 mg.L⁻¹ do floculante em meio de cultivo de baixa salinidade (10 PSU) e em pH 6. Resultados eficientes também foram observados nos estudos de Hou et al. (2018), para a colheita da microalga *Microcystis aeruginosa* utilizando Tanfloc em uma concentração de 10,42 mg.L⁻¹. No presente estudo, foi alcançada alta eficiência de colheita da biomassa de *H. pluvialis* e *N. oculata* com baixa dose de Tanfloc SG, apenas 0,6 mg.L⁻¹ e 1,2 mg.L⁻¹, respectivamente; resultado altamente relevante pois, geralmente, doses baixas são necessárias apenas quando polímeros sintéticos inorgânicos são empregados (t'LAM et al., 2014).

Avaliação da extração de Lipídios totais e de Carotenoides totais

As biomassas liofilizadas foram analisadas a fim de verificar se o uso dos floculantes selecionados interfeririam na recuperação de compostos de interesse comercial. Os teores em lipídios totais e carotenoides totais das amostras colhidas por floculação foram comparados aos obtidos das amostras recuperadas por centrifugação (condição controle), que se presume não afetar no processo de extração ou, de alguma forma, o conteúdo intracelular. Foram realizadas análises em triplicata de cada experimento, denominados experimentos 1, 2 e 3.

Os resultados de lipídios totais evidenciaram um menor percentual obtido nas biomassas floculadas comparadas à biomassa recuperada apenas por centrifugação. Onde, para *H. pluvialis* (Figura 20), foi obtido um percentual de 36,20 ± 0,32% para a situação controle e 25,91 ± 0,07% para a biomassa obtida da floculação com TSG. Já a espécie marinha (Figura 21) apresentou, para as condições: Controle, Floculação Alcalina, ESM e TSG, percentuais de 19,56 ± 0,26%, 6,68 ± 0,59%, 8,08 ± 0,68% e 13,17 ± 0,33%, respectivamente.

Figura 21: Gráfico do percentual de lipídios totais de *Haematococcus pluvialis*, das biomassas obtidas da Centrifugação (Controle) e da floculação com Tanfloc SG (TSG).

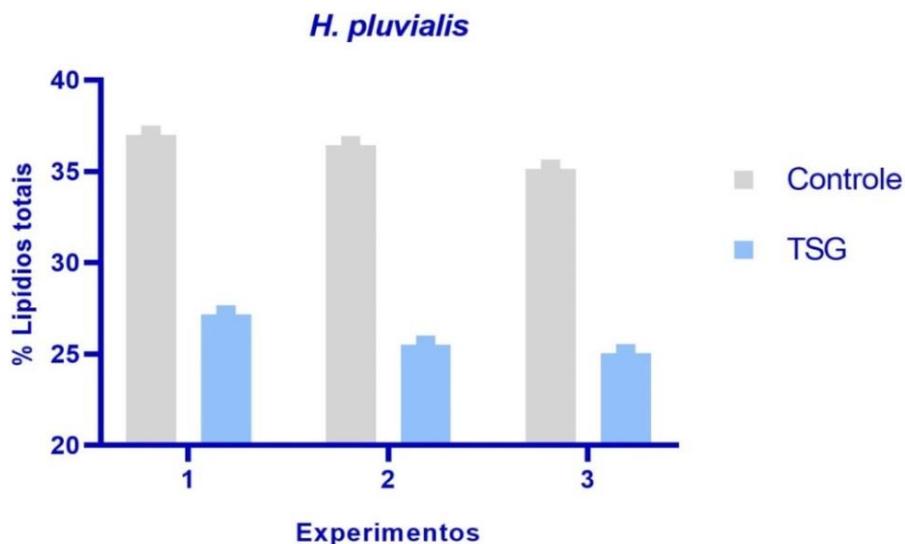
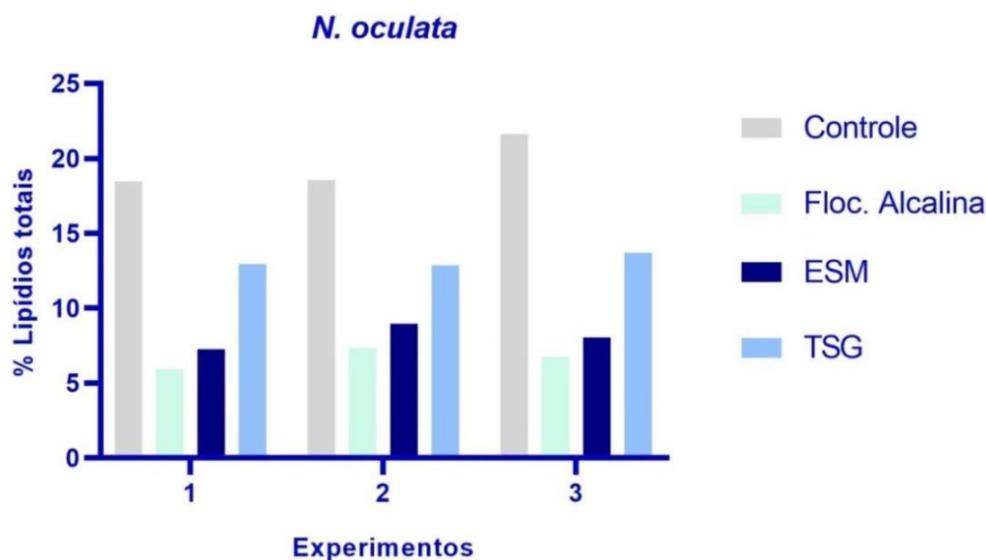


Figura 22: Gráfico do percentual de lipídios totais de *Nannochloropsis oculata*, das biomassas obtidas da Centrifugação (Controle), Floculação Alcalina, Extrato Salino da Semente de *Moringa oleifera* (ESM) e Tanfloc SG (TSG).



O teor em lipídios totais de microalgas é específica de cada espécie, sendo que as algas mais conhecidas (*Chlorella*, *Dunaliella*, *Haematococcus*, *Isochrysis*, *Nannochloris*, *Nannochloropsis*, *Neochloris*, *Nitzschia*, *Porphyridium*, *Schizochytrium*, *Tetraselmis*) apresentam níveis de óleo entre 20 e 50% (MATA; MARTIN; CAETANO, 2010). Diversos estudos demonstraram que fatores ambientais como temperatura, luz, pH, salinidade e estado nutricional do meio de cultura não afetam

apenas a fotossíntese e a produtividade das células de algas, mas também influenciam a composição celular dinâmica (HUANG et al., 2014). Portanto, é possível manipular o conteúdo intracelular das microalgas, otimizando as condições de cultura (temperatura e intensidade de luz) e/ou as características do meio de cultivo (disponibilidade de nutrientes, salinidade) (BORGES et al., 2011). O teor de lipídios totais obtidos da biomassa centrifugada (controle) de *H. pluvialis* foi comparado ao encontrado por Damiani et al. (2010). Os autores observaram um percentual de 34,85% em um cultivo sob alta intensidade de luz contínua e sem privação de nutrientes, valores próximos aos esperados para células de *H. pluvialis* em condições de estresse, as quais podem acumular até 40% em lipídios totais na massa seca (SHAH et al., 2016). Para a espécie marinha, com base na literatura, os valores percentuais de lipídios totais variam de 7 a 29% (MATA; MARTIN; CAETANO, 2010). Converte et al. (2009) observaram um aumento no teor lipídico de *N. oculata* de 7,90 para 14,92% quando a temperatura do cultivo passou de 20 para 25°C. Dessa forma, os resultados obtidos no presente estudo estão dentro do esperado para a espécie, nas condições de cultivo utilizadas.

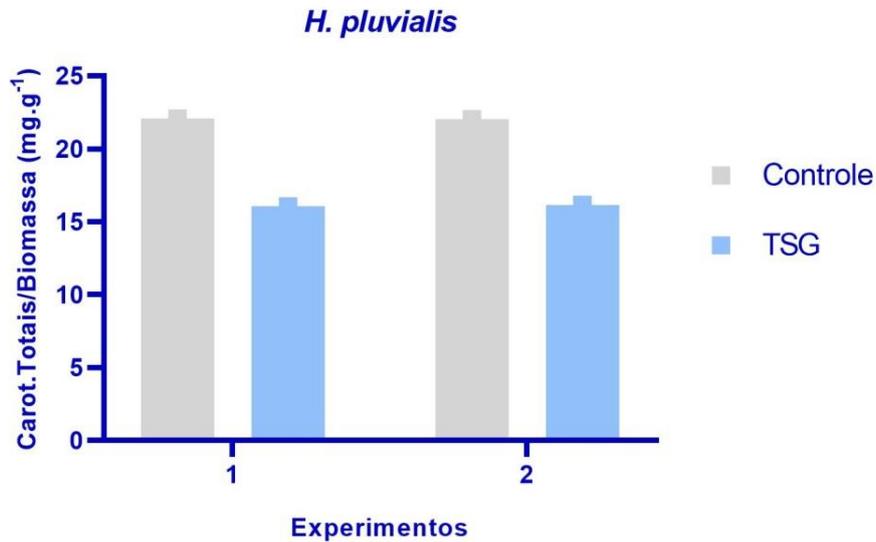
A floculação com TSG, apesar de ter se mostrado altamente eficaz para ambas espécies, promovendo eficiência de floculação superior a 98%, apresentou uma redução no teor de lipídios totais em relação ao controle, tanto para a espécie dulcícola quanto para a espécie marinha. Resultados corroborados por De Moraes et al., (2020), os quais obtiveram um menor teor de lipídios totais da biomassa de *C. vulgaris* floculada com Tanfloc SG comparada à biomassa obtida por centrifugação. Os autores observaram as células em microscópio após o processo de floculação e concluíram não haver indicativo de rompimento da membrana. Hou et al. (2018) também aplicaram Tanfloc para a recuperação de células de microalgas (*Microcystis aeruginosa*) obtendo alta eficiência de floculação. No entanto, os autores observaram que, durante o armazenamento dos flocos, Tanfloc inicialmente protegeu as células revestindo-as, mas após 8 dias ocorreu lise celular em grande escala pela decomposição do floculante. Embora os estudos de Hou et al. (2018) não tenham detalhado as condições de armazenamento da biomassa, esta decomposição do floculante pode explicar o ocorrido no presente estudo, uma vez que a biomassa seca foi armazenada em congelador por mais de 30 dias para as análises. Assim, estudos mais aprofundados são necessários.

Os resultados do percentual de lipídios totais da biomassa de *N. oculata* obtidas por floculação alcalina e desta associada ao ESM não apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) e apresentaram um teor menor que o obtido da condição controle

e com a utilização de TSG. Resultados corroborados por Lemos et al. (2016), os quais observaram que a floculação com NaOH causou uma redução significativa no conteúdo lipídico de *Acutodesmus obliquus*; e por Borges et al. (2016), os quais demonstraram que a floculação com NaOH interferiu fortemente na extração de lipídios e no perfil de ácidos graxos de *N. oculata*, mesmo após lavagem da biomassa. A hipótese dos autores é que o NaOH interage com a biomassa, ligando-se à membrana/parede celular, formando uma “camada” que impede a atividade do solvente orgânico e a extração de lipídios. Embora tenham sido utilizados métodos de extração diferentes nos estudos citados, os quais utilizaram metodologia segundo Bligh; Dyer (1959), a técnica assemelha-se ao proposto por Folch et al. (1957), onde ambas metodologias são baseadas na mistura binária de clorofórmio e metanol.

Assim como o teor lipídico, o teor em carotenoides totais obtidos das biomassas floculadas apresentaram uma redução em relação à biomassa recuperada por centrifugação (Controle), conforme apresentado na Figura 22, das biomassas de *H. pluvialis* e Figura 23, das biomassas de *N. oculata*. O teor de carotenoides totais de *H. pluvialis* obtido da biomassa Controle foi de $24,70 \pm 1,06 \text{ mg.g}^{-1}$ de biomassa seca, já da biomassa obtida via floculação com TSG foi de $18,06 \pm 0,65 \text{ mg.g}^{-1}$. Mesquita (2018), em seus experimentos com *H. pluvialis* obtiveram um teor em carotenoides totais na biomassa seca de $11,51 \text{ mg.g}^{-1}$, resultados superiores a $3,5 \text{ mg.g}^{-1}$ obtidos por Goksan; Ak (2006) ao cultivarem a espécie em frascos tubulares de 5 L de capacidade e $170 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Portanto, a aplicação do floculante TSG, mesmo acarretando um menor teor de carotenoides totais obtido após a extração, se mostra eficiente quando comparado à literatura. O aumento substancial do teor em carotenoides totais no presente estudo quando comparado aos resultados encontrados na literatura, pode ser justificado, possivelmente, pelo cultivo em duas fases - uma fase de crescimento sob intensidade de $200 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e uma fase de indução à carotenogênese sob $400 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

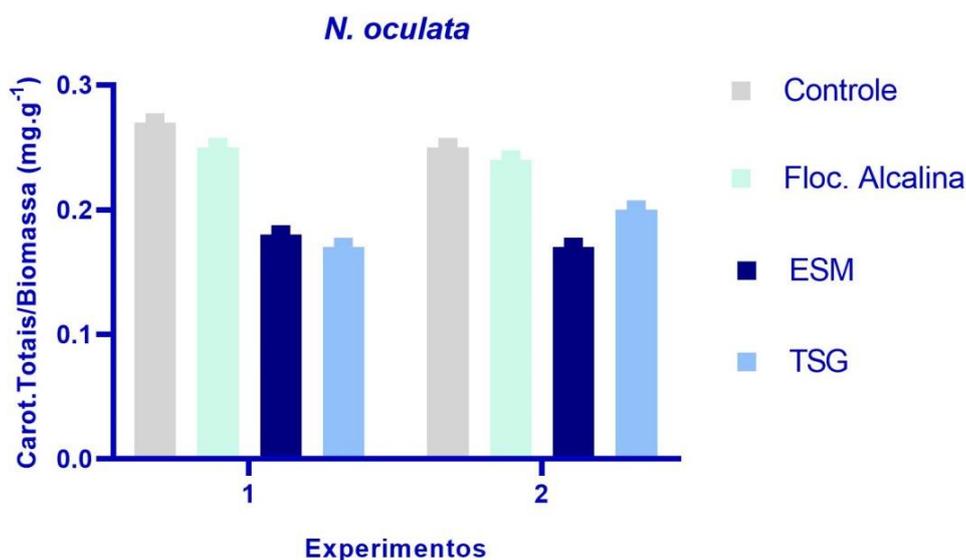
Figura 23: Gráfico da produção de carotenoides totais na biomassa de *Haematococcus pluvialis*, das biomassas obtidas da Centrifugação (Controle) e da floculação com Tanfloc SG (TSG).



O teor de carotenoides totais de *N. oculata* obtido das biomassas floculadas e da biomassa obtida apenas por centrifugação, variaram de $0,30 \pm 0,01 \text{ mg.g}^{-1}$ em biomassa seca para a condição controle, $0,28 \pm 0,02 \text{ mg.g}^{-1}$ para a biomassa obtida via floculação alcalina, $0,20 \pm 0,02 \text{ mg.g}^{-1}$ para a biomassa floculada com ESM e $0,21 \pm 0,02 \text{ mg.g}^{-1}$ para a biomassa obtida por floculação com TSG. Estes resultados estão próximos aos relatados por Neto; Mendes; Abreu (2018) para esta mesma espécie. Os autores avaliaram a viabilidade de produção de pigmentos de *N. oculata* em meios de cultivo de baixo custo (fertilizantes e efluentes de aquicultura) comparado-os aos resultados obtidos em meio F/2, e obtiveram um teor em carotenoides totais na biomassa seca de $0,31 \text{ mg.g}^{-1}$ em meio F/2, $0,21$ e $0,27 \text{ mg.g}^{-1}$ nos meios de cultura de baixo custo.

Apesar da concentração de pigmentos em *N. oculata* não ser tão alta quanto em outras espécies, como *H. pluvialis*, por exemplo, a espécie marinha tem uma elevada taxa de crescimento e pode produzir uma ampla gama de pigmentos em intervalos de tempo curtos (LUBIAN et al., 2000). Os resultados obtidos da biomassa controle e da biomassa obtida por floculação alcalina não apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$). Assim, a floculação pela indução do pH, pela adição de NaOH, pode ser considerada eficiente para a produção de biomassa de *N. oculata* visando a produção de pigmentos.

Figura 24: Gráfico da produção de carotenoides totais na biomassa de *Nannochloropsis oculata*, das biomassas obtidas da Centrifugação (Controle), Floculação Alcalina, Extrato Salino da Semente de *Moringa oleifera* (ESM) e Tanfloc SG (TSG).



Avaliação da reutilização do meio residual para novo ciclo de cultivo

Os meios residuais que não foram suplementados com nitrato e fosfato (o que os faria apresentar condição nutricional similar aos respectivos meios de cultura inicial) não suportaram o crescimento de *H. pluvialis* e *N. oculata*, exceto o meio residual da floculação mediada por TSG no cultivo da espécie marinha (Figura 24).

As curvas de crescimento de *H. pluvialis* estão apresentadas na Figura 25, em meio WC (condição inicial – estéril) e em meio residual obtido da centrifugação (controle) com suplementação de nutrientes; segundo análise estatística, não foram encontradas diferenças significativas ($p < 0,05$) ao se comparar o crescimento entre os meios. O meio residual proveniente da floculação utilizando Tanfloc (TSG) não suportou o crescimento das células, incluindo o meio residual ao qual foram adicionados nutrientes.

Por outro lado, o cultivo de *N. oculata* em meios residuais suplementados obtidos da centrifugação e da floculação suportaram o crescimento das células, conforme representado na Figura 26. Ao final do cultivo verificou-se que não houve diferença significativa no crescimento das células em meios residuais comparados ao meio F/2 ($p < 0.05$). A estratégia de ajustar o pH do meio residual da floculação alcalina e da floculação alcalina associado ao ESM para as condições do cultivo inicial (F/2) e, em seguida, suplementar com nutrientes permitiu que os meios de cultura mantivessem

um crescimento de *N. oculata* aproximado àquele do meio estéril. E para os meios residuais provenientes da floculação com TSG, não foram necessários ajustes de pH.

A possibilidade de reutilização do sobrenadante da floculação usando sementes de *M. oleifera*, também foi demonstrada para o crescimento de *C. vulgaris* (DE MORAES et al., 2020), bem como da floculação alcalina (NaOH) para *C. vulgaris*, *Scenedesmus* sp., *Chlorococcum* sp. e *P. tricornutum* (WU et al. 2012). Ainda mais interessante, foram os resultados obtidos do meios reciclados recuperados pela floculação utilizando TSG, que favoreceram o crescimento das células mesmo sem a suplementação de nutrientes. Além disso, não gerou uma mudança significativa no pH; portanto, não foi necessário ajustar o pH do meio residual para ser utilizado para novo ciclo de cultivo. Resultados corroborados por Hesse et al. (2017), os quais avaliaram os efeitos da reutilização de meio residual para novos ciclos de cultivo de *Acutodesmus obliquus*, utilizando efluente suíno como meio de cultura, recuperado por floculação com Tanfloc SG. Os autores concluíram que o meio resultante da floculação mostrou efeitos positivos no crescimento das algas e aumentou a produtividade da biomassa em comparação com o controle e, destacaram ainda, os efeitos positivos no crescimento das algas mesmo após o terceiro ciclo de reaproveitamento. Esses resultados são relevantes para a diminuição de custos associados à produção da biomassa de microalgas e para garantir maior sustentabilidade do processo.

Figura 25: Culturas de *Nannochloropsis oculata* no último dia de cultivo em meios residuais - à esquerda duplicata com suplementação de nutrientes e, à direita duplicata sem suplementação de nutrientes. (A) Meio residual obtido após a Centrifugação (Controle). (B) Meio residual obtido após a Floculação Alcalina. (C) Meio residual obtido após floculação com Extrato Salino de Semente de Moringa oleifera (ESM). (D) Meio residual obtido após floculação com Tanfloc SG (TSG).

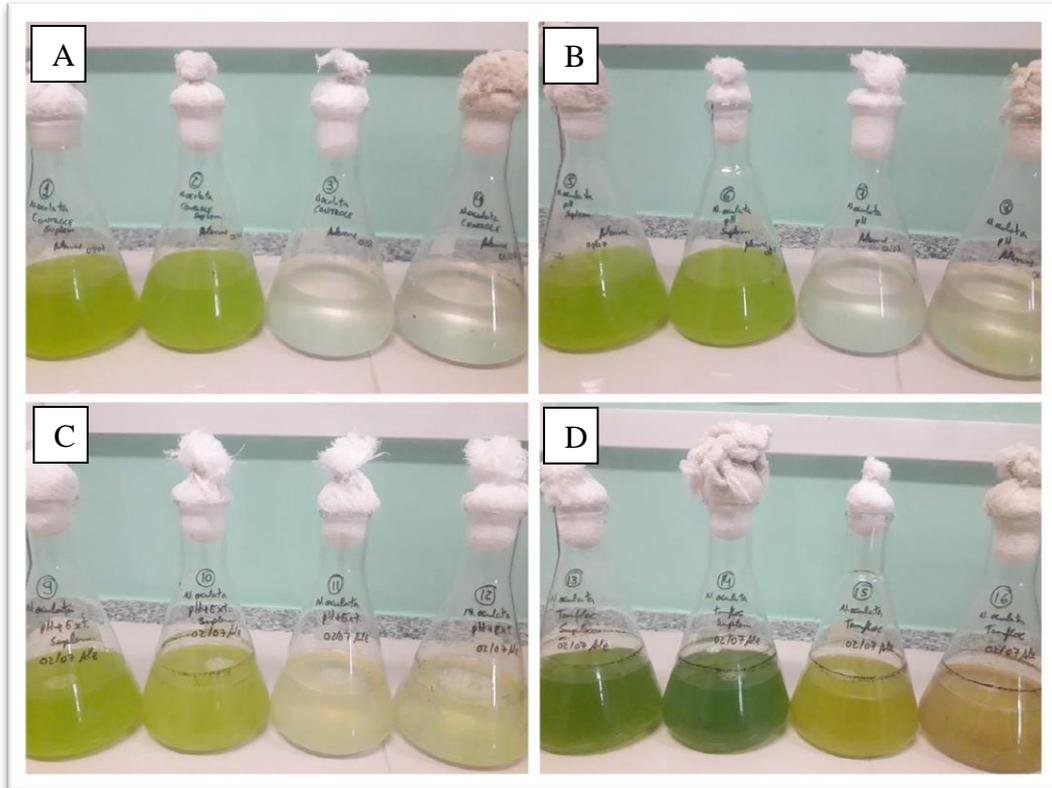


Figura 26: Crescimento das culturas de *Haematococcus pluvialis* em meio WC e em meio residual obtido da Centrifugação (Controle) com suplementação (nitrato e fosfato). Crescimento acompanhado por citometria de fluxo.

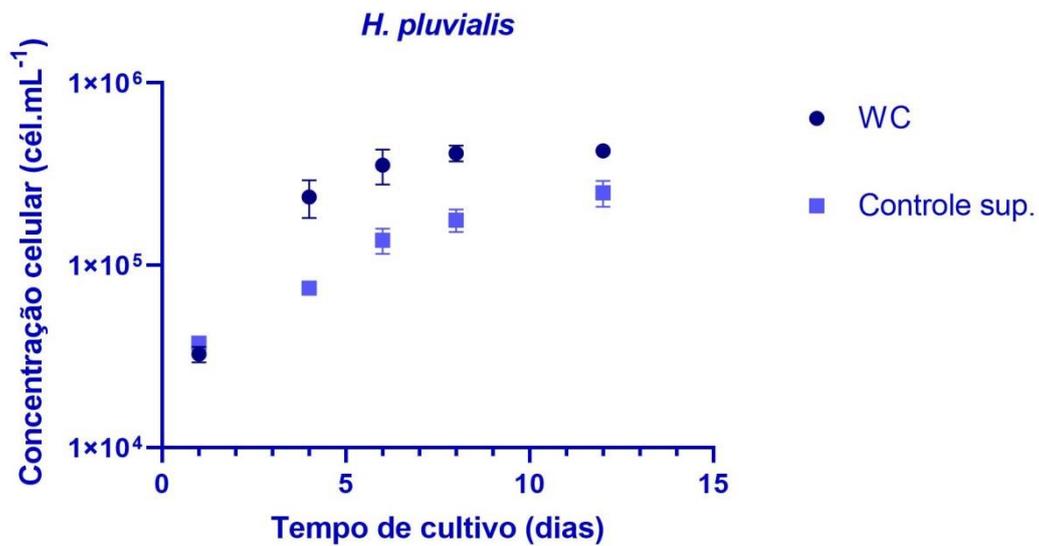
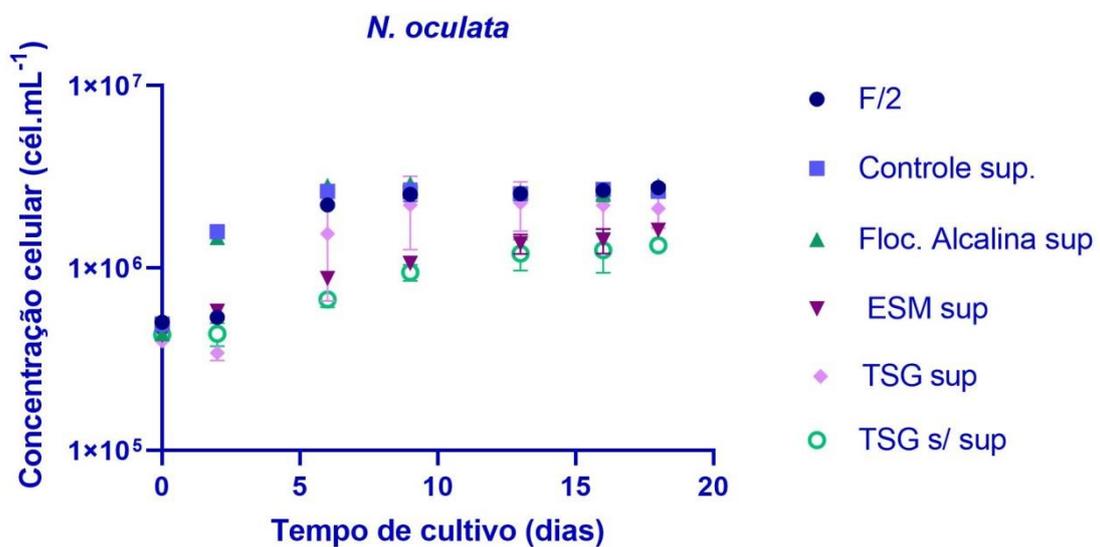


Figura 27: Crescimento das culturas de *Nannochloropsis oculata* em meio F/2 e em meios residuais obtidos da: Centrifugação (Controle) com suplementação (nitrato e fosfato), da Floculação Alcalina com suplementação, da floculação com Extrato Salino da Semente de *Moringa oleifera* (ESM) com suplementação, da floculação com Tanfloc SG (TSG) com suplementação e sem suplementação. Crescimento acompanhado por citometria de fluxo.



CONCLUSÕES

Através das análises do planejamento fatorial 2^3 , foi possível determinar os efeitos dos fatores (principais e de interação) significativos na eficiência de floculação de *H. pluvialis* e *N. oculata* utilizando biofloculantes derivados de semente de *M. oleifera* (SM, TSM e ESM) e o produto comercial Tanfloc SG (TSG), onde concluiu-se que os flocculantes Extrato Salino da Semente de *M. oleifera* (ESM) associados à floculação alcalina (pela adição de NaOH) e Tanfloc SG (TSG) promoveram melhores resultados para ambas microalgas e a floculação alcalina também se mostrou eficiente para a recuperação da biomassa da microalga marinha.

Os experimentos em Jar Test demonstraram que o flocculante biodegradável TSG gerou a maior eficiência de recuperação da biomassa das duas espécies de microalgas, apresentando eficiências de floculação superiores a 98%. O teor de lipídios totais da biomassa floculada com TSG apresentou uma redução em relação à biomassa centrifugada (controle). No entanto, quando comparados à literatura, os resultados foram considerados satisfatórios. O flocculante ESM foi eficaz apenas para a espécie marinha, e em pH 10.5. Embora a floculação alcalina e esta associado ao ESM tenham apresentado resultados de eficiência de floculação superior a 97% para *N. oculata*, o teor de lipídios totais apresentou uma redução significativa comparada à condição controle. Entretanto, nas extrações de carotenoides totais, a biomassa obtida por floculação alcalina não apresentou diferença significativa comparada à biomassa controle ($p < 0.05$). Portanto, a escolha do flocculante depende da aplicação da biomassa e dos bioprodutos de interesse. Além disso, é importante ressaltar que o teor do conteúdo intracelular de *N. oculata* pode ter sido subestimado pela presença de sais na biomassa seca, pois o teor de sal superestima a biomassa concentrada total.

Em relação à reutilização dos meios de cultura para novo ciclo de cultivo, para *H. pluvialis* apenas o meio residual obtido da centrifugação (controle) suplementado com nutrientes promoveu o crescimento das células, com crescimento próximo ao do meio estéril (WC). Já para *N. oculata*, o reuso de todos os meios de cultura obtidos após o processo floculação e de centrifugação em que foram suplementados com nutrientes, conforme condição inicial, promoveram o crescimento da microalga marinha comparado ao do meio F/2, inclusive o meio residual obtido da floculação com TSG sem suplementação. Esses resultados são importantes para reduzir a pegada hídrica e diminuir o custo da produção de biomassa de microalgas.

Perspectivas Futuras

- Analisar o perfil de ácidos graxos das biomassas obtidas da floculação, pois podem diferir significativamente quando tratadas com diferentes tipos de floclulantes;
- Analisar a concentração e composição dos pigmentos das biomassas obtidas da floculação;
- Analisar as biomassas obtidas dos cultivos em meios residuais quanto ao teor de carotenoides e perfil pigmentar bem como, os lipídios totais e perfil de ácidos graxos;
- Caracterizar as biomassas recuperadas por floculação e as biomassas obtidas dos cultivos em meios residuais - por análise de EDX (espectroscopia de raios X por dispersão em energia) para examinar a composição elementar dos flocos das microalgas;
- Avaliar a influência de períodos de armazenamento da biomassa obtida por floculação com Tanfloc SG e sua interferência na extração do conteúdo intracelular.

BIBLIOGRAFIA

- ALALWAN, H.A., ALMINSHID, A.H., ALJAAFARI, H.A.S. (2019). Promising evolution of biofuel generations . Subject review. **Reinforced Plastics** 28, 127–139. <https://doi.org/10.1016/j.ref.2018.12.006>
- ALCÁZAR-ALAY, S. C., & MEIRELES, M. A. A. (2015). Physicochemical properties, modifications and applications of starches from different botanical sources. **Food Science and and Technology**, 35(2), 215-236.
- ALGAEBASE. Disponível em: <https://www.algaebase.org/search/species/>. Acesso em: 10/04/2019
- ALESSANDRO, E.B.D., ANTONIOSI, N.R. (2016). Concepts and studies on lipid and pigments of microalgae : A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews** 58, 832–841. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.12.162>
- ALI, M., MUSTAFA, A., SALEEM, M. (2019). Comparative Study between Indigenous Natural Coagulants and Alum for Microalgae Harvesting. **Arabian Journal for Science and Engineering** 44, 6453–6463. <https://doi.org/10.1007/s13369-018-3681-5>
- ALMOMANI, F., AL KETIFE, A., JUDD, S., SHURAIR, M., BHOSALE, R. R., ZNAD, H., & TAWALBEH, M. (2019). Impact of CO2 concentration and ambient conditions on microalgal growth and nutrient removal from wastewater by a photobioreactor. **Science of The Total Environment**, 662, 662-671.
- AMINUL, M., HEIMANN, K., BROWN, R.J. (2017). Microalgae biodiesel : Current status and future needs for engine performance and emissions. **Renewable and Sustainable Energy Reviews** 79, 1160–1170. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.05.041>
- ANDERSEN, R.A., BREW, R.W., POTTER, D., SEXTON, J.P. (1998). Phylogeny of the Eustigmatophyceae Based upon 18S rDNA , with Emphasis on Nannochloropsis. **Protist** 149, 61–74. [https://doi.org/10.1016/S1434-4610\(98\)70010-0](https://doi.org/10.1016/S1434-4610(98)70010-0)
- ANDRADE, D.S., COLOZZI FILHO, A. (2014). Microalgas de águas continentais: Potencialidades e desafios do cultivo, Microalgas de águas continentais. Editora IAPAR
- ANEY, J. S., RASHMI, T., MAUSHUMI, K., & KIRAN, B. (2009). Pharmacological and pharmaceutical potential of Moringa oleifera: a review. **Journal of Pharmacy Research**, 2(9), 1424-1426.
- ANP (Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biodiesel). Disponível em: < <http://www.anp.gov.br/biocombustiveis>>. Acesso em: 10/02/2020
- ANWAR, F., LATIF, S., ASHRAF, M., GILANI, A.H. (2007). Moringa oleifera: A food plant with multiple medicinal uses. **Phytotherapy Research**. <https://doi.org/10.1002/ptr.2023>

- APONE, F., BARBULOVA, A., COLUCCI, M.G. (2019). Plant and Microalgae Derived Peptides Are Advantageously Employed as Bioactive Compounds in Cosmetics. **Frontiers in plant science**, 10, 756. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00756>
- ARO, E. (2016). From first generation biofuels to advanced solar biofuels. **Ambio** 45, 24–31. <https://doi.org/10.1007/s13280-015-0730-0>
- AZEVÊDO, L. C.; SÁ, A,S,C,; ROVANI, S.; FUNGARO, D.A. (2018). Propriedades do amido e suas aplicações em biopolímeros. **Cadernos de Prospecção**, [S.l.], v. 11, p. 351-358, 2018.
- BARRADO-MORENO, M.M., BELTRAN-HEREDIA, J., MARTÍN-GALLARDO, J. (2016^a). Microalgae removal with Moringa oleifera. **Toxicon** 110, 68–73. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.12.001>
- BARRADO-MORENO, M.M., BELTRÁN-HEREDIA, J., MARTÍN-GALLARDO, J. (2016^b). Microalgal removal with natural coagulants. **Phycologia** 55 (6), 688–695.
- BARROS, A.I., GONÇALVES, A.L., SIMÕES, M., PIRES, J.C.M. (2015). Harvesting techniques applied to microalgae: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews** 41, 1489–1500. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.09.037>
- BATISTA, A.P., AMBROSANO, L., GRAÇA, S., SOUSA, C., MARQUES, P.A.S., RIBEIRO, B., BOTREL, E.P., NETO, P.C., GOUVEIA, L. (2014) Combining urban wastewater treatment with biohydrogen production – an integrated microalgae-based approach, **Bioresource Technology**. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.10.064>
- BECKER, E. W. (2004). Microalgae in human and animal nutrition. In: Richmond A, editor. **Handbook of Microalgal Culture. Biotechnology and Applied Phycology**. Oxford: Blackwell Science, p.312-51.
- BEHERA, B., BALASUBRAMANIAN, P. (2019). Natural plant extracts as an economical and ecofriendly alternative for harvesting microalgae. **Bioresource Technology** 283, 45–52. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.03.070>
- BELTRÁN-HEREDIA, J., SÁNCHEZ-MARTÍN, J., DÁVILA-ACEDO, M.A. (2011). Optimization of the synthesis of a new coagulant from a tannin extract. **Journal of Hazardous Materials** 186, 1704–1712. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.12.075>
- BESSON, A.; GUIRAUD, P. (2013). High-pH-induced flocculation–flotation of the hypersaline microalga *Dunaliella salina*. **Bioresource technology**, 147, 464-470.
- BEUCKELS, A., DEPRAETERE, O., VANDAMME, D., FOUBERT, I., SMOLDERS, E., MUYLAERT, K. (2013). Influence of organic matter on flocculation of *Chlorella vulgaris* by calcium phosphate precipitation. **Biomass and Bioenergy** 54, 107–114. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2013.03.027>
- BHATIA, R. K., SAKHUJA, D., MUNDHE, S., & WALIA, A. (2020). Renewable Energy Products through Bioremediation of Wastewater. **Sustainability**, 12(18),

7501.

- BHATTACHARJEE, S., ZHAO, Y., HILL, J. M., PERCY, M. E., & LUKIW, W. J. (2014). Aluminum and its potential contribution to Alzheimer's disease (AD). **Frontiers in aging neuroscience**, *6*, 62.
- BHUVANA, P., SANGEETHA, P., ANURADHA, V., ALI, M.S. (2019). Biocatalysis and Agricultural Biotechnology Spectral characterization of bioactive compounds from microalgae: *N . Oculata* and *C . Vulgaris*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology** *19*, 101094. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101094>
- BILANOVIC, D., SHELEF, G., SUKENIK, A. (1988). Flocculation of Microalgae with Cationic Polymers -- Effects of Medium Salinity Algal growth conditions. **Biomass**. v. 17, p. 65–76.
- BLIGH, E. G. & DYER, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry**, *37* (8): 911-917.
- BLOCKX, J., VERFAILLIE, A., THIELEMANS, W., MUYLAERT, K. (2018). Unravelling the Mechanism of Chitosan-Driven Flocculation of Microalgae in Seawater as a Function of pH. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering** *6*, 11273–11279. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.7b04802>
- BORGES, L., MORÓN-VILLARREYES, J. A., D'OCA, M. G. M., & ABREU, P. C. (2011). Effects of flocculants on lipid extraction and fatty acid composition of the microalgae *Nannochloropsis oculata* and *Thalassiosira weissflogii*. **Biomass and Bioenergy**, *35*(10), 4449-4454.
- BORGES, L., CALDAS, S., D'OCA, M. G. M., & ABREU, P. C. (2016). Effect of harvesting processes on the lipid yield and fatty acid profile of the marine microalga *Nannochloropsis oculata*. **Aquaculture Reports**, *4*, 164-168.
- BOROWITZKA, M. A. (2013). High-value products from microalgae—their development and commercialisation. **Journal of applied phycology**, *25*(3), 743-756. <https://doi.org/10.1007/s10811-013-9983-9>
- BOUSSIBA, S. (2000). Carotenogenesis in the green alga *Haematococcus pluvialis*: Cellular physiology and stress response. **Physiologia Plantarum** *108*, 111–117.
- BRACHARZ, F., HELMDACH, D., ASCHENBRENNER, I., FUNCK, N., WIBBERG, D., WINKLER, A., BRÜCK, T. B. (2018). Harvest of the oleaginous microalgae *Scenedesmus obtusiusculus* by flocculation from culture based on natural water sources. **Frontiers in bioengineering and biotechnology**, *6*, 200.
- BRASIL, B. S. A. F.; SILVA, F. C. P.; SIQUEIRA, F. G. (2017). Microalgae biorefineries: The Brazilian scenario in perspective. **New biotechnology**, v. 39, p. 90-98.
- BRATBY, J. (2016). Coagulation and flocculation in water and wastewater treatment. **IWA publishing**.
- BRENNAN, L., OWENDE, P. (2010). Biofuels from microalgae-A review of

technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews** 14, 557–577. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.10.009>

- BURCHARDT, L., BALCERKIEWICZ, S., KOKOCIŃSKI, M., SAMARDAKIEWICZ, S., ADAMSKI, Z. (2006). Occurrence of *Haematococcus pluvialis* Flotow emend. Wille in a small artificial pool on the university campus of the Collegium Biologicum in Poznań (Poland). **Biodiversity: Research and Conservation**, (1-2), 163-166.
- CALDEIRA, M. V. W., SCHUMACHER, M.V., SANTOS, E.M., VIEGAS, J., PEREIRA, J.C.. (1998). Quantificação de tanino em três povoamentos de *Acacia mearnsii* De Wild. **Boletim de Pesquisa Florestal**, n. 37, p. 81-88.
- CALDEIRA, M. V. W., SCHUMACHER, M.V., TEDESCO, N., SANTOS, E.M. (2000). Ciclagem de nutrientes em *Acacia mearnsii* De Wild. V. Quantificação do conteúdo de nutrientes na biomassa aérea de *Acacia mearnsii* de Wild. procedência australiana. **Ciência Rural**, n. 30, v. 6, p. 977- 982.
- CALIXTO, C.D., DA SILVA SANTANA, J.K., TIBÚRCIO, V.P., DE PONTES, L. DE F.B.L., DA COSTA SASSI, C.F., DA CONCEIÇÃO, M.M., SASSI, R. (2018). Productivity and fuel quality parameters of lipids obtained from 12 species of microalgae from the northeastern region of Brazil. **Renewable Energy** 115, 1144–1152. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2017.09.029>
- CASTRILLO, M., LUCAS-SALAS, L.M., RODRÍGUEZ-GILA, C., MARTÍNEZ, D. (2013). High pH-induced flocculation–sedimentation and effect of supernatant reuse on growth rate and lipid productivity of *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella vulgaris*. **Bioresource Technology**. 128, 324–329.
- CASTRO, R. P. Desenvolvimento de Bioprodutos Inovadores derivados da Moringa (*Moringa Oleifera* Lamarck. 2017. 61 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciência Tecnologia e Inovação, Escola de Ciências Tecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal. 61p.Brasil
- CASTRO, F. C. Ambiente: Polímero orgânico natural trata água e efluentes. Disponível em: <<https://www.quimica.com.br/ambiente-polimetro-organico-natural-trata-agua-e-efluentes/>>. Acesso em: 04/03/2019.
- CHATSUNGNOEN, T., CHISTI, Y. (2016). Harvesting microalgae by flocculation – sedimentation. **ALGAL** 13, 271–283. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.12.009>
- CHEKANOV, K., LOBAKOVA, E., SELYAKH, I., SEMENOVA, L., SIDOROV, R., AND SOLOVCHENKO, A. (2014). Accumulation of astaxanthin by a new *Haematococcus pluvialis* strain BM1 from the White Sea coastal rocks (Russia). **Marine Drugs**. 12, 4504–4520. doi: 10.3390/md12084504
- CHEN, L., WANG, C., WANG, W., WEI, J. (2013). Optimal conditions of different flocculation methods for harvesting *Scenedesmus* sp. Cultivated in an open-pond system. **Bioresource Technology** 133, 9–15. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.01.071>

- CHIARAMONTI, D., PRUSSI, M., BUFFI, M., MARIA, A., PARI, L. (2016). Review and experimental study on pyrolysis and hydrothermal liquefaction of microalgae for biofuel production. **Applied Energy** 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2015.12.001>
- CHIEN, Y.H., SHIAU, W.C. (2005). The effects of dietary supplementation of algae and synthetic astaxanthin on body astaxanthin, survival, growth, and low dissolved oxygen stress resistance of kuruma prawn, *Marsupenaeus japonicus* Bate. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, 318, 201–211.
- CHINNASAMY, S., BHATNAGAR, A., HUNT, R. W., & DAS, K. C. (2010). Microalgae cultivation in a wastewater dominated by carpet mill effluents for biofuel applications. **Bioresource Technology**, 101, 3097–3105.
- CHISTI, Y., (2007). Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances** 25, 294–306. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.02.001>
- CONVERTI, A.; CASAZZA, A. A.; ORTIZ, E. Y.; PEREGO, P.; DEL BORGHI, M., (2009). Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 48, n. 6, p. 1146–1151.
- CORAL, L.A., BERGAMASCO, R., BASSETTI, F.J. (2009). Estudo da Viabilidade de Utilização do Polímero Natural (TANFLOC) em Substituição ao Sulfato de Alumínio no Tratamento de Águas para Consumo. **2 International Workshop Advances in Cleaner Production** 1–9.
- CORRÊA, D.O., DUARTE, M.E.R., NOSEDA, M.D. (2019). Biomass production and harvesting of *Desmodesmus subspicatus* cultivated in flat plate photobioreactor using chitosan as flocculant agent. **Journal of Applied Phycology** 31, 857–866. <https://doi.org/10.1007/s10811-018-1586-z>
- CRUZ, A. L. C . F, TEIXEIRA, C. M. L. L., NETO, J. A. A., MENEZES, R. S., (2013). Biodiesel de Microalga: avanços e desafios. **Química Nova**, v. 36, n.3, p. 437-448.
- CRUZ, R. P., SANTIAGO, B. L. S., PEREIRA, E E. L. (2019). Microalgas como matéria-prima na produção de biodiesel: uma revisão. **The Journal of Engineering and Exact Sciences**, vol. 5, nº 3, p. 0244-56, doi:10.18540/jcecv15iss3pp0244-0256.
- DAMIANI, M. C., POPOVICH, C. A., CONSTENLA, D., & LEONARDI, P. I. (2010). Lipid analysis in *Haematococcus pluvialis* to assess its potential use as a biodiesel feedstock. **Bioresource technology**, 101(11), 3801-3807.
- DE MORAES, A. P. J.; TEIXEIRA, C. M. L. L.; FARIA-MACHADO, A. F.; LAGE, C. L. S., (2020). Effects of bioflocculants on lipid extraction, fatty acid composition and reuse of the culture media for biodiesel production using *Chlorella vulgaris*, **Separation Science and Technology**, <https://doi.org/10.1080/01496395.2020.1839097>
- DEGHANI, M.; ALIZADEH, M. H. (2016). The effects of the natural coagulant

Moringa oleifera and alum in wastewater treatment at the Bandar Abbas Oil Refinery. **Environmental Health Engineering and Management Journal**, 3(4), 225-230.

- DEMIRBAS, A., DEMIRBAS, M.F. (2011). Importance of algae oil as a source of biodiesel. **Energy Conversion and Management** 52, 163–170. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2010.06.055>
- DENG, X., GAO, K., ADDY, M., CHEN, P., LI, D., ZHANG, R., LU, Q., MA, Y., CHENG, Y., LIU, Y., RUAN, R. (2018). Growing *Chlorella vulgaris* on mixed wastewaters for biodiesel feedstock production and nutrient removal. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology** 93, 2748–2757. <https://doi.org/10.1002/jctb.5634>
- DERNER, R.B., OHSE, S., VILLELA, M., DE CARVALHO, S.M., FETT, R. (2006). Microalgas, produtos e aplicações. **Ciencia Rural** 36, 1959–1967. <https://doi.org/10.1590/s0103-84782006000600050>
- DINESHBABU, G., GOSWAMI, G., KUMAR, R., SINHA, A., DAS, D. (2019). Microalgae – nutritious , sustainable aqua- and animal feed source. **Journal of Functional Foods** 62, 103545. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103545>
- DOMÍNGUEZ-BOCANEGRA, A.R., GUERRERO LEGARRETA, I., MARTINEZ JERONIMO, F., TOMASINI CAMPOCOSIO, A. (2004). Influence of environmental and nutritional factors in the production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. **Bioresource Technology** 92, 209–214. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2003.04.001>
- ELDRIGE, R. J.; HILL, D. R. A.; GLADMAN, B. R., (2012). A comparative study of the coagulation behaviour of marine microalgae. **Journal of Applied Phycology**. v.24. p.1667–1679. DOI 10.1007/s10811-012-9830-4.
- ELRAYIES, G.M. (2018). Microalgae: Prospects for greener future buildings. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v. 81, p. 1175–1191. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.08.032>
- ENDUT, A.; HAMID, A.S.H., LANANAN, F., KHATOON, H. (2016). Moringa oleifera seed derivatives as potential bio-coagulant for microalgae *Chlorella* sp. harvesting. **Malaysian Journal of Analytical Science** 20, 401–412. <https://doi.org/10.17576/mjas-2016-2002-25>
- ESMAEILI, H., YEGANEH, G., ESMAEILZADEH, F. (2019). Optimization of biodiesel production from Moringa oleifera seeds oil in the presence of nano - MgO using Taguchi method. **International Nano Letters** 9, 257–263. <https://doi.org/10.1007/s40089-019-0278-2>
- FAHEY, J. W. (2005). Moringa oleifera: a review of the medical evidence for its nutritional, therapeutic, and prophylactic properties. Part 1. **Trees for life Journal**, 1(5), 1-15.
- FAROOQ, W., MOON, M., RYU, B. GON, SUH, W.I., SHRIVASTAV, A., PARK, M.S., MISHRA, S.K., YANG, J.W. (2015). Effect of harvesting methods on the

reusability of water for cultivation of chlorella vulgaris, its lipid productivity and biodiesel quality. **Algal Research** 8, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2014.12.007>

FELLER, A.R., MATOS, P., MAZZUTTI, S., MOECKE, E.H.S., TRES, M. V, DERNER, R.B., MOECKE, H.S., TRES, M. V, DERNER, R.B. (2017). Polyunsaturated ω -3 and ω -6 fatty acids, total carotenoids and antioxidant activity of three marine microalgae extracts obtained by supercritical CO₂ and subcritical n-butane. **The Journal of Supercritical Fluids**. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2017.11.015>

FERREIRA, S., SANT, C. (2017). Impact of culture conditions on the chlorophyll content of microalgae for biotechnological applications. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2181-6>

FLATEN, T. P. (2001). Aluminium as a risk factor in Alzheimer's disease, with emphasis on drinking water. **Brain research bulletin**, 55(2), 187-196.

FOLCH, J.; LESS, M. & SLOANE STANLEY, G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. **The Journal of Biological Chemistry**, 26 (1): 497-509.

GALLÃO, M.I.; DAMASCENO, L.F.; BRITO, E.S. (2006). Avaliação química e estrutural da semente de Moringa. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 37, n. 1, p. 106-109, 2006.

GARZA, N. G. G., KOYOC, J. A. C., CASTILLO, J. A. T., ZAMBRANO, E. A. G., ANCONA, D. B., GUERRERO, L. C., & GARCÍA, S. R. S. (2017). Biofunctional properties of bioactive peptide fractions from protein isolates of moringa seed (*Moringa oleifera*). **Journal of food science and technology**, 54(13), 4268-4276.

GARZON-SANABRIA, A.J., DAVIS, R.T., NIKOLOV, Z.L. (2012). Harvesting *Nannochloris oculata* by inorganic electrolyte flocculation: effect of initial cell density, ionic strength, coagulant dosage, and media pH. **Bioresource Technology** 118, 418–424.

GERARDO, M.L., VAN DEN HENDE, S., VERVAEREN, H., COWARD, T., SKILL, S.C. (2015). Harvesting of microalgae within a biorefinery approach: A review of the developments and case studies from pilot-plants. **Algal Research** 11, 248–262. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.06.019>

GERDE, J.A., YAO, L., LIO, J.Y., WEN, Z., WANG, T. (2014). Microalgae flocculation: Impact of flocculant type, algae species and cell concentration. **Algal Research** 3, 30–35. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2013.11.015>

GHEBREMICHAEL, K. A., GUNARATNA, K. R., HENRIKSSON, H., BRUMER, H., & DALHAMMAR, G. (2005). A simple purification and activity assay of the coagulant protein from *Moringa oleifera* seed. **Water research**, 39(11), 2338-2344.

GIORDANO, G. (2004). Tratamento e controle de efluentes industriais. **Revista ABES**, 4(76), 1-84.

- GREENWELL, H.C., LAURENS, L.M.L., SHIELDS, R.J., LOVITT, R.W., FLYNN, K.J. (2010). Placing microalgae on the biofuels priority list: A review of the technological challenges. **Journal of the Royal Society Interface** 7, 703–726. <https://doi.org/10.1098/rsif.2009.0322>
- GRIMA, E. M., BELARBI, E.H., ACIÉN FERNÁNDEZ, F.G., ROBLES MEDINA, A., CHISTI, Y. (2003). Recovery of microalgal biomass and metabolites: Process options and economics. **Biotechnology Advances** 20, 491–515. [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(02\)00050-2](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(02)00050-2)
- GOKSAN, T.; AK, I. (2006). Vegetative growth of the green alga *Haematococcus pluvialis* cultivated in different light-path lengths. **Asian journal of plant sciences**, v. 5, n. 3, p. 455-460.
- GUILLARD, R. R. L. & LORENZEN, C. J. (1972). Yellow-green algae with chlorophyllide. **Journal of Phycology**, 8: 10-4.
- GUILLARD, R. R. L. (1975). Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: SMITH, W. L.; CHANLEY, M. H. **Culture of marine invertebrate animals**. New York: Plenum Publishing Corporation, p. 48-49.
- GUPTA, S. K., KUMAR, N.M., GULDHE, A., AHMAD ANSARI, F., RAWAT, I., NASR, M., BUX, F. (2018). Wastewater to biofuels: Comprehensive evaluation of various flocculants on biochemical composition and yield of microalgae. **Ecological Engineering** 117, 62–68. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2018.04.005>
- GUTIÉRREZ, R., PASSOS, F., FERRER, I., UGGETTI, E., GARCÍA, J. (2015). Harvesting microalgae from wastewater treatment systems with natural flocculants: Effect on biomass settling and biogas production. **Algal Research** 9, 204–211. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.03.010>
- HAMED, I. (2016). The evolution and versatility of microalgal biotechnology: a review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, 15(6), 1104-1123. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12227>
- HAMEED, Y.T., IDRIS, A., HUSSAIN, S.A., ABDULLAH, N. (2016). A tannin-based agent for coagulation and flocculation of municipal wastewater: Chemical composition, performance assessment compared to Polyaluminum chloride, and application in a pilot plant. **Journal of Environmental Management** 184, 494–503. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.10.033>
- HAMID, A.S.H., LANANAN, F., KHATOON, H., JUSOH, A., ENDUT, A. (2016). A study of coagulating protein of *Moringa oleifera* in microalgae bio-flocculation. **International Biodeterioration and Biodegradation** 113, 310–317. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.03.027>
- HAMIDI, N., YANUHAR, U., & WARDANA, I. N. G. (2014). Potential and properties of marine microalgae *Nannochloropsis oculata* as biomass fuel feedstock. **International Journal of Energy and Environmental Engineering**, 5(4), 279-290. <https://doi.org/10.1007/s40095-014-0138-9>

- HAUWA, A., MOHAMED, R.M.S.R., AL-GHEETHI, A.A., WUROCHEKKE, A.A., AMIR HASHIM, M.K. (2018). Harvesting of *Botryococcus* sp. Biomass from Greywater by Natural Coagulants. **Waste and Biomass Valorization** 9, 1841–1853. <https://doi.org/10.1007/s12649-017-9958-1>
- HESSE, M.C.S. Estudo da floculação de microalgas empregando flocculantes naturais. (2016) 76 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba. Brasil
- HESSE, M.C.S.; SANTOS, B.; SELESU, N.F.H.; CORRÊA, D.O.; MARIANO, A.B.; VARGAS, J.V.C.; VIEIRA, R.B. (2017) Optimization of flocculation with tannin-based flocculant in the water reuse and lipidic production for the cultivation of *Acutodesmus obliquus*, **Separation Science and Technology**, 52:5, 936-942, DOI: 10.1080/01496395.2016.1269130
- HO, S., HUANG, S., CHEN, C., HASUNUMA, T., KONDO, A. (2013). Biore source Technology Bioethanol production using carbohydrate-rich microalgae biomass as feedstock. **Bioresource Technology** 135, 191–198. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.015>
- HOEK, C.; MANN, D.; JAHNS, H. M. Algae: an introduction to phycology. **Cambridge university press**, 1995.
- HOSIKIAN, A., LIM, S., HALIM, R., & DANQUAH, M. K. (2010). Chlorophyll extraction from microalgae: a review on the process engineering aspects. **International journal of chemical engineering**. <https://doi.org/10.1155/2010/391632>
- HOU, J.; YANG, Z.; WANG, P.; WANG, C.; YANG, Y.; WANG, X. (2018). Changes in *Microcystis aeruginosa* cell integrity and variation in microcystin-LR and proteins during Tanfloc flocculation and floc storage. **Science of the Total Environment**, 264-273.
- HU, H., & GAO, K. (2003). Optimization of growth and fatty acid composition of a unicellular marine picoplankton, *Nannochloropsis* sp., with enriched carbon sources. **Biotechnology letters**, 25(5), 421-425.
- HUANG, X.; WEI, L.; HUANG, Z.; YAN, J. (2014). Effect of high ferric ion concentrations on total lipids and lipid characteristics of *Tetraselmis subcordiformis*, *Nannochloropsis oculata* and *Pavlova viridis*. **Journal of Applied Phycology**, v. 26, n. 1, p. 105–114.
- HUANG, Y., WEI, C., LIAO, Q., XIA, A., ZHU, X., ZHU, X. (2019). Bioresource Technology Biodegradable branched cationic starch with high C / N ratio for *Chlorella vulgaris* cells concentration: Regulating microalgae flocculation performance by pH. **Bioresource Technology** 276, 133–139. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.12.072>
- HWANG, J. H., CHURCH, J., LEE, S. J., PARK, J., & LEE, W. H. (2016). Use of microalgae for advanced wastewater treatment and sustainable bioenergy generation. **Environmental Engineering Science**, 33(11), 882-897.

- JACOB-LOPES, E., MARONEZE, M. M., DEPRÁ, M. C., SARTORI, R. B., DIAS, R. R., & ZEPKA, L. Q. (2019). Bioactive food compounds from microalgae: an innovative framework on industrial biorefineries. **Current Opinion in Food Science**, 25, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2018.12.003>
- JAVED, F., ASLAM, M., RASHID, N., SHAMAIR, Z. (2019). Microalgae-based biofuels , resource recovery and wastewater treatment : A pathway towards sustainable biorefinery. **Fuel** 255, 115826. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2019.115826>
- KAMATH SB, CHIDAMBAR S, BRINDA BR, KUMAR MA, SARADA R, RAVISHANKAR GA. (2005). Digital image processing-an alternate tool for monitoring of pigment levels in cultured cells with special reference to green alga *Haematococcus pluvialis*. **Biosensors & Bioelectronics**. 15;21(5):768-73. doi: 10.1016/j.bios.2005.01.022. PMID: 16242616.
- KANDASAMY, G.; SHALEH, S.R.M. (2018). Flotation removal of the microalga *Nannochloropsis* sp. using *Moringa* protein-oil emulsion: A novel green approach. **Bioresource Technology**, 247, 327–331.
- KANGAMA, A., ZENG, D., TIAN, X., FANG, J., (2018). Application of Chitosan Composite Flocculant in Tap Water Treatment . **Journal of Chemistry**.
- KATIIYAR, R., ARORA, A. (2020). Health promoting functional lipids from microalgae pool: A review. **Algal Research** 46, 101800. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.101800>
- KHOO, K.S., LEE, S.Y., OOI, C.W., FU, X., MIAO, X. (2019). Bioresource Technology Recent advances in biorefinery of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. **Bioresource Technology** 288, 121606. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121606>
- KIMURA I. Y. (2001). Remoção de corantes reativos contendo grupos vinilsulfona e triazina por adsorção e coagulação/floculação com quitosana. Tese (Doutorado) - Departamento de Química. UFSC, Florianópolis, Brasil.
- KIRNEV, P.C.S., DE CARVALHO, J.C., MIYAOKA, J.T., CARTAS, L.C., VANDENBERGHE, L.P.S., SOCCOL, C.R. (2018). Harvesting *Neochloris oleoabundans* using commercial organic flocculants. **Journal of Applied Phycology** 30, 2317–2324. <https://doi.org/10.1007/s10811-018-1429-y>
- KLEIMAN, R., ASHLEY, D.A., BROWN, J.H. (2008). Short communication Comparison of two seed oils used in cosmetics , moringa and marula. **Industrial Crops and Products**. 8, 361–364. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2008.04.003>
- KNUCKEY, R.M., BROWN, M.R., ROBERT, R., FRAMPTON, D.M.F. (2006). Production of microalgal concentrates by flocculation and their assessment as aquaculture feeds. **Aquacultural Engineering** 35, 300–313. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2006.04.001>
- KOLLER, M., MUHR, A., BRAUNEGG, G. (2014). Microalgae as versatile cellular factories for valued products. **Algal** 6, 52–63.

<https://doi.org/10.1016/j.algal.2014.09.002>

- KOSINKOVA, J., DOSHI, A., MAIRE, J., RISTOVSKI, Z., BROWN, R., RAINEY, T.J. (2015). Measuring the regional availability of biomass for biofuels and the potential for microalgae. **Renewable and Sustainable Energy Reviews** 49, 1271–1285. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.04.084>
- LAAMANEN, C. A., ROSS, G. M., & SCOTT, J. A. (2016). Flotation harvesting of microalgae. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 58, 75-86.
- LAFARGA, T. (2019). Effect of microalgal biomass incorporation into foods: Nutritional and sensorial attributes of the end products. **Algal Research** 41, 101566. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101566>
- LAMA, S., MUYLAERT, K., KARKI, T.B., FOUBERT, I., HENDERSON, R.K., VANDAMME, D. (2016). Flocculation properties of several microalgae and a cyanobacterium species during ferric chloride, chitosan and alkaline flocculation. **Bioresource Technology** 220, 464–470. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.08.080>
- LEITE, R.C.C.; LEAL, M.R.L.V. (2007). O biocombustível no Brasil. **Novos Estudos CEBRAP**. 78, 15–21
- LEMO, J. S., VARGAS, J. V. C., MARIANO, A. B., KAVA, V., & ORDONEZ, J. C. (2016). A flocculation strategy for harvesting high lipid content microalgae biomass. In **2016 IEEE Conference on Technologies for Sustainability (SusTech)** (pp. 240-245). IEEE.
- LEONG, W., LIM, J., LAM, M., UEMURA, Y., HO, Y. (2018). Third generation biofuels: A nutritional perspective in enhancing microbial lipid production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews** 91, 950–961. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.04.066>
- LICHTENTHALER, H. K. (1987). Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. **Methods in enzymology**, v. 148, p. 350–382.
- LIMA, R.N., ABREU, F.O.M.S., 2018. Natural products used as coagulants and flocculants for public water supply: A review of benefits and potentialities. *Revista Virtual de Quimica* 10, 709–735. <https://doi.org/10.21577/1984-6835.20180052>
- LORENZ, R. T., & CYSEWSKI, G. R. (2000). Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin. **Trends in biotechnology**, 18(4), 160-167.
- LOURENÇO, S. O. (2006). Cultivo de microalgas marinhas: princípios e aplicações. **São Carlos: RiMa**, 588 p.
- LUBIÁN, L. M., MONTERO, O., MORENO-GARRIDO, I., HUERTAS, I. E., SOBRINO, C., GONZÁLEZ-DEL VALLE, M., & PARÉS, G. (2000). *Nannochloropsis* (Eustigmatophyceae) as source of commercially valuable pigments. **Journal of Applied Phycology**, 12(3-5), 249-255.

- MA, R.; THOMAS-HALL, S.R.; CHUA, E.T.; ELTANAHY, E.; NETZEL, M.E.; NETZEL, G.; LU, Y.; SCHENK, P.M. (2018). Blue light enhances astaxanthin biosynthesis metabolism and extraction efficiency in *Haematococcus pluvialis* by inducing haematocyst germination. **Algal Research**, Vol 35, p. 215-222, ISSN 2211-9264. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.08.023>.
- MANGRICH, A.S., DOUMER, M.E., MALLMANN, A.S., WOLF, C.R. (2014). Green chemistry in water treatment: Use of coagulant derived from acacia mearnsii tannin extracts. **Revista Virtual de Química** 6, 2–15. <https://doi.org/10.5935/1984-6835.20140002>
- MATA, T.M., MARTINS, A., CAETANO, N.S. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications : A review. **Renew. Sustain. Energy Rev.** 14, 217–232. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.07.020>
- MATHIMANI, T., UMA, L., PRABAHARAN, D. (2015). Homogeneous acid catalysed transesterification of marine microalga *Chlorella* sp. BDUG 91771 lipid - An efficient biodiesel yield and its characterization. **Renewable Energy** 81, 523–533. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2015.03.059>
- MATHUR, N. K.; NARANG, C. K. (1990) Chitin and chitosan, versatile polysaccharides from marine animals. **Journal of Chemical Education**, v.67, n. 11, p. 938-942.
- MATOS, Â.P. (2017). The Impact of Microalgae in Food Science and Technology. **Journal of the American Oil Chemists' Society**. <https://doi.org/10.1007/s11746-017-3050-7>
- MESQUITA, S.S. Seleção de cepa de microalga brasileira para a produção de carotenoides de interesse industrial (2018) 185 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. Brasil
- MILLEDGE, J. J., & HEAVEN, S. (2013). A review of the harvesting of micro-algae for biofuel production. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, 12(2), 165-178.
- MOAZAMI, N., ASHORI, A., RANJBAR, R., TANGESTANI, M. (2012). Large-scale biodiesel production using microalgae biomass of *Nannochloropsis*. **Biomass and Bioenergy** 39, 449–453. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.01.046>
- MOHLER, D., WILSON, M.H., KESNER, S., SCHAMBACH, J.Y., VAUGHAN, D., FRAZAR, M., STEWART, J., GROppo, J., PACE, R., CROCKER, M. (2019). Beneficial reuse of industrial CO₂ emissions using microalgae : Demonstration assessment and biomass characterization. **Bioresource Technology** 293. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122014>
- MOLAZADEH, M., AHMADZADEH, H., POURIANFAR, H.R., LYON, S., RAMPELOTTO, P.H. (2018). The Use of Microalgae for Coupling Wastewater Treatment with CO₂ Biofixation. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**. 7:42. doi:10.3389/fbioe.2019.00042

- MONTGOMERY, D. C. (1991). Diseño y análisis de experimentos. Traduzido por Jaime Delgado Saldivar. México, Iberoamérica.
- MORETI, L.D.O.R., CAMACHO, F.P., SILVA, M.O., NISHI, L., SILVA, M.F., BERGAMASCO, R. (2015). Comparação Entre O Teor Lipídico Do Lodo Gerado Por Anabaena Flos-Aquae E Chlorella Vulgaris Nos Processos De Tratamento De Água. **XXXVII Congresso Brasileiro de Sistemas Particulados**. <https://doi.org/10.5151/enemp2015-tc-645>
- MUYLAERT, K., VANDAMME, D., FOUBERT, I., & BRADY, P. V. (2015). Harvesting of microalgae by means of flocculation. In **Biomass and Biofuels from Microalgae** (pp. 251-273). Springer, Cham.
- NDABIGENGESERE, A., NARASIAH, K.S., TALBOT, B.G. (1995). Active agents and mechanism of coagulation of turbid waters using Moringa oleifera. **Water Research** 29, 703–710. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(94\)00161-Y](https://doi.org/10.1016/0043-1354(94)00161-Y)
- NETO, W. A. F.; MENDES, C. R. B.; ABREU, P. C. (2018). Carotenoid production by the marine microalgae Nannochloropsis oculata in different low-cost culture media. **Aquaculture research**, 49(7), 2527-2535.
- NIJU, S., BALAJII, M., ANUSHYA, C., NIJU, S. (2019). A comprehensive review on biodiesel production using Moringa oleifera oil. **International Journal of Green Energy** 16, 702–715. <https://doi.org/10.1080/15435075.2019.1619565>
- NISHA, R.R., JEGATHAMBAL, P., PARAMESWARI, K., KIRUPA, K. (2017). Biocompatible water softening system using cationic protein from moringa oleifera extract. **Applied Water Science** 7, 2933–2941. <https://doi.org/10.1007/s13201-017-0591-8>
- OKORO, V., AZIMOV, U., MUNOZ, J., HERNANDEZ, H.H., PHAN, A.N., 2019. Microalgae cultivation and harvesting : Growth performance and use of flocculants - A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v.115. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.109364>
- OKUDA, T., BAES, A. U., NISHIJIMA, W., & OKADA, M. (1999). Improvement of extraction method of coagulation active components from Moringa oleifera seed. **Water research**, 33(15), 3373-3378.
- OKUDA, T., & ALI, E. N. (2019). Application of Moringa oleifera plant in water treatment. In **Water and wastewater treatment technologies** (pp. 63-79). Springer, Singapore.
- OLADOJA, N.A., SALIU, T.D., OLOLADE, I.A., ANTHONY, E.T., BELLO, G.A. (2017). A new indigenous green option for turbidity removal from aqueous system. **Separation and Purification Technology** 186, 166–174. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2017.05.054>
- OYEYINKA, A.T., OYEYINKA, S.A. (2016). Moringa oleifera as a food fortificant : Recent trends and prospects. **Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences**. <https://doi.org/10.1016/j.jssas.2016.02.002>

- PARK, J., PARK, M.S., LEE, Y., YANG, J. (2014). Advances in direct transesterification of algal oils from wet biomass. **Bioresource Technology**. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.10.089>
- PASSOS, F., HERNÁNDEZ-MARINÉ, M., GARCÍA, J., & FERRER, I. (2014). Long-term anaerobic digestion of microalgae grown in HRAP for wastewater treatment. Effect of microwave pretreatment. **Water research**, 49, 351-359.
- PIDOU, M., AVERY, L., STEPHENSON, T., JEFFREY, P., PARSONS, S.A., LIU, S., MEMON, F.A., JEFFERSON, B. (2008). Chemical solutions for greywater recycling. **Chemosphere**, 71, 147–155. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.10.046>
- PRITCHARD, M., CRAVEN, T., MKANDAWIRE, T., EDMONDSON, A.S., O'NEILL, J.G. (2010). A comparison between *Moringa oleifera* and chemical coagulants in the purification of drinking water - An alternative sustainable solution for developing countries. **Physics and Chemistry of the Earth** 35, 798–805. <https://doi.org/10.1016/j.pce.2010.07.014>
- RAKESH, S., SAXENA, S., DHAR, D.W. (2014). Comparative evaluation of inorganic and organic amendments for their flocculation efficiency of selected microalgae. **Journal of applied phycology**, v.26, p.399–406. <https://doi.org/10.1007/s10811-013-0114-4>
- RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. *Biologia Vegetal*. 7th ed. Editora Guanabara Koogan S. A., Rio de Janeiro, 2007.
- RENAULT, F., SANCEY, B., BADOT, P., CRINI, G. (2009). Chitosan for coagulation / flocculation processes – An eco-friendly approach. **European Polymer Journal** 45, 1337–1348. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2008.12.027>
- RONGA, D., BIAZZI, E., PARATI, K., CARMINATI, D., CARMINATI, E., & TAVA, A. (2019). Microalgal biostimulants and biofertilisers in crop productions. **Agronomy**, 9(4), 192.
- ROSELET, F., VANDAMME, D., ROSELET, M., MUYLAERT, K., ABREU, P.C. (2017). Effects of pH, Salinity, Biomass Concentration, and Algal Organic Matter on Flocculant Efficiency of Synthetic Versus Natural Polymers for Harvesting Microalgae **Biomass&Bioenergy Research** 10, 427–437. <https://doi.org/10.1007/s12155-016-9806-3>
- RWEHUMBIZA, V.M., HARRISON, R., THOMSEN, L. (2012). Alum-induced flocculation of pre-concentrated *Nannochloropsis salina*: Residual aluminium in the biomass, FAMES and its effects on microalgae growth upon media recycling. **Chemical Engineering Journal** 200–202, 168–175. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2012.06.008>
- RYMER, C., GIBBS, R.A., GIVENS, D.I. (2006). Comparison of algal and fish sources on the oxidative stability of poultry meat and its enrichment with omega-3 polyunsaturated fatty acids. **Poultry Science**. 150–159. <https://doi.org/10.3382/ps.2009-00232>

- SALADINI, F., PATRIZI, N., PULSELLI, F.M., MARCHETTINI, N. (2020). Guidelines for energy evaluation of first, second and third generation biofuels. **Renewable and Sustainable Energy Reviews** 66, 221–227. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.07.073>
- SALES, R., & ABREU, P. C. (2015). Use of natural pH variation to increase the flocculation of the marine microalgae *Nannochloropsis oculata*. **Applied biochemistry and biotechnology**, 175(4), 2012–2019.
- SANTANA, C.R., PEREIRA, D.F., ARAÚJO, N.A., CAVALCANTI, E.B., SILVA, G.F. (2010). Caracterização físico-química da Moringa (*Moringa oleifera* Lam). **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais** 12, 55–60. <https://doi.org/10.15871/1517-8595/rbpa.v12n1p55-60>
- SANTOS, R. R. Estudo de diferentes condições de cultivo de *Chlorella vulgaris* visando o aumento da produtividade em biomassa e lipídios (2013) 92 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. Brasil
- SARKER, P.K., KAPUSCINSKI, A.R., BAE, A.Y., DONALDSON, E., SITEK, J., FITZGERALD, D.S., EDELSON, O.F. (2018). Towards sustainable aquafeeds: Evaluating substitution of fishmeal with lipid-extracted microalgal co-product (*Nannochloropsis oculata*) in diets of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) 1–26. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201315>
- SCHENK, P.M., THOMAS-HALL, S.R., STEPHENS, E., MARX, U.C., MUSSGUG, J.H., POSTEN, C., KRUSE, O., HANKAMER, B. (2008). Second Generation Biofuels: High-Efficiency Microalgae for Biodiesel Production. **BioEnergy Research** 1, 20–43. <https://doi.org/10.1007/s12155-008-9008-8>
- SCHLUCHTER, W.M., BRYANT, D.A. (2002). Analysis and reconstitution of phycobiliproteins. methods for the characterization of bilin attachment reactions. In: Smith AG, Witty M, editors. Heme, Chlorophyll, and Bilins. **Totowa, NJ: Humana Press**; pp. 311–334.
- SCHOCH, C.L., ADL, S.M., BASS, D., LANE, C.E., LUKE, J., AGATHA, S., BERNEY, C., BROWN, M.W., BURKI, F., PACO, C., CHISTYAKOVA, L., CAMPO, J., DUNTHORN, M., GUILLOU, L., HEISS, A.A., HOPPENRATH, M., JAMES, T.Y., KARN, A., KARPOV, S., KIM, E., KOLISKO, M., KUDRYAVTSEV, A., LAHR, D.J.G., LARA, E., LE, L., LYNN, D.H., MANN, D.G., MASSANA, R., EDWARD, A.D., MORROW, C., SOO, J., PAWLOWSKI, J.W., POWELL, M.J., DANIEL, J., YOUSSEF, N., ZLATOGURSKY, V., ZHANG, Q. (2019). Revisions to the Classification, Nomenclature, and Diversity of Eukaryotes 4–119. <https://doi.org/10.1111/jeu.12691>
- SEKAR, S., & CHANDRAMOHAN, M. (2008). Phycobiliproteins as a commodity: trends in applied research, patents and commercialization. **Journal of Applied Phycology**, 20(2), 113–136. <https://doi.org/10.1007/s10811-007-9188-1>
- SELESU, N.F.H., DE OLIVEIRA, T. V., CORRÊA, D.O., MIYAWAKI, B., MARIANO, A.B., VARGAS, J.V.C., VIEIRA, R.B. (2016). Maximum

microalgae biomass harvesting via flocculation in large scale photobioreactor cultivation. **Canadian Journal of Chemical Engineering** 94, 304–309. <https://doi.org/10.1002/cjce.22391>

SEMERJIAN, L., & AYOUB, G. M. (2003). High-pH–magnesium coagulation–flocculation in wastewater treatment. **Advances in Environmental Research**, 7(2), 389-403.

SHAABAN, M.T., AGLAN, A.A., SHAABAN, M.T., AGLAN, A.A. (2019). A comparative study on the efficiency of Moringa oleifera seed extract and aluminium sulphate applications as coagulants in different water treatment plants in Menoufia Governorate , Egypt. **The Egyptian Journal of Experimental Biology**. 15, 403–418. <https://doi.org/10.5455/egyjebb.20191105090434>

SHAH, M., MAHFUZUR, R., LIANG, Y., CHENG, J. J., & DAROCH, M. (2016). Astaxanthin-producing green microalga Haematococcus pluvialis: from single cell to high value commercial products. **Frontiers in plant science**, 7, 531. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00531>

SHIH MC, CHANG CM, KANG SM, TSAI ML. (2011). Effect of different parts (leaf, stem and stalk) and seasons (summer and winter) on the chemical compositions and antioxidant activity of Moringa oleifera. **International Journal of Molecular Sciences**; 12(9):6077-88. <https://doi.org/10.3390/ijms12096077>

SIDDIQUI, M.R., MIRANDA, A., MOURADOV, A. (2018). Microalgae as Bio-Converters of Wastewater into Biofuel and Food. **Springer International Publishing**. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-75199-3>

SILVA, G. V., SOUTO, J. S., & DOS SANTOS, J. B. (2020). Cultivo de moringa: importância nutricional, uso e aplicações. **Meio Ambiente (Brasil)**, 1(3).

SINGH, G., PATIDAR, S.K. (2018). Microalgae harvesting techniques : A review. **Journal of Environmental Management** 217, 499–508. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.04.010>

SINGH, V.P., ARULANANTHAM, A., PARISIPOGULA, V. (2018). Moringa olifera : Nutrient Dense Food Source and World ’ s Most Useful Plant to Ensure Nutritional Security , Good Health and Eradication of Malnutrition. **European Journal of Nutrition & Food Safety**. 8, 204–214. <https://doi.org/10.9734/EJNFS/2018/42468>

ŞIRIN, S., TROBAJO, R., IBANEZ, C., & SALVADÓ, J. (2012). Harvesting the microalgae Phaeodactylum tricornutum with polyaluminum chloride, aluminium sulphate, chitosan and alkalinity-induced flocculation. **Journal of applied phycology**, 24(5), 1067-1080.

SOARES, A.T., SILVA, B.F., FIALHO, L.L., PEQUENO, M.A.G., VIEIRA, A.A.H., SOUZA, A.G., ANTONIOSI FILHO, N.R. (2013). Chromatographic characterization of triacylglycerides and fatty acid methyl esters in microalgae oils for biodiesel production. **Journal of Renewable and Sustainable Energy** 5, 55–62. <https://doi.org/10.1063/1.4821289>

- SPILLING, K., SEPPÄLÄ, J., & TAMMINEN, T. (2011). Inducing autoflocculation in the diatom *Phaeodactylum tricornutum* through CO₂ regulation. **Journal of Applied Phycology**, 23(6), 959-966. <https://doi.org/10.1007/s10811-010-9616-5>
- SUN, H., LIU, B., LU, X., CHENG, K., CHEN, F. (2017). Staged cultivation enhances biomass accumulation in the green growth phase of *Haematococcus pluvialis*. **Bioresource Technology**. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.03.011>
- TANAC S. A. "Tratamento de Aguas, Tanfloc SG". Disponível em: <<https://www.tanac.com.br>>. Acesso em: 10/04/2019
- TEIXEIRA, C.M.L.L., KIRSTEN, F.V., TEIXEIRA, P.C.N. (2012). Evaluation of *Moringa oleifera* seed flour as a flocculating agent for potential biodiesel producer microalgae. **Journal of Applied Phycology** 24, 557–563. <https://doi.org/10.1007/s10811-011-9773-1>
- TEIXEIRA, C.M.L., TEIXEIRA, P.C.N. (2017). Evaluation of the flocculation efficiency of *Chlorella vulgaris* mediated by *Moringa oleifera* seed under different forms: Flour, seed cake and extracts of flour and cake. **Brazilian Journal of Chemical Engineering** 34, 65–74. <https://doi.org/10.1590/0104-6632.20170341s20150470>
- †LAM, G.P.; VERMUE, M. H.; OLIVIERI, G.; VAN DEN BROEK, L. A. M.; BARBOSA, M. J.; EPPINK, M. H. M.; WIJFFELS, R. H.; KLEINEGRIS, D. M. M. (2014). Cationic polymers for successful flocculation of marine microalgae. **Bioresource technology**, 169, 804-807.
- †LAM, G.P., GIRALDO, J.B., VERMUE, M.H., OLIVIERI, G., EPPINK, M.H.M., WIJFFELS, R.H. (2016). Understanding the salinity effect on cationic polymers in inducing flocculation of the microalga *Neochloris oleoabundans*. **Journal of Biotechnology** 225, 10–17. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.03.009>
- UDUMAN, N., QI, Y., DANQUAH, M.K., FORDE, G.M., HOADLEY, A. (2010). Dewatering of microalgal cultures: A major bottleneck to algae-based fuels. **Journal of Renewable and Sustainable Energy** 2. <https://doi.org/10.1063/1.3294480>
- UENOJO, M.; MARÓSTICA JÚNIOR, M. R.; PASTORE, G. M. (2007). Carotenóides: Propriedades, Aplicações e Biotransformação para Formação de Compostos de Aroma. **Química Nova**, 30 (3): 616-622.
- UMMALYMA, S.B., GNANSOUNOU, E., SUKUMARAN, R.K., SINDHU, R., PANDEY, A., SAHOO, D. (2017). Bioflocculation: An alternative strategy for harvesting of microalgae – An overview. **Bioresource Technology** 242, 227–235. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.02.097>
- UYSAL, O.; UYSAL, O.; EKINCI, K., (2016). Determination of fertilizing characteristics of three different microalgae cultivated in raceways in greenhouse conditions could increase soil fertility and product yield. **Journal of Agronomical Science**. 59, 15–19
- VANDAMME, D., FOUBERT, I., MEESCHAERT, B., & MUYLAERT, K. (2010).

- Flocculation of microalgae using cationic starch. **Journal of applied Phycology**, 22(4), 525-530. <https://doi.org/10.1007/s10811-009-9488-8>
- VANDAMME, D., FOUBERT, I., FRAEYE, I., MUYLAERT, K. (2012). Influence of organic matter generated by *Chlorella vulgaris* on five different modes of flocculation. **Bioresource Technology** 124, 508–511. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.08.121>
- VANDAMME, D., FOUBERT, I., MUYLAERT, K. (2013). Flocculation as a low-cost method for harvesting microalgae for bulk biomass production. **Trends in Biotechnology** 31, 233–239. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.12.005>
- VANDAMME, D., BEUCKELS, A., VADELIUS, E., DEPRAETERE, O., NOPPE, W., DUTTA, A., FOUBERT, I., LAURENS, L., MUYLAERT, K. (2016). Inhibition of alkaline flocculation by algal organic matter for *Chlorella vulgaris*. **Water Research** 88, 301–307. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.10.032>
- VASSILEV, S. V., VASSILEVA, C.G. (2016). Composition , properties and challenges of algae biomass for biofuel application: An overview. **Fuel** 181, 1–33. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2016.04.106>
- VAZ, G. L. G., KLEN, M. R. F., VEIT, M. T., SILVA, E. A., BARBIERO, T. A., BERGAMASCO, R. (2010). Avaliação da eficiência de diferentes agentes coagulantes na remoção de cor e turbidez em efluente de galvanoplastia. **Eclética Química**, v. 35, n. 4, p. 45-54.
- WAN, C., ALAM, M.A., ZHAO, X.Q., ZHANG, X.Y., GUO, S.L., HO, S.H., CHANG, J.S., BAI, F.W. (2015). Current progress and future prospect of microalgal biomass harvest using various flocculation technologies. **Bioresource Technology** 184, 251–257. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.11.081>
- WANG, B., ZHANG, Z., HU, Q., SOMMERFELD, M., LU, Y., HAN, D. (2014). Cellular Capacities for High-Light Acclimation and Changing Lipid Profiles across Life Cycle Stages of the Green Alga *Haematococcus pluvialis* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106679>
- WANG, X., FOSSE, H.K., LI, K., CHAUTON, M., VADSTEIN, O., INGE, K. (2019). Influence of Nitrogen Limitation on Lipid Accumulation and EPA and DHA Content in Four Marine Microalgae for Possible Use in Aquafeed. **Frontiers in Marine Science**. <https://doi.org/10.3389/fmars.2019.00095>
- WARD, O. P., & SINGH, A. (2005). Omega-3/6 fatty acids: alternative sources of production. **Process biochemistry**, 40(12), 3627-3652. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.02.020>
- WARRA, A.A., (2015). A Review of Moringa Oleifera Lam Seed Oil Prospects in Personal Care Formulations. **Research and Reviews : Journal of Pharmaceutics and Nanotechnology**.
- WU, Z., ZHU, Y., HUANG, W., ZHANG, C., LI, T., ZHANG, Y., & LI, A. (2012). Evaluation of flocculation induced by pH increase for harvesting microalgae and reuse of flocculated medium. **Bioresource Technology**, 110, 496-502.

- XU, Y., PURTON, S., BAGANZ, F. (2013). Chitosan flocculation to aid the harvesting of the microalga *Chlorella sorokiniana*. **Bioresource Technology** 129, 296–301. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.11.068>
- YAAKOB, Z., FAKIR, K., ALI, E., ABDULLAH, S. R. S., & TAKRIFF, M. S. (2011). An overview of microalgae as a wastewater treatment. In **Jordan international energy conference**.
- YADAV, G., DUBEY, B.K., SEN, R. (2020). A comparative life cycle assessment of microalgae production by CO₂ sequestration from flue gas in outdoor raceway ponds under batch and semi-continuous regime. **Journal of Cleaner Production** 120703. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.120703>
- YANG, J., XU, M., ZHANG, X., HU, Q., SOMMERFELD, M., CHEN, Y. (2011). Corrigendum to “Life-cycle analysis on biodiesel production from microalgae: Water footprint and nutrients balance” **Bioresource Technology** 102 (2011) 159-165]. **Bioresource Technology** 102, 6633. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.03.029>
- YANG, I.S., SALAMA, E.S., KIM, J.O., GOVINDWAR, S.P., KURADE, M.B., LEE, M., ROH, H.S., JEON, B.H. (2016). Cultivation and harvesting of microalgae in photobioreactor for biodiesel production and simultaneous nutrient removal. **Energy Conversion and Management** 117, 54–62. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2016.03.017>
- YANG, L., LI, H., WANG, Q. (2019). A novel one-step method for oil-rich biomass production and harvesting by co-cultivating microalgae with filamentous fungi in molasses wastewater. **Bioresource Technology** 275, 35–43. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.12.036>
- YEHUDA S, RABINOVITZ S, CARASSO RL, MOSTOFISKY DI. (2002). The role of polyunsaturated fatty acids in restoring the aging neuronal membrane. **Neurobiol Aging**. 2002; 23(5):843-53
- YIN, Z., ZHU, L., LI, S., HU, T., CHU, R., MO, F., HU, D., LIU, C., LI, B. (2020). School of Resource and Environmental Sciences , Hubei Key Laboratory of **Bioresource Technology** 122804. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122804>
- YOUDIM, A.K.; MARTIN, A.; JOSEPH, J.A. (2000). Essential fatty acids the brain: possible health implications. **International journal of developmental neuroscience**, v.18. p. 383-399.
- ZHU, L., LI, Z., HILTUNEN, E. (2018). Microalgae *Chlorella vulgaris* biomass harvesting by natural flocculant: Effects on biomass sedimentation, spent medium recycling and lipid extraction. **Biotechnology for Biofuels** 11, 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1183-z>
- ZITTELLI, G. C., LAVISTA, F., BASTIANINI, A., RODOLFI, L., VINCENZINI, M., & TREDICI, M. R. (1999). Production of eicosapentaenoic acid by *Nannochloropsis* sp. cultures in outdoor tubular photobioreactors. In **Progress in Industrial Microbiology** (Vol. 35, pp. 299-312). Elsevier.

APÊNDICES

Apêndice A - Protocolo de preparo do Meio WC modificado, segundo descrito por Guillard e Lorenzen (1972)

Para o preparo dos volumes:	1 L	10 L	50 L
Tris (acrescentar à água destilada)	0,5 g	5 g	25 g

OBS: Autoclavar a solução obtida ou filtrar em sistema de filtração (esterilizado previamente) com membrana de 0,22 μm .

Após o resfriamento da solução obtida, prosseguir com a adição das **soluções-estoque** (previamente preparadas).

	1 L	10 L	50 L
Solução-estoque 1	1 mL	10 mL	50 mL
Solução-estoque 2	1 mL	10 mL	50 mL
Solução-estoque 3	1 mL	10 mL	50 mL
Solução-estoque 4	1 mL	10 mL	50 mL
Solução-estoque 5	1 mL	10 mL	50 mL
Solução-estoque 6	1 mL	10 mL	50 mL
Solução-estoque 7	1 mL	10 mL	50 mL
Solução de ácido Bórico (H_3BO_3 1%)	0,1 mL	1 mL	5 mL

Ao final do procedimento medir o pH e ajustar para o pH ideal - entre 7,0 e 8,5 (acrescentando gradualmente solução de HCl 1M ou solução de NaOH 1M).

Preparo das soluções-estoque para o meio WC

1) Solução-estoque de Nitrato de Sódio

Dissolver 8,5 g de NaNO_3 em 100 mL de água destilada

2) Solução-estoque de Bicarbonato de Sódio

Dissolver 1,260 g de NaHCO_3 em 100 mL de água destilada

3) Solução-estoque de Cloreto de Cálcio

Dissolver 3,676 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ em 100 mL de água destilada

4) Solução-estoque de Sulfato de Magnésio hidratado

Dissolver 3,697 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ em 100 mL de água destilada

5) Solução-estoque de Fosfato de Potássio

Dissolver 0,871 g de K_2HPO_4 em 100 mL de água destilada

6) Solução-estoque de vitaminas

Dissolver 0,1 g de Tiamina; 0,0005 g de Cianocobalamina e 0,0005 g de Biotina em mesmo volume de 1000 mL de água destilada, solução deverá ser filtrada em membrana de 0,22 μm

7) Solução-estoque de metais traço:

Adicionar 1 mL de cada solução-estoque primário (**a; b; c; d; e**) à solução de ferro quelado; em seguida, ajustar o volume para 1000 mL. Estas soluções são autoclavadas separadamente.

Solução de Ferro quelado (EDTA e Ferro): Dissolver 4,36 g de Na_2EDTA em 900 mL de água destilada; em seguida adicionar 3,15 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

Soluções estoque primário

a) Cobre: Dissolver 0,98 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ em 100 mL de água destilada

b) Zinco: Dissolver 2,2 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ em 100 mL de água destilada

c) Cobalto: Dissolver 1,0 g $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ em 100 mL de água destilada

d) Manganês: Dissolver 18,0 g de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ em 100 mL de água destilada

e) Molibdênio: Dissolver 0,63 g de $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ em 100 mL de água destilada

Solução de ácido bórico a 1%

Dissolver 1g de H_3BO_3 em 100mL de água destilada

Apêndice B - Protocolo de preparo do Meio F/2, segundo descrito por Guillard (1975)

Para o preparo dos volumes:	1 L	10 L	50 L
Água do mar*	1 L	10 L	50 L
Solução-estoque 1	1 mL	10 mL	50 mL
Solução-estoque 2	1 mL	10 mL	50 mL
Solução-estoque 3	1 mL	10 mL	50 mL
Solução-estoque 4	1 mL	10 mL	50 mL

*Água do mar filtrada em membrana de 0,45 μm (acetato de celulose) e em seguida autoclavada. Após o resfriamento prosseguir com a adição das **soluções-estoque** (previamente preparadas).

Ao final do procedimento medir o pH e ajustar para o pH ideal - entre 7,0 e 8,5 (acrescentando gradualmente solução de HCl 1M ou solução de NaOH 1M). Ajustar Salinidade para 32-35 com o auxílio do refratômetro (Instrutherm, RTS-101ATC).

Preparação das soluções-estoque para o meio F/2

1) Solução-estoque de Nitrato de Sódio

Dissolver 7,5 g de NaNO_3 em 100 mL de água destilada

2) Solução-estoque de Fosfato de Sódio

Dissolver 0,5 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ em 100 mL de água destilada

3) Solução-estoque de vitaminas

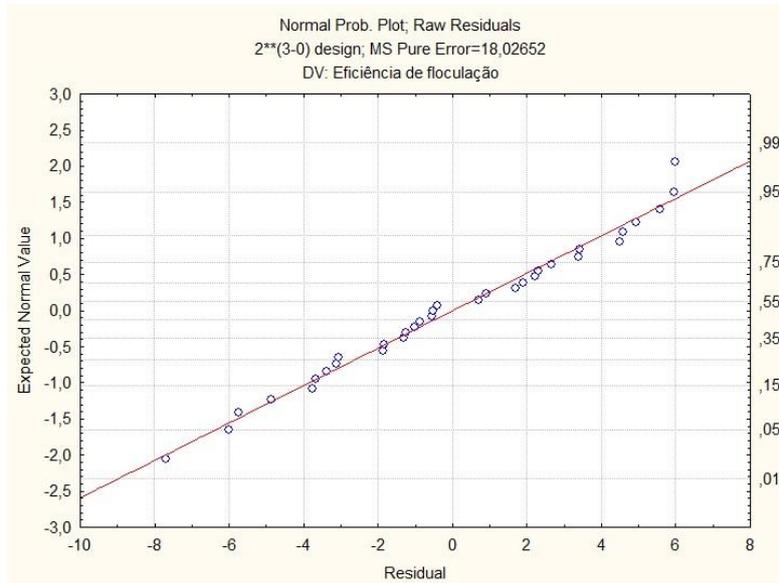
Dissolver 0,1 g de Tiamina; 0,0005 g de Cianocobalamina e 0,0005 g de Biotina em mesmo volume de 1000 mL de água destilada, solução deverá ser filtrada em membrana de 0,22 μm

4) Solução-estoque de metais traço

Confome descrito no item 7 do Apêndice A.

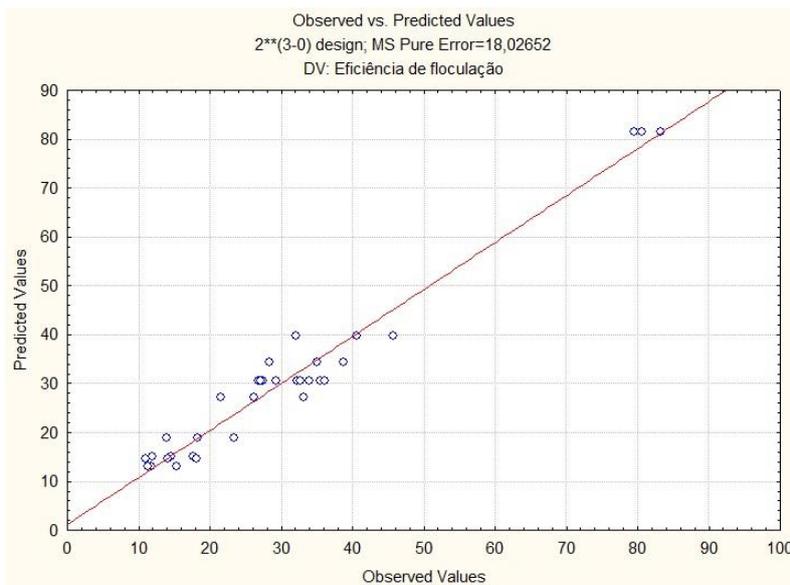
Apêndice C - Gráficos complementares das avaliações da influência de variáveis no processo de floculação de *Haematococcus pluvialis*.

Figura 28: Gráfico da probabilidade normal dos resíduos para a resposta eficiência de floculação do planejamento fatorial completo $2^3 + 3PC$ na floculação de *Haematococcus pluvialis* utilizando Extrato Salino da Semente de *Moringa oleifera* (ESM).



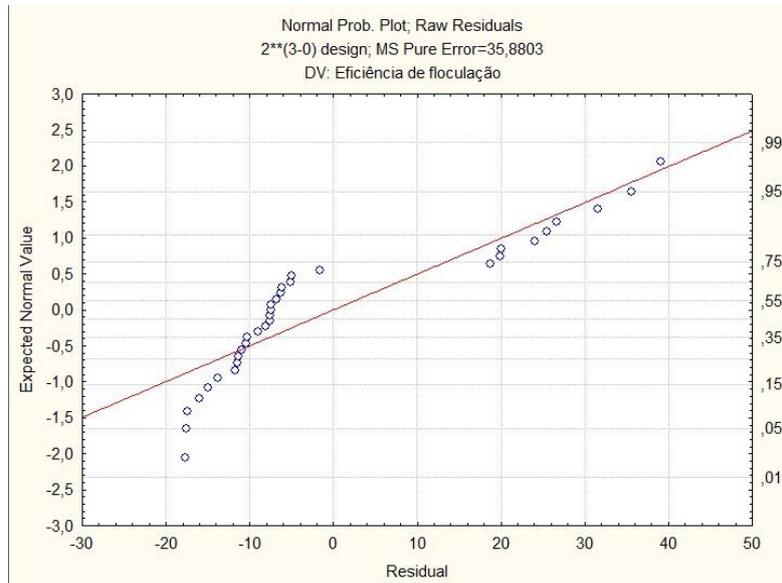
Fonte: Autora, 2020. Gráfico gerado no software *Statistica 7.0* (StatSoft ®).

Figura 29: Gráfico dos valores observados versus preditos para a resposta eficiência de floculação do planejamento fatorial completo $2^3 + 3PC$ na floculação de *Haematococcus pluvialis* utilizando Extrato Salino da Semente de *Moringa oleifera* (ESM).



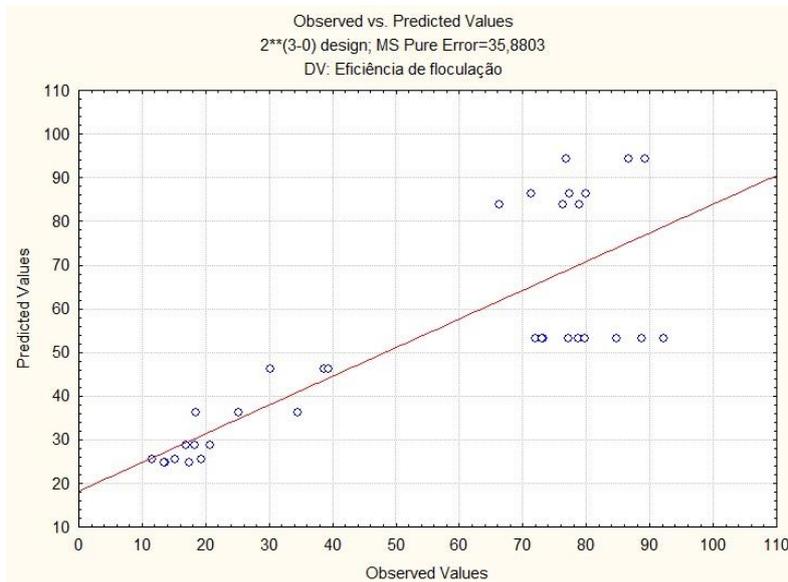
Fonte: Autora, 2020. Gráfico gerado no software *Statistica 7.0* (StatSoft ®).

Figura 30: Gráfico da probabilidade normal dos resíduos para a resposta eficiência de floculação do planejamento fatorial completo $2^3 + 3PC$ na floculação de *Haematococcus pluvialis* utilizando Tanfloc SG (TSG).



Fonte: Autora, 2020. Gráfico gerado no software *Statistica 7.0* (StatSoft ®).

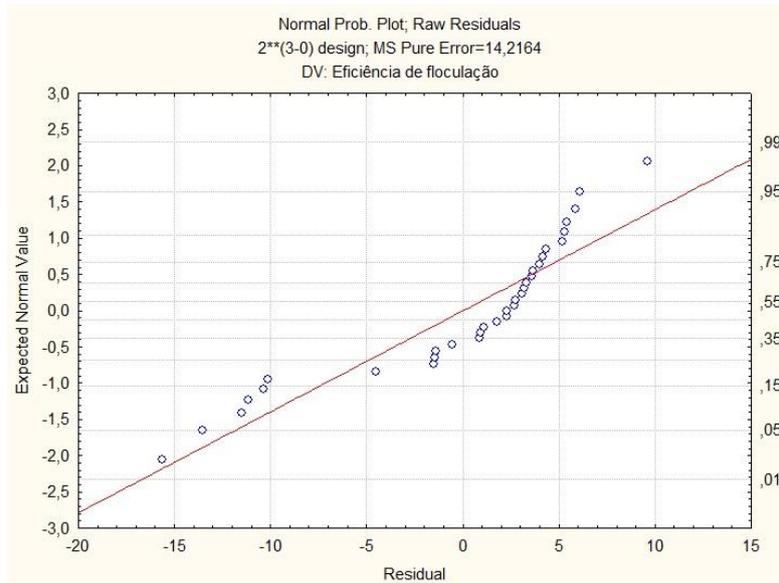
Figura 31: Gráfico dos valores observados versus preditos para a resposta eficiência de floculação do planejamento fatorial completo $2^3 + 3PC$ na floculação de *Haematococcus pluvialis* utilizando Tanfloc (TSG).



Fonte: Autora, 2020. Gráfico gerado no software *Statistica 7.0* (StatSoft ®).

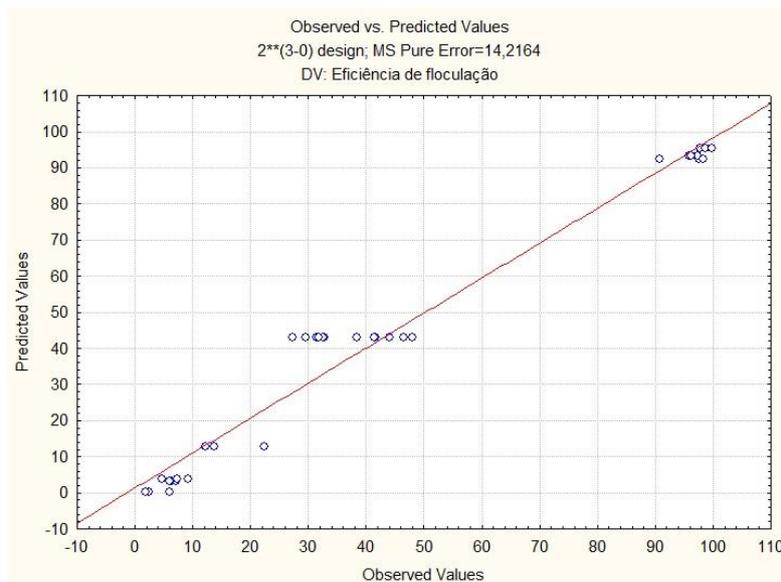
Apêndice D - Gráficos complementares das avaliações da influência de variáveis no processo de floculação de *Nannochloropsis oculata*.

Figura 32: Gráfico da probabilidade normal dos resíduos para a resposta eficiência de floculação do planejamento fatorial completo $2^3 + 3PC$ na floculação de *Nannochloropsis oculata* utilizando Extrato Salino da Semente de *Moringa oleifera* (ESM).



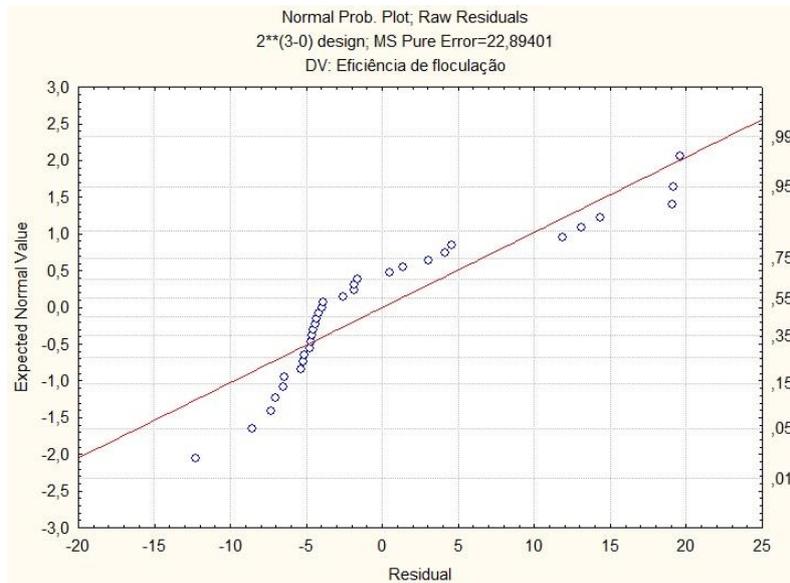
Fonte: Autora, 2020. Gráfico gerado no software *Statistica 7.0* (StatSoft ®).

Figura 33: Gráfico dos valores observados versus preditos para a resposta eficiência de floculação do planejamento fatorial completo $2^3 + 3PC$ na floculação de *Nannochloropsis oculata* utilizando Extrato Salino da Semente de *Moringa oleifera* (ESM).



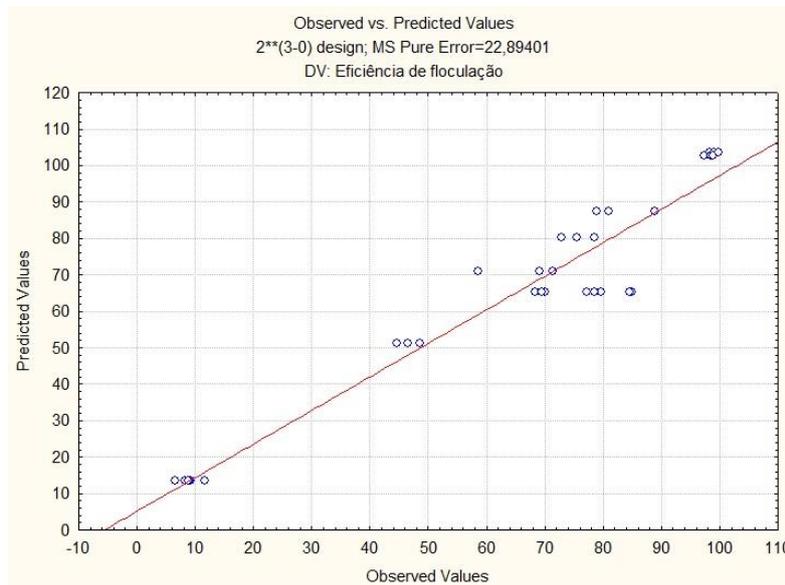
Fonte: Autora, 2020. Gráfico gerado no software *Statistica 7.0* (StatSoft ®).

Figura 34: Gráfico da probabilidade normal dos resíduos para a resposta eficiência de floculação do planejamento fatorial completo $2^3 + 3PC$ na floculação de *Nannochloropsis oculata* utilizando Tanfloc SG (TSG).



Fonte: Autora, 2020. Gráfico gerado no software *Statistica 7.0 (StatSoft®)*.

Figura 35: Gráfico dos valores observados versus preditos para a resposta eficiência de floculação do planejamento fatorial completo $2^3 + 3PC$ na floculação de *Nannochloropsis oculata* utilizando Tanfloc SG (TSG).



Fonte: Autora, 2020. Gráfico gerado no software *Statistica 7.0 (StatSoft®)*.