

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA  
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA**

**ANA CLÁUDIA ZANATA**

**OBTENÇÃO DE BIOMASSA MICROALGAL DE *CHLORELLA  
VULGARIS* TOLERANTE A HERBICIDAS**

**DISSERTAÇÃO**

**DOIS VIZINHOS**

**2020**

ANA CLÁUDIA ZANATA

**OBTENÇÃO DE BIOMASSA MICROALGAL DE *CHLORELLA*  
*VULGARIS* TOLERANTE A HERBICIDAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Andreia Anschau  
Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria da Conceição Constantino Fernandes  
Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rosa Mitiko Saito Matsubara

DOIS VIZINHOS

2020

Ficha catalográfica elaborada pelo Departamento de Biblioteca  
da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Ponta Grossa  
n.22/20

Z27      Zanata, Ana Cláudia

Obtenção de biomassa microalgal de *Chlorella vulgaris* tolerante a herbicidas. / Ana Cláudia Zanata, 2020.  
148 f.; il. 30 cm.

Orientadora: Profa. Dra. Andreia Anschau  
Coorientadora: Profa. Dra. Maria da Conceição Constantino Fernandes  
Coorientadora: Profa. Dra. Rosa Mitiko Saito Matsubara

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, 2020.

1. Biomassa. 2. Algas. 3. Herbicidas. 4. Testes de toxicidade. 5. Bibliometria. I. Anschau, Andreia. II. Fernandes, Maria da Conceição Constantino. III. Matsubara, Rosa Mitiko Saito. IV. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. V. Título.

CDD 606.6



Ministério da Educação  
**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ**  
Diretoria de Pesquisa e Pós-Graduação  
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

**PPGBIOTEC**  
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Título de Dissertação Nº **15/2020**

**Obtenção de biomassa microalgal de *Chlorella vulgaris* tolerante a herbicidas**

**Por**

**Ana Cláudia Zanata**

Esta dissertação foi apresentada às dez horas do dia **6 de março de 2020**, no Mini Auditório V - UTFPR-DV, como requisito parcial para a obtenção do título de MESTRE EM BIOTECNOLOGIA, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. A candidata foi arguida pela Banca Examinadora, composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

---

**Profa. Dra. Andréia Anschau**  
**(UTFPR-DV)**

---

**Profa. Dra. Paula Fernandes**  
**Montanher (UTFPR-DV)**

---

**Profa. Dra. Tatiana Rodrigues da Silva**  
**Baumgärtner (UNIOESTE-TD)**



---

**Profa. Dra. Andreia Anschau**  
**(UTFPR)**  
Coordenadora do PPGBIOTEC  
UTFPR - Câmpus Dois Vizinhos

- Folha de Aprovação assinada encontra-se arquivada na Secretaria do Programa -

À Deus, dedico.

## AGRADECIMENTOS

Gratidão à Deus, por sempre atender os meus pedidos, pela minha saúde e força para seguir em frente.

À minha professora Dr<sup>a</sup>. Andreia Anschau, orientadora, companheira e amiga, que esteve do meu lado em todos os momentos, sempre disposta e pronta a atender. Obrigada pelo seu incentivo constante, por sua persistência, serenidade e amizade. Serei eternamente grata por tudo que fez por mim.

Às professoras Dr<sup>a</sup>. Paula Montanher, Dr<sup>a</sup>. Tatiana Baumgartner, Dr<sup>a</sup>. Nédia Ghisi e Dr<sup>a</sup>. Naiana Gabiatti pela disponibilidade em me auxiliar sempre que solicitei. Minha imensa gratidão.

À minha família, meus pais Terezinha e Paulo Zanata por acreditarem em mim, me incentivar, apoiar. Vocês são luz na minha vida.

Ao meu namorado Maikon, por compreender e auxiliar em tudo que podia, por estar comigo, confiar e ser meu companheiro. Que eu possa sempre retribuir o seu carinho e apoio incondicional.

Aos meus amigos e colegas Gerusa Ferreira, Caliandra Bernardi, Casi Santos, Fernanda Bertan, Gabrieli Rossoni, Rafael Uliam Marttao, Maikely Feliceti e todos que de uma forma ou outra foram meu braço direito, ombro amigo e companheiros. Desejo muito sucesso na jornada de cada um de vocês. Muito obrigada.

A UTFPR Câmpus Dois Vizinhos, pela disposição de espaço, material e equipamentos para realização das disciplinas e pesquisa.

Agradeço a todos os familiares e amigos que mesmo indiretamente sempre estiveram comigo, fizeram suas orações e proferiram palavras de apoio e incentivo para que mais essa etapa fosse concluída.

Muito obrigada a todos!

“Peça a Deus que abençoe os seus planos, e eles darão certo”.

(Provérbios 16:3)

## RESUMO

ZANATA, Ana Cláudia. **Obtenção de biomassa microalgal de *Chlorella vulgaris* tolerante a herbicidas**. 2020. 148 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, 2020.

As microalgas representam um universo de biotecnologia e biodiversidade. São microrganismos de grandes aplicações e que podem ser cultivados com resíduos agroindustriais, gerando ganhos socioambientais e econômicos. O cultivo das microalgas com herbicidas permite sua aplicação como possível biofertilizante, tornando-a adaptada a esse meio. O estudo realizado teve como objetivos: realizar pesquisa cienciométrica sobre estudos com resíduos usados como substratos no cultivo de microalgas; cultivar *Chlorella vulgaris* com permeado de soro lácteo e com os herbicidas Jaguar® e Trueno® (em três concentrações: 60, 600 e 6000 µg.L<sup>-1</sup>) e estudar a ecotoxicidade com *Artemia salina* e *Lactuca sativa*; realizar pesquisa bibliométrica dos testes de ecotoxicidade de herbicidas em microalgas. Para a cienciométrica, fez-se busca de dados em WoS e notou-se o avanço das publicações na área, além de poder avaliar os principais resíduos e analisar tendências e lacunas. Com os cultivos, a *Chlorella vulgaris* teve bom crescimento com permeado de soro lácteo em pó (C/N=20), obtendo concentração celular de 5,2 g.L<sup>-1</sup> e rendimentos menores com os herbicidas (Jaguar® e Trueno® a 600 µg.L<sup>-1</sup>, 4,6 e 4,8 g.L<sup>-1</sup>, respectivamente) assim como, conteúdo lipídico menor (cerca de 13% a menos). Para o estudo bibliométrico, com o método *Methodi Ordinatio*, ranqueou-se 20 artigos mais relevantes dos testes de ecotoxicidade de herbicidas em microalgas. O estudo indicou uma tendência das pesquisas e a importância de pesquisas futuras na área de desenvolvimento, otimização e validação da avaliação de toxicidade por microalgas multiespécies em variados herbicidas.

**Palavras-chave:** Microalga. Ecotoxicidade. Cienciométrica. *Methodi Ordinatio*.



## ABSTRACT

ZANATA, Ana Cláudia. **Obtaining herbicide-tolerant microalgal biomass of *Chlorella vulgaris***. 2020. 148 p. Thesis (Master's Degree in Biotechnology) - Federal University of Technology - Paraná, Dois Vizinhos, 2020.

Microalgae represent a universe of biotechnology and biodiversity. They are microorganisms of great applications and that can be cultivated with agro-industrial residues, generating socioenvironmental and economic gains. The cultivation of microalgae with herbicides allows its application as a possible biofertilizer, making it adapted to this medium. The study carried out had as objectives: to carry out scientometric research on studies with residues used as substrates in the cultivation of microalgae; cultivate *Chlorella vulgaris* with sodium permeate and with Jaguar® and Trueno® herbicides (in three doses: 60, 600 and 6000 µg.L<sup>-1</sup>) and study ecotoxicity with *Artemia salina* and *Lactuca sativa*; carry out bibliometric research on ecotoxicity tests for herbicides in microalgae. For scientometrics, he searched for data in the WoS and did not advance in the publications in the area, in addition to being able to evaluate the main residues and analyze trends and gaps. With the crops, *Chlorella vulgaris* had a good growth with permeability to powdered latex (C / N = 20), obtaining a cell concentration of 5.2 gL<sup>-1</sup> and with lesser benefits with herbicides (Jaguar® and Trueno® at 600 µg .L<sup>-1</sup>, 4.6 and 4.8 gL<sup>-1</sup>, respectively), as well as the lower lipid content (about 13% less). For the bibliometric study, using the *Methodi Ordinatio* method, 20 most relevant articles from the ecotoxicity tests of herbicides in microalgae were ranked. The study indicates a trend in research and the importance of future research in the area of development, optimization and validation of toxicity assessment by multispecies microalgae in herbicidal variables.

**Keywords:** Microalgae. Ecotoxicity. Scientometrics. *Methodi Ordinatio*.

## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| Figura 1 - Aplicações biotecnológicas das microalgas.....  | 22 |
| Figura 2 - Rede de categorias da pesquisa de microalgas cultivadas em diferentes substratos entre os anos de 2009 e 2019 e as 8 principais categorias em termos de frequência e centralidade ..... | 31 |
| Figura 3 - A. Países com publicações sobre cultivo de microalgas usando resíduos como substrato entre 2009 e 2019. B. Rede colaboradora de países de co-autores .....                              | 33 |
| Figura 4 - Periódicos com mais publicações sobre cultivo de microalgas com resíduos entre 2009 e 2019.....   | 34 |
| Figura 5 - Linha do tempo das fontes de publicações organizadas por clusters categorizados pelo título das publicações .....   | 37 |
| Figura 6 - Mapa de densidade dos autores e citações por clusters .....   | 38 |
| Figura 7 - Rede de palavras-chave mais citadas nos estudos analisados entre 2009 a 2019 .....  | 41 |
| Figura 8 - Palavras-chave co-ocorrentes e termos co-ocorrentes na rede.....  | 48 |
| Figura 9 - Cultivo das cepas IPR-7104, IPR-7117, IPR-7115, IPR-7116, IPR-7151 e UTEX-1185 feito em meio sintético em B.O.D. para seleção da cepa.....  | 58 |
| Figura 10 - Cultivo da <i>C. vulgaris</i> IPR-7117 nos diferentes substratos .....   | 59 |
| Figura 11 - Curva padrão glicose .....   | 61 |
| Figura 12 - Curva padrão lactose .....   | 61 |
| Figura 13 - Concentração celular das cepas ao longo de 144 h de cultivo (□ IPR-7104; ■ IPR-7117; ▲ IPR-7115; ● IPR-7116; ○ UTEX-1185; △ IPR-7151).....   | 69 |
| Figura 14 - Concentração celular da <i>C. vulgaris</i> IPR-7117 nos substratos ● Glicose; ▲ Lactose; ■ PSP10; □ PSP20; ○ PSL.....  | 70 |
| Figura 15 - Concentração celular (▲) e de lactose (○) para o cultivo de <i>C. vulgaris</i> IPR-7117 .....  | 71 |
| Figura 16 - Concentração celular (▲) e de glicose (○) para o cultivo de <i>C. vulgaris</i> IPR-7117 .....  | 72 |
| Figura 17 - Concentração celular (▲) e de PSP20 (○) para o cultivo de <i>C. vulgaris</i> IPR-7117 .....  | 72 |
| Figura 18 - Concentração celular (▲) e de PSP10 (○) para o cultivo de <i>C. vulgaris</i> IPR-7117 .....  | 73 |
| Figura 19 - Concentração celular (▲) e de PSL (○) para o cultivo de <i>C. vulgaris</i> IPR-7117.....   | 73 |
| Figura 20 - Cultivos da <i>C. vulgaris</i> IPR-7117 com PSP20 e Jaguar® nas concentrações de ● 60 µg.L <sup>-1</sup> ; ■ 600 µg.L <sup>-1</sup> ;▲ 6000 µg.L <sup>-1</sup> .....                   | 77 |
| Figura 21 - Concentração de células (○), lactose (▲) e Jaguar® (Δ) para o cultivo da <i>C. vulgaris</i> IPR-7117 com PSP20 e Jaguar® na concentração inicial de 60 µg.L <sup>-1</sup> .....        | 78 |

|   |     |
|---|-----|
| Figura 22 - Concentração de células (○), lactose (▲) e Jaguar® (Δ) para o cultivo da <i>C. vulgaris</i> IPR-7117 com PSP20 e Jaguar® na concentração inicial de 600 µg.L <sup>-1</sup> .....                    | 78  |
| Figura 23 - Concentração de células (○), lactose (▲) e Jaguar® (Δ) para o cultivo da <i>C. vulgaris</i> IPR-7117 com PSP20 e Jaguar® na concentração inicial de 6000 µg.L <sup>-1</sup> .....                   | 79  |
| Figura 24 - Amostras dos cultivos da <i>C. vulgaris</i> IPR-7117 com PSP20 e Jaguar® 600 µg.L <sup>-1</sup> (a), 60 µg.L <sup>-1</sup> (b) e 6000 µg.L <sup>-1</sup> (c) .....                                  | 81  |
| Figura 25 - Cultivos da <i>C. vulgaris</i> IPR-7117 com PSP20 e Trueno® nas concentrações de ▲ 60 µg.L <sup>-1</sup> ; ■ 600 µg.L <sup>-1</sup> ; ● 6000 µg.L <sup>-1</sup> .....                               | 83  |
| Figura 26- Concentração de células (○), lactose (▲) e Trueno® (Δ) para o cultivo da <i>C. vulgaris</i> IPR-7117 com PSP20 e Trueno® na concentração inicial de 60 µg.L <sup>-1</sup> .....                      | 84  |
| Figura 27 - Concentração de células (○), lactose (▲) e Trueno® (Δ) para o cultivo da <i>C. vulgaris</i> IPR-7117 com PSP20 e Trueno® na concentração inicial de 600 µg.L <sup>-1</sup> .....                    | 84  |
| Figura 28 - Concentração de células (○), lactose (▲) e Trueno® (Δ) para o cultivo da <i>C. vulgaris</i> IPR-7117 com PSP20 e Trueno® na concentração inicial de 6000 µg.L <sup>-1</sup> .....                   | 85  |
| Figura 29 - Placas com sementes de alface germinadas e não germinadas na presença de Jaguar.....  | 89  |
| Figura 30 - Placas com sementes de alface germinadas e não germinadas na presença de Trueno .....   | 89  |
| Figura 31 - Germinação relativa em função das concentrações de meio de cultivo contendo Jaguar® e Trueno® .....   | 90  |
| Figura 32 - Inibição relativa (%) do crescimento da radícula relativo ao controle negativo em função das concentrações de meio de cultivo contendo Jaguar® e Trueno® .....                                      | 91  |
| Figura 33 - Inibição relativa (%) do crescimento da raiz relativo ao controle negativo em função das concentrações de meio de cultivo contendo Jaguar® e Trueno® .....  | 91  |
| Figura 34 - Mapa bibliométrico construído pelo VOSviewer com base na co-ocorrência da palavra-chave EAHM em uma linha do tempo e suas inter-relações.....   | 105 |
| Figura 35 - Mapa bibliométrico das colaborações dos principais países com base no acoplamento bibliográfico nas publicações da EAHM .....   | 106 |
| Figura 36 - Mapa bibliométrico de co-autoria baseado em publicações da EAHM..   | 107 |
| Figura 37 - Mapa bibliométrico baseado na citação dos principais periódicos das publicações da EAHM: (A) mapa bibliométrico baseado no FI; (B) ano médio das publicações da EAHM dos principais periódicos..... | 108 |

## LISTA DE GRÁFICOS

|   |     |
|---|-----|
| Gráfico 1 - Distribuição anual de publicações sobre microalga e substrato residual.....       | 29  |
| Gráfico 2 - Número de publicações por ano obtidas na fase 5 da <i>Methodi Ordinatio</i> ..... | 104 |

## LISTA DE TABELAS

|   |     |
|---|-----|
| Tabela 1 - Distribuição das dez principais áreas de pesquisa e número de publicações .....  | 30  |
| Tabela 2 - Dez principais publicações citadas com base na frequência de citações .....  | 40  |
| Tabela 3 - Dez principais agências financiadoras e respectivos países .....   | 46  |
| Tabela 4 - Composição do meio sintético BBM modificado (pH=6,8).....  | 57  |
| Tabela 5 - Equações da reta e Coeficiente de Determinação ( $R^2$ ) .....   | 61  |
| Tabela 6 - Diluições do sobrenadante dos cultivos para os ensaios de ecotoxicidade com <i>Artemia salina</i> .....                                      | 63  |
| Tabela 7 - Caracterização físico-química do soro (S), permeado de soro lácteo líquido (PSL) e em pó (PSP) .....   | 67  |
| Tabela 8 - Parâmetros cinéticos, pH e teor de lipídeos dos cultivos da <i>C. vulgaris</i> IPR-7117 em 400 horas de cultivo .....                        | 75  |
| Tabela 9 - Parâmetros cinéticos, pH e teor de lipídeos dos cultivos da <i>C. vulgaris</i> IPR-7117 adicionada de Jaguar® em 400 horas de cultivo.....   | 81  |
| Tabela 10 - Parâmetros cinéticos, pH e teor de lipídeos dos cultivos da <i>C. vulgaris</i> IPR-7117 adicionada de Trueno® em 379 horas de cultivo ..... | 86  |
| Tabela 11 - Mortalidade de <i>Artemia salina</i> em função das concentrações de Jaguar® e Trueno®.....  | 87  |
| Tabela 12 - Concentração letal ( $LC_{50}$ ) para os meios de cultivo contendo os herbicidas Jaguar® e Trueno® .....                                    | 88  |
| Tabela 13 - Lista dos 20 artigos classificados por índice <i>InOrdinatio</i> .....  | 103 |
| Tabela 14 - Avaliação de ecotoxicidade de vários herbicidas utilizando espécies de microalgas .....   | 110 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

|                    |   |
|--------------------|---|
| BBM                | <i>Bold's Basal Medium</i>                                      |
| $\mu$              | Velocidade específica de crescimento                            |
| $\mu\text{g}$      | Micrograma  |
| $\mu_{\text{máx}}$ | Velocidade máxima específica de crescimento                     |
| AEHM               | Avaliação ecotoxicidade herbicidas microalgas                   |
| C/N                | Carbono/Nitrogênio  |
| CCAP               | Centro de Cultura de Algas e Protozoários                       |
| CE <sub>50</sub>   | Concentração efetiva média (causa inibição de 50% dos náuplios) |
| CEC                | Compostos de interesse emergente                                |
| CO <sub>2</sub>    | Dióxido de Carbono  |
| CONAB              | Companhia Nacional de Abastecimento                             |
| d                  | Dia   |
| DBO                | Demanda Bioquímica de Oxigênio                                  |
| DCF                | Diclofenaco   |
| DQO                | Demanda Química de Oxigênio                                     |
| FAO                | <i>Food and Agriculture Organization</i>                        |
| FI                 | Fator de impacto  |
| g                  | Gramma  |
| h                  | Hora  |
| ICRRd              | Inibição do crescimento relativo da radícula                    |
| ICRRz              | Inibição do crescimento relativo da raiz                        |
| JCR                | <i>Journal Citation Reports</i>                                 |
| L                  | Litro   |
| LC <sub>50</sub>   | Concentração letal (causa morte de 50% dos náuplios)            |
| MCRdA              | Média de crescimento das radículas na amostra                   |
| MCRdC              | Média de crescimento das radículas no controle negativo         |
| MCRzA              | Média de crescimento das raízes na amostra                      |
| MCRzC              | Média de crescimento das raízes no controle negativo            |
| mg                 | Miligramma  |
| mM                 | Milimol   |
| MT                 | Milhões de toneladas  |
| NaOH               | Hidróxido de Sódio  |
| NH <sub>3</sub>    | Amônia  |

|           |   |
|-----------|---|
| ONU       | Organização das Nações Unidas                 |
| $P_f$     | Concentração final de lipídeos                |
| $P_i$     | Concentração inicial de lipídeos              |
| PSL       | Permeado de soro lácteo líquido               |
| PSP       | Permeado de soro lácteo em pó                 |
| PSP10     | Permeado de soro lácteo em pó (C/N=10)        |
| PSP20     | Permeado de soro lácteo em pó (C/N=20)        |
| $Q_P$     | Produtividade volumétrica de produto          |
| rpm       | Rotação por minuto                            |
| $r_s$     | Velocidade volumétrica de consumo de açúcares |
| $r_x$     | Velocidade volumétrica de crescimento         |
| S         | Soro lácteo                                   |
| $S_f$     | Concentração final de açúcar                  |
| SH        | Sem herbicida                                 |
| $S_i$     | Concentração inicial de açúcar                |
| SM        | Sem microalga                                 |
| $t_f$     | Tempo final de fermentação                    |
| $t_g$     | Tempo de geração                              |
| $t_i$     | Tempo inicial de fermentação                  |
| WoS       | <i>Web of Science</i>                         |
| $X_f$     | Concentração final de células                 |
| $X_i$     | Concentração inicial de células               |
| $X_{máx}$ | Concentração celular máxima                   |
| $Y_{P/S}$ | Fator de conversão de substrato em produto    |
| $Y_{X/S}$ | Fator de conversão substrato em célula        |

## LISTA DE SÍMBOLOS

|          |                              |
|----------|------------------------------|
| ®        | Marca comercial              |
| +        | Soma                         |
| $\Delta$ | Varição                      |
| -        | Subtração                    |
| x        | Multiplicação                |
| .        | Multiplicação                |
| %        | Porcentagem                  |
| $R^2$    | Coefficiente de determinação |



## SUMÁRIO

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO</b> .....   | <b>17</b> |
| <b>2 CULTIVO DE MICROALGAS COM DIFERENTES RESÍDUOS COMO SUBSTRATO: UMA REVISÃO CIENCIOMÉTRICA</b> ..... | <b>20</b> |
| 2.1 INTRODUÇÃO .....  | 20        |
| 2.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....  | 21        |
| 2.2.1 Microalgas .....  | 21        |
| 2.2.2 <i>Chlorella vulgaris</i> .....   | 23        |
| 2.2.3 Cultivo De Microalgas.....  | 24        |
| 2.2.4 Substratos Usados como Fonte Nutricional Para Microalgas.....                                     | 25        |
| 2.2.5 Cienciometria .....   | 26        |
| 2.3 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS.....  | 27        |
| 2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....  | 28        |
| 2.5 CONCLUSÃO.....  | 46        |
| <b>3 CULTIVO DE <i>CHLORELLA VULGARIS</i> EM PERMEADO DE SORO LÁCTEO TOLERANTE A HERBICIDAS</b> .....   | <b>48</b> |
| 3.1 INTRODUÇÃO .....  | 48        |
| 3.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....  | 49        |
| 3.2.1 Soro Lácteo .....   | 49        |
| 3.2.2 Soro Lácteo Usado como Substrato no Cultivo de Microalgas.....                                    | 50        |
| 3.2.3 Herbicidas .....  | 51        |
| 3.2.3.1 Jaguar®.....  | 70        |
| 3.2.3.2 Trueno® .....   | 70        |
| 3.2.4 Cultivo de Microalgas em Meios Contendo Herbicidas .....  | 52        |
| 3.2.5 Ecotoxicidade De Herbicidas.....  | 53        |
| 3.3 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS.....  | 55        |
| 3.3.1 Fluxograma Procedimentos Metodológicos.....   | 55        |
| 3.3.2 Microrganismo e Matérias-primas .....   | 56        |
| 3.3.3 Caracterização do Soro Lácteo .....   | 56        |
| 3.3.4 Condições de Cultivo.....   | 56        |
| 3.3.4.1 Preparo de ágar inclinado para cultivo mixotrófico .....  | 61        |
| 3.3.4.2 Preparo de inóculo e condições de axenia .....  | 62        |
| 3.3.4.3 Cultivo de microalgas com herbicidas .....  | 64        |
| 3.3.5 Metodologia Analítica .....   | 60        |
| 3.3.5.1 Determinação de pH.....   | 65        |
| 3.3.5.2 Determinação da concentração celular .....  | 65        |
| 3.3.5.3 Determinação de glicose e lactose.....  | 65        |

|   |            |
|---|------------|
| 3.3.5.4 Determinação de lipídeos.....   | 67         |
| 3.3.5.5 Determinação de herbicidas.....   | 68         |
| 3.3.5.6 Análise de ecotoxicidade dos herbicidas usando <i>Artemia salina</i> .....                    | 68         |
| 3.3.5.7 Análise de ecotoxicidade dos herbicidas usando alface ( <i>Lactuca sativa</i> ).....          | 69         |
| 3.3.6 Determinação dos Parâmetros Fermentativos.....  | 64         |
| 3.3.6.1 Fator de conversão de substrato em produto ( $Y_{P/S}$ ).....                                 | 70         |
| 3.3.6.2 Fator de conversão de substrato em produto( $Y_{X/S}$ ).....                                  | 70         |
| 3.3.6.3 Produtividade volumétrica de produto ( $Q_P$ ).....   | 70         |
| 3.3.6.4 Velocidade volumétrica de crescimento celular ( $r_x$ ).....                                  | 71         |
| 3.3.6.5 Velocidade volumétrica de consumo de açúcares ( $r_s$ ).....                                  | 71         |
| 3.3.6.6 Máxima velocidade específica de crescimento ( $\mu_{m\acute{a}x}$ ).....                      | 71         |
| 3.3.6.7 Tempo de geração ( $t_g$ ).....   | 72         |
| 3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....   | 67         |
| 3.4.1 Caracterização do Soro Lácteo e do Permeado de Soro Lácteo Líquido.....                         | 67         |
| 3.4.2 Seleção da Microalga.....   | 68         |
| 3.4.3 Cultivo <i>Chlorella vulgaris</i> IPR-7117 Usando Diferentes Substratos.....                    | 69         |
| 3.4.4 Cultivo da <i>Chlorella vulgaris</i> IPR-7117 com PSP20 e Herbicida Jaguar®.....                | 77         |
| 3.4.5 Cultivo da <i>Chlorella vulgaris</i> IPR-7117 com PSP20 e Herbicida Trueno®.....                | 82         |
| 3.4.6 Ecotoxicidade dos Herbicidas Usando <i>Artemia salina</i> .....                                 | 87         |
| 3.4.7 Ecotoxicidade dos Herbicidas Usando alface ( <i>Lactuca sativa</i> ).....                       | 89         |
| 3.5 CONCLUSÃO.....  | 92         |
| <b>4 AVALIAÇÃO DE ECOTOXICIDADE DE HERBICIDAS EM MICROALGAS:<br/>UMA VISÃO GERAL.....</b>             | <b>93</b>  |
| 4.1 INTRODUÇÃO.....   | 93         |
| 4.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....  | 94         |
| 4.2.1 Mercado Agrícola Atual.....   | 94         |
| 4.2.2 Uso de Agroquímicos.....  | 96         |
| 4.2.3 Estudos de Ecotoxicidade Usando Microalgas.....   | 97         |
| 4.2.4 <i>Methodi Ordinatio</i> .....  | 99         |
| 4.3 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS.....  | 99         |
| 4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....   | 102        |
| 4.4.1 Construção de um Portfólio Bibliográfico sobre EAHM Usando o <i>Methodi<br/>Ordinatio</i> ..... | 102        |
| 4.4.2 Análise Bibliométrica de EAHM.....  | 104        |
| 4.4.3 Destaques de Revisão: Quais os Estudos de Alto Impacto Sobre EAHM.....                          | 109        |
| 4.5 CONCLUSÃO.....  | 117        |
| <b>5 CONCLUSÕES GERAIS.....</b>   | <b>119</b> |
| <b>REFERÊNCIAS.....</b>   | <b>120</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

A conservação das águas e dos ecossistemas é fundamental para um planeta sustentável. Contudo, o crescimento da população, ascendente ao desenvolvimento econômico, agrícola e industrial, conseqüentemente aumenta o uso da água. Assim, a preservação dos ambientes hídricos e promoção da qualidade da água é fundamental (PLAPPALLY; LIENHARD V, 2012).

As formas de contaminação mais comuns do ambiente aquático, são os despejos de efluentes domésticos e industriais sem que passem por um tratamento prévio, além de lançamento de fármacos e pesticidas (GASPAR; PEREIRA; NETO, 2012; QU et al., 2013). O último produto, refere-se a compostos tóxicos, os quais tem aumentado de modo drástico e incontrolável, com a intensividade das atividades agrícolas (ALVES, 2014).

Estudos buscam formas de minimizar ou erradicar os prejuízos que tanto os dejetos quanto os agrotóxicos utilizados no campo proporcionam aos ecossistemas. Um dos focos dessas pesquisas é o aproveitamento dos subprodutos agroindustriais, procurando agregar valor em processos de produção (CHRISTENSON; SIMS, 2011). Como alternativa sustentável, tem-se o uso de microrganismos capazes de realizar a biofixação de dióxido de carbono, remoção de carga orgânica e tóxicos de efluentes (LACERDA, 2013).

As microalgas têm sido fonte de pesquisas em diversos campos biotecnológicos (KOLLER; MUHR; BRAUNEGG, 2014). A biomassa das microalgas e seus produtos se relacionam com muitas áreas de interesse, como indústrias alimentícias, fármacos, biocombustíveis, biofertilizantes, entre outras (COSTA et al., 2002). Esses microrganismos vêm sendo estudados em razão dos benefícios que proporcionam e suas múltiplas aplicações (PERREIRA, 2017).

O cultivo de microalgas em meios sintéticos necessita de grandes investimentos. Por isso, buscam-se meios de culturas alternativos, que garantam um crescimento similar ou até maior, a fim de minimizar os custos de cultivo e promover a remediação de lançamento de dejetos indesejáveis ao meio ambiente (MONTEIRO, M. D. A.; FERNANDES, 2014).

Entre as microalgas mais usadas no tratamento de efluentes está a *Chlorella*

*vulgaris*. Ela atua na diminuição da carga de matéria orgânica, compostos fosfatados e nitratos gerados em esgotos por exemplo, e que acabam provocando a contaminação e eutrofização de ambientes aquáticos (EVANS et al., 2017). Além disso, este microrganismo é sensível a substâncias tóxicas, é encontrada facilmente em ambientes aquáticos de água doce e salgada e cultivada de modo simples em laboratório, além de ter representatividade entre as algas (WU; LIN; YUAN, 2007).

As microalgas tolerantes a herbicidas podem ser aplicadas nas plantações, como biofertilizante ou bioestimulante, garantindo que o seu desenvolvimento não seja inibido na presença desses compostos no solo. O uso das microalgas na agricultura tem despertado o interesse de produtores na formulação de produtos, a fim de melhorar o desempenho produtivo de plantas (SEMPREBOM, 2017). Os biofertilizantes a base de microalgas podem oferecer vantagens as plantas e ao ambiente, pois: incrementam a matéria orgânica no solo, melhoram a porosidade do solo, aumentam a oferta de oxigênio na rizosfera, aumenta a retenção de água do solo, liberam substâncias que promovem o crescimento vegetal, além de melhorarem a salinidade e controle da acidez do solo, prevenirem o crescimento de ervas daninhas e aumentarem a disponibilidade de fosfatos para as plantas. (DE MEDEIROS et al., 2007; DOS SANTOS; RODELLA, 2007; NOBILE, 2009; UYSAL, UYSAL e EKINCI, 2015)

Dessa forma, os principais objetivos desta dissertação visam: 1) realizar uma revisão cienciométrica sobre estudos que cultivam microalgas em meios residuais; 2) obter biomassa da microalga *Chlorella vulgaris* cultivada em permeado de soro lácteo; avaliar a tolerância da microalga frente aos herbicidas Jaguar® e Trueno® e verificar seus efeitos sobre a microalga; 3) realizar uma revisão sistemática sobre ecotoxicidade de herbicidas em microalgas, através do ranqueamento de artigos obtidos pelo *Methodi Ordinatio*,

O primeiro assunto, trata de uma revisão cienciométrica de publicações sobre o cultivo de microalgas usando resíduos como substrato. A finalidade é o reaproveitamento desses subprodutos gerando um produto novo de valor agregado, além, de reduzir os custos com o cultivo de microalgas e com os tratamentos desses efluentes. Na parte experimental, aborda-se propriamente o cultivo da microalga *Chlorella vulgaris* com permeado de soro lácteo e com herbicidas, além de analisar a ecotoxicidade dos herbicidas. Como complemento, o último assunto trata de uma revisão sistemática da literatura sobre a estudos de ecotoxicidade de herbicidas

usando microalgas, com o objetivo de levantar tendências e lacunas nessa área e contribuir para futuras pesquisas.

## 2 CULTIVO DE MICROALGAS COM DIFERENTES RESÍDUOS COMO SUBSTRATO: UMA REVISÃO CIENCIOMÉTRICA

### 2.1 INTRODUÇÃO

O uso da biomassa microalgal está em diversas áreas industriais. Elas são aplicadas na área farmacêutica, de cosméticos, alimentícias, além de ambiental, como no tratamento de águas residuárias, biofixação de gás carbônico e remoção de metais tóxicos, produção de energia e biocombustíveis, além da obtenção de biomassa aplicada para nutrição animal e humana, produção de biofertilizantes, dentre outros fins (AHMAD; MEHMOOD; MALIK, 2019; SCHMITZ; MAGRO; COLLA, 2013).

O emprego de microalgas no tratamento de resíduos agroindustriais vem sendo estudado como alternativa viável na minimização dos problemas ambientais e na redução dos custos de produção desses microrganismos (SILVA, 2014). Um exemplo de subproduto agroindustrial é o soro de leite, principal componente gerado na indústria de laticínios, rico em carboidratos, proteínas, lipídios, sais mineiras, vitaminas e sólidos totais (CEDENO; YEPEZ TAMAYO; RAMIREZ-CARDENAS, 2018). Dessa forma, é possível complementar o meio nutritivo das microalgas com soro lácteo (Abreu et al., 2012).

Outros produtos estudados e aplicados como substrato para as microalgas são os resíduos da suinocultura (ZHU et al., 2013), efluentes do processamento da cana-de-açúcar (RAMIREZ; FARENZENA; TRIERWEILER, 2014), esgoto doméstico (KLIGERMAN; BOUWER, 2015), resíduos de cervejarias (FAROOQ et al., 2013), processo de fabricação do óleo de palma (LAM; LEE, 2011), entre outros. Para o setor industrial, a aplicabilidade destes resíduos representam lucros, tendo em vista, que na maioria das vezes, as empresas não dispõem de tratamento e descarte adequado, resultando em graves problemas ambientais (PERREIRA, 2017).

A microalga *Chlorella* é uma das mais cultivadas mundialmente e comercializada como suplemento alimentar, pois apresenta rápida velocidade de reprodução e facilidade de adaptação em diferentes ambientes (Primo et al., 2015). É uma das algas mais usadas no tratamento de efluentes oriundos de esgotos, onde além de minimizar a carga de matéria orgânica, de compostos fosfatados e nitratos, evita poluição e degradação de sistemas aquáticos (EVANS et al., 2017).

Novas pesquisas relacionadas aos mais diversos assuntos são publicadas em

vários jornais ao redor do mundo, tornando difícil acompanhar efetivamente o progresso da informação em uma ou mais áreas do conhecimento. A cienciometria estuda os aspectos quantitativos das produções científicas e permite mensurar o número de publicações ao longo do tempo, verificar os temas mais estudados e identificar as tendências e lacunas de publicação em determinada área (SANTOS; KOBASHI, 2009). Além disso, essa metodologia pode auxiliar os pesquisadores na tomada de decisões e com isso, softwares foram desenvolvidos que possibilitam uma busca bibliográfica de modo rápido, eficiente e de fácil visualização dos dados e resultados, por meio de gráficos e figuras.

Com base nisso, realizou-se revisão cienciométrica de publicações sobre o cultivo de microalgas utilizando resíduos como substratos, como forma de reaproveitamento e/ou descontaminação do mesmo.

## 2.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.2.1 Microalgas

As microalgas são seres microscópicos, geralmente unicelulares, procariontes ou eucariontes, predominantemente aquáticos e fazem parte de um grupo heterogêneo de organismos. São microrganismos fotossintéticos que combinam água, dióxido de carbono e luz solar para produzir variadas formas de energia (polissacarídeos, proteínas, lipídios e hidrocarbonetos) (ANDRADE; COSTA, 2008; CHISTI, 2007).

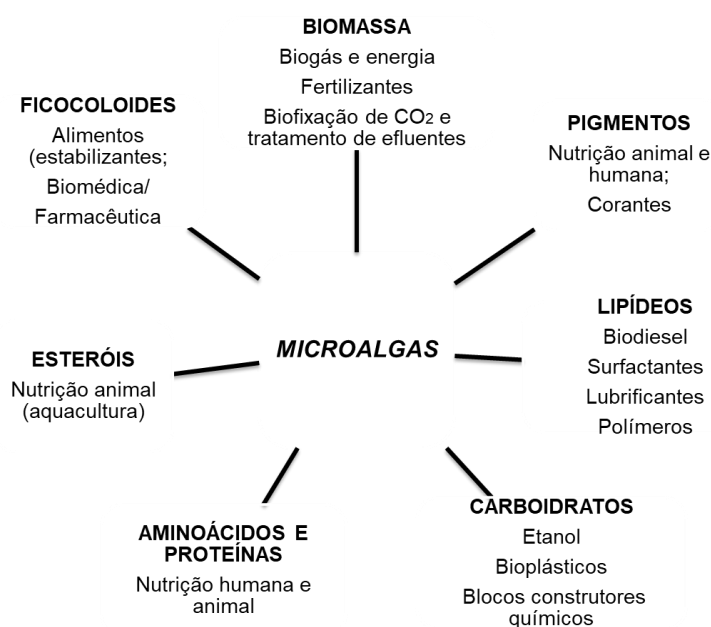
O cultivo de microalgas é influenciado por aspectos físicos, químicos e biológicos, sendo os fatores físico-químicos: a luz, temperatura, pH, salinidade e disponibilidade de nutrientes. Os aspectos químicos se referem a composição do meio de cultivo. E, os fatores biológicos, por sua vez, dizem respeito às taxas metabólicas da espécie que está sendo cultivada (FERREIRA; SOARES; COSTA, 2013; SCHMITZ; MAGRO; COLLA, 2013).

São inúmeras as aplicações biotecnológicas das microalgas: aditivo nutricional em rações animais, matéria-prima para produção de biocombustíveis, biofertilizantes, polímeros, alimento para organismos aquáticos, fonte de antioxidantes, pigmentos, ácidos graxos, proteínas e outros compostos bioativos (PRIMO et al., 2015).

O interesse em empregar as microalgas nos processos industriais como matéria-prima tem em vista a formulação de produtos oriundos de compostos naturais com alto valor no mercado mundial (DERNER et al., 2006). As pesquisas visam conhecer e produzir microalgas de modo viável e eficaz, permitindo a produção de compostos valiosos aplicados em vários segmentos industriais (PERREIRA, 2017).

As características e propriedades específicas das microalgas garantem o alto potencial das microalgas. Como exemplo, cita-se a atividade antioxidante, com aplicação em alimentos funcionais (DE MORAIS; COSTA, 2008). A Figura 01 apresenta algumas aplicações das microalgas nos variados setores da biotecnologia.

**Figura 1 - Aplicações biotecnológicas das microalgas**



**Fonte: Adaptado por autora de Brasil e Costa (2016)**

O uso da biomassa microalgal vem crescendo em diversas áreas industriais e esta pode ser usada como alimento ou fonte de biocompostos (RADMANN; COSTA, 2008). Os ramos de cosméticos, farmacêuticos e alimentícios são os mais fortalecidos no mercado, tendo-se em vista o maior valor agregado apresentado nesses setores (PRIMO, et al., 2015).

No âmbito ambiental, o uso de microalgas inclui a biofixação de CO<sub>2</sub> (gás carbônico), com uma maior eficiência e elevada taxa de produtividade (ton/ha/ano) comparadas com plantas terrestres. Além disso, as microalgas realizam o tratamento de águas residuais, o que garante sustentabilidade ambiental e viabilidade econômica



(RAZZAK et al., 2017). Na produção de biocombustíveis, como biodiesel e bioetanol, e produção de moléculas de origem lipídica com capacidade surfactante, esses microrganismos também são representativos (SCHMITZ; MAGRO; COLLA, 2013).

A produção de microalgas apresenta diversas vantagens em relação a culturas tradicionais, como por exemplo, comparando-se com o soja, amendoim, girassol, para a produção de óleos, como biodiesel. Algumas das vantagens são: capacidade elevada de fixação de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), alto teor de lipídeos e amido, produtividade significativa, além de produção em terras não cultiváveis, cultivada em diversos biótopos (água doce, marinha, residuais) e é facilmente disponível (BRASIL; COSTA, 2016; CHEN et al., 2015; LAM; LEE, 2011).

Os principais desafios quanto à produção de biomassa microalgal, são os elevados custos e investimentos de produção, no que diz respeito aos nutrientes, mão-de-obra, energia, entre outros (BRAGA et al., 2013). Para maximizar a produção de biomassa e de compostos intracelulares, as microalgas devem ser cultivadas em sistemas apropriados, respeitando as peculiaridades e características de cada cepa (PERREIRA, 2017). O sucesso da inserção de microalgas depende da produtividade, qualidade da biomassa e custo-benefício de produção (GEORGIANNA; MAYFIELD, 2012).

A fim de minimizar os custos de produção com os meios de culturas sintéticos e otimizar os índices produtivos, a utilização de efluentes de diversos setores industriais e domésticos tem se fortalecido, além de ter fundamental importância em questões de cunho econômico e ambiental. A sustentabilidade é foco nesse ramo, onde além de agregar valor a um produto que geraria gastos para seu tratamento, serve como forma de baratear a produção e cultivo de microalgas (CHRISTENSON; SIMS, 2011; LI et al., 2011; WU et al., 2014; ZHOU et al., 2014).

### 2.2.2 *Chlorella vulgaris*

A *Chlorella vulgaris* é uma alga unicelular pertencente a classe Chlorophyceae, ordem Chlorococcales e família Oocystaceae (Belasco, 1997). Apresenta forma de vida unicelular ou colonial e pode acumular pigmentos como clorofila *a* e *b*, β-caroteno e xantofilas. A principal forma de reserva energética é o amido, porém em algumas condições pode acumular lipídeos. A reprodução desta espécie pode ocorrer nas formas de divisão binária, esporos assexuais e reprodução

sexual (HOEK; MANN; JAHNS, 1995).

Essa espécie de microalga situa-se na classe de algas verdes, tamanho variando de 2 e 10  $\mu\text{m}$  e não possui flagelo. Constitui um grupo variado e são encontradas em vários ambientes marinhos e água doce. Apresenta teor de nutrientes em torno de 45% de proteínas, 20% de lipídios, 20% de carboidratos, 5% de fibras e 10% de vitaminas e minerais (BELASCO, 1997; BRAGA et al., 2013).

A *Chlorella* é umas das microalgas mais cultivadas mundialmente e é amplamente comercializada. Conforme Safi et al., (2014) suas principais atribuições são como suplemento alimentar, tanto nutrição humana como animal, tendo em vista, seu elevado poder nutricional, bem como, no tratamento de efluentes, produção de biofertilizantes, biocombustíveis e extração de lipídeos.

Em relação à produção de lipídeos, as microalgas sintetizam-os a partir de um fonte de carbono, sendo esta de origem inorgânica ou orgânica (HUANG; HUNG; YANG, 2016). Se a *Chlorella vulgaris* for cultivada em ótimas condições pode-se atingir níveis altos de lipídeos, de 5 a 40% de lipídeos em sua biomassa seca. Contudo, quando cultivada sob condições de stress as microalgas podem chegar até 68% de lipídeos em sua composição (SAFI et al., 2014).

Para produção de biomassa a *Chlorella vulgaris* é uma das mais adequadas, por ser resistente a contaminantes e não necessitar de grandes quantidades de nutrientes produzindo alta quantidade de biomassa (YEH; CHANG, 2012). Contudo, para qualquer espécie de microalga os fatores nutricionais são de fundamental importância no seu desenvolvimento, precisando de macronutrientes, micronutrientes e vitaminas (GUILLARD, 1975).

### 2.2.3 Cultivo de Microalgas

Há três tipos de metabolismo nas microalgas que dependem da forma como a fonte de carbono é usada: autotrófico, heterotrófico e mixotrófico. No autotrófico as microalgas dependem de luz e dióxido de carbono para crescimento. Para o heterotrófico, crescem com a fonte de carbono e a fonte de energia é disponibilizada por meio de compostos orgânicos. Nos cultivos mixotróficos, ambos os metabolismos são usados, variando a concentração de compostos orgânicos e intensidade de luz fornecida (CHOJNACKA; MARQUEZ-ROCHA, 2004; KLEIN; BONOMI; FILHO, 2018; YANG et al., 2014).

A fonte de carbono utilizada muitas vezes se refere a compostos orgânicos. Diversas pesquisas têm relatado o uso de resíduos domésticos e industriais como forma de minimizar os custos de cultivo de microalgas. Miao et al., (2016), afirma que *C. vulgaris* atinge altas concentrações celulares quando cultivada em resíduo doméstico sintético e Abreu et al., (2012) relata que o cultivo de *C. vulgaris* é favorável utilizando o soro de leite.

Nos cultivos heterotrófico e mixotrófico, o conteúdo lipídico aumenta e os rendimentos em biomassa e produtividade lipídica passam a ser mais elevados (LEE, 2001). Grande parte dos estudos comparando-se os sistemas, mostram que a condição mixotrófica apresenta grandes vantagens, quanto à produtividade e taxa de crescimento (IP; WONG; CHEN, 2004; LIANG; SARKANY; CUI, 2009; YANG; HUA; SHIMIZU, 2000).

Segundo Azaman et al., (2017), a microalga *Chlorella* cultivada em meio mixotrófico modificou morfologicamente as células, principalmente no tamanho das células devido a elevada quantidade de conteúdo celular. O diâmetro da *Chlorella Sorokiniana*, para condição fotoautotrófica foi de 2 a 4  $\mu\text{m}$ , enquanto que em condições mixotróficas, as células aumentaram de 3 a 5  $\mu\text{m}$  e para alguns casos chegou a 7 a 8  $\mu\text{m}$ .

Babaei et al., (2018) avaliaram a remoção de nutrientes e produção de biomassa na microalga *C. vulgaris* em águas residuais com elevadas taxas de nitrato e amônio, obtendo maior taxa de remoção no sistema mixotrófico. Outra vantagem associada ao cultivo de microalgas em sistema mixotrófico está na remoção de nutrientes, crescimento e toxicidade de subprodutos agroindustriais.

Conforme estudo de De Melo et al., (2018), no cultivo mixotrófico de *C. vulgaris*, a produtividade celular foi maior, erradicando a toxicidade dos subprodutos (licor de milho, soro lácteo e vinhaça), além de ser uma alternativa viável. Salati et al., (2017), com a mesma espécie de microalga, obtiveram maior concentração de biomassa e eficiência energética de carbono orgânico e total comparando-se cultivo mixotrófico e autotrófico.

#### 2.2.4 Substratos Usados como Fonte Nutricional Para Microalgas

O uso de resíduos como substratos de baixo custo e de fácil acesso é vista como alternativa para os cultivos microalgais, desenvolvendo-se assim, muitos

estudos nessa área. Efluentes tanto domésticos como industriais requerem tratamento antes de serem lançados diretamente ao meio, portanto, utilizá-los como fonte nutricional para as microalgas, torna-se ferramenta interessante para otimizar o processo produtivo e minimizar custos, ou seja, é uma prática ambientalmente aceita e economicamente viável (CHRISTENSON; SIMS, 2011; KUMARI; KAUR; BHATNAGAR, 2011)

Os estudos e pesquisas envolvem resíduos agroindustriais aplicados como fonte nutricional para as microalgas dos mais vários ramos, alguns deles são: subprodutos lácteos (HENA; FATIMAH; TABASSUM, 2015), resíduos da suinocultura (ZHU et al., 2013), efluentes do processo da cana de açúcar (RAMIREZ; FARENZENA; TRIERWEILER, 2014), efluente doméstico (KLIGERMAN; BOUWER, 2015), resíduos das indústrias de cervejas (FAROOQ et al., 2013), entre outros.

A microalga *C. vulgaris* em específico é amplamente usada em pesquisas por seu alto teor lipídico e capacidade de remoção de águas residuais. Essas águas contêm em sua composição nitrogênio, fósforo e nutrientes orgânicos de carbono e mesmo sendo tratadas em estações de tratamento, são difíceis e tem alto custo para remoção completa e podem causar eutrofização (KIM et al., 2010). Os nutrientes que são geradas nas águas residuais domésticas são necessários para o crescimento e desenvolvimento da *C. vulgaris* (HOFFMANN, 1998; MALLICK, 2002).

A valorização dessa prática é garantida pela produção de biomassa de boa qualidade e pela diminuição significativa dos custos. Em vista disso, a busca por fontes alternativas teve aumento considerável, onde os valores dispensados para nutrientes ficaram bem inferior ao comumente gasto com os meios sintéticos, além de as indústrias produtores desses resíduos não terem muitas vezes aplicação, tratamento ou descarte adequado, sofrendo com problemas ambientais (KANG et al., 2015; PERREIRA, 2017).

### 2.2.5 Cienciometria

Um dos ramos importantes da ciência da informação é a bibliometria. Ciência que permite realizar análise quantitativa de dados, através da matemática e estatística. Os pesquisadores podem analisar o andamento, tendências e desafios de vários campos de pesquisa (YE, 2018)

A cienciometria é o estudo quantitativo da ciência, comunicação na ciência e

política científica (MACIAS-CHAPULA, 1998). Ela se propõe a compreender o conhecimento científico, identificar as tendências e avanço de uma área em específico, verificar as revistas, prever tendências de publicação, de produtividade de autores, de organizações, de países, analisar processos de citação e co-citação e medir o avanço de áreas e surgimento de novas (VANTI, 2002).

Com a utilização dessa metodologia é possível estudar os aspectos de modo quantitativo da produção científica de modo que sejam feitas medidas de quanto se publicou em determinado período de tempo, analisar áreas de estudo, além das principais tendências e identificar as instituições que apresentaram maior produção científica (AKERMAN, 2013; RAZERA, 2016; SANTOS; KOBASHI, 2009).

A análise bibliométrica pode ser conduzida por diferentes pacotes de softwares, como Bibexcel, CiteSpace, Gephi, HistCite, Pajek, Publish or Perish, SciMat e VOSviewer. Nesse estudo, foram utilizados os softwares CiteSpace e VOSviewer. O Citespace<sup>®</sup> é um aplicativo em Java, gratuito e que permite a visualização do estudo cientométrico. A fundamentação desse programa é a análise de rede e visualização. Por meio dessa rede pode-se explorar a paisagem intelectual de uma área de conhecimento e avaliar os principais parâmetros envolvidos, como coloração, tamanho e as ligações entre os pontos apresentados (CHEN, 2014). Esse programa tem como objetivo analisar citações e gerar mapas visuais, além de identificar pontos críticos no desenvolvimento de um determinado assunto, especialmente pontos de inflexão e itens de pesquisa importantes (CUI; LIU; MOU, 2018). É usado também para avaliar a produtividade de instituições, países e autores; identificar colaborações internacionais e distribuições geográficas; e explorar hotspots e fronteiras de pesquisa em campos específicos (CHEN; DUBIN; KIM, 2014).

O software VOSviewer permite construir e visualizar mapas bibliométricos, sendo especialmente útil para exibir grandes mapas que facilitam a interpretação. Neste programa pode-se representar as redes por coautoria, co-citação ou pelas relações existentes bibliograficamente (VAN ECK; WALTMAN, 2010).

### 2.3 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

A análise cientométrica foi feita em quatro etapas. Inicialmente, fez-se uma pesquisa na base de dados Web of Science -WoS (Thomson Reuters, New York, NY, USA), que apresenta um quadro preciso e abrangente de impacto acadêmico

(FALAGAS et al., 2008). As buscas foram feitas de 2009 a dezembro de 2019 utilizando as palavras-chave nos campos “tópico”: “microalgae” AND “waste substrate”. Foram coletadas as seguintes informações de cada publicação: 1) Ano de publicação; 2) Tipos de publicação; 3) Autores; 4) Agências financiadoras; 5) Países; 6) Idioma; 7) Área de pesquisa; 8) Palavras-chave; 9) Categorias de pesquisa; 10) Periódicos. Outro levantamento realizado através da plataforma WoS foi o índice H, através da ferramenta “create citation report” que relaciona o número de publicações científicas com o número de suas citações, o que torna o um parâmetro avaliativo de um autor ou artigo (ANALYTICS, 2019).

Após a pesquisa, na segunda etapa, os dados obtidos na base de dados foram exportados para uma planilha Microsoft Excel para posterior refinamento dos dados, como forma de visualizar melhor o cenário de publicações na área de estudo.

O software VOSviewer (versão 1.6.13) foi usado para as representações gráficas deste estudo em relação as dimensões como revistas científicas, autores, países, organizações e publicações individuais extraídas do WoS. Foram usados dois tipos diferentes de mapa disponíveis no VOSviewer: Mapa de visualização de rede e mapa de densidade. No mapa de visualização da rede, os itens são indicados por um rótulo, um círculo e linhas. Quanto maior o círculo, maior a contribuição desse item e quanto mais próximos e espesso o elo entre dois itens, mais forte é a relação. Resumidamente, o tamanho dos itens depende do peso do item. Ele é determinado pela cor de um item ao qual o cluster pertence. Já no mapa de densidade, cada item em um mapa tem uma cor de acordo com sua densidade, variando do azul (menor densidade) ao vermelho (maior densidade) (VAN ECK; WALTMAN, 2010).

Por fim, na quarta etapa, foi feita a importação dos dados para o software CiteSpace V (5.4.R4), para explorar a tendência dessas pesquisas e analisar visualmente, periódicos instituições e países, palavras-chaves, ano de publicação, autores, além das principais agências financiadoras. Com esse software obteve-se os mapas de relacionamento por centralidade e frequência. Com a centralidade é possível observar os grandes grupos de nós presentes, sendo realçado em roxo os mais fortes e no centro de um componente de rede, enquanto, a frequência indica o quanto aquela citação ou termo é citado na busca (CHEN, 2014).

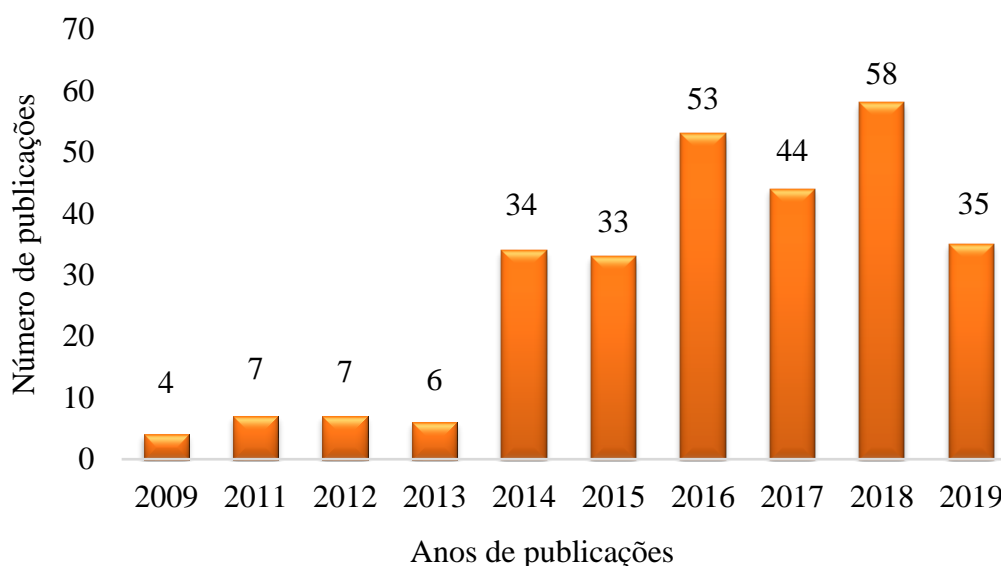
## 2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir da pesquisa na base WoS foram obtidas 294 publicações sobre cultivo

de microalgas usando diferentes resíduos como substratos. Os resultados foram filtrados a partir de leitura e análise dos estudos, chegando-se a 281 publicações relacionadas com o tema em estudo. Destes trabalhos, a língua predominante foi o inglês em 279 publicações, associado ao fato de que esse é o principal idioma através do qual se comunica ou divulga-se no meio científico (BERNARDO; EDUCAÇÃO, 2017), além de ser a língua da globalização e o mais ensinado nas escolas mundialmente (CHARLOT, 2007; PILHION, 2008).

Dos estudos, 81,5 % dessas publicações estavam na categoria artigos científicos, 12,5 % em artigos de revisão e 10 % como artigos de procedimento, que se referem a trabalhos completos apresentados em conferências e posteriormente publicados em periódicos. A tendência dos anos de publicações também foi avaliada. Nota-se, que houve um aumento significativo a partir dos anos de 2014 (Gráfico 1). Os anos com maior número de publicações foram em 2016 (18,9 %) e 2018 (20,6 %), deve-se considerar que as publicações do ano de 2019 podem apresentar número maior, uma vez que a pesquisa foi feita até a primeira quinzena de dezembro de 2019.

**Gráfico 1 - Distribuição anual de publicações sobre microalga e substrato residual**



**Fonte: Elaborado pela autora (2019)**

Uma das justificativas para o número de publicações alavancar a partir de 2014, é a divulgação do acesso aberto dos meios de publicação de periódicos, os quais, ampliam as redes de conhecimento e compartilhamento de informações. Em 2016, vários periódicos tiveram acesso livre de leitura na web de todo o conteúdo

publicado, o que garante um aumento do número do Fator de Impacto (FI) (MARQUES, 2017).

As áreas de pesquisa desses estudos são variadas e contemplam desde a Microbiologia Aplicada em Biotecnologia até a Biologia Computacional Matemática e Oceanografia. Os dois principais campos de estudo foram a Microbiologia Aplicada em Biotecnologia (118 estudos) e Combustíveis Energéticos (112 estudos), os quais representaram mais de 80% de todos os trabalhos publicados. A Tabela 1 apresenta dez áreas de pesquisa com maior número de publicações.

**Tabela 1 - Distribuição das dez principais áreas de pesquisa e número de publicações**

| Área de pesquisa                          | Contagem de registro (%) |
|---|--------------------------|
| <i>Biotechnology Applied Microbiology</i> | 118 (42,0)               |
| <i>Energy Fuels</i>                       | 112 (39,9)               |
| <i>Engineering</i>                        | 83 (29,5)                |
| <i>Environmental Sciences Ecology</i>     | 56 (19,9)                |
| <i>Agriculture</i>                        | 49 (17,4)                |
| <i>Chemistry</i>                          | 37 (13,2)                |
| <i>Science Technology Other Topics</i>    | 29 (10,3)                |
| <i>Water Resources</i>                    | 23 (8,2)                 |
| <i>Marine Freshwater Biology</i>          | 18 (6,4)                 |
| <i>Electrochemistry</i>                   | 13 (4,6)                 |

Fonte: Elaborado pela autora (2019)

A diversificação nas áreas de pesquisa se refere ao potencial que elas apresentam biotecnologicamente, e por isso seu destaque como principal campo é na biotecnologia. A microbiologia está inserida nesse contexto, pois a produção de biomassa microalgal está diretamente relacionada aos processos fermentativos, cultivos, produção de cepas, co-digestão, entre outras análises correspondentes a área microbiológica. Além disso, o vasto campo de atuação das microalgas e produção de produtos de alto valor comercial permitem que elas sejam aplicadas em indústrias químicas, farmacêuticas, de biocombustíveis, alimentícias, cosméticos e empresas do ramo agrícola (DERNER et al., 2006). Outro setor importante na área estudada, são os Combustíveis Energéticos. As microalgas são alternativas interessantes na produção desses compostos, sendo vistas como fontes de energia renováveis, considerando-se sua capacidade fotossintética, aumento de biomassa de forma rápida e alta capacidade de produção de lipídeos (OLIVEIRA, 2013).



Com base nas categorias de destaque da pesquisa, nota-se que as principais dizem respeito à biotecnologia aplicada a microbiologia, agricultura, engenharia, bioquímica e biologia molecular. Esses temas tem sido destacados, visto a grande aplicação das microalgas nos mais diversos campos biotecnológicos (KOLLER; MUHR; BRAUNEGG, 2014). Elas são usadas na formulação de produtos de nutrição humana e animal, produção de biocombustíveis, biofertilizantes, polímeros, fonte de antioxidantes, pigmentos, ácidos graxos, proteínas e outros compostos bioativos (PRIMO, et al., 2015). Na Figura 2, está apresentada a rede de co-ocorrência, sendo os nós uma categoria de assunto e as linhas que conectam os nós demonstram a co-ocorrência de duas categorias no assunto. A tabela presente na Figura, mostra a frequência e centralidade das categorias.

**Figura 2 - Rede de categorias da pesquisa de microalgas cultivadas em diferentes substratos entre os anos de 2009 e 2019 e as 8 principais categorias em termos de frequência e centralidade**



Fonte: Elaborado pela autora (2019)

Observa-se a centralidade representada pelos anéis roxos, sendo notórias as áreas de “Química” e “Biotecnologia Aplicada a Microbiologia”. Segundo Chen (2014), o termo nó com alta centralidade é aquele que conecta dois ou mais nós com o nó central.

A tabela associada à Figura 2 reforça as principais categorias relacionando-as com a frequência e centralidade. As centralidades foram maiores nas áreas de “Química” (1,03) e “Biotecnologia Aplicada a Microbiologia” (0,9), o que indica maior influência destes temas nos trabalhos realizados. As áreas de Bioquímica e Biologia

Molecular (0,16) também tem destaque por centralidade. Nota-se que o tema é variado, pois abrange variados campos de estudo. Com relação à frequência, as áreas em destaque foram “Biotecnologia Aplicada a Microbiologia”, “Engenharia Agrícola” e “Agricultura”, o que indica que essas áreas apresentam-se mais visíveis no meio científico (CHEN, 2014). Assim, pode-se concluir que as áreas com maior centralidade não foram iguais às áreas com maior frequência, com exceção da “Biotecnologia Aplicada a Microbiologia”, o que significa que nem sempre a categoria de maior influência é a de maior visibilidade.

De acordo com os países que mais impactaram na área do presente estudo, verifica-se países de diferentes regiões geográficas. A Figura 3A apresenta a distribuição dos principais países e a Figura 3B apresenta a rede de co-autoria dos autores por países

A China apresentou o maior número de estudos (13,5 %), seguida dos Estados Unidos (13,2 %), Índia (11,4 %) e Espanha (9,6 %). Em estudo realizado por Pulz e Gross, (2004), verificou-se que o uso de microalgas na confecção de alimentos funcionais (massas, pães, iogurtes e bebidas), estava em rápido e crescente avanço em países como a China, Estados Unidos e França. O mercado de microalgas cresce nos setores de cosméticos, higiene pessoal, nutrição humana e animal e são produzidos principalmente na China (DERNER et al., 2006).

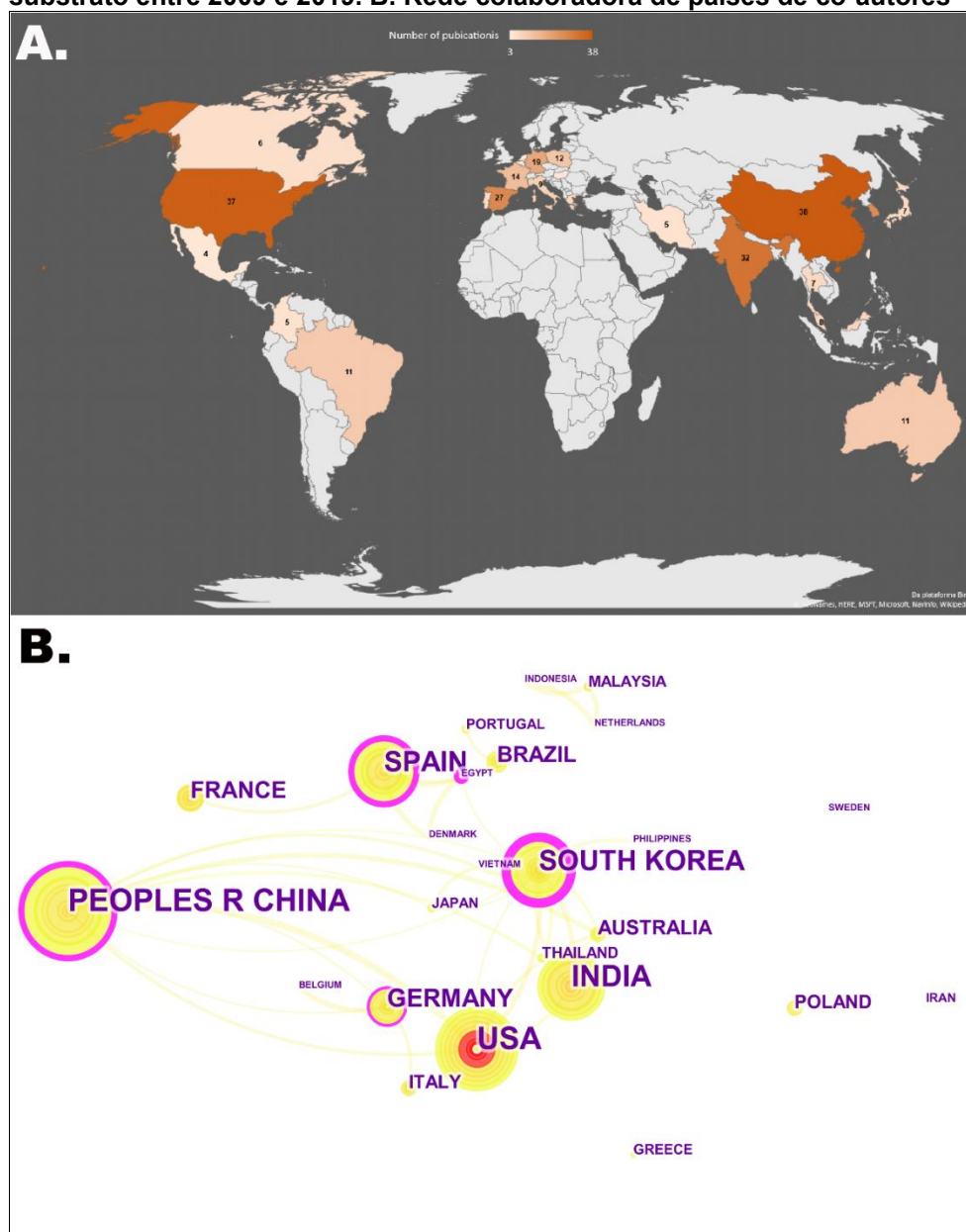
A Figura 3B mostra a rede de co-autoria dos trabalhos, destacando os círculos roxos que demonstram a centralidade dos países na área de estudo. Coreia do Sul apresenta a maior centralidade (0,48), seguida de Egito (0,34), China (0,26), Alemanha (0,18), Brasil (0,09) and EUA (0,01). O EUA se destaca pelo *Burst*, representado com o um círculo vermelho. A explosão de citação é um indicador da área de pesquisa mais ativa. O *burst* de citação é a detecção de um evento de *burst*, que pode durar vários anos e um único ano. Uma explosão de citação fornece evidências de que uma publicação específica está associada a um aumento de citações. Em outras palavras, as publicações deste país evidentemente atraíram um grau extraordinário de atenção de sua comunidade científica (CHEN, 2014).

Segundo Chen (2014), a frequência representa a visibilidade de um país, enquanto a centralidade mostra a influência. A centralidade é um indicador útil e revela, neste caso, a influência de um país. Um nó de alta centralidade de intermediação geralmente é aquele que conecta dois ou mais grandes grupos de nós com o próprio nó intermediário, daí o termo intermediário. CiteSpace destaca nós com

alta centralidade de entrelaçamento com anéis roxos (CHEN, 2014).

Na América do Sul, o país com maior número de publicações na área é o Brasil. O cenário do Brasil no campo das microalgas compreende uma vasta biodiversidade de espécies, além de temperaturas favoráveis e altos níveis de radiação solar adequadas para o desenvolvimento de grande parte dos gêneros e espécies de microalgas. Os pesquisadores buscam incentivo de instituições e do governo para o desenvolvimento de tecnologias que visem aplicar as microalgas em vários setores da economia (BRASIL; COSTA, 2016).

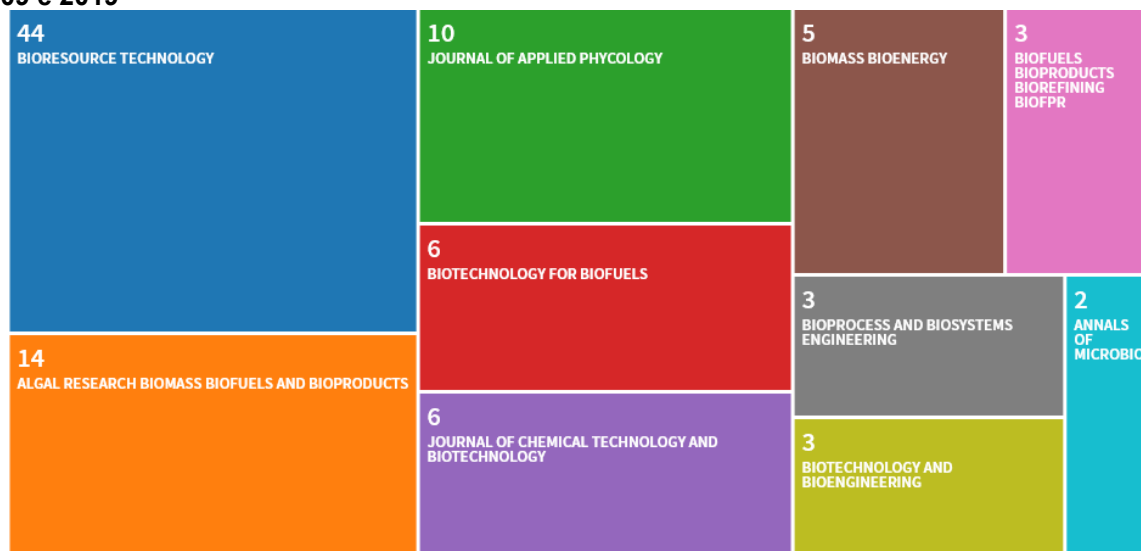
**Figura 3 - A. Países com publicações sobre cultivo de microalgas usando resíduos como substrato entre 2009 e 2019. B. Rede colaboradora de países de co-autores**



Fonte: Elaborado pela autora (2019)

Os artigos foram publicados em 25 periódicos. Os periódicos com mais publicações estão apresentados na Figura 4. Os periódicos com mais publicações foram: *Bioresource Technology* (44 publicações), *Algal Research Biomass Biofuels and Bioproducts* (14 publicações) e *Journal of Applied Phycology* (10 publicações).

**Figura 4 - Periódicos com mais publicações sobre cultivo de microalgas com resíduos entre 2009 e 2019**



Fonte: Elaborado pela autora (2019)

O periódico *Bioresource Technology* se destaca pois tem como objetivo disseminar conhecimento nas áreas que relacionam estudos de biomassa, tratamento de resíduos biológicos, bioenergia, análise de sistemas de biotransformações e biofontes e tecnologias ligadas a conversão ou produção (PANDEY, 2019). Com isso, o tema abordado nesse estudo, tem associação direta com este periódico, uma vez que as publicações obtidas na presente pesquisa abordam-se tópicos como: biocombustíveis, bioprocessos e bioprodutos, uso de biomassa e matérias-primas (com bioconversão de resíduos agroindustriais), além de proteção ambiental e conversão termoquímica de biomassa.

Na Figura 5, os principais periódicos deste estudo estão organizados em uma linha do tempo mostrando a rede de citações e os clusters organizados por título das publicações (os clusters são identificados por #). *Bioresource Technology* novamente aparece como o periódico com maior número de citações (271), seguido da *Applied Energy* (152), *Biotechnology Advances* (151), *Water Research* (149), *Renewable Sustainable Energy Review* (146), *Biotechnology*

*Bioengineering* (139), *Applied Microbiology Biotechnology* (138), *Journal Applied Phycology* (114), *Biomass Bioenergy* (113) e *Algal Research Biomass Biofuels and Bioproducts* (112). Em relação à centralidade, destacam-se com halo roxo os periódicos mais fortes: *Applied Environmental Microbiology* (0,19), *Applied Microbiology Biotechnology* (0,14), *Biotechnology Letters* (0,12), *Enzyme Microbial Technology* (0,12), e *Journal Biotechnology* (0,10).

Conforme os clusters da Figura 5, pode-se fazer um paralelo das características da biomassa microalgal, como: alta produtividade; captura de CO<sub>2</sub>; altos teores de proteína, carboidratos, lipídeos e ácidos graxos; (LAM; LEE, 2011), com as aplicações como a produção de biodiesel em função do alto teor lipídico produzidos na fermentação (DERNER et al., 2006).

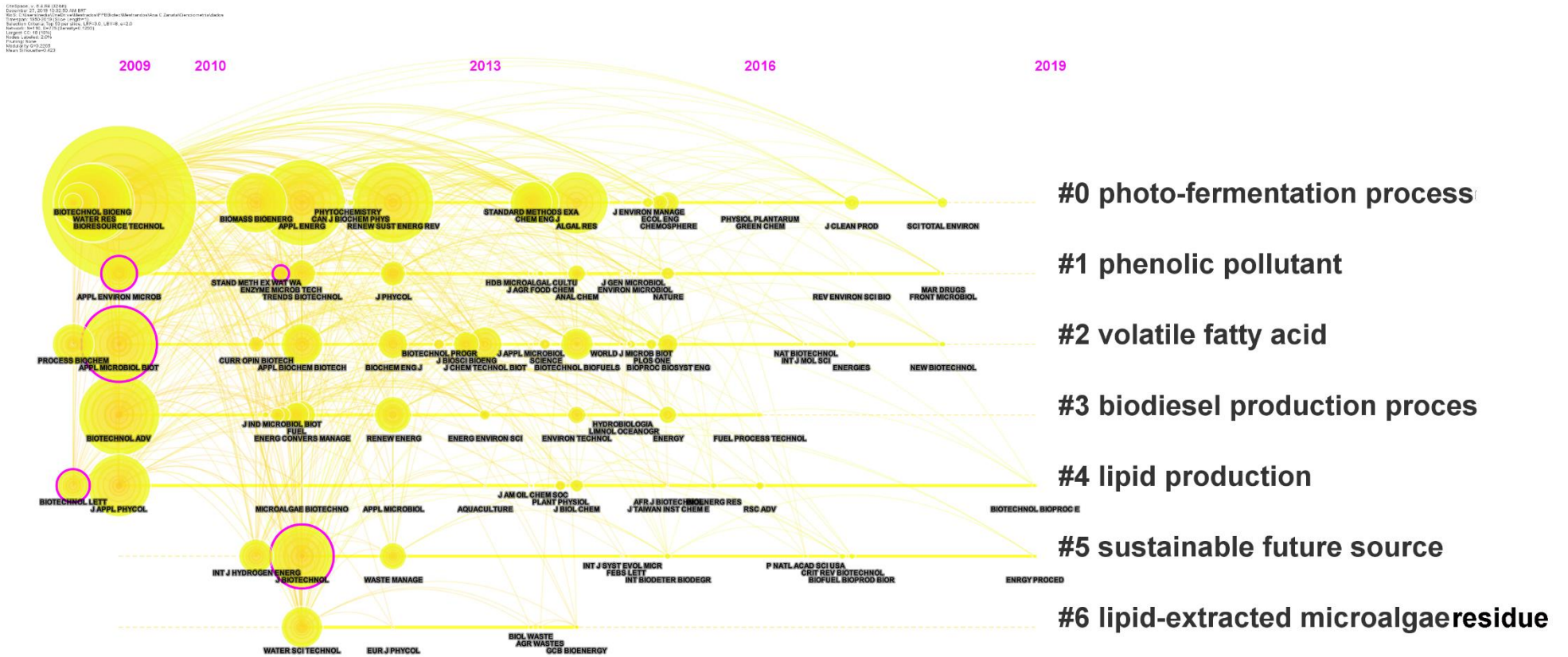
Analisando-se os clusters categorizados pelos títulos das publicações, pode-se observar que as microalgas, desempenham funções fundamentais e possuem importância biológica, ecológica e econômica. A notoriedade desses seres na área biológica diz respeito ao fato de que elas garantem a estruturação da atual atmosfera terrestre, proporcionando a vida dos seres aeróbicos. Na área ecológica, as microalgas são responsáveis pela sustentação da vida nos mares e oceanos por serem produtores primários. Em relação a parte econômica, tem-se a diversidade das aplicações destes seres em muitos países no mundo, visto que, seu uso está nas indústrias alimentícias, farmacêuticas, imunoestimulantes, cosméticas, biocombustíveis, entre outras (VIDOTTI; ROLLEMBERG, 2004).

De acordo com os clusters relacionados à produção de lipídeos, produção de biodiesel, ácidos graxos voláteis e resíduo de microalgas para extração de lipídeos, estes estão diretamente associados às aplicações e atribuições das características das microalgas. Esses organismos requerem baixo investimento para produção, atuam na captura do CO<sub>2</sub> (CHISTI, 2007; HUNDT; REDDY, 2011), além de armazenarem quantidade de lipídeos significativamente maior que plantas oleaginosas, diminuindo custos de processo e matéria-prima. Ainda, a biomassa residual dessa etapa pode ser fornecida a outros processos produtivos (fármacos, cosméticos, alimentos, entre outros), agregando valor a outros materiais, assim como, gerar biogás em um biodigestor (CHISTI, 2007). Além disso, outra menção dada em cluster é a fonte sustentável, visto que, as microalgas são fontes alternativas sustentáveis na produção de biocombustíveis, compostos estes, ambientalmente aceitos e viáveis economicamente (HILL et al., 2006).

Conforme o cluster relacionado aos compostos fenólicos, as algas podem apresentar alta atividade antioxidante pela alta concentração de compostos fenólicos intracelulares. A concentração desses compostos pode variar com o tempo de fermentação e local de cultivo, o que mostra que as condições ambientais são fundamentais na produção desses compostos (FARASAT et al., 2013).

O processo de foto-fermentação, se refere ao fato de que as microalgas realizam fotossíntese para se desenvolverem. Segundo Mata, Martins e Caetano (2010), os metabolismos das microalgas na presença de luz podem ser: autotrófico quando a luz é usada como fonte de energia; mixotrófico, que dependem de luz e de compostos orgânicos; e o fotoheterotrófico, quando usa luz para desencadear o uso de compostos orgânicos como fonte de carbono. Muitas das fermentações utilizando compostos orgânicos como fonte de energia estão sendo estudadas, a fim de diminuir o custo de produção, que é o objetivo dos estudos levantados nesta cienciométrica. O cultivo de microalgas representa alternativa ambiental e econômica no tratamento de muitos efluentes (OLIVEIRA, 2013).

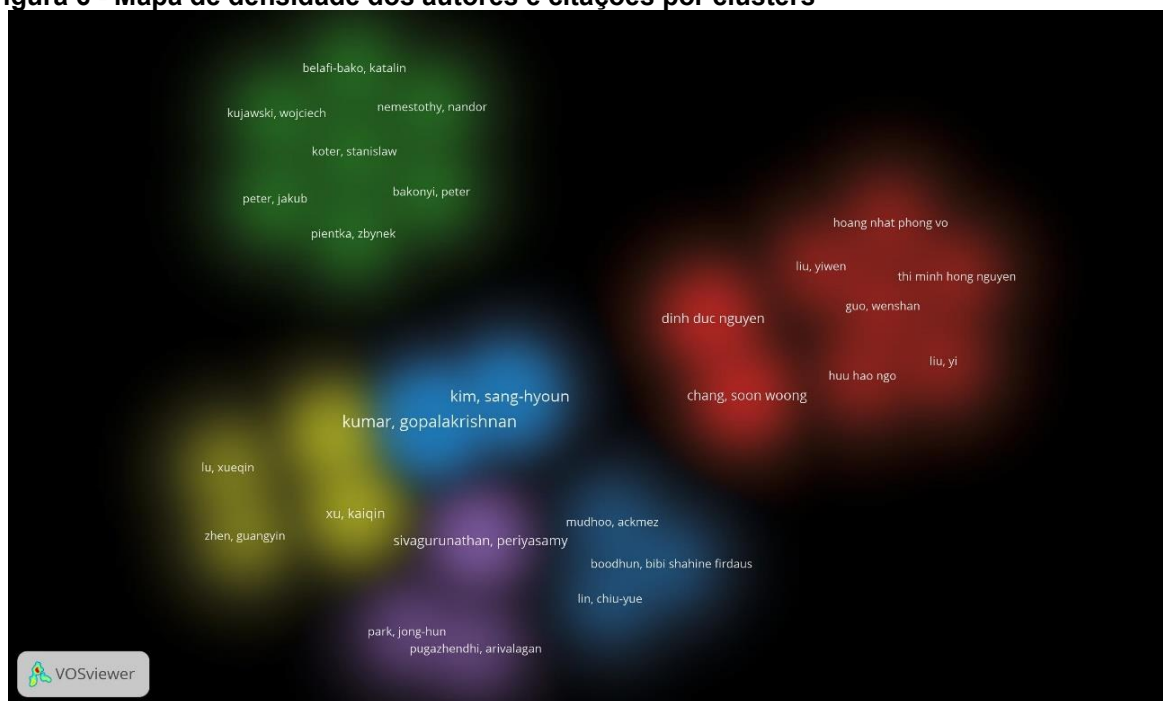
Figura 5 - Linha do tempo das fontes de publicações organizadas por clusters categorizados pelo título das publicações



Fonte: Elaborado pela autora (2019)

É fundamental conhecer os autores que atuam nessa área. A Figura 6 mostra os principais autores que publicam na área de estudo.

**Figura 6 - Mapa de densidade dos autores e citações por clusters**



Fonte: Elaborado pela autora (2019)

Observa-se que os itens de maior peso e número de itens foram Kim Sang-Hyoun e Kumar Gopalakrishnan, apresentando coloração mais intensa, nesse caso em azul. Os dois autores possuem 5 registros cada (são também co-autores) e seus trabalhos tratam da produção de bio-hidrogênio, avaliando novos biorreatores, co-digestões, fermentações variando concentrações de substrato, além de estudo de análise de perspectivas, oportunidades e restrições na área. Além disso, Kim pesquisou sobre estressores abióticos e melhoria da produtividade de lipídeos. Patidar et al., (2018) analisaram *Pelagicaba bermudensis* para obtenção de biocombustíveis em *Tetraselmis striata* com estressores, promoveu maior produção de biomassa e aumentou a produtividade lipídica. Kumar, em um dos seus trabalhos, avaliou a co-digestão de microalgas para produção de bio-hidrogênio, e que com carga inicial adequada pode-se aumentar a produção de hidrogênio (SIVAGURUNATHAN et al., 2018).

Foram obtidos 5 clusters, diferenciados por cores. Nesta visualização, a cor de um ponto é obtida misturando as cores de diferentes clusters e o peso da cor é



dados pelo número de itens que pertencem a esse cluster (VAN ECK; WALTMAN, 2010). O maior cluster composto por 8 autores (cor vermelha). Um dos estudos desse cluster trata de um modelo para remoção de nitrogênio por algas e bactérias, o qual pode capturar de modo satisfatório a dinâmica de populações e substratos microbianos sob diferentes condições operacionais (PENG et al., 2018)

A Tabela 2 mostra os dez principais artigos em termos de citação na área de estudo, contendo o título da publicação, os autores, ano de publicação, total de citações, média de citações por ano. É importante que pesquisadores interessados em realizar pesquisas com microalgas cultivadas em diferentes resíduos realizem a leitura dos 10 principais desses trabalhos publicados. As pesquisas tratam sobre a reutilização das microalgas após extração de óleo, (JOHN et al., 2011); uso de microalgas derivadas de águas residuais aplicadas na produção de biocombustíveis e biogás (WARD; LEWIS; GREEN, 2014); produção de bioeletricidade a partir de *Chlorella vulgaris* (VELASQUEZ-ORTA; CURTIS; LOGAN, 2009) otimização do acúmulo de lipídeos usando diferentes fontes de carbono (HEREDIA-ARROYO et al., 2011); co-digestão de resíduos de microalgas (EHIMEN et al., 2011); produção de biogás a partir de microalgas (DĘBOWSKI et al., 2013); biomassa microalgal usada como substrato na fermentação do metano (KWIETNIEWSKA; TYS, 2014); cultivo de microalgas com efluente digerido anaeróbico (UGGETTI et al., 2014); digestão anaeróbica da biomassa algal e resíduo de algas (KEYMER et al., 2013); utilização do óleo de microalgas em processo de liquefação (GAI et al., 2015).

Os artigos do conjunto de dados refinados foram citados 5323 vezes, com uma média de 18,94 citações por item e um índice H de 37. O índice H foi desenvolvido por Hirsch em 2005 e revela o impacto ou a relevância de um artigo, autor ou campo (HIRSCH, 2005). Isto mostra a relevância e representatividade deste assunto no meio científico. Esse índice pode ser adotado não só para avaliar pesquisadores, mas também universidades, grupos de pesquisa e revistas científicas. A vantagem deste índice é sua simplicidade e objetividade, resumindo em um único número a produtividade e a relevância do trabalho científico.

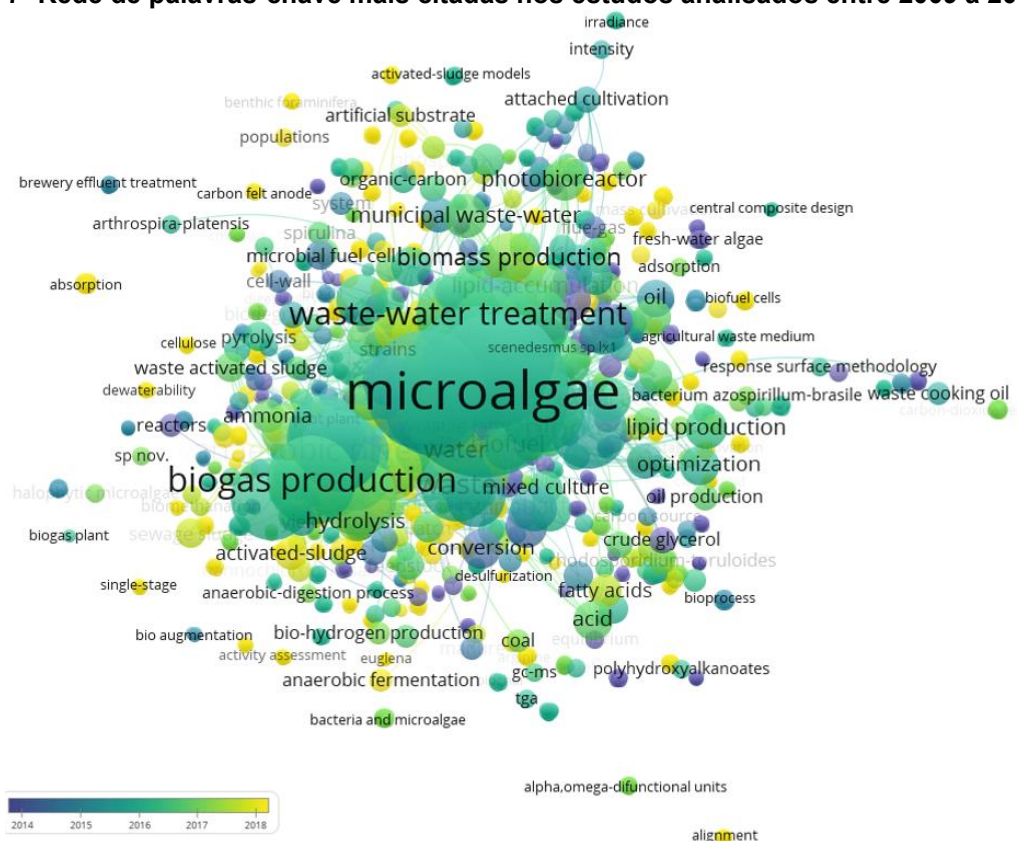
**Tabela 2 - Dez principais publicações citadas com base na frequência de citações**

| Classificação | Título da Publicação   | Autores  | Fonte  | Ano  | Total de citações | Média por ano |
|---------------|--|--|--|------|-------------------|---------------|
| 1             | Biomassa de micro e macroalgas: uma fonte renovável de bioetanol   | John, Rojan P.; Anisha, G. S.; Nampoothiri, K. Madhavan; Pandey, Ashok       | <i>Bioresource technology</i>                          | 2011 | 530               | 58,9          |
| 2             | Digestão anaeróbica da biomassa de algas: uma revisão  | Ward, A. J.; Lewis, D. M.; Green, B.   | <i>Algal research-biomass biofuels and bioproducts</i> | 2014 | 206               | 34,3          |
| 3             | Energia de algas usando células microbianas de combustível   | Velasquez-Orta, Sharon B.; Curtis, Tom P.; Logan, Bruce E.                   | <i>Biotechnology and bioengineering</i>                | 2009 | 169               | 15,4          |
| 4             | Cultivo mixotrófico de <i>C. vulgaris</i> e sua potencial aplicação para o acúmulo de óleo de materiais não açucarados.  | Heredia-Arroyo, Tamarys; Wei, Wei; Ruan, Roger; Hu, Bo                       | <i>Biomass &amp; bioenergy</i>                         | 2011 | 154               | 17,1          |
| 5             | Digestão anaeróbica de resíduos de microalgas resultantes do processo de produção de biodiesel   | Ehimen, E. A.; Sun, Z. F.; Carrington, C. G.; Birch, E. J.; Eaton-Rye, J. J. | <i>Applied energy</i>                                  | 2011 | 152               | 16,9          |
| 6             | Biomassa de algas como substrato alternativo nas tecnologias de produção de biogás - Revisão   | Debowski, Marcin; Zielinski, Marcin; Grala, Anna; Dudek, Magda               | <i>Renewable &amp; sustainable energy reviews</i>      | 2013 | 101               | 14,4          |
| 7             | Características do processo, fatores de inibição e rendimento de metano no processo de digestão anaeróbica, com foco especial na fermentação de biomassa de microalgas | Kwietniewska, Ewa; Tys, Jerzy  | <i>Renewable &amp; sustainable energy reviews</i>      | 2014 | 91                | 15,2          |
| 8             | Digestado anaeróbico como substrato para a cultura de microalgas: o papel da concentração de amônio na produtividade de microalgas.                                    | Uggetti, Enrica; Sialve, Bruno; Latrille, Eric; Steyer, Jean-Philippe        | <i>Bioresource technology</i>                          | 2014 | 89                | 14,8          |
| 9             | Hidrólise térmica de alta pressão como pré-tratamento para aumentar o rendimento de metano durante a digestão anaeróbica de microalgas                                 | Keymer, Philip; Ruffell, Ian; Pratt, Steven; Lant, Paul                      | <i>Bioresource technology</i>                          | 2013 | 89                | 12,7          |
| 10            | Investigação das vias de reação da liquefação hidrotérmica usando <i>Chlorella pyrenoidosa</i> e <i>Spirulina platensis</i>  | Gai, Chao; Zhang, Yuanhui; Chen, Wan-Ting; Zhang, Peng; Dong, Yuping         | <i>Energy conversion and management</i>                | 2015 | 80                | 16,0          |

**Fonte: Elaborado pela autora (2019)**

A Figura 7 apresenta as palavras-chave destacadas, através do mapa de visualização de rede. As palavras-chave são pontos de grande relevância quando se buscam por artigos, pois elas nomeiam tópicos de importância no estudo. Neste mapa, nota-se que as palavras com círculos maiores são as que mais tem contribuição do item em estudo. Dessa forma, quanto maior o círculo, maior peso tem a palavra, ou seja, aparece em mais publicações no período estudado. As palavras-chaves com destaque em amarelo, se referem às publicações mais recentes. Também é possível analisar a interconexão existente entre as palavras-chaves, ou seja, a formação de uma rede de conexão. Quanto mais próximas e mais espessas as palavras-chaves, mais forte é a conexão entre elas (CHEN, 2014).

**Figura 7- Rede de palavras-chave mais citadas nos estudos analisados entre 2009 a 2019**



Fonte: Elaborado pela autora (2019)

Pela rede formada, tem-se que as palavras-chaves mais usadas foram: *Microalgae*, *biomass*, *waste-water*, *biodiesel production*, *growth*, *biogás production* e *waste-water treatment*. Nota-se que as redes existentes entre essas palavras e a relação dessas com as demais são grandes e significativas para o estudo.

As palavras-chave podem ser consideradas um dos pontos mais importantes

de uma publicação e a análise de co-palavras pode ser usada para detectar tópicos de pesquisa, analisar pontos de acesso de pesquisa e monitorar transições de fronteira de pesquisa de um determinado domínio de conhecimento (YU et al., 2017).

A palavra *Microalgae* aparece 163 vezes e é o destaque frente aos trabalhos nesse tema. Alguns dos trabalhos abordam o cultivo das microalgas, formas de cultivar, uso de diferentes substratos, além da aplicação desses microrganismos e seus resíduos. Nos estudos que tratavam das aplicações industriais das microalgas, o destaque está na biotecnologia. Como exemplo cita-se a produção de biodiesel pelos altos níveis de lipídeos extraídos; produção de compostos antioxidantes e antibióticos, servindo de matéria-prima para indústrias farmacêuticas; biorremediação como indicadores ambientais e no tratamento de águas residuais suplementação nutricional para consumo humano pela quantidade elevada de proteína, conteúdos de vitaminas; nutrição animal, principalmente produção de rações; utilização na agricultura como biofertilizantes (HARUN et al., 2010).

Quanto à forma de cultivo das microalgas, quando se trata de cultivos em pequena escala, estes podem ocorrer em ambientes climatizados, monitorando os parâmetros que influenciam no seu desenvolvimento (ANGELO; ANDRADE; FILHO, 2014; DERNER et al., 2006). Em escala industrial, o cultivo pode ser feito em lagoas abertas ou sistemas fechados que são chamados de fotobiorreatores (ERIKSEN, 2008; SOARES, 2010). Os principais fatores que afetam o crescimento das microalgas são: luminosidade, pH, temperatura, aeração, concentração de nutrientes e concentração de CO<sub>2</sub> (CHISTI, 2007).

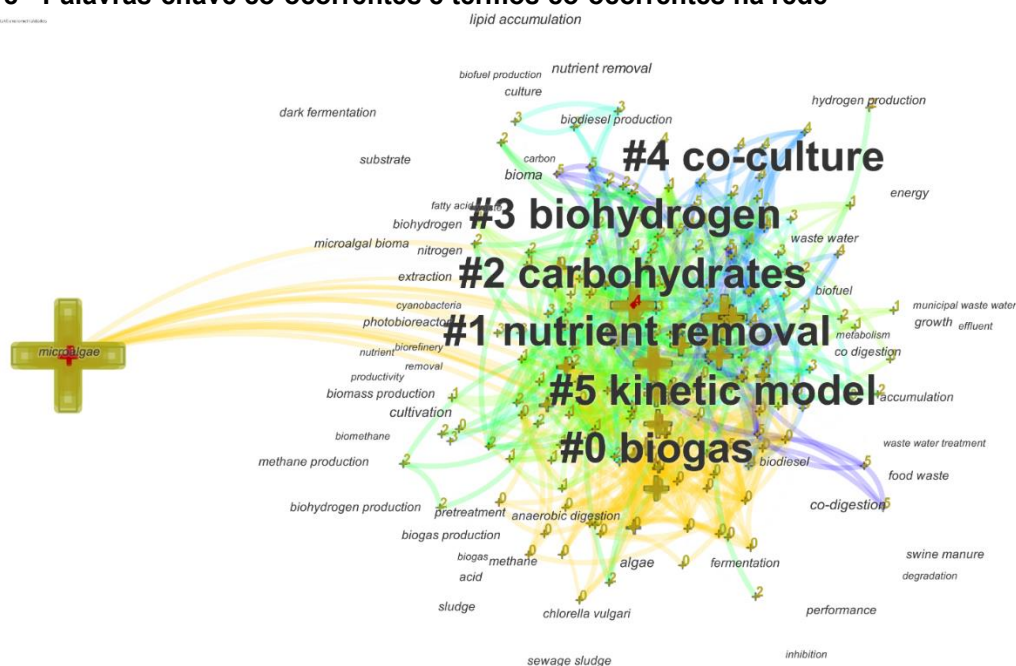
De acordo com a fonte nutricional e a biorremediação de ambientes aquáticos, tem-se o uso de resíduos agroindustriais para o cultivo de microalgas que se apresenta como alternativa econômica e ambiental. Ambientalmente, as microalgas como são produtoras primárias dos ecossistemas e que dependem de condições físicas e nutrientes, demonstram sensibilidade a mudanças, o que garante a elas atuarem como bioindicadores biológicos da qualidade da água (TREVÍÑO, 2008), além de sua capacidade de tratar águas residuais (SPÍNOLA, 2010). Ainda, as algas impedem que esses resíduos sejam lançados no meio ambiente de forma a agredir a natureza, visto que as composições dos efluentes são variáveis e podem ter grande quantidade de matéria orgânica ou concentrações elevadas de metais tóxicos (DAL MAGRO et al., 2013). Economicamente, o custo com o cultivo de microalgas será menor e o custo de operação de tratamento residual também (VIDOTTI;

ROLLEMBERG, 2004).

A análise dos dados pelo CiteSpace resultou em 5 clusters principais, os quais indicam grupos de documentos associados que representam os diferentes rumos da pesquisa (CHEN, 2014). Pode-se perceber os destaques para a formação dos cluster #0 *biogas* ( #1 *nutrient removal*, ambos com 43 membros, #2 *carbohydrates* (39 membros), #3 *biohydrogen* (26 membros), #4 *co-culture* (17 membros) e #5 *kinetic model* (with 16 membros). Os clusters de palavras-chaves estão associados com os estudos levantados, os quais, demonstram a associação das microalgas com seus principais fins.

Pode-se notar que as palavras-chave das Figuras 7 e 8 também são citadas no ranking das 10 principais publicações (Tabela 2). O principal artigo intitulado *Micro and macroalgal biomass: A renewable source for bioethanol* (JOHN et al., 2011), corrobora com as palavras-chave Microalga, Biomassa, “Produção de biodiesel” e “Produção de Biogás”, além do cluster Biohidrogênio. Outros artigos também possuem relação com essas palavras (EHIMEN et al., 2011; VELASQUEZ-ORTA; CURTIS; LOGAN, 2009) . Demais palavras-chave importantes verificadas nos clusters são água residual, tratamento de água residual e remoção de nutrientes” (DĘBOWSKI et al., 2013; HEREDIA-ARROYO et al., 2011).

**Figura 8 - Palavras-chave co-ocorrentes e termos co-ocorrentes na rede**



Fonte: Elaborado pela autora (2019)

A maioria dos artigos deste estudo são da área dos biocombustíveis, tratamento especificamente da extração de lipídeos, ou da produção de biohidrogênio, biodiesel, bioetanol e biogás (Cluster #0). Os artigos de 2009 já abordavam energia de algas usando células de combustível microbianas, como o estudo de VELASQUEZ-ORTA; CURTIS; LOGAN (, 2009), que está em terceiro no ranking apresentado na Tabela 2. Em 2011, o enfoque foi ainda maior, falando-se em: biomassa micro e macroalgal como fonte renovável para produção de bioetanol a exemplo da publicação classificada em primeiro lugar na lista dos top 10 (JOHN et al., 2011); produção de lipídeos usando o glicerol (O&APOS;GRADY; MORGAN, 2011); produção de lipídeos em cultivo mixotrófico de microalga, testando os substratos: glicerol, acetato, glicose e combinações de glicose-glicerol e glicose-acetato em diferentes concentrações (HEREDIA-ARROYO et al., 2011); avaliação de condições de crescimento de microalgas que afetam a produção de biohidrogênio (CHANDRA; VENKATA MOHAN, 2011), entre outros. Esse tema avançou com o passar dos anos, considerando-se o aumento na demanda por energia, aumento da população e que os combustíveis fósseis estão se esgotando. Por isso, as microalgas são vistas como fonte alternativa para diversificar as matérias-primas usadas na produção de energia renovável (OLIVEIRA, 2013).

Avaliando-se os estudos, nota-se que os estudos de 2009, 2011 e 2012, por exemplo, já tratavam de questões de remoção de nutrientes (Cluster #1). A primeira publicação refere-se ao crescimento de microalgas em água de processo diluída da estação de tratamento de águas residuais de animais (PARK; LIM; LEE, 2009). Os efluentes geralmente possuem grande quantidade de nitrogênio e fósforo, nutrientes necessários para o desenvolvimento de microalgas. Nos artigos mais recentes, verifica-se as fontes nutricionais das microalgas de origem residual garantem otimização de custos, tanto no tratamento dos efluentes como no cultivo de microalgas e que além disso, ambientalmente não irão agredir o meio ambiente (DIAS et al., 2019).

Vários são os estudos sobre biorremediação usando microalgas. Paskuliakova et al. (2018) fez uma comparação do crescimento de microalga em lixiviados de aterro sanitário (tipo de água residual difícil de tratar). Nesse trabalho, foi possível observar que alguns lixiviados foram mais adequados para remediação usando microalgas que outros, sendo necessária uma melhor compreensão dos processos físico-químicos que ocorrem com o crescimento das algas e a redução da concentração dos

contaminantes (PASKULIAKOVA et al., 2018).

A biomassa de microalga possui aplicações na produção de carboidratos (Cluster #2) (BECKER; VENKATARAMAN, 1984) ou na utilização de diferentes carboidratos como fontes de carbono para cultivo heterotrófico (FRANCISCO et al., 2014). Choix, De-Bashan e Bashan (2012) estudaram o efeito de bactéria imobilizada com microalga em crescimento sintético com suplemento de d-glicose ou acetato de sódio obtendo um aumento do teor total de carboidratos por cultura e célula após 24 horas.

Algumas pesquisas, além de estudarem métodos de viabilidade e otimização de custos no cultivo de microalgas com efluentes, avaliaram o aumento da produção de lipídeos por co-cultivo com microrganismos que apoiam o crescimento (KUMSIRI et al., 2018). Outras ainda, na busca de implementar co-culturas (Cluster #4) como forma de exploração de comunidades de microrganismos na busca da produção de biocombustíveis (Cluster #3), buscaram revisar trabalhos que destacavam sistemas de co-culturas existentes para melhorar a produtividade de biomassa e lipídeos em outras espécies (MAGDOULI; BRAR; BLAIS, 2016).

O cluster #5 refere-se à modelagem cinética. Mohammad Mirzaie et al. (2016) realizaram uma modelagem cinética do crescimento de microalgas, da produção de lipídeos e do consumo de substrato. A análise considerou condições ótimas de produtividade de biomassa e de lipídeos, a fim de aumentar a quantidade de lipídeos para produção de biolubrificantes. O modelo proposto indicou que os lipídeos foram produzidos simultaneamente com o crescimento (MOHAMMAD MIRZAIE et al., 2016). El-Mashad, (2013) e Zhen et al., (2015, 2016) adotaram modelos matemáticos baseados em equações já propostas para descrição de mecanismos de digestão de resíduos orgânicos em sistema anaeróbico. A precisão do modelo depende das condições operacionais e tipos de substratos (EL-MASHAD, 2013; ZHEN et al., 2015, 2016).

Por fim, analisou-se a presença e apoio de agências financiadoras nas pesquisas, imprescindíveis no custeio de investimentos que em sua grande maioria são onerosas. A Tabela 3 apresenta as principais agências financiadoras na área de estudo e os respectivos países a que cada agência pertence. Nota-se, comparando com os resultados dos principais países presentes no estudo (apresentados na Figura 3), que as agências que mais financiam pesquisas nessa área são originárias dos países com mais publicações no segmento.

**Tabela 3 - Dez principais agências financiadoras e respectivos países**

| <b>Agência financiadora</b>                                   | <b>País</b>    | <b>Registros (%)</b> |
|---|----------------|----------------------|
| <i>National Natural Science Foundation of China</i>           | China          | 17 (6,1)             |
| <i>Council of Scientific Industrial Research (CSIR) India</i> | Índia          | 10 (3,6)             |
| <i>European Union (EU)</i>                                    | União Europeia | 8 (2,8)              |
| <i>Spanish Ministry of Economy and Competitiveness</i>        | Espanha        | 7 (2,5)              |
| <i>Consejo Nacional de Ciencia Y Tecnologia Conacyt</i>       | Paraguai       | 6 (2,1)              |
| <i>Australian Research Council</i>                            | Austrália      | 5 (1,8)              |
| <i>National Science Foundation (NSF)</i>                      | EUA            | 5 (1,8)              |
| <i>Community of Madrid</i>                                    | Espanha        | 4 (1,4)              |
| <i>Department of Biotechnology (DBT) India</i>                | Índia          | 4 (1,4)              |
| <i>Fundação para a Ciencia e a Tecnologia (FCT)</i>           | Portugal       | 4 (1,4)              |

**Fonte: Elaborado pela autora (2019)**

## 2.5 CONCLUSÃO

Pesquisas cienciométricas permitem inferir as tendências das publicações científicas e contribuem para determinar seus vieses e lacunas. Os resultados das análises das publicações relacionadas a resíduos usados como substratos no cultivo de microalgas, indicaram uma tendência de crescimento no número de publicações, ao longo dos anos estudados e do número de citações.

Os países com maior número de publicações, são os que utilizam as microalgas como matéria-prima na produção de novos produtos de valor agregado e que conseqüentemente associam a isso pesquisas que irão aprimorar a sua utilização, como é o caso da China, EUA, Índia e Espanha. As duas áreas com mais publicações foram “Biotecnologia aplicada a Microbiologia” e “Combustíveis Energéticos”.

O periódico “Bioresource Technology” foi o que mais teve trabalhos publicações na área em pesquisa. As principais palavras-chave são: microalgas, biomassa, água residual, crescimento, produção de biocombustíveis, remoção de nutrientes, entre outros tópicos que abordam desde a forma de cultivo até a aplicação.

Dessa forma, esse estudo indicou a importância de desenvolvimento de



pesquisas nessa temática, a qual está intimamente ligada com as preocupações socioambientais e econômicas. Os resíduos que causam grandes custos e consequências ambientais, se destinados como fonte nutricional as microalgas, estão sendo aproveitados de forma sustentável, otimizando despesas de cultivo desses organismos e de tratamento de efluentes, além de estar gerando um novo produto. Assim, a análise cienciométrica permitiu analisar tendências, oportunidades e desafios na biotecnologia de microalgas, auxiliando em pesquisas futuras.

### 3 CULTIVO DE *CHLORELLA VULGARIS* EM PERMEADO DE SORO LÁCTEO TOLERANTE A HERBICIDAS

#### 3.1 INTRODUÇÃO

As microalgas são microrganismos que vivem tanto em ambientes aquáticos como no solo, realizam fotossíntese e combinam água, dióxido de carbono com luz para produzir energia e converter em biomassa (SCHMITZ; MAGRO; COLLA, 2013). O cultivo das microalgas é relativamente fácil e rápido, o que impulsiona o interesse em pesquisas e aplicação em muitas áreas. Alguns parâmetros são importantes para o seu desenvolvimento, como luz, temperatura, aeração, fonte de carbono, entre outros (ANDRADE & COLOZZI FILHO, 2014; DERNER et al., 2006)

Entre os desafios do cultivo desses organismos, estão os custos com meios de cultura sintéticos que encarecem o processo. Assim, resíduos orgânicos como fonte nutricional vem sendo estudados em substituição aos nutrientes sintéticos (PERREIRA, 2017). Estes subprodutos apresentam-se como excelente ferramenta na otimização de produtividade, redução de custos e interesse econômico e ambiental (CHRISTENSON; SIMS, 2011).

O interesse ambiental está no descarte desses subprodutos, os quais tem gerado questões que envolvem a proteção dos ecossistemas e preocupado mundialmente (DE MELO et al., 2018). A busca por alternativas viáveis e sustentáveis que reutilizem um subproduto industrial como matéria-prima para originar um novo produto tem ganhado estímulo (PERREIRA, 2017).

Os subprodutos agroindustriais e industriais podem afetar o solo e todo o ecossistema de forma geral, visto que, possuem alta carga de poluentes orgânicos. Com isso, vários estudos se destacam na utilização de tais subprodutos como matéria-prima, gerando produtos de valor agregado (ALAYU; YIRGU, 2018).

O soro lácteo se destinado diretamente ao meio ambiente sem tratamento prévio pode causar sérios prejuízos no meio ambiente, principalmente na qualidade de água (YADAVALLI; HEGGERS, 2013). O permeado de soro é o resíduo do processo de concentração das proteínas do soro pelo método de ultrafiltração ou coagulação, que contém nutrientes importantes, como lactose, minerais e traços de proteínas e lipídeos e que pode causar sérios danos ao meio ambiente (DE ALMEIDA et al., 2015).

Na área ambiental com a destinação de efluentes, uso de herbicidas,

inseticidas e agrotóxicos, as microalgas são importantes na biorremediação, processo que ocorre a degradação de contaminantes no ambiente de forma biológica (SCHMITZ; MAGRO; COLLA, 2013). As microalgas atuam como produtores primários na cadeia alimentar e com o seu potencial metabólico degradam grande parte de compostos orgânicos tóxicos (MARIANO, 2006).

Ao longo da última década, detectou-se muitos compostos orgânicos em ambientes aquáticos, pela melhoria de métodos analíticos, frequência crescente e concentração (JARDIM; DE ALMEIDA ANDRADE; DE QUEIROZ, 2009). Esses compostos são considerados de preocupação emergente, pois podem causar sérios efeitos sobre organismos não-alvo. Essas substâncias possuem regulamento que leva em conta sua ocorrência, destino ambiental e toxicidade (MACHADO; SOARES, 2019).

Segundo Ebenezer e Ki (2013), as microalgas, em ambientes aquáticos, são a base da cadeia alimentar aquática. São conhecidas por sua diversidade, sensibilidade as mudanças ambientais e por isso, potenciais para estudo de avaliação de riscos no meio ambiente com contaminantes tóxicos, visto que, são vulneráveis a herbicidas (LORENTE et al., 2015).

Nesse sentido, o objetivo do presente estudo foi obter biomassa microalgal cultivada em sistema mixotrófico, em meio de cultivo contendo permeado de soro lácteo e os herbicidas Trueno<sup>®</sup> e Jaguar<sup>®</sup>, a fim de avaliar seus efeitos no crescimento microalgal.

## 3.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 3.2.1 Soro Lácteo

O principal subproduto gerado por laticínios durante o beneficiamento do queijo é o soro lácteo. Estima-se que a cada dez litros de leite utilizados na produção de um quilo de queijo, são gerados cerca de nove litros de soro lácteo (MOLLEA; MARMO; BOSCO, 2013). Conforme a *Food and Agriculture Organization* (FAO), o queijo é considerado um dos produtos agrícolas mais importantes do mundo (LENCASTRE, 2012). O soro lácteo possui características próximas ao leite: é rico em carboidratos, proteínas, lipídeos, sais minerais, vitaminas e sólidos totais, além de apresentar coloração amarelo-esverdeada (CEDENO; YEPEZ TAMAYO; RAMIREZ-CARDENAS, 2018).

Quando não tratado, o soro resulta em grave dano ao meio ambiente, além da saúde humana, animais e todo o ecossistema. É um resíduo que necessita de tratamento para diminuição da Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) e Demanda Química de Oxigênio (DQO), além de fosfatos, amônia e demais sólidos que afetam de modo agressivo o meio ambiente, bem como as gorduras e lactose dissolvidas (ALVES, 2005; MARKOU; GEORGAKAKIS, 2011).

Grande parte do soro gerado pelas indústrias lácteas é utilizado na produção de derivados lácteos, como: bebidas lácteas, iogurtes, coalhadas, suplementos, alimentos funcionais, queijos, alimentação animal, entre outros (PERREIRA, 2017). Assim, reverte-se em produtos para consumo direto de forma líquida, em pó, em concentrados de proteína de soro (GONZÁLEZ SISO, 1996) e como alimentação em animais. Contudo, mesmo que o soro tenha diversas aplicações, ainda boa parte é descartada como efluente (BASTOS, 2015; SILVA, BUENO e SÁ, 2017; SMITHERS, 2008). Do processo de separação das proteínas do soro, obtem-se de um lado o concentrado ou isolado proteico de soro e, de outro, uma grande quantidade de resíduo líquido, denominado permeado de soro ou soro de leite desproteínado. Contém nutrientes importantes, como lactose, minerais e traços de proteínas e lipídeos. Industrialmente é um resíduo que não possui um fim estabelecido e que causa danos graves ao meio ambiente (DE ALMEIDA et al., 2015).

O uso de resíduos agroindustriais na recuperação de materiais que aumentem sua rentabilidade cresce cada vez mais (GIRARD et al., 2014). São formuladas constantemente técnicas de emprego desses subprodutos para produção de um produto de valor agregado. Além disso, com as questões ambientais envolvidas, a aplicação desses resíduos apresenta grande valia em bioprocessos (SAITO, 2005).

### 3.2.2 Soro Lácteo Usado como Substrato no Cultivo de Microalgas

O soro de leite pode ser usado como fonte nutricional para o cultivo de microalgas. Abreu et al., (2012) cultivaram a microalga *Chlorella vulgaris* em cultivo mixotrófico suplementado com hidrolizado de soro lácteo em pó. Os autores obtiveram elevada produção de biomassa ( $3,58 \text{ g.L}^{-1}$ ), comparando-se com glicose mais galactose ( $2,24 \text{ g.L}^{-1}$ ).

Girard et al., (2014), estudaram o cultivo da microalga *Scenedesmus obliquus* usando o soro lácteo como fonte de carbono, substituindo 40% (v/v) do meio padrão

(Bold's basal medium - BBM) por soro e obtiveram  $3,6 \text{ g.L}^{-1}$  de biomassa. Segundo trabalho realizado por Pereira (2017), com a microalga *Spirulina platensis* em cultivo mixotrófico usando soro, além de minimizar de forma significativa os custos de produção de biomassa microalgal e o tempo de cultivo. A utilização do permeado no meio de cultura para fitorremediação por microalgas, além de estimular a produção de biomassa, visto que, é uma ótima fonte proteica, reduz a DQO (ZIMERMANN, 2019).

### 3.2.3 Herbicidas

A agricultura convencional tem papel determinante nas demandas de alimento, visto que, a população está em constante crescimento. Como consequência, aumenta-se a necessidade por fertilizantes químicos, herbicidas e pesticidas (BHARDWAJ et al., 2014). O objetivo principal do uso de produtos químicos como pesticidas, herbicidas, em sua grande parte tóxicos, é de acabar com as pragas e fitopatógenos que afetam as produções agrícolas. Tais produtos são compostos orgânicos sintéticos que possuem elevada atividade biológica, destacando-se os inseticidas, fungicidas e herbicidas, podendo ser cancerígenos e causar sérios danos à saúde humana e a todo ecossistema (águas, animais, plantas, e demais seres presentes no meio ambiente) (CABRERA; COSTA; PRIMEL, 2008).

Esses compostos químicos são aplicados em quantidades significativas em áreas extensas por todo o mundo. O uso excessivo desses produtos acarreta: desequilíbrio biológico; modifica matéria orgânica presente nos nutrientes do solo; diminui a biodiversidade; causa danos no solo, águas, alimentos, animais e humanos (BHARDWAJ et al., 2014; CABRERA; COSTA; PRIMEL, 2008; DOMINGUES et al., 2004). Os herbicidas estão entre os compostos mais resistentes ao metabolismo microbiano e possuem capacidade biodegradativa e mobilidade no solo. (CRUCIANI et al., 1996).

#### 3.2.3.1 Jaguar<sup>®</sup>

O herbicida Jaguar<sup>®</sup> é constituído por ácido diclorofenoxiacético (2,4-D) e ácido piridinocarboxílico (aminopiralde). O ácido piridinocarboxílico pertence ao grupo dos ácidos piridinecarboxílicos, sendo da Classe I - extremamente tóxico e não é persistente no meio (MAPA, 2017).

O 2.4-D é um herbicida bastante aplicado na agricultura, indicado para controle de plantas invasoras em culturas de pastagem (MAPA, 2017). Com base em estudos, este herbicida tem elevado potencial de indução de efeitos indesejáveis a organismos não-alvos, porém apresenta tanto em ambientes aquáticos como no solo, tempo curto de meia-vida (CHINALIA; REGALI-SELEGHIN; CORREA, 2007). As principais características do herbicida Jaguar<sup>®</sup> é a solubilidade total em água, e deslocamento simples em diferentes ambientes como solo, águas subterrâneas e superficiais (DOW AGROSCIENCES, 2014).

### 3.2.3.2 Trueno<sup>®</sup>

O herbicida seletivo Trueno<sup>®</sup>, assim como o Jaguar<sup>®</sup>, pertence a Classe I - altamente tóxica e é caracterizado como um produto de alto perigo ao meio ambiente. O seu uso é indicado no controle de plantas que são infestantes em pastagens e possui ação sistêmica e pós-emergente (DOW AGROSCIENCES, 2014).

O Trueno<sup>®</sup> é composto por ácido piridinocarboxílico (Aminopiralde) e ácido piridiniloxialcanóico (Fluroxipir). O Fluroxipir é aplicado em cereais, oliveiras, além de ervas daninhas. A fórmula química do Fluroxipir é o ácido 4-amino-3,5- dicloro-6-fluoro-2-piridiloxiacético e pertence à família da Piridina (DOW AGROSCIENCES, 2014).

### 3.2.4 Cultivo de Microalgas em Meios Contendo Herbicidas

Estudos têm sido realizados com o intuito de identificar o efeito de herbicidas no cultivo de microalgas, avaliando qual a resistência ou a concentração máxima suportada por determinada espécie. D'Aquino-Rosa e Andrade (1995), estudaram diferentes concentrações de Roundup<sup>®</sup> (1,5; 3,0; 6,0 e 12,0 mg.L<sup>-1</sup>) em culturas mistas de microalgas. A *Chlorella* sp. teve o crescimento estimulado e os demais gêneros (*Nitzschia* sp., *Navicula* sp., *Scenedesmus acuminatus* e *Monoraphidium* cf. *contortum*) foram inibidos.

Arantes, (2010) avaliou diferentes concentrações de glifosato (0; 0,118; 0,236; 0,472; 0,944; 1,888; 3,776 mg.L<sup>-1</sup>) no crescimento de *Pseudokirchneriella subcapitata* e verificou que este herbicida afeta o desenvolvimento da microalga. Caamaño (2014), testou o mesmo herbicida do estudo anterior em cultivo de *Scenedesmus*

*quadricauda*. O autor notou diferença na estrutura celular, redução da pigmentação e inibição celular, mas permanecendo ativas.

Araujo (2015), testou nonifenol<sup>®</sup> no cultivo de *Scenedesmus* sp. A microalga se mostrou resistente e o crescimento celular deu-se de forma contínua. Agirman, Kendirlioglu e Cetin (2014) testaram quatro pesticidas (Diclorvós, Diazinon, Trifluralina e Paraquat) no cultivo de *C. vulgaris*. Os resultados mostraram que houve sensibilidade da microalga frente aos pesticidas estudados.

Zhao, et al., (2017), avaliaram o herbicida Topramezona em *C. vulgaris*. Os resultados mostraram: influência no crescimento da microalga, alterações no conteúdo de pigmentos, permeabilidade da membrana e transcrição dos genes relacionados com o sistema de fotossíntese.

Os herbicidas podem apresentar danos inesperados para organismos não-alvo, devido à dificuldade em prever interações indesejáveis bióticas. Um herbicida muito usado é o Poast<sup>®</sup>, o qual foi estudado por Smythers et al., (2019) com a *C. vulgaris* como organismo não-alvo. A microalga sofreu danos fotossintéticos e fragmentação da membrana, sugerindo alto potencial do herbicida.

### 3.2.5 Ecotoxicidade de Herbicidas

A ecotoxicidade permite a verificação da qualidade da água, analisa impactos ambientais, os níveis de contaminação e eficiência de técnicas de tratamento (MARTINS; OLIVA TELES; VASCONCELOS, 2007). A ecotoxicidade refere-se aos estudos dos efeitos adversos das substâncias químicas sobre os ambientes naturais. É uma parte da ciência ambiental que avalia a toxicidade e necessita do entendimento dos fundamentos ecológicos (KLAASSEN; WATKINS, 2010).

As análises de ecotoxicidade são realizadas como forma de complementar os experimentos físico-químicos. Os testes de toxicidade avaliam os efeitos das substâncias tóxicas sobre sistemas biológicos, ao passo que os testes físico-químicos somente identificam e quantificam concentrações de substâncias tóxicas, não podendo distinguir os compostos que afetam ou não o ambiente, não avaliando o potencial risco ambiental (COSTA et al., 2008). Por isso, as análises de toxicidade são muito importantes na avaliação da água e carga de efluentes (MAGALHÃES; FILHO, 2008; SILVA; POMPÊO; PAIVA, 2015).

Os testes de ecotoxicidade são feitos usando organismos-teste, que podem

ser microalgas, microcrustáceos, equinoides, poliquetas, oligoquetas, peixes e bactérias, representando os mais diversos ecossistemas e níveis tróficos (MAGALHÃES; FILHO, 2008). Essas espécies são armazenadas em laboratório e o conhecimento sobre sua biologia é fundamental para sua utilização como bioindicadores a substâncias tóxicas (ARENZON; NETO; GERBER, 2011). Qualquer espécie pode ser usada em testes de toxicidade, porém elas devem apresentar algumas características: sensibilidade a contaminantes; uniformidade e estabilidade genética; significado ambiental em relação a área que está estudando; facilidade de cultivo e adaptabilidade a condições laboratoriais (RONCO, 2004).

Um microrganismo muito utilizado para testes de ecotoxicidade é a *Artemia salina*, microcrustáceo que possui ciclo de vida curto. Possui quatro fases de vida: estágio larval chamado de náuplios, metanáuplio, jovem (6 dias) e adulta (10 dias) (VINATEA, 1994). O seu uso no ensaio de toxicidade aguda é rápido, barato e eficiente, necessitando de pouca quantidade de amostra (PIMENTEL et al., 2011).

Em alguns estudos também sobre toxicidade, foi observado que a alface (*Lactuca sativa*) apresenta sensibilidade e pode ser utilizada nesses testes. Essa hortaliça é altamente utilizada pela população, pelo sabor e quantidade nutritiva, além de ser viável economicamente e facilmente obtida (MARQUES et al., 2003). Conforme estudo feito por Santos et al., (2019) para as concentrações de glifosato (12,5; 25; 50; 75 e 100%) aplicadas em *Lactuca sativa*, notou-se sensibilidade para a toxicidade, houve diminuição do índice de germinação. Esse resultado foi também visto por Nascimento et al., (2009) com o estudo do efeito toxicológico do glifosato em alface nas concentrações de 10-50 mg.L<sup>-1</sup> e Sousa et al., (SOUSA; NOCITI; SILVA E CASTRO, 2014) no efeito do mesmo composto tóxico diretamente no solo, com sementes de alface.

Alguns trabalhos relatam ecotoxicidade de herbicidas, usando *Artemia salina* e *Lactuca sativa*. Um deles é o realizado por Araujo e pesquisadores (2015), onde a avaliação de fitotoxicidade do glifosato para a *Artemia salina* foi classificada como moderadamente tóxica. Quanto a germinação das sementes e crescimento de raízes foi relativamente não tóxico.

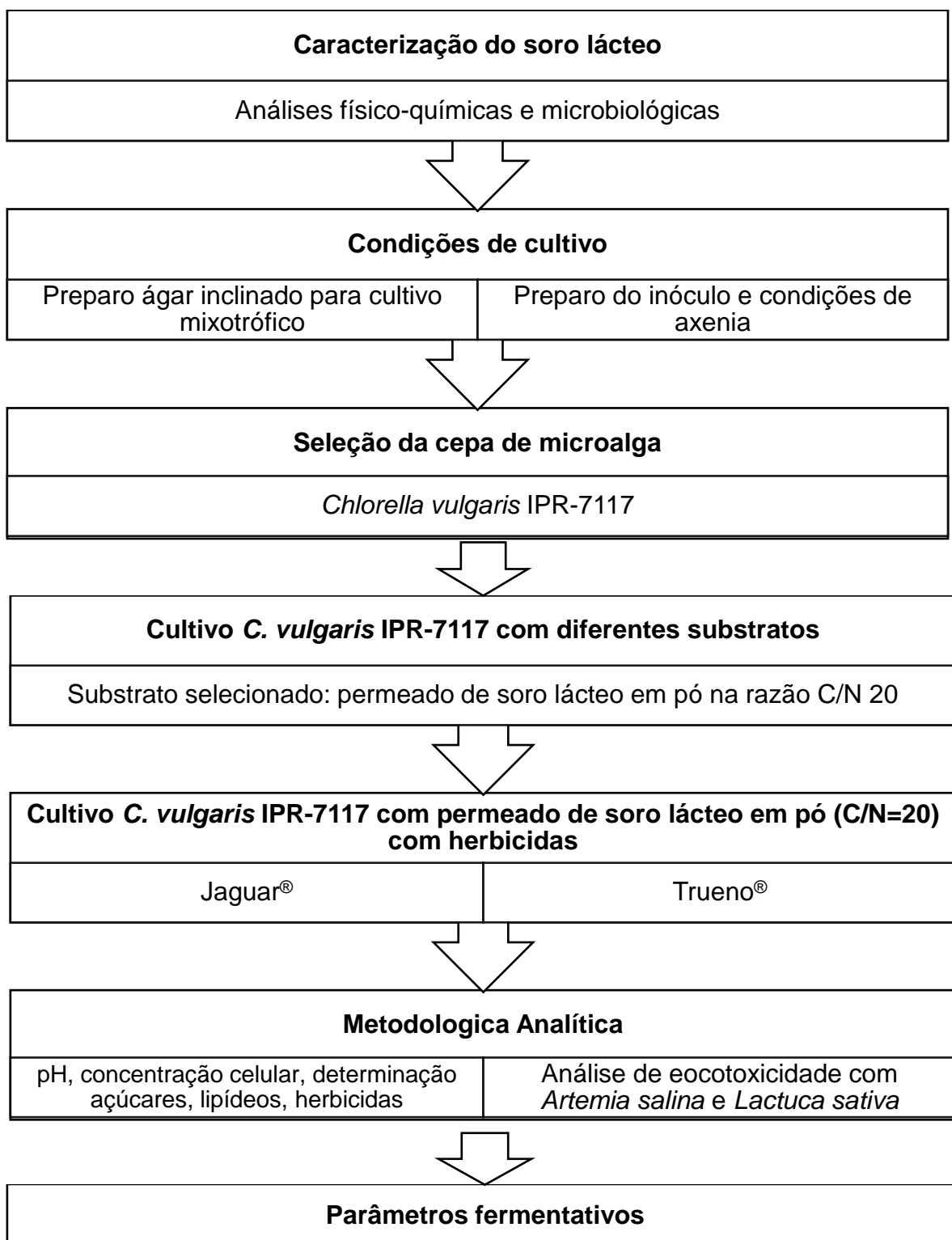
Em trabalho desenvolvido por Chaves (2017) com o herbicida 2,4-D e sua avaliação de toxicidade com a *Artemia salina*, não observou-se efeito tóxico para as concentrações avaliadas (1, 5, 10, 20 e 40 mg.L<sup>-1</sup>). Porém, seu produto de degradação, 2,4-diclorofenol, foi extremamente tóxico para organismos-teste, nas concentrações



de 14,88 e 13,73 mg.L<sup>-1</sup> para 24 e 48 horas de exposição, respectivamente.

### 3.3 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

#### 3.3.1 Fluxograma Procedimentos Metodológicos



### 3.3.2 Microrganismo e Matérias-primas

As cepas de *Chlorella* sp. IPR-7104, IPR-7115, IPR-7116, IPR-7117, IPR-7151, e *Neochloris oleoabundans* UTEX-1185, foram cedidas pelo Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR) do município de Londrina, Paraná. O permeado de soro lácteo em pó foi fornecido pela Sooro Concentrado Ind. de Prod. Lácteos Ltda. de Marechal Cândido Rondon, Paraná - PR. Os herbicidas Jaguar® e Trueno® foram adquiridos no comércio local. Neste estudo foi utilizada polpa branqueada pelo processo Kraft obtida da madeira de *Pinus* sp. cedida por uma empresa de Papel e Celulose da região de São Paulo.

### 3.3.3 Caracterização do Soro Lácteo

Com o intuito de utilizar o permeado do soro nos meios de cultivo, o soro lácteo (aproximadamente 4 L) foi autoclavado a 121°C por 15 minutos para coagulação das proteínas. O soro autoclavado foi centrifugado e o sobrenadante foi congelado até o uso para manutenção de suas propriedades.

O soro lácteo foi caracterizado quanto ao pH, acidez titulável, turbidez, densidade, açúcares redutores e gordura, análises físico-químicas e microbiológicas. O pH das amostras foi medido usando pHmetro (Aparelho Instruterm pH 2600) e a turbidez foi medida através de um turbidímetro (Aparelho Turbidity Meter TD-300), sendo os testes feitos em triplicata. Para a quantificação da acidez titulável, foi usado o método de Dornic (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008). A densidade foi analisada usando um termolactodensímetro (CAP-LAB). A concentração de açúcares redutores foi analisada através do método de DNS (MILLER, 1959). A gordura foi quantificada pelo método de Gerber (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

### 3.3.4 Condições de Cultivo

#### 3.3.4.1 Preparo de ágar inclinado para cultivo mixotrófico

O meio sintético utilizado para o cultivo das cepas de *C. vulgaris* é Bold's Basal Medium (BBM modificado) (BISCHOFF; BOLD, 1963), recomendado pelo Centro de Cultura de Algas e Protozoários de Cambridge (CCAP). A Tabela 4, apresenta a composição do meio de cultivo.

Tabela 4 - Composição do meio sintético BBM modificado (pH=6,8)

| Composto                             | Concentração (g.L <sup>-1</sup> ) | Composto                             | Concentração (g.L <sup>-1</sup> ) |
|--------------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------------|
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>      | 0,175                             | NaCl                                 | 0,0250                            |
| CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O | 0,025                             | Na <sub>2</sub> EDTA KOH             | 0,100                             |
| MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O | 0,075                             | FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O | 0,0498                            |
| NaNO <sub>3</sub>                    | 0,250                             | Metais*                              | 0,0541                            |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>      | 0,075                             | H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>       | 0,1150                            |

\* Concentrações dos metais (g.L<sup>-1</sup>): H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> = 2,86; MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O = 1,81; ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O = 0,22; (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>.4H<sub>2</sub>O = 0,88; CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O = 0,07; NaCl = 0,05

As microalgas foram transferidas para tubos de ensaio contendo ágar inclinado em meio BBM, acrescentados de glicose, e nitrato de sódio em quantidade suficiente para manter a relação de C/N em 20. Os tubos com ágar inclinado foram cultivados com fotoperíodo de 12 horas (claro-escuro) com lâmpadas de LED por aproximadamente 8 dias.

#### 3.3.4.2 Preparo do inóculo e condições de axenia

Após o cultivo da microalga em meio sólido, adicionou-se 3 mL de meio BBM modificado aos tubos inclinados de *C. vulgaris* e com uma alça de inoculação ressuspendeu-se as células na fase líquida, homogeneizando o tubo a partir da agitação. Transferiu-se para um Erlenmeyer todo o volume celular para obtenção de concentração de células homogênea. Adicionou-se 2,5 mL de suspensão de células a cada um dos Erlenmeyers contendo 47,5 mL de meio BBM com 5 g.L<sup>-1</sup> da fonte de carbono a ser avaliada (glicose, lactose, permeado de soro lácteo em pó (PSP10 e PSP20) (C/N=10 e C/N =20) ou permeado de soro lácteo líquido (PSL). Nitrato de sódio foi adicionado em quantidade suficiente para manter a relação de C/N em 20 para todos os casos, exceto para o PSP, C/N em 10. Os Erlenmeyers foram mantidos com fotoperíodo de 12 horas (claro-escuro) e com aeração constante. Durante o cultivo, alíquotas foram retiradas para análise de consumo de substrato e

concentração celular. No final dos cultivos, a biomassa foi centrifugada e, liofilizada para análise de lipídeos.

Os procedimentos foram realizados assepticamente, em câmara de fluxo laminar e os meios de cultivo e materiais necessários foram autoclavados a 121°C por 20 minutos. A Figura 10 apresenta o cultivo para seleção da cepa, das seis estirpes realizados em B.O.D.

**Figura 9 - Cultivo das cepas IPR-7104, IPR-7117, IPR-7115, IPR-7116, IPR-7151 e UTEX-1185 feito em meio sintético em B.O.D. para seleção da cepa.**



**Fonte: Autoria própria**

Os cultivos mixotróficos da *Chlorella vulgaris* IPR-7117 usando glicose, lactose, permeado de soro lácteo em pó com razão C/N 20 (PSP20), permeado de soro lácteo em pó com razão C/N 10 (PSP10) e PSL foram feitos durante 17 dias. Esses cultivos foram realizados em um “simulador de B.O.D.”, construído para a presente dissertação, sendo composto por uma caixa térmica, aquecedor, termômetro, controlador de fotoperíodo, duas lâmpadas LED e aeração por bomba de aquário, conforme mostrado na Figura 10.

**Figura 10 - Cultivo da *C. vulgaris* IPR-7117 nos diferentes substratos**



**Fonte: Autoria própria**

#### 3.3.4.3 Cultivo de microalgas com herbicidas

Os cultivos de microalgas com herbicidas, foram feitos usando meio sintético BBM modificado acrescido PSP20, substrato que resultou na maior concentração celular. Os herbicidas foram testados nas concentrações de 60, 600 e 6000  $\mu\text{g.L}^{-1}$  para ambos os herbicidas, Jaguar<sup>®</sup> e Trueno<sup>®</sup>. Como até o presente momento não há estudos sobre os efeitos de aminopiralde e fluroxipir sobre microalgas, a concentração mais baixa dos herbicidas foi definida com base no limite máximo permitido pela legislação brasileira (CONAMA, resolução nº 357, de 17 de março de 2005) para 2,4-D em águas doce da classe III que é de 30  $\mu\text{g.L}^{-1}$ . Assim, além de 60  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , também foram estudadas concentrações dez vezes e cem vezes acima do limite máximo estabelecido para o 2,4-D.

Além disso, foram feitos cultivos controle: sem adição de herbicida (Controle SH); sem adição de microalgas (Controle SM) nas mesmas concentrações estudadas, a fim de verificar a degradação não biológica dos herbicidas.

Os experimentos foram conduzidos por 19 dias com amostragens a cada 48 horas das culturas para as análises de densidade celular, viabilidade celular consumo de substrato e concentração de herbicida no meio. A concentração de lipídeos foi analisada somente ao final dos cultivos, a fim de analisar quanto o metabolismo lipídico foi afetado nos diferentes cultivos. O sobrenadante obtido ao final dos cultivos,

foi utilizado para os estudos de ecotoxicidade.

### 3.3.5 Metodologia Analítica

#### 3.3.5.1 Determinação do pH

O pH foi avaliado nas primeiras horas e ao final de cada cultivo, utilizando um potenciômetro (Aparelho Instruterm pH 2600), com faixa de trabalho de 4 a 9.

#### 3.3.5.2 Determinação da concentração celular

A concentração celular foi determinada pela contagem direta das células em microscópio utilizando Câmara de Neubauer. A concentração celular também foi determinada por massa seca. Para isso, amostras de 1 mL foram coletadas em microtubos previamente pesados e centrifugados 14500 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células lavadas com água seguidas de nova centrifugação. O sobrenadante foi descartado e o microtubos contendo a biomassa foram congelados e posteriormente liofilizados até o completo processo de desidratação. Finalmente, pesou-se as amostras para obtenção da concentração celular, conforme equação 1:

$$\text{Concentração celular (g/L)} = \frac{\text{massa seca obtida (g)}}{\text{volume amostra (L)}} \quad (1)$$

#### 3.3.5.3 Determinação de glicose e lactose

A determinação de glicose e lactose foi realizada conforme metodologia da reação dos açúcares redutores com o ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) descrita por Miller (1959). Curvas-padrão de glicose e lactose com diferentes concentrações foram utilizadas como referência e são apresentadas nas Figuras 11 e 12, além da Tabela 5 que apresenta as equações da reta e os coeficientes de determinação ( $R^2$ ).

Figura 2 - Curva padrão glicose

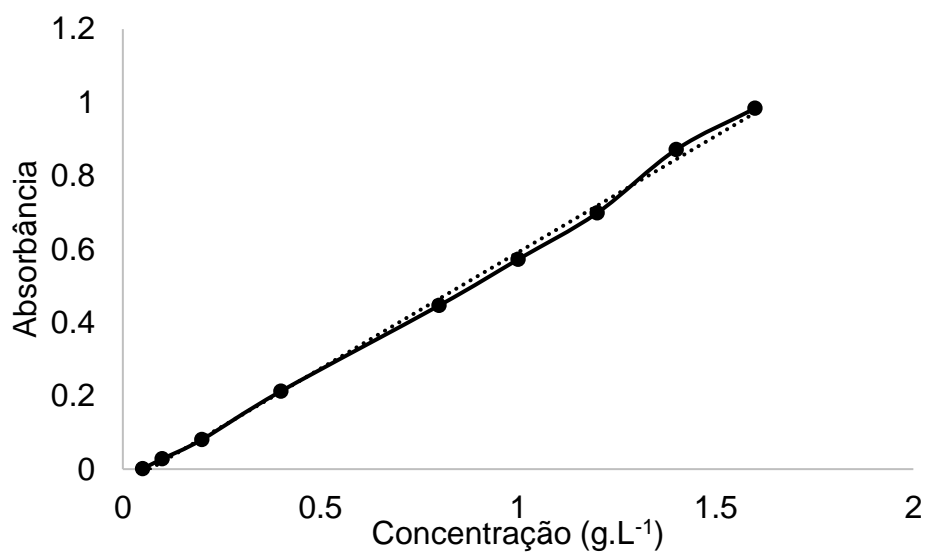
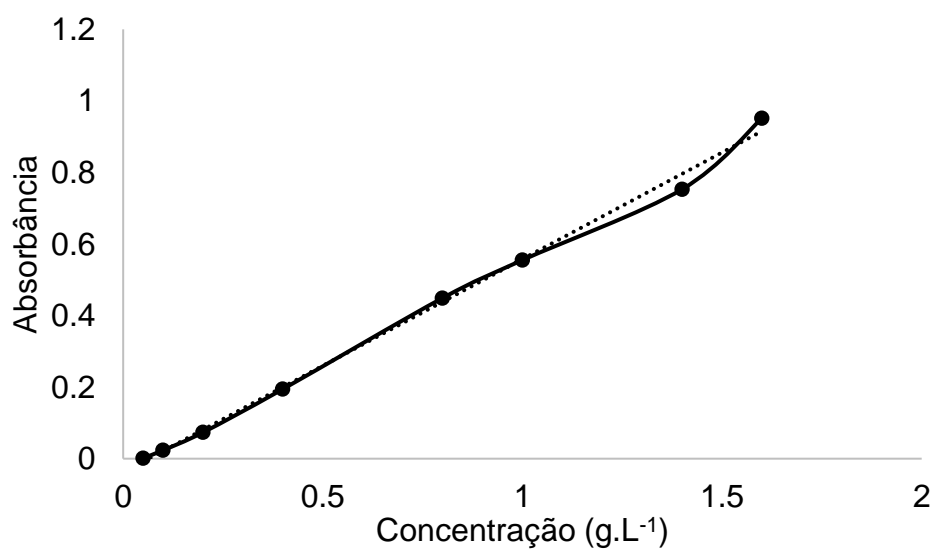


Figura 32 - Curva padrão lactose

Tabela 5 - Equações da reta e Coeficiente de Determinação (R<sup>2</sup>)

| Substrato | Equação da Reta         | R <sup>2</sup> |
|-----------|-------------------------|----------------|
| Lactose   | $y = 0,5961.x - 0,0383$ | 0,996          |
| Glicose   | $y = 0,6345.x - 0,0432$ | 0,998          |

#### 3.3.5.4 Determinação de lipídeos

Inicialmente, para a biomassa microalgal obtida por diferentes substratos, os

lipídeos foram extraídos conforme metodologia proposta por Bligh e Dyer (1959) adaptado por Manirakiza, Covaci e Schepens (2001). Inicialmente, 300 mg de biomassa celular seca foram adicionadas em tubo com 5 mL de ácido clorídrico (2M), homogeneizadas e colocadas em banho a 80°C por 1 hora. Após centrifugou-se os tubos a 2000 rpm por 15 minutos e retirou a massa sem lipídeos. Adicionou-se 4 mL metanol a massa lipídica, agitou em vórtex, adicionando em seguida 2 mL de clorofórmio, agitando e repetiu-se esse passo. Na sequência, adicionou-se 3,6 mL de água, agitou e centrifugou novamente em 2000 rpm por 10 minutos. Esse procedimento foi repetido e em seguida o solvente foi evaporado no evaporador rotatório. A porcentagem de lipídeos totais foi determinada conforme equação (2):

$$\text{Lipídeos (\%)} = \frac{\text{massa final de lipídeos (g)}}{\text{massa inicial de biomassa (g)}} \times 100 \quad (2)$$

Para a biomassa microalgal obtida nos cultivos contendo herbicidas, verificou-se a necessidade de usar uma metodologia que utilizasse menor quantidade de biomassa. Assim, utilizou-se a metodologia de Bligh e Dyer (1959), adaptado por Chen et al.(2012). Inicialmente, 100 mg de biomassa seca foram adicionados em tubo de ensaio contendo 5 mL de solução de clorofórmio e metanol, na proporção 1:2 (v:v). Posteriormente, o tubo foi aquecido a 65°C, por 60 minutos. Logo após, as amostras foram centrifugadas a 2000 rpm, por 5 minutos, e, então, recolheu-se o sobrenadante, que foi transferido para um tubo de ensaio com tampa. No tubo com o sobrenadante, adicionou-se clorofórmio e solução de cloreto de sódio a 1% até alcançar a proporção final de 1:1:0,9 de clorofórmio:metanol:solução de cloreto de sódio. Esse processo foi repetido três vezes. Após a separação de fases, a fase contendo os lipídeos foi transferida para um novo tubo de ensaio, previamente pesado ( $P_1$ ), e o solvente foi evaporado em estufa, a 60°C, até massa constante ( $P_2$ ). O teor de lipídeos foi determinado a partir da diferença de massa entre  $P_2$  e  $P_1$ , ou seja ( $P_2 - P_1$ ), multiplicado por 100 para obtenção de porcentagem lipídica.

### 3.3.5.5 Determinação de herbicidas

No decorrer dos cultivos, a concentração dos herbicidas foi determinada por espectrofotometria (Espectrofotômetro BEL). Amostras foram coletadas e transferidas



para microtubos e centrifugados por 5 minutos 14500 rpm. O sobrenadante foi coletado para as leituras a 290 nm (Jaguar) e 287 nm (Trueno) (SANTOS; FRANÇA; ANSCHAU, 2017) e a concentração de cada herbicida foi determinada a partir de curva de calibração.

### 3.3.5.6 Análise de ecotoxicidade dos herbicidas usando *Artemia salina*

Os ensaios de ecotoxicidade dos herbicidas com *Artemia salina* foram realizados conforme metodologia proposta por Garcia et al., (2013). Preparou-se solução de 23 g.L<sup>-1</sup> de NaCl em água destilada, com pH ajustado entre 8,0 e 9,0 usando NaOH (0,1 mol.L<sup>-1</sup>). O controle utilizado, chamado negativo, foi feito usando somente água salina e um controle positivo contendo solução de dicromato de potássio 1,0 g.L<sup>-1</sup>. Os testes foram realizados em triplicata e durante 5 dias.

No primeiro dia, a solução salina preparada foi deixada sob aeração por 24 h. No segundo dia, os cistos de *Artemia salina* foram adicionados à solução e deixados sob iluminação e aeração constante por mais 24 h. No terceiro dia, após a eclosão dos cistos, por meio de feixe de luz, os cistos que eclodiram foram separados e deixados mais 24 h sob iluminação. No quarto dia, com o auxílio de uma pipeta Pasteur, foram adicionados 10 náuplios de *Artemia salina* em tubos de ensaio contendo as diluições apresentadas na Tabela 5 e estes foram deixados sob iluminação por mais 24 h.

**Tabela 6 - Diluições do sobrenadante dos cultivos para os ensaios de ecotoxicidade com *Artemia salina***

| Volume (mL)                            | Porcentagem do sobrenadante do meio de cultivo (%) |     |     |     |     |     |
|--|--|-----|-----|-----|-----|-----|
|  | 0  | 15  | 35  | 50  | 75  | 100 |
| <b>Sobrenadante do meio de cultivo</b> | 0,0  | 0,3 | 0,7 | 1,0 | 1,5 | 2,0 |
| <b>Solução salina</b>                  | 2,0  | 1,7 | 1,3 | 1,0 | 0,5 | 0,0 |

No quinto dia, avaliou-se a mortalidade dos náuplios para cada diluição e pode-se então determinar a concentração letal das amostras (LC<sub>50</sub>), sendo esta a

concentração necessária para matar 50% dos náuplios. Dessa forma, pode-se também construir as curvas de toxicidade (Mortalidade vs. Diluição do efluente).

### 3.3.5.7 Análise de ecotoxicidade dos herbicidas usando alface (*Lactuca sativa*)

Nos estudos de ecotoxicidade usando alface, foi utilizada a metodologia descrita por Sobrero e Ronco (2004). Inicialmente foram feitas diluições do sobrenadante dos cultivos contendo os herbicidas. Os percentuais de diluição para cada herbicida foram 1, 3, 10, 30, 50 e 100%. Água deionizada foi usada como controle negativo. Em placas de Petri com papel filtro, as sementes de alface foram depositadas espaçadamente e umedecidas com as diluições preparadas, em triplicata.

As placas foram levadas em incubadora por um período de 120 h, em temperatura igual a  $22^{\circ}\text{C} \pm 2$ . Após incubação, contou-se o número de sementes germinadas e mediu-se o comprimento de raízes e radícula. Calculou-se o percentual de germinação conforme Equação 3.

$$\text{Germinação (\%)} = \frac{\text{n}^{\circ} \text{ de sementes germinadas na amostra}}{\text{n}^{\circ} \text{ de sementes germinadas no controle}} \times 100 \quad (3)$$

Pôde-se calcular também o percentual de inibição do crescimento relativo da radícula e da raiz, conforme Equações 4 e 5, respectivamente.

$$\text{ICRRd (\%)} = \frac{\text{MCRdC} - \text{MCRdA}}{\text{MCRdC}} \times 100 \quad (4)$$

$$\text{ICRRz (\%)} = \frac{\text{MCRzC} - \text{MCRzA}}{\text{MCRzC}} \times 100 \quad (5)$$

### 3.3.6 Determinação dos Parâmetros Fermentativos

#### 3.3.6.1 Fator de conversão de substrato em produto ( $Y_{P/S}$ )

O fator de conversão ( $Y_{P/S}$ ) foi calculado correlacionando a massa (g) de lipídeos produzida e a massa (g) de açúcares consumidos, conforme Equação 6:

$$Y_{P/S} = -\frac{\Delta P}{\Delta S} = \frac{P_f - P_i}{S_f - S_i} \quad (6)$$

Em que:

$S_i$  e  $S_f$  correspondem as concentrações inicial e final de açúcares ( $\text{g.L}^{-1}$ )

$P_i$  e  $P_f$  correspondem as concentrações inicial e final de lipídeos ( $\text{g.L}^{-1}$ )

### 3.3.6.2 Fator de conversão de substrato em produto ( $Y_{X/S}$ )

O fator de conversão ( $Y_{X/S}$ ) foi calculado correlacionando a massa (g) de células produzidas e a massa (g) de açúcares consumidos, conforme Equação 7:

$$Y_{X/S} = -\frac{\Delta X}{\Delta S} = \frac{X_f - X_i}{S_f - S_i} \quad (7)$$

Em que:

$S_i$  e  $S_f$  correspondem as concentrações inicial e final de açúcares ( $\text{g.L}^{-1}$ )

$X_i$  e  $X_f$  correspondem as concentrações inicial de massa celular ( $\text{g.L}^{-1}$ )

### 3.3.6.3 Produtividade volumétrica de produto ( $Q_P$ )

A produtividade volumétrica foi calculada correlacionando a concentração de lipídeos produzidos ( $\text{g.L}^{-1}$ ) por tempo de cultivo (h), conforme Equação 8:

$$Q_P = \frac{\Delta P}{\Delta t} = \frac{P_f - P_i}{t_f - t_i} \quad (8)$$

Em que:

$P_i$  e  $P_f$  correspondem as concentrações inicial e final de lipídeos ( $\text{g.L}^{-1}$ )

$t_i$  e  $t_f$  correspondem ao tempo inicial e final do cultivo (h)

### 3.3.6.4 Velocidade volumétrica de crescimento celular ( $r_x$ )

A velocidade volumétrica de crescimento expressa a formação de massa celular em função do tempo ( $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ) e é calculada de acordo com a Equação 9:

$$r_x = \frac{\Delta X}{\Delta t} = \frac{X_f - X_i}{t_f - t_i} \quad (9)$$

Em que:

$X_i$  e  $X_f$  correspondem as concentrações inicial de massa celular ( $\text{g.L}^{-1}$ )

$t_i$  e  $t_f$  correspondem ao tempo inicial e final do cultivo (h)

### 3.3.6.5 Velocidade volumétrica de consumo de açúcares ( $r_s$ )

A velocidade volumétrica de consumo de açúcares baseia-se no consumo de açúcar em função do tempo ( $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ) e é calculada de acordo com a Equação 10:

$$r_s = -\frac{\Delta S}{\Delta t} = \frac{S_f - S_i}{t_f - t_i} \quad (10)$$

Em que:

$S_i$  e  $S_f$  correspondem as concentrações inicial e final de açúcares ( $\text{g.L}^{-1}$ )

$t_i$  e  $t_f$  correspondem ao tempo inicial e final do cultivo (h)

### 3.3.6.6 Máxima velocidade específica de crescimento ( $\mu_{\text{máx}}$ )

Curvas de concentração celular *versus* tempo foram elaboradas, a partir das quais foram obtidas a concentração celular máxima ( $X_{\text{máx}}$ ) e a máxima velocidade específica de crescimento ( $\mu_{\text{máx}}$ ) para cada estudo. A  $\mu_{\text{máx}}$  foi calculada a partir da integração da Equação 11, por regressão exponencial dos dados de concentração células *versus* tempo na fase logarítmica de crescimento, resultado na Equação 12.

$$\mu = \frac{1}{X} \cdot \frac{dx}{dt} \quad (11)$$

$$\mu_{\text{máx}} = \frac{1}{\Delta t} \cdot \text{Ln} \frac{X_2}{X_1} \quad (12)$$

Em que:

$\mu$ : velocidade específica de crescimento ( $\text{h}^{-1}$ )

$\mu_{\text{máx}}$ : máxima velocidade específica de crescimento ( $\text{h}^{-1}$ )

### 3.3.6.7 Tempo de geração ( $t_g$ )

O tempo de geração permite medir a que tempo a concentração do microrganismo dobra do seu valor inicial e este foi calculado conforme Equação 13.

$$t_g = \frac{\text{Ln}(2)}{\mu_{\text{máx}}} \quad (13)$$

Em que:

$t_g$ : tempo de geração (h)

$\mu_{\text{máx}}$ : máxima velocidade específica de crescimento ( $\text{h}^{-1}$ ) (SCHMIDELL et al., 2001)

## 3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.4.1 Caracterização do Soro Lácteo e do Permeado de Soro Lácteo Líquido

A Tabela 7 apresenta a caracterização físico-química do soro lácteo (S) e do permeado de soro lácteo líquido (PSL). A caracterização do permeado de soro lácteo em pó (PSP) foi fornecida pela Empresa Sooro.

**Tabela 7 - Caracterização físico-química do soro (S), permeado de soro lácteo líquido (PSL) e em pó (PSP).**

| Parâmetro                                   | S             | PSL           | PSP                  |
|---|---------------|---------------|----------------------|
| pH  | 6,19 ± 0,01   | 5,70 ± 0,04   | 6,34 (6,00 - 6,70)   |
| Turbidez (NTU)                              | 893 ± 18      | 868 ± 2       | -                    |
| Lactose ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )    | 50,1 ± 0,004  | 60,9 ± 0,004  | 88,84 (mínimo 88,00) |
| Gordura (%)                                 | 0,00 ± 0,01   | 0,20 ± 0,01   | 0,00 (máximo 1,50)   |
| Densidade ( $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) | 1,026 ± 0,001 | 1,026 ± 0,001 | -                    |
| Acidez ácido láctico (%)                    | 0,13 ± 0,02   | 0,10 ± 0,02   | 1,07 (máximo 2,00)   |

Fonte: Autora e Empresa Sooro (2018)

Sabe-se que o S oriundo da produção de queijo é considerado ácido pela etapa de coagulação ácida que ocorre na produção. Os valores de pH para o PSL

foram menores comparados com o S e o PSP, e ficaram entre 5,66 e 5,74. Segundo análises de Teixeira e Fonseca (2008), o soro proveniente do queijo mussarela apresenta o pH em média de 6,0. A acidez para o soro foi similar ao obtido por Teixeira e Fonseca (2008) de 0,132%.

Piovesan (2017), obteve valor de turbidez de soro próximo do presente no estudo (1126 NTU). A composição do leite pode influenciar nesse parâmetro, pois a turbidez é caracterizada pelas partículas orgânicas e minerais em suspensão.

Em relação à lactose, Teixeira e Fonseca (2008) obtiveram  $42,7 \text{ g.L}^{-1}$  para o soro lácteo. A alta concentração de lactose obtida no S e no PSL do presente estudo está associada ao teor de lactose do leite que é transferida ao soro lácteo durante o processamento de queijo.

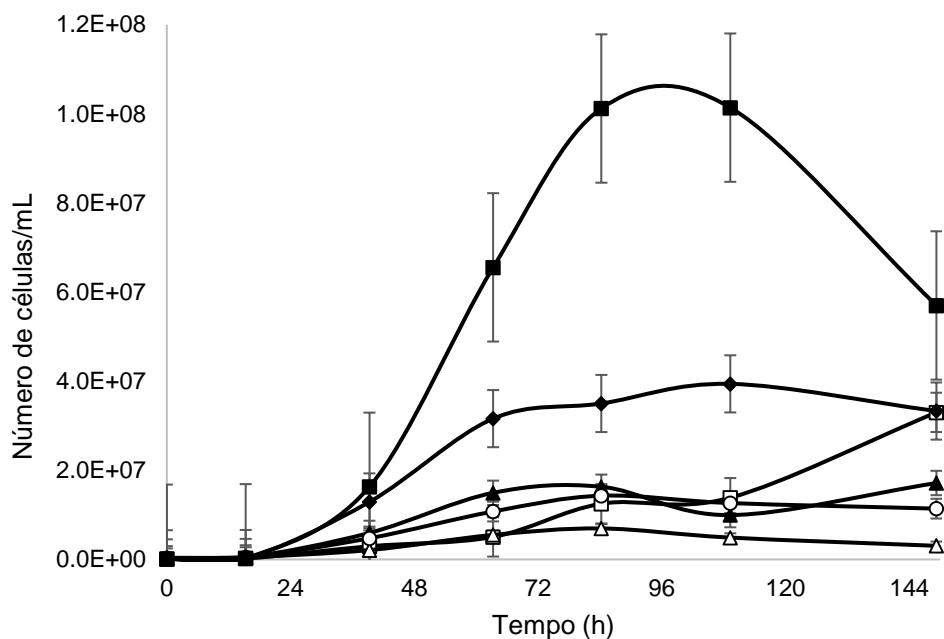
O baixo teor de gordura no soro e no permeado já eram esperados, uma vez que quase a totalidade da gordura presente no leite é convertida em queijo. O teor de gordura é influenciado diretamente pela forma como o leite é usado na produção de queijo (TEIXEIRA; FONSECA, 2008). Pinto et al., (2011) obtiveram 0,04% de gordura em soro de leite.

A densidade tanto para o S como para o PSL, apresentou similaridade com o valor determinado por Nunes e Santos (2015) de  $1,027 \text{ g/mL}$ . A densidade depende da composição da água, gordura e sólidos presentes no soro (NUNES; SANTOS, 2015).

#### 3.4.2 Seleção da microalga

A seleção da microalga aconteceu em paralelo com a caracterização do S e do PSL, assim os cultivos das seis cepas de microalgas foram feitos inicialmente em incubadora tipo B.O.D., com meio sintético BBM Modificado. A concentração celular em número de células por mL, ao longo de 144 h de cultivo está apresentada na Figura 13. A cepa *Chlorella* sp. IPR-7117 apresentou maior concentração celular ao longo de todo o cultivo, sendo selecionada para os estudos posteriores.

**Figura 43- Concentração celular das cepas ao longo de 144 h de cultivo (□ IPR-7104; ■ IPR-7117; ▲ IPR-7115; ● IPR-7116; ○ UTEX-1185; △ IPR-7151).**



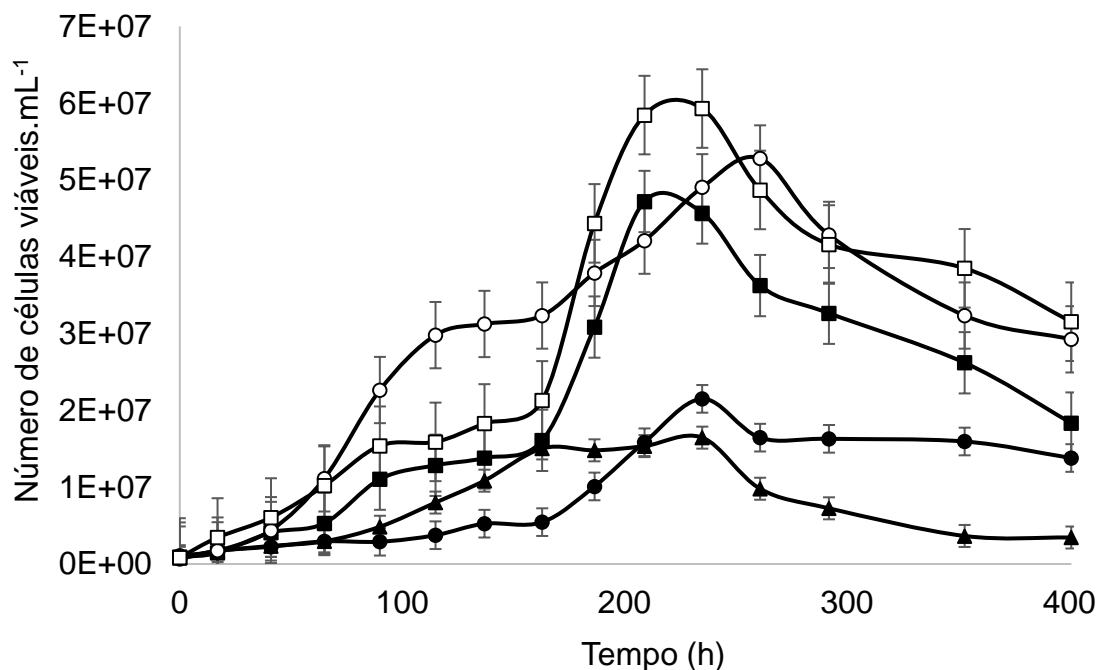
Nota-se que todos os cultivos apresentam fase lag de crescimento celular nas primeiras 20 h de cultivo. A cepa IPR-7117 apresentou fase exponencial mais acentuada que as demais cepas, chegando a  $5,93 \times 10^7$  células.mL<sup>-1</sup> em X horas. Em função da alta concentração celular obtida, a cepa *Chlorella vulgaris* IPR-7117 foi selecionada para os demais estudos.

Maroubou, Caviglione e Andrade (2016), avaliaram as mesmas cepas deste estudo, porém a questão de influência da temperatura de cultivo das microalgas. Os autores verificaram que a produção de biomassa das cepas IPR-7115 e IPR-7116 e teor de lipídeos das estirpes IPR-7115, IPR-7117 e IPR-7151 não foram afetados pelas quatro condições de temperaturas avaliadas (Máximo/Mínimo°C: 15/08°C; 19/15°C; 25/19°C e 39/25°C).

### 3.4.3 Cultivo *Chlorella vulgaris* IPR-7117 usando diferentes substratos

A Figura 14 apresenta o crescimento celular *C. vulgaris* IPR-7117 nos diferentes substratos.

**Figura 54- Concentração celular da *C. vulgaris* IPR-7117 nos substratos • Glicose; ▲ Lactose; ■ PSP10; □ PSP20; ○ PSL.**



O cultivo contendo PSP20 resultou em maior concentração celular obtendo-se  $5,93 \times 10^7$  células.mL<sup>-1</sup>, em 235 h de cultivo. Comparando-se com o PSL e PSP10 no mesmo tempo, chegou-se em  $4,91 \times 10^7$  e  $4,57 \times 10^7$  células.mL<sup>-1</sup>, respectivamente. Para a lactose e glicose, a concentração celular foi menor ainda, obtendo-se  $1,65 \times 10^7$  e  $2,15 \times 10^7$  células.mL<sup>-1</sup>, respectivamente.

A diferença encontrada entre PSP10 e PSP20, já eram esperadas, visto a concentração de PSP inicial, onde a razão C/N tem influência. Essa razão implica diretamente no crescimento das microalgas e biossíntese de lipídeos (CHEN; CHEN, 2006), sendo muito utilizadas as razões C/N 20 e 30 (FONTENOT et al., 2007). O carbono é o principal componente da biomassa de algas, aproximadamente 50% do peso seco. Já o nitrogênio, é um nutriente importante e que afeta o metabolismo lipídico das algas (LIU et al., 2010).

Para os cultivos com glicose e lactose, a fase *lag* foi maior que os demais. Contudo, os resultados indicam que a microalga foi capaz de usar lactose além da glicose em seu metabolismo. Mesmo que a principal fonte de carbono seja o CO<sub>2</sub>, muitos estudos comprovam que outras fontes orgânicas também podem ser usadas (DERNER, 2006). A maior concentração celular obtida para o PSP comparado com a glicose e lactose, por exemplo, pode ser relacionado a presença de alguns nutrientes do PSP, como fósforo e cálcio. Conforme Ozmihci e Kargi (2007) o PSP contém 0,96%



de fósforo com base no peso seco. O fósforo é um macronutriente que realiza funções vitais nos processos metabólicos celulares por formar componentes estruturais e funcionais necessários no desenvolvimento e crescimento de microalgas. É importante considerar que o conteúdo mineral no soro depende das técnicas de processamento usadas (RICHMOND, 2004).

Nota-se pela Figura 13 que a fase exponencial de crescimento inicia a partir das 100 h de cultivo para todos os cultivos e estas se mantem até as 200 h, exceto para o PSL que esta foi até 260 h aproximadamente. Nessa fase os teores de lipídeos podem até diminuir pela alta demanda de energia. Porém, na fase estacionária tendem a aumentar, pois as células acumulam reservas energéticas pela limitação de nutrientes no meio (LEMOS, 2012).

As Figuras 15, 16, 17, 18 e 19 apresentam a concentração celular e a concentração de substrato expressos em  $\text{g.L}^{-1}$  pelo tempo de fermentação para os cultivos contendo para os substratos: lactose, glicose, PSP20, PSP10 e PSL, respectivamente.

**Figura 6- Concentração celular ( $\blacktriangle$ ) e de lactose ( $\circ$ ) para o cultivo de *C. vulgaris* IPR-7117**

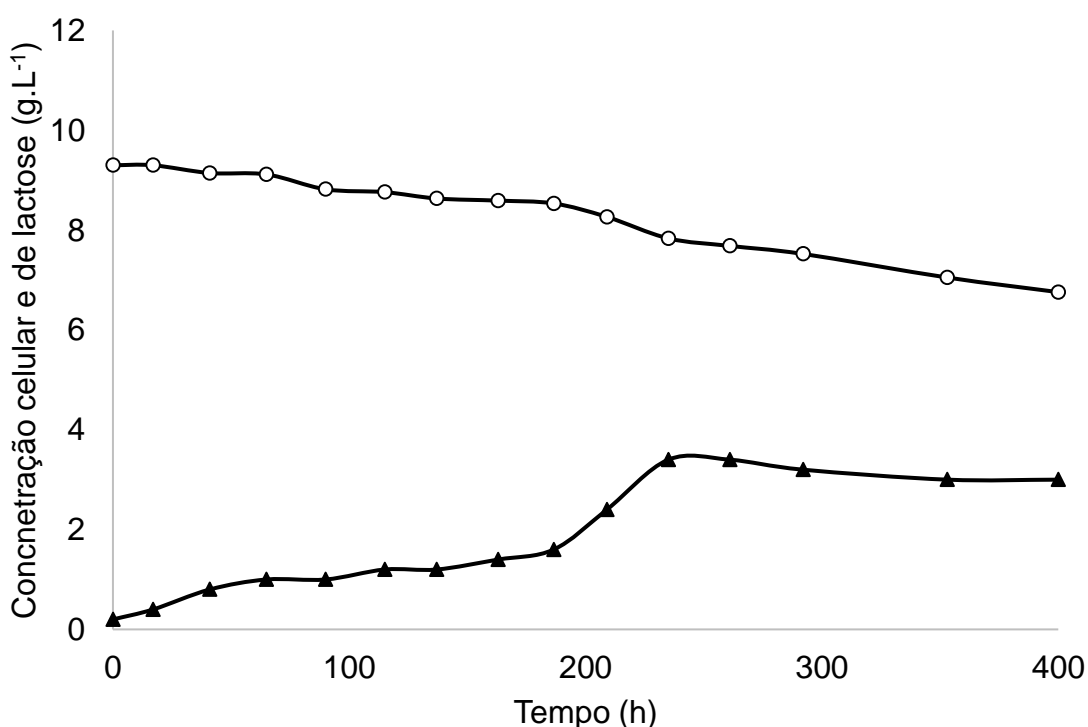


Figura 76- Concentração celular (▲) e de glicose (○) para o cultivo de *C. vulgaris* IPR-7117

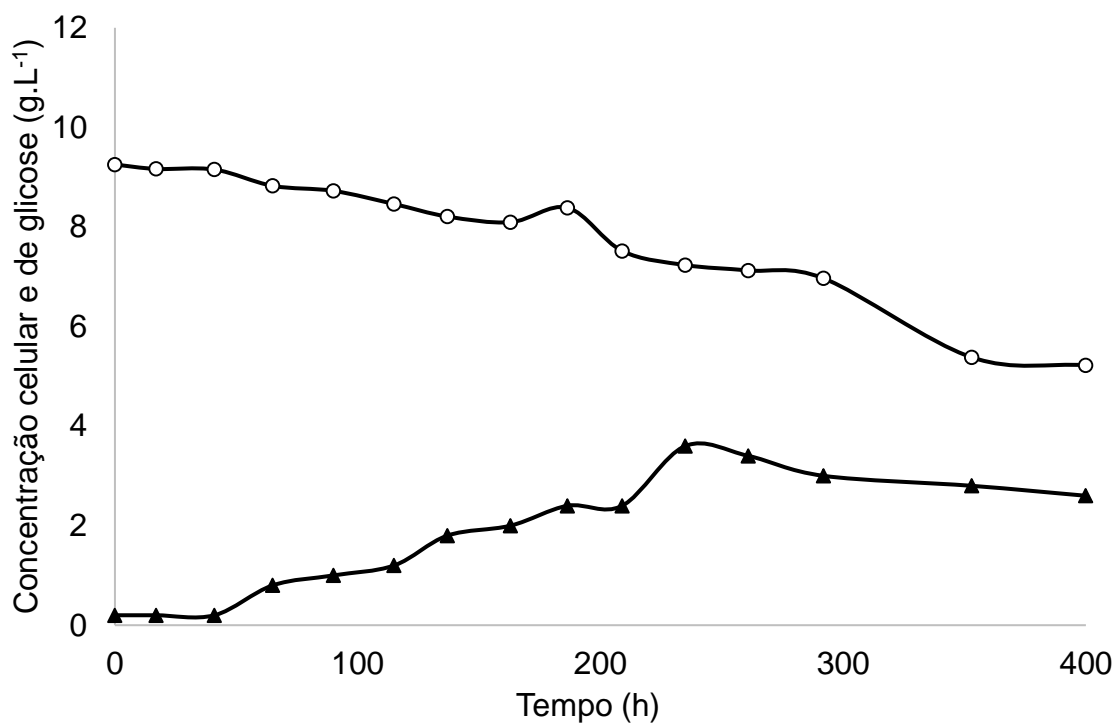
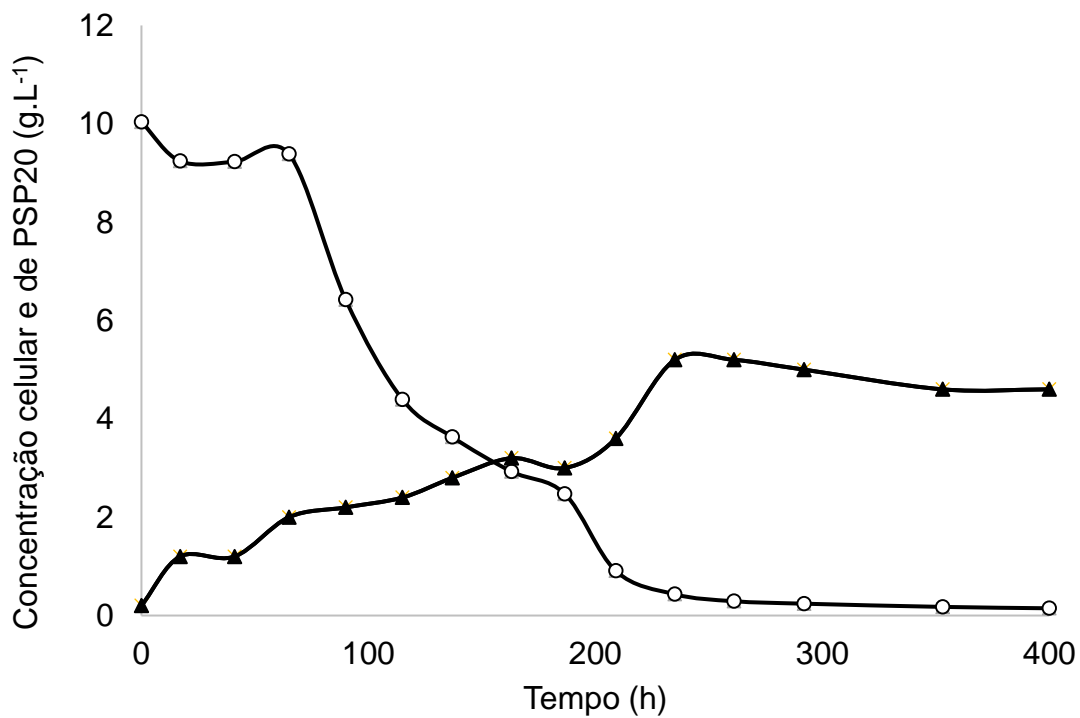
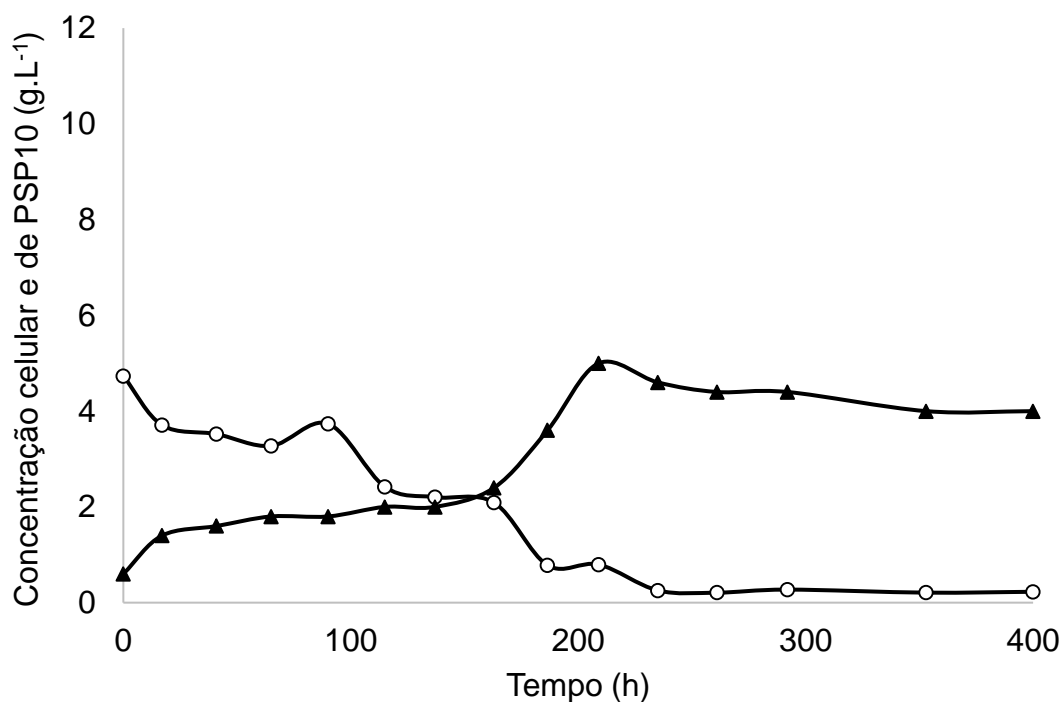


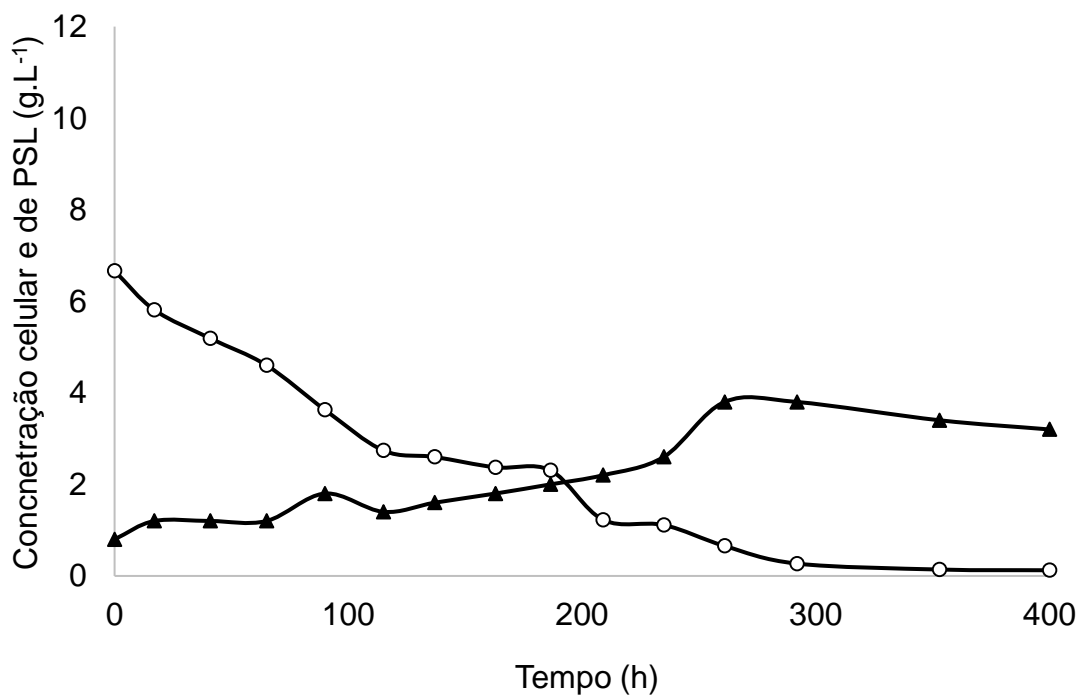
Figura 87- Concentração celular (▲) e de PSP20 (○) para o cultivo de *C. vulgaris* IPR-7117



**Figura 98 - Concentração celular (▲) e de PSP10 (○) para o cultivo de *C. vulgaris* IPR-7117**



**Figura 19 - Concentração celular (▲) e de PSL (○) para o cultivo de *C. vulgaris* IPR-7117**



As maiores concentrações celulares foram obtidas usando PSP20 e PSP10, chegando a 5,2 e 5,0 g.L<sup>-1</sup>, respectivamente (Figuras 16 e 17). O PSL apresentou a

menor concentração celular ( $3,8 \text{ g.L}^{-1}$ ) e os cultivos com glicose e lactose, resultaram em  $4,4 \text{ g.L}^{-1}$  de células.

Neste estudo obteve-se uma concentração significativamente maior que a encontrada por Abreu et al., (2012) em cultivo com *C. vulgaris* em permeado de soro de queijo em pó. A concentração celular obtida neste trabalho foi de  $5,2 \text{ g.L}^{-1}$ , e no de Abreu et al., (2012) foi de  $3,6 \text{ g.L}^{-1}$ , na presença de  $\text{CO}_2$ , permeado de soro de queijo hidrolisado em pó e glicose e galactose em uma concentração de  $5 \text{ g.L}^{-1}$ . Espinosa-Gonzalez, Parashar e Bressler (2014) cultivaram a *Chlorella protothecoides* usando hidrolisado de permeado de soro e obtiveram concentração celular de  $9,1 \text{ g.L}^{-1}$ . Contudo, a concentração de açúcar inicial para Espinosa-Gonzalez, Parashar e Bressler (2014) foi aproximadamente  $15 \text{ g.L}^{-1}$ , enquanto neste estudo foi de aproximadamente  $10 \text{ g.L}^{-1}$ . Além disso, o fator de conversão substrato em células foi maior no presente trabalho (0,44) comparado com o de Espinosa-Gonzalez, Parashar e Bressler (2014) (0,41).

O cultivo com PSP20 resultou em concentração celular um pouco maior ( $5,2 \text{ g.L}^{-1}$ ) que usando PSP10 ( $5,0 \text{ g.L}^{-1}$ ), o que pode estar associado ao fato de que a relação C/N 20 favorece o desempenho microbiano (FAY, 1983) e relaciona-se diretamente ao crescimento das microalgas e conteúdo lipídico (CHEN; CHEN, 2006). O consumo de substrato para ambos os casos chegou quase a 0 ao final do cultivo, o que significa que boa parte do açúcar foi convertido em biomassa. Para o cultivo mixotrófico, como acontece a fotossíntese, o consumo de  $\text{CO}_2$  é maior (YEH; CHANG, 2012).

Segundo Chojnacka e Marquez-Rocha (2004), em um sistema mixotrófico ideal, a velocidade de respiração corresponde com a da fotossíntese, ou seja, ocorre um equilíbrio entre o consumo e a produção. Contudo, na prática, nem sempre isso acontece, pois depende da condição metabólica predominante pode ocorrer um desequilíbrio. As limitações do sistema são as principais causas para isso acontecer. Para o metabolismo mixotrófico, os fatores limitantes de crescimento, e em termos de produtividade e substratos, podem ser luz e fonte orgânica de carbono. E, é por isso que cada substrato avaliado é consumido de um jeito particular.

Os cultivos contendo lactose e glicose resultaram em  $4,4 \text{ g.L}^{-1}$ , porém o consumo dos açúcares foi baixo durante os cultivos. Em estudo realizado por Girard et al., (2014), na presença de lactose, a *Scenedesmus obliquus* cresce e há uma redução na concentração do substrato. Porém, na presença de glicose e galactose,

as concentrações aumentam no meio de cultura, ou seja, observou-se acúmulo de glicose e galactose, sugerindo hidrólise extracelular de lactose pelas microalgas. Em estudo de Espinosa-Gonzalez, Parashar e Bressler (2014), a *C. protothecoides* foi incapaz de usar a lactose como fonte de carbono, crescendo bem com o permeado de soro hidratado, assimilando glicose e galactose.

Conforme estudo realizado por Choi (2016), o crescimento das microalgas depende principalmente de carbono orgânico, nitrogênio e fósforo. Bracher et al., (2015), em estudo com *Chlorella minutissima*, obtiveram maior crescimento celular ( $1,90 \text{ g.L}^{-1}$ ) com a adição de 20% de soro lácteo.

A Tabela 8 apresenta os resultados de pH, conteúdo de lipídeos e os parâmetros cinéticos para os substratos estudados.

**Tabela 8- Parâmetros cinéticos, pH e teor de lipídeos dos cultivos da *C. vulgaris* IPR-7117 em 400 horas de cultivo.**

| Parâmetro                              | Substrato |         |      |       |       |
|--|-----------|---------|------|-------|-------|
|  | Lactose   | Glicose | PSL  | PSP20 | PSP10 |
| pH                                     | 7,2       | 8,0     | 6,9  | 7,2   | 6,9   |
| Lipídeos (%)                           | -         | -       | -    | 27,98 | -     |
| $Y_{P/S}$                              | -         | -       | -    | 0,12  | -     |
| $Y_{X/S}$                              | 1,10      | 0,60    | 0,37 | 0,44  | 0,76  |
| $Q_P \text{ (g.L}^{-1}.\text{d}^{-1})$ | -         | -       | -    | 0,07  | -     |
| $r_x \text{ (g.L}^{-1}.\text{d}^{-1})$ | 0,17      | 0,14    | 0,14 | 0,26  | 0,20  |
| $r_s \text{ (g.L}^{-1}.\text{d}^{-1})$ | 0,15      | 0,24    | 0,39 | 0,59  | 0,27  |
| $\mu_{\text{máx}} \text{ (d}^{-1})$    | 0,16      | 0,15    | 0,08 | 0,19  | 0,11  |
| $t_g \text{ (d)}$                      | 4,28      | 4,52    | 8,35 | 3,69  | 6,10  |

Observa-se os valores de pH para todos os substratos aumentaram durante o cultivo. Segundo Mourthé (2010) à medida que o microrganismo se desenvolve, seu metabolismo torna o meio alcalino. É o pH quem regula reações bioquímicas que se relacionam com a concentração de íons  $\text{H}^+$  no meio de cultura, além de interferir na estrutura e atividade de proteínas. O aumento do pH paralelo ao crescimento celular é explicado pelo consumo da fonte de carbono durante o cultivo (RODRIGUES, 2008).

Durante o metabolismo células, há o transporte ativo de íons bicarbonato do meio para o interior das células e estes são convertidos a íons carbonato e gás carbônico, sendo este último usado na fotossíntese. Cada molécula de CO<sub>2</sub> forma um íon carbonato (MILLER; COLMAN, 1980) liberado no meio (RANGEL, 2000) e isso aumenta o pH.

O cultivo usando glicose apresentou o pH mais alcalino ao final da fermentação apesar da concentração celular ter chegando somente a 4,4 g.L<sup>-1</sup>. Lucas (1975, 1979) cita a relação das taxas fotossintéticas com valores de pH e transporte de íons bicarbonato. Em um de seus trabalhos ele verifica que em pH 9,0 a taxa fotossintética é maior do que a suportada pela fixação de CO<sub>2</sub>, ocorrendo a desidratação dos íons bicarbonato no meio externo. Por isso, nem sempre o aumento do pH se relaciona com o crescimento celular.

É o pH quem determina a solubilidade do CO<sub>2</sub> e minerais do meio nutritivo e influencia no metabolismo das algas (KARAM; SOCCOL, 2007). Precisa-se ter muito cuidado com as variações de pH no cultivo, visto que, elas podem afetar a distribuição de CO<sub>2</sub> e a disponibilidade de carbono, além dos outros macro e micronutrientes, induzem efeitos fisiológicos no meio de cultura e afetam o metabolismo celular e o crescimento da biomassa das microalgas (MOSTAFA; SHALABY; MAHMOUD, 2012).

A quantificação de lipídeos foi feita somente para o cultivo PSP20, em função desse cultivo ter alcançado maior concentração celular. Ao final do cultivo, as células apresentaram 27,98% de lipídeos com produtividade volumétrica de produto de 0,07 g.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>. Espinosa-Gonzalez, Parashar e Bressler (2014) cultivaram a *Chlorella prototheicoides* em meio contendo hidrolisado de permeado de soro e obtiveram concentração celular de 4,3 g.L<sup>-1</sup> com teor lipídico de 24,6%. Girard et al., (2014), obteve uma produtividade lipídica de 0,04 g.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> com meio BBM adicionado de 40% de permeado de soro de queijo para *Scenedesmus obliquus*, valor próximo ao obtido neste estudo (0,07 g.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>). De Melo et al., (2018), com *C. vulgaris* cultivada com meio BBM modificado suplementado com soro de queijo (com concentração inicial de lactose de 10 g.L<sup>-1</sup>) obteve uma produtividade máxima de 0,12 g.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>. Bracher et al., (2015) obteve a maior produtividade para *Chlorella minutissima* com 25% de soro de leite, chegando a 0,490 g.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>.

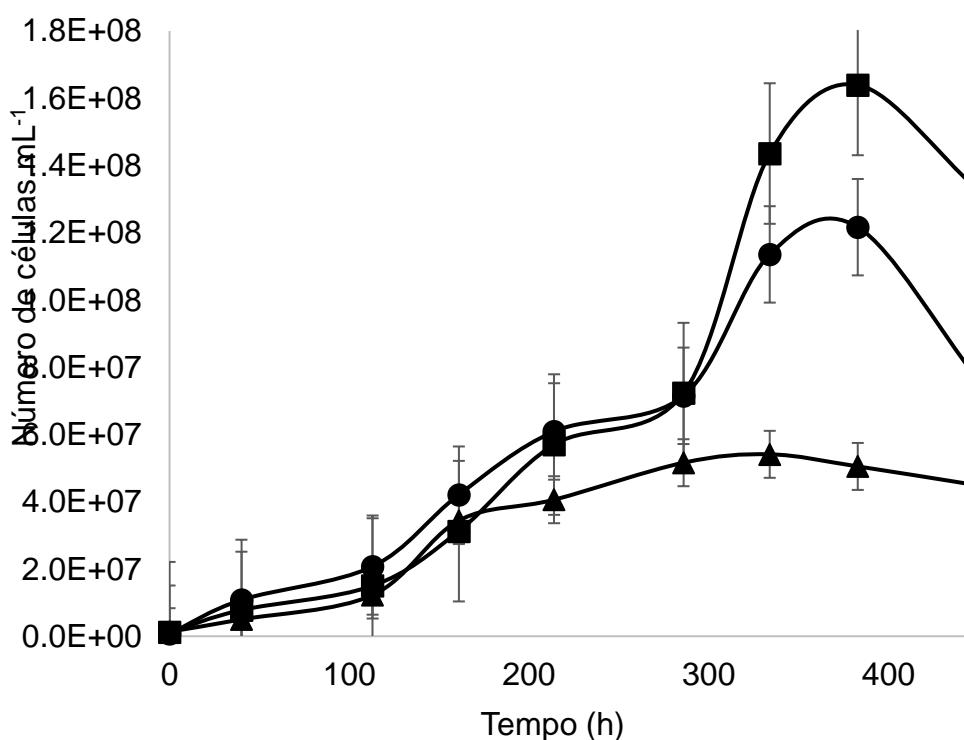
O cultivo com PSP20 também resultou na máxima velocidade específica de crescimento e tempo de geração, 0,19 d<sup>-1</sup> e 3,69 d, respectivamente. Bracher et al.,(2015), cultivaram a *Chlorella minutissima* com a adição de 5% de soro de leite, resultando na máxima velocidade específica de crescimento de 0,494 d<sup>-1</sup> e tempo de

geração de 1,40 d. Em estudo desenvolvido por Perreira (2017) com *Spirulina platensis* e 10% de soro de leite, o autor obteve máxima velocidade específica de crescimento de  $0,18 \text{ d}^{-1}$  e tempo de geração de 3,79 d. Na pesquisa de Cassuriaga et al.(2015) com a *Spirulina* sp. LEB 18, com 50% de nitrogênio, 10% de  $\text{CO}_2$ , foram obtidas máxima velocidade específica de crescimento de  $0,13 \text{ d}^{-1}$  e tempo de geração de 5,39 d. Para a *Chlorella vulgaris* cultivada com permeado de soro de queijo ( $10 \text{ g.L}^{-1}$  de lactose) , em trabalho desenvolvido por De Melo et al., (2018) a máxima velocidade específica de crescimento foi de  $0,29 \text{ d}^{-1}$ , resultado similar ao presente estudo para o PSP20 ( $0,19 \text{ d}^{-1}$ ). Sendo, esse substrato foi selecionado para os estudos com herbicidas.

#### 3.4.4 Cultivo da *Chlorella vulgaris* IPR-7117 com PSP20 e Herbicida Jaguar®

A Figura 20 apresenta as concentrações celulares para os cultivos feitos com a *Chlorella vulgaris* IPR-7117 em meio PSP20 acrescido de Jaguar® nas concentrações de 60, 600 e 6000  $\mu\text{g.L}^{-1}$ .

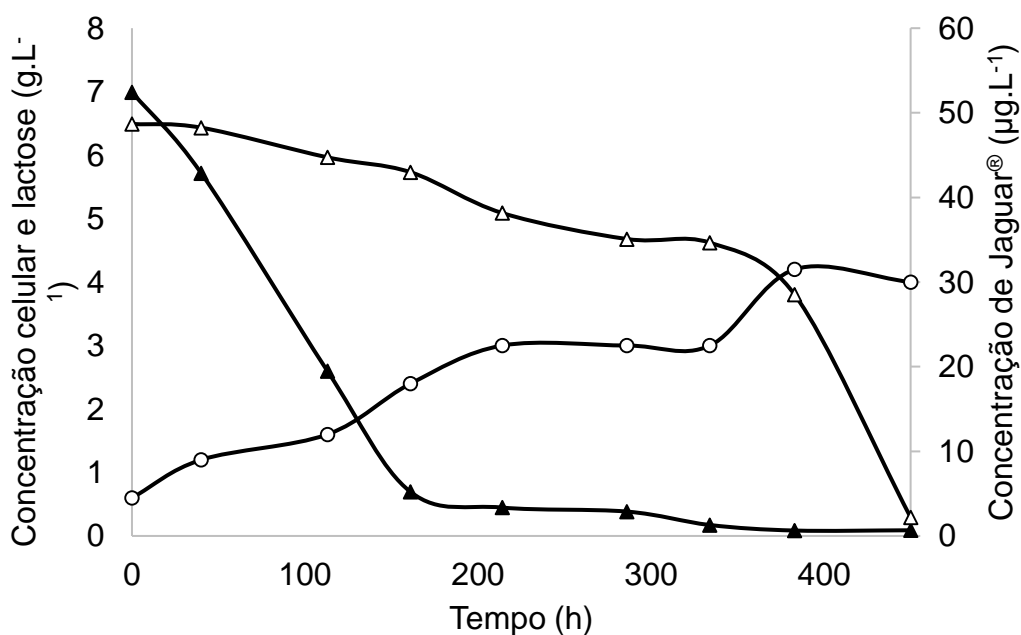
**Figura 100-** Cultivos da *C. vulgaris* IPR-7117 com PSP20 e Jaguar® nas concentrações de ● 60  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ; ■ 600  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ; ▲ 6000  $\mu\text{g.L}^{-1}$



A maior contagem celular foi obtida no cultivo adicionado de 600  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , chegando a  $1,64 \times 10^8$  células. $\text{mL}^{-1}$ . Arantes (2010), em cultivo com *Pseudokirchneriella supcapitata* com meio de cultivo sintético, segundo ABNT (2005), adicionado de glifosato ( $11.8000 \mu\text{g.L}^{-1}$ ), a contagem celular chegou a  $4,29 \times 10^6$  células. $\text{mL}^{-1}$ . Martínez-Ruiz e Martínez-Jerónimo (2018b), supuseram a *Ankistrodesmus falcatus* ao 2,4-D em concentrações de 200.000 e 400.000  $\mu\text{g.L}^{-1}$  e obtiveram  $5,5 \times 10^5$  células. $\text{mL}^{-1}$ , após 96 horas de cultivo.

As Figuras 21, 22 e 23 apresentam a concentração celular, de lactose ( $\text{g.L}^{-1}$ ) e de Jaguar ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) para os cultivos nas diferentes concentrações de Jaguar® (60, 600 e 6000  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) e controle SH.

**Figura 11 - Concentração de células (○), lactose (▲) e Jaguar® (Δ) para o cultivo da *C. vulgaris* IPR-7117 com PSP20 e Jaguar® na concentração inicial de 60  $\mu\text{g.L}^{-1}$**



**Figura 12 - Concentração de células (○), lactose (▲) e Jaguar® (Δ) para o cultivo da**



*C. vulgaris* IPR-7117 com PSP20 e Jaguar® na concentração inicial de 600  $\mu\text{g.L}^{-1}$

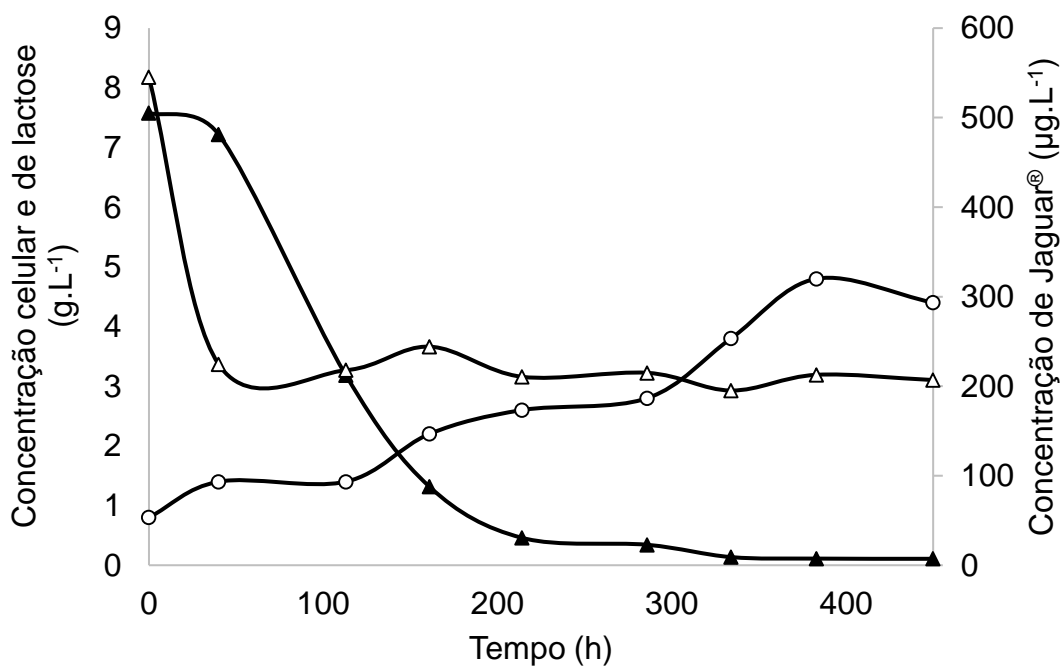
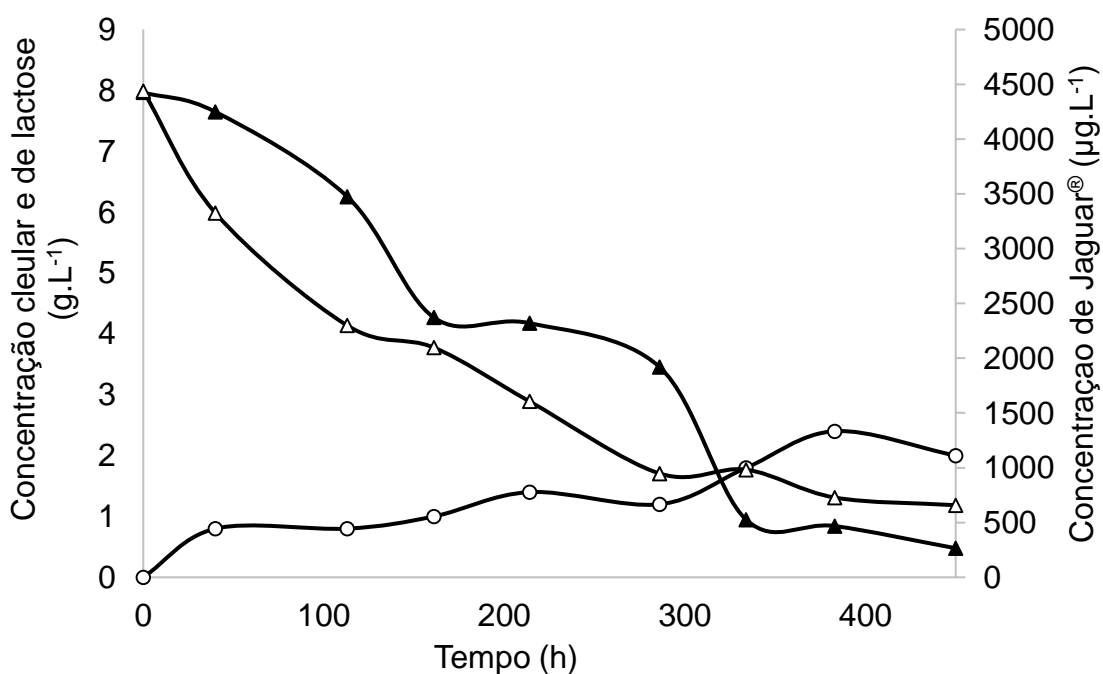


Figura 133 - Concentração de células (○), lactose (▲) e Jaguar® (Δ) para o cultivo da *C. vulgaris* IPR-7117 com PSP20 e Jaguar® na concentração inicial de 6000  $\mu\text{g.L}^{-1}$



Observando as Figuras 21 a 23, nota-se que a concentração de lactose atinge valores próximos a zero, sendo convertido em sua grande parte, em biomassa. A

maior concentração celular de  $4,8 \text{ g.L}^{-1}$  foi obtida em meio contendo  $600 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ , de Jaguar<sup>®</sup>, verificando-se que a microalga mostrou-se resistente ao herbicida. Pelo estudo de Martínez-Ruiz e Martínez-Jerónimo, (2018a), a microalga *Ankistrodesmus falcatus* se mostrou tolerante ao 2,4-D até  $600 \text{ mg.L}^{-1}$ .

Contraditoriamente, a microalga exposta a  $60 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$  de Jaguar<sup>®</sup> resultou em concentração celular inferior ao cultivo exposto a  $600 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ . Os danos que os herbicidas podem provocar aos organismos não-alvo são difíceis de analisar, visto que, ocorrem interações indesejáveis (SMYTHERS et al., 2019). Zhao et al., (2017) relatou em seu estudo, a toxicidade individual e combinada de alguns herbicidas na microalga *Selenastrum capricornutum*. Os resultados mostraram um aumento da toxicidade causada pela combinação dos herbicidas, contudo, não se tem explicação exata para o fato.

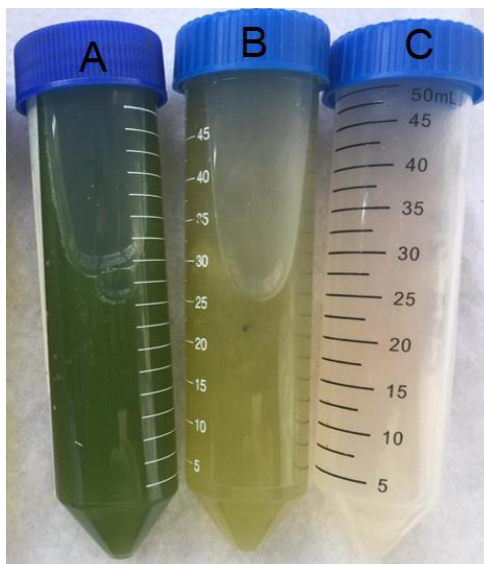
Comparando-se o crescimento Controle SH (Figura 15), pode-se ver que a concentração celular foi maior ( $5,2 \text{ g.L}^{-1}$ ) do que nos cultivos com Jaguar<sup>®</sup>, onde a máxima foi para Jaguar<sup>®</sup>, com  $4,4 \text{ g.L}^{-1}$ . A sensibilidade celular pode ser influenciada pelo estado fisiológico da microalga e este, depende do crescimento (MACHADO; SOARES, 2019).

Saygideger & Okkay (2008) avaliaram o efeito do crescimento das microalgas *Chlorella vulgaris* e *Spirulina platensis* na presença do 2,4-D nas concentrações  $9 \times 10^{-5}$ ,  $9 \times 10^{-4}$ ,  $9 \times 10^{-3}$  e  $9 \times 10^{-2}$  mM. Os autores verificaram que houve aumento do número de células nas concentrações de  $9 \times 10^{-5}$  e  $9 \times 10^{-4}$  mM do herbicida, respectivamente para *Chlorella vulgaris* e *Spirulina platensis*). Os autores relataram que altas doses de 2,4-D podem ter efeito inibitório sobre *C. vulgaris*, contudo, em baixas dosagens, as microalgas podem ser bioindicadores de ambientes aquáticos.

Nos cultivos com os herbicidas, também verificou-se alterações na cor das células. Shing et al., (2018), quantificaram o teor de clorofila em cultivos na presença de metais e herbicidas e verificaram alterações no conteúdo do pigmento. As mudanças de coloração podem estar associadas com reações bioquímicas desencadeadas pelos herbicidas e seus compostos (SHING et al., 2018). Assim, as algas podem ser vistas como potenciais bioindicadores na detecção de metais e pesticidas. No estudo feito por Saygideger & Okkay (2008), com *Chlorella vulgaris*, o teor de clorofila foi maior ( $441,9 \text{ mg.L}^{-1}$ ) no cultivo com  $9 \times 10^{-4}$  mM de 2,4-D, em comparação ao controle (0 mM), resultando em  $336,4 \text{ mg.L}^{-1}$ . A Figura 24 apresenta amostras dos cultivos destacando as diferentes colorações das células de *C. vulgaris*

IPR-7117 expostas às diferentes concentrações do Jaguar®.

Figura 14- Amostras dos cultivos da *C. vulgaris* IPR-7117 com PSP20 e Jaguar® 600 µg.L-1(a), 60 µg.L-1(b) e 6000 µg.L-1(c).



A Tabela 9 apresenta os resultados de pH, conteúdo de lipídeos e os parâmetros cinéticos para os cultivos adicionados das três concentrações avaliadas de Jaguar®.

Tabela 9- Parâmetros cinéticos, pH e teor de lipídeos dos cultivos da *C. vulgaris* IPR-7117 adicionada de Jaguar® em 400 horas de cultivo.

| Parâmetro  | Concentração de Jaguar® (µg.L <sup>-1</sup> ) |       |       |      |
|--|---|-------|-------|------|
|  | 0   | 60    | 600   | 6000 |
| pH   | 7,2   | 4,4   | 4,2   | 4,3  |
| Lipídeos (%)   | 27,98   | 15,47 | 13,30 | -    |
| Y <sub>P/S</sub>                                     | 0,12  | 0,08  | 0,06  | -    |
| Y <sub>X/S</sub>                                     | 0,44  | 0,49  | 0,48  | 0,27 |
| Q <sub>P</sub> (g.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> ) | 0,07  | 0,03  | 0,03  | -    |
| r <sub>x</sub> (g.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> ) | 0,26  | 0,18  | 0,19  | 0,11 |
| r <sub>s</sub> (g.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> ) | 0,59  | 0,37  | 0,40  | 0,40 |
| µ <sub>máx</sub> (d <sup>-1</sup> )                  | 0,19  | 0,10  | 0,09  | -    |
| t <sub>g</sub> (d)                                   | 3,69  | 6,90  | 7,67  | -    |

O pH diminuiu ao final das 400 h para todos os cultivos. Segundo Esteves (1988), em uma cultura com pH ácido, a disponibilidade de CO<sub>2</sub> aumenta, visto que,

essa fonte de carbono é usada pelas algas. Em estudo feito por Mayo e Noike (1994), o crescimento da *C. vulgaris* foi maior na faixa de pH de 5,5 a 8,0. O pH pode ser alto quando há consumo de formas inorgânicas de carbono, pois os íons hidroxila são levados para o exterior celular (LOPES, 2007).

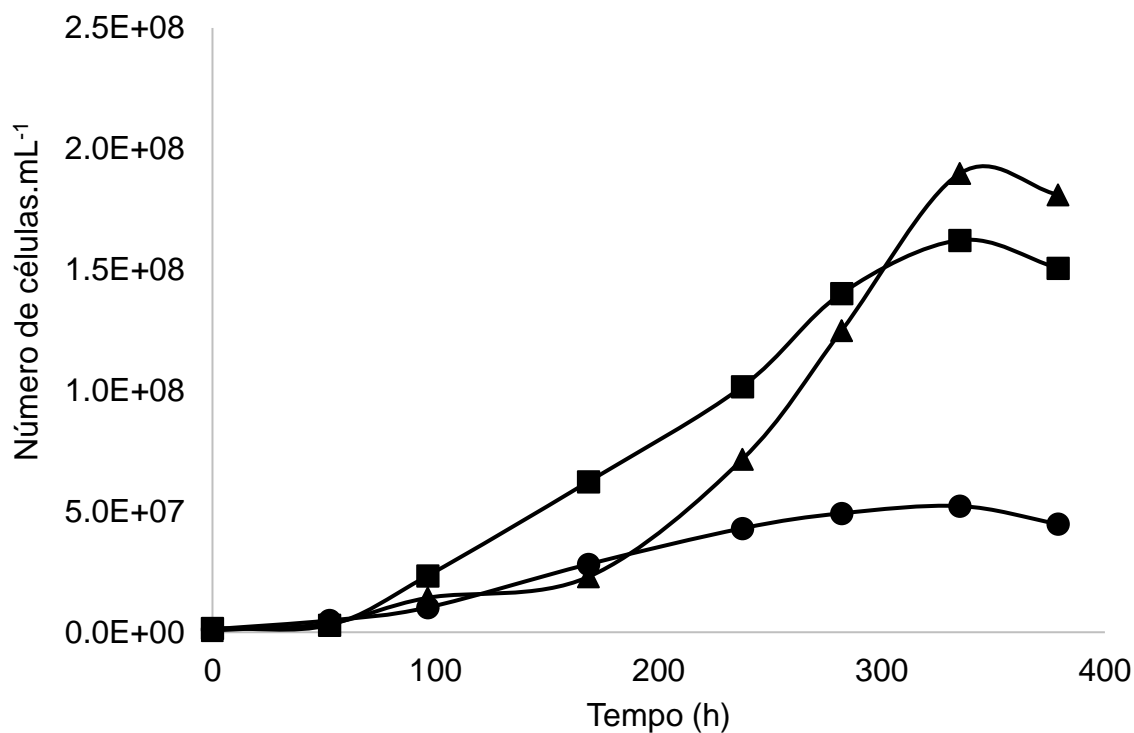
Os lipídeos foram quantificados para os cultivos adicionados de 60 e 600  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , resultando em valores 13,6 % inferiores ao cultivo controle, sem a presença de herbicidas. No estudo feito por Smythers et al., (2019), com *C. vulgaris* exposta a uma concentração de 0,08 % de Poast®, verificou-se o acúmulo de lipídeos 28% inferior nas primeiras 12 horas de cultivo, comparado ao controle.

Comparando os valores de máximas velocidades específicas de crescimento e tempo de geração, nota-se que os cultivos com os herbicidas resultaram em tempo de geração maiores (7,67 dias, comparado a 3,69 dias no cultivo sem herbicida) e consequentemente, máximas velocidades específicas de crescimento inferiores. Para o cultivo de melhor desempenho em crescimento microbiano com o 600  $\mu\text{g.L}^{-1}$  de Jaguar® o tempo de geração é de 7,67 dias, enquanto que o cultivo com o PSP20, é 3,69 dias, representando metade do tempo para duplicação celular.

#### 3.4.5 Cultivo da *Chlorella vulgaris* IPR-7117 com PSP20 e herbicida Trueno®

A Figura 25 apresenta as concentrações celulares para os cultivos feitos com a *Chlorella vulgaris* IPR-7117 em meio PSP20 acrescido de Trueno® nas concentrações de 60, 600 e 6000  $\mu\text{g.L}^{-1}$ .

Figura 155 - Cultivos da *C. vulgaris* IPR-7117 com PSP20 e Trueno® nas concentrações de ▲ 60 µg.L<sup>-1</sup>; ■ 600 µg.L<sup>-1</sup>; ● 6000 µg.L<sup>-1</sup>



O cultivo adicionado de 600 µg.L<sup>-1</sup> de Trueno® apresentou maior concentração celular até 300 h de cultivo, chegando a 1,62x10<sup>8</sup> células.mL<sup>-1</sup>, na fase estacionária. A maior concentração celular (1,90x10<sup>8</sup> células.mL<sup>-1</sup>) foi obtida no cultivo adicionado da menor concentração de Trueno® (60 µg.L<sup>-1</sup>) em 379h.

As Figuras 26 a 28 mostram as concentrações celulares, de lactose e de Trueno® ao longo das 379 h de cultivo para as três concentrações usadas de herbicida.

Figura 16- Concentração de células ( $\circ$ ), lactose ( $\blacktriangle$ ) e Trueno® ( $\Delta$ ) para o cultivo da *C. vulgaris* IPR-7117 com PSP20 e Trueno® na concentração inicial de  $60 \mu\text{g.L}^{-1}$

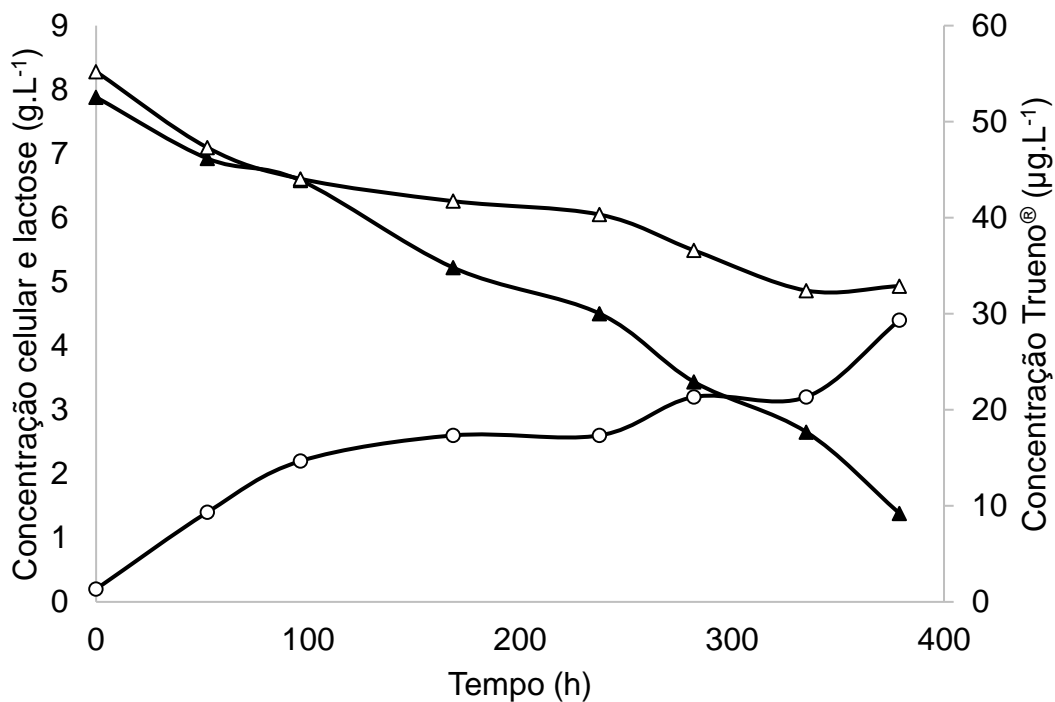
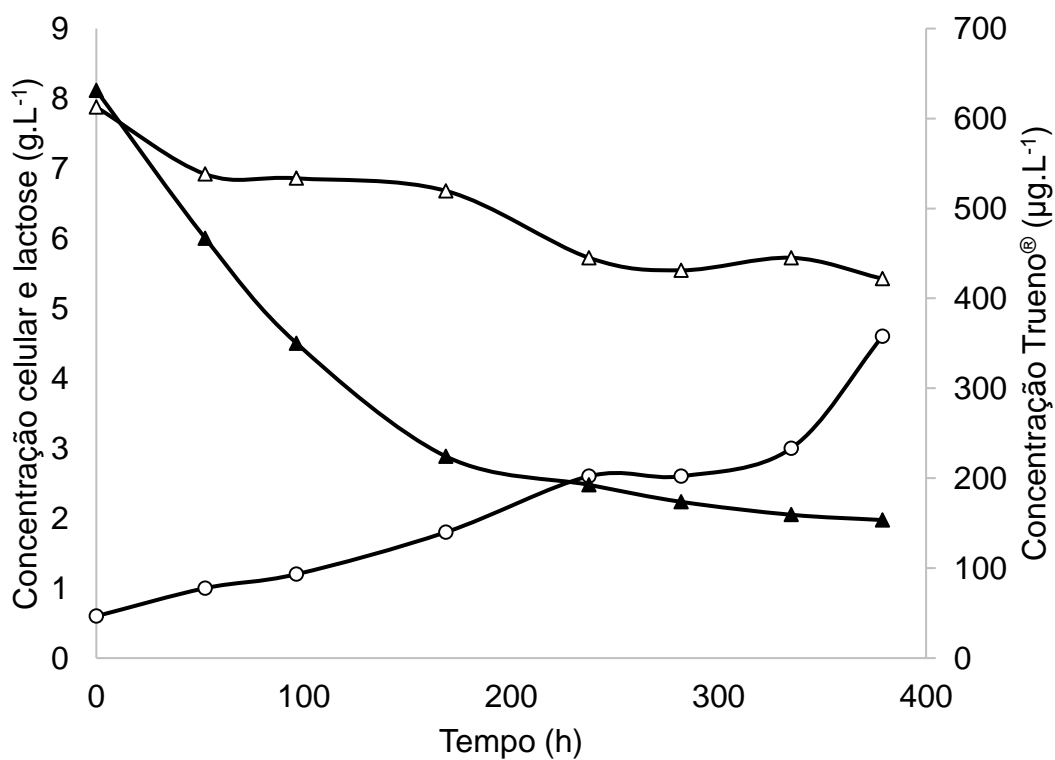
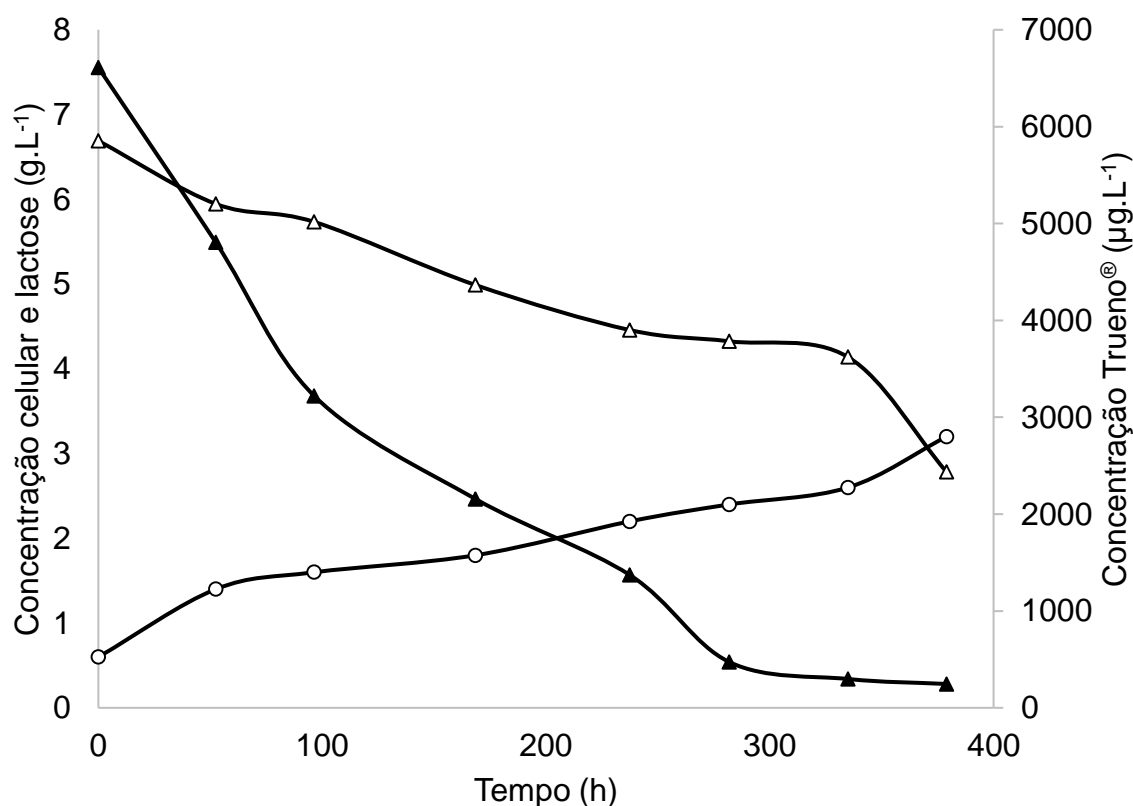


Figura 177 - Concentração de células ( $\circ$ ), lactose ( $\blacktriangle$ ) e Trueno® ( $\Delta$ ) para o cultivo da *C. vulgaris* IPR-7117 com PSP20 e Trueno® na concentração inicial de  $600 \mu\text{g.L}^{-1}$



**Figura 18 - Concentração de células (○), lactose (▲) e Trueno® (Δ) para o cultivo da *C. vulgaris* IPR-7117 com PSP20 e Trueno® na concentração inicial de 6000  $\mu\text{g.L}^{-1}$**



A partir das Figuras 26 a 28, nota-se que as maiores concentrações de biomassa obtidas foram 4,4; 4,6 e 3,2 g.L<sup>-1</sup> para as concentrações de herbicidas de 60, 600 e 6000  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , respectivamente.

Comparando a concentração celular da *C. vulgaris* em células.mL<sup>-1</sup> e em g.L<sup>-1</sup>, verifica-se que apesar da maior concentração em g.L<sup>-1</sup> ter ocorrido em meio com 600  $\mu\text{g.L}^{-1}$  de Trueno®, o maior número de células.mL<sup>-1</sup> foi obtido na concentração mais baixa do herbicida.

O consumo de lactose nas três concentrações de Trueno® foi similar. No cultivo com a concentração mais alta de herbicida (6000  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ), a lactose foi quase totalmente consumida, chegando a 0,28 g.L<sup>-1</sup>. Para as concentrações de herbicida durante as 379 horas de cultivo teve-se decréscimo maior para as concentrações de 60 e 6000  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , enquanto que para a concentração de 600  $\mu\text{g.L}^{-1}$  houve um decréscimo menor na concentração de herbicida, porém não afetou o crescimento celular, visto sua produção em biomassa.

Ouada et al., (2019), avaliou a remoção de Diclofenaco (DCF) pelas microalgas *Picocystis* sp. e *Graesiella* sp. A remoção de DCF pela *Picocystis* foi de

73, 43 e 25% usando 25, 50 e 100 mg.L<sup>-1</sup> de herbicida, respectivamente. A remoção para o controle SM não excedeu 8%, o que significa que a remoção de DCF ocorreu principalmente pela remoção das microalgas por biotransformação ou biodegradação.

No presente estudo, para os dois herbicidas estudados Jaguar® e Trueno®, a remoção para o controle SM chegou ao final do cultivo com 14,03 e 11,86 µg.L<sup>-1</sup>, respectivamente.

A Tabela 10 apresenta os resultados de pH, conteúdo de lipídeos e os parâmetros cinéticos para os cultivos nas concentrações de 60, 600 e 6.000 µg.L<sup>-1</sup> de Trueno® em 380 horas de cultivo.

**Tabela 10- Parâmetros cinéticos, pH e teor de lipídeos dos cultivos da *C. vulgaris* IPR-7117 adicionada de Trueno® em 379 horas de cultivo.**

| Parâmetro  | Concentração de Trueno® (µg.L <sup>-1</sup> ) |      |      |       |
|--|---|------|------|-------|
|  | 0   | 60   | 600  | 6.000 |
| pH   | 7,2   | 4,5  | 8,1  | 4,7   |
| Lipídeos (%)   | 27,98   | 11,8 | -    | -     |
| Y <sub>P/S</sub>                                     | 0,12  | 0,08 | -    | -     |
| Y <sub>X/S</sub>                                     | 0,44  | 0,65 | 0,65 | 0,36  |
| Q <sub>P</sub> (g.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> ) | 0,07  | 0,03 | -    | -     |
| r <sub>x</sub> (g.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> ) | 0,26  | 0,27 | 0,25 | 0,16  |
| r <sub>s</sub> (g.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> ) | 0,59  | 0,41 | 0,39 | 0,46  |
| µ <sub>máx</sub> (d <sup>-1</sup> )                  | 0,19  | 0,20 | 0,13 | 0,11  |
| t <sub>g</sub> (d)                                   | 3,69  | 3,54 | 5,37 | 6,54  |

A concentração lipídica nos cultivos com Trueno® foi inferior aos obtidos nos cultivos com Jaguar® e nos cultivos sem herbicidas. Em contrapartida, verifica-se que os tempos de geração nos cultivos com Trueno® foram inferiores aos do Jaguar®. Assim, apesar da necessidade de estudos metabólicos, pode-se constatar que o Jaguar® afeta mais o crescimento celular do que a produção de lipídeos, ao passo que o Trueno® possui maior efeito na biossíntese de lipídeos.

Os estudos na literatura com os efeitos de herbicida sobre organismos aquáticos, mostram efeitos variados. Peterson et al., (1994) com as microalgas *M.*



*aeruginosa*, *Oscillatoria* sp., *Pseudoanabaena* sp., *Anabaena inaequalis* e *Aphanizomenon flos-aquae*, além de outros organismos aquáticos, com concentração de glifosato de 2,848 mg.L<sup>-1</sup>, observaram efeitos inibitórios significativos de crescimento, fotossíntese e clorofila-a. Forlani et al., (2008), com as microalgas: *M. aeruginosa*, *Anabaena* sp., *Arthrospira fusiformis*, *Leptolyngbya boryana*, *Nostoc punctiforme* e *Spirulina platensis*, com concentrações de glifosato variando de 1,69 mg.L<sup>-1</sup> a 1,69 g.L<sup>-1</sup>. As algas mostraram tolerância nas concentrações de ordem mg.L<sup>-1</sup>.

### 3.4.6 Ecotoxicidade dos Herbicidas Usando *Artemia salina*

Na Tabela 11 constam os resultados dos ensaios de ecotoxicidade dos cultivos contendo os herbicidas usando *Artemia salina*.

**Tabela 11- Mortalidade de *Artemia salina* em função das concentrações de Jaguar® e Trueno®.**

| Meio de cultivo (%) | Mortalidade (%)               |      |       |                               |       |       |
|---------------------|-------------------------------|------|-------|-------------------------------|-------|-------|
|                     | Jaguar® (µg.L <sup>-1</sup> ) |      |       | Trueno® (µg.L <sup>-1</sup> ) |       |       |
|                     | 60                            | 600  | 6000  | 60                            | 600   | 6000  |
| Controle            | 0                             | 0    | 0     | 0                             | 0     | 0     |
| 15                  | 26,7                          | 20,0 | 93,3  | 30,0                          | 66,7  | 90,0  |
| 35                  | 36,7                          | 26,7 | 100,0 | 36,7                          | 76,6  | 93,3  |
| 50                  | 43,3                          | 30,0 | 100,0 | 43,3                          | 83,3  | 96,7  |
| 75                  | 53,3                          | 43,3 | 100,0 | 53,3                          | 96,7  | 100,0 |
| 100                 | 66,7                          | 60,0 | 100,0 | 70,0                          | 100,0 | 100,0 |

Nota-se que as maiores mortalidades encontradas para o Jaguar® e Trueno® foram na concentração de 6000 µg.L<sup>-1</sup>, independente da concentração que estava o meio de cultivo.

Regressões lineares foram feitas para calcular o LC<sub>50</sub>, utilizando a concentração de 50% e esses resultados são apresentados na Tabela 12. Para as concentrações de Jaguar® 6000 µg.L<sup>-1</sup>, Trueno® 600 e 6000 µg.L<sup>-1</sup> devido à alta mortalidade, os valores obtidos para LC<sub>50</sub> foram negativos e os R<sup>2</sup> ficaram muito

abaixo do esperado.

**Tabela 12- Concentração letal (LC<sub>50</sub>) para os meios de cultivo contendo os herbicidas Jaguar® e Trueno®.**

| Herbicida - concentração        | LC <sub>50</sub> (%) |
|---------------------------------|----------------------|
| Jaguar - 60 µg.L <sup>-1</sup>  | 65,00                |
| Jaguar - 600 µg.L <sup>-1</sup> | 84,09                |
| Trueno - 60 µg.L <sup>-1</sup>  | 63,34                |

Conforme a ficha técnica de informações sobre o Jaguar® (Dow Agrosiences, 2014), a LC<sub>50</sub>) para algas após 96 horas, é inferior a 100 mg.L<sup>-1</sup> e para *Daphnia* é inferior a 100 mg.L<sup>-1</sup> após 48 horas. Para o Trueno®, concentração de efeito (CE<sub>50</sub>) para algas após 96 horas é inferior a 3,6 mg.L<sup>-1</sup>. A LC<sub>50</sub> se diferencia da CE<sub>50</sub>, pois a primeira se refere a concentração que causa mortalidade, enquanto que a CE<sub>50</sub> é a concentração efetiva média, ou seja, que causa um efeito agudo a 50% dos organismos expostos.

Com esse teste de toxicidade aguda em *Artemia salina*, nota-se que a relação concentração de meio de cultivo (efluente) com a mortalidade nem sempre é proporcional. As porcentagens letais obtidas foram elevadas em altas concentrações de meio de cultivo, indicando que quanto mais meio de cultivo em contato com a *Artemia salina*, mais herbicidas terá no mesmo volume total.

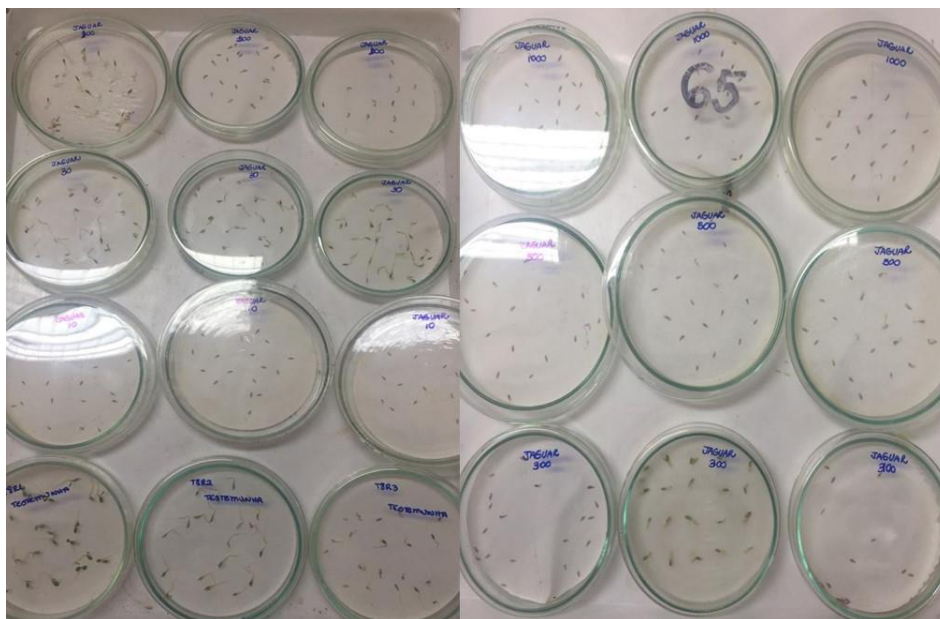
Martínez-Ruiz & Martínez-Jerónimo (2018), avaliaram os efeitos tóxicos do 2,4-D na microalga *Ankistrodesmus falcatus* e observaram a tolerância da mesma em elevadas concentrações do herbicida (até 1.353,8 mg.L<sup>-1</sup>). Já Machado e Soares (2019), verificaram que a alga de água doce *Pseudokirchneriella subcapitata* apresenta alta sensibilidade ao metolacoloro, sendo, portanto, indicada para testes de ecotoxicidade de águas doces.

Silva et al., (2009), avaliou a eficiência do tratamento de águas residuais gerados no próprio laboratório a partir de testes de ecotoxicidade usando *C. vulgaris*. Para águas residuais de análise de DQO (contendo cromo (VI), mercúrio e prata), foram eficientes e reduziu a ecotoxicidade. Obteve-se uma CE<sub>50</sub> de 1,5%, o que indica ainda um alto nível de ecotoxicidade. Neste estudo, os testes de ecotoxicidade podem ser considerados úteis ferramentas no tratamento dos efluentes e gerenciamento as águas residuais perigosas.

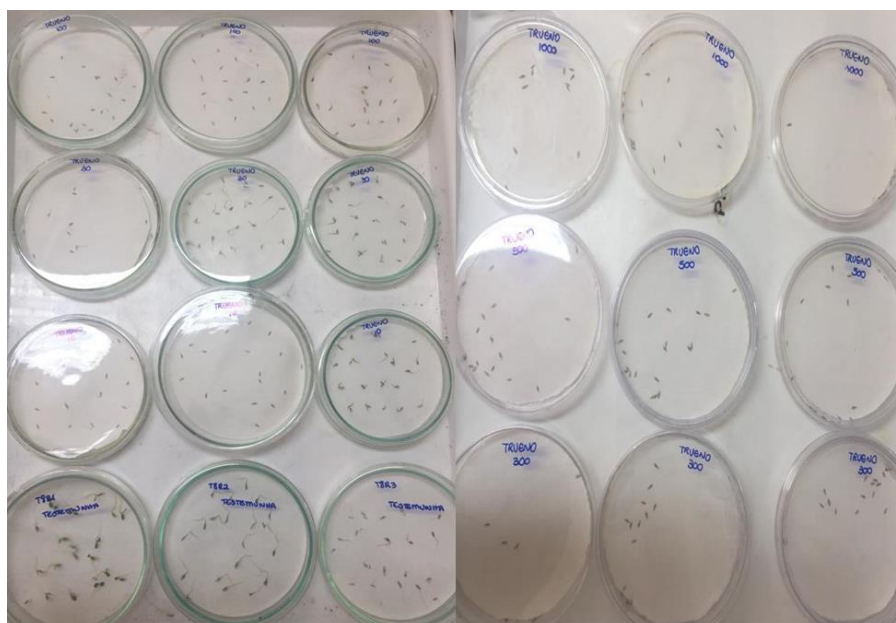
### 3.4.7 Ecotoxicidade dos Herbicidas Usando alface (*Lactuca sativa*)

A Figura 29 e 30 apresentam as placas com as sementes de alface germinadas e não germinadas para o Jaguar® e Trueno® respectivamente.

**Figura 2919** - Placas com sementes de alface germinadas e não germinadas na presença de Jaguar®

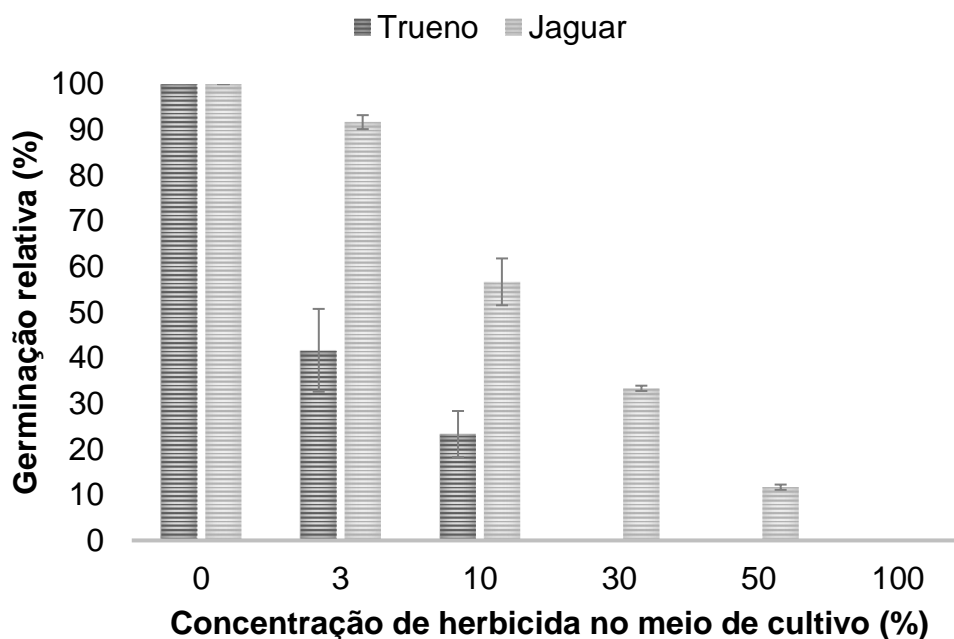


**Figura 200** - Placas com sementes de alface germinadas e não germinadas na presença de Trueno®



A Figura 31 apresenta os resultados de germinação relativa das sementes de alface frente aos meios de cultivo contendo Jaguar® e Trueno® na maior concentração destes ( $6000 \mu\text{g.L}^{-1}$ ), conforme diluições de 3, 10, 30, 50 e 100%.

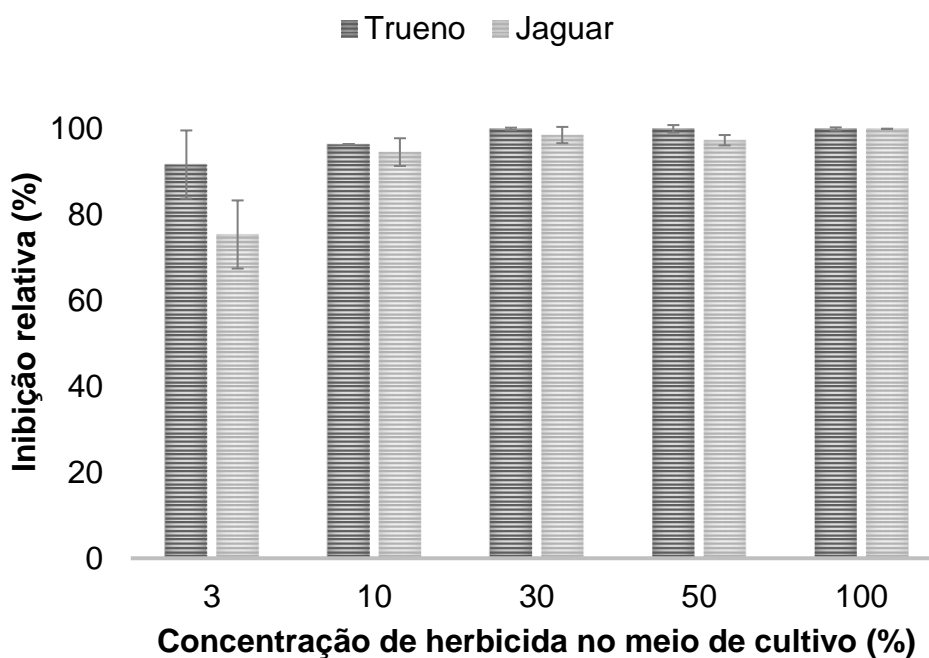
**Figura 21 - Germinação relativa em função das concentrações de meio de cultivo contendo Jaguar® e Trueno®**



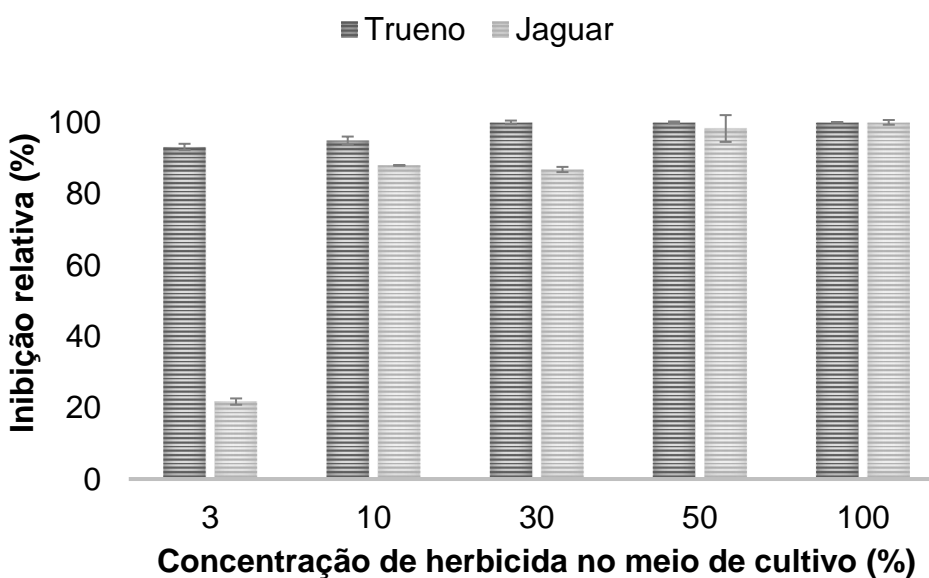
Nota-se que no Trueno® houve maior influência na germinação das sementes do que o Jaguar®. Ocorreu um decréscimo no percentual de germinação de acordo com o aumento da concentração do meio de cultivo, chegando a zero a partir de 30% de meio, pois quanto mais efluente, mais herbicidas estavam presentes no meio. O Jaguar® também afetou a germinação das sementes. Porém a germinação ocorreu mesmo em altas concentrações de meio (até 50%).

Em estudos de ecotoxicidade usando *Lactuca sativa*, pode-se verificar quais meios são potencialmente tóxicos e quais a espécie consegue se desenvolver parcialmente. Pode-se verificar também os efeitos letais (inibição por germinação) e sub-letais (inibição por desenvolvimento de raízes e radículas) (PALÁCIO et al., 2012). Assim, para as concentrações de meio de cultivo em que houve germinação, foi calculado o o percentual de inibição do desenvolvimento das raízes e radículas. Os resultados para a raiz e radículas são apresentados na Figura 32 e 33, respectivamente.

**Figura 22 - Inibição relativa (%) do crescimento da radícula relativo ao controle negativo em função das concentrações de meio de cultivo contendo Jaguar® e Trueno®**



**Figura 23 - Inibição relativa (%) do crescimento da raiz relativo ao controle negativo em função das concentrações de meio de cultivo contendo Jaguar® e Trueno®**



As plântulas de alface apresentaram menor inibição de crescimento para as radículas e raízes nas menores concentrações de meio de cultivo, em função da menor concentração de substâncias tóxicas.

Campos (2009) realizou estudo de ecotoxicidade de atrazina em

cianobácteria *Microcystis novacekii*. O autor obteve  $EC_{50}$  de  $4.202,6 \mu\text{g.L}^{-1}$  em 96 h, conforme concentrações testes, que seriam as diluições analisadas e o quanto obteve de inibição (%) para cada uma. Para a atrazina a  $EC_{50}$  foi de  $4,2 \text{ mg.L}^{-1}$ .

Silveira et al., (2017) avaliou a ecotoxicidade em diferentes processos de tratamento como águas residuais brutas e tratadas (concentração de  $\text{NH}_3$ , P total e DBO de 68,8; 7,71 e  $526,4 \text{ mg.L}^{-1}$ ), diluídas, em 25, 50 e 75%. Nenhuma das amostras afetou a germinação e o alongamento radicular das sementes de *Lactuca sativa*, indicando ausência de toxicidade desses efluentes nas concentrações estudadas para a alface.

### 3.5 CONCLUSÃO

Com os resultados desse estudo, após a seleção da cepa e o cultivo da *C. vulgaris* IPR-7117 em diferentes fontes de carbono, verificou-se a capacidade da cepa em assimilar lactose como substrato e que os minerais presentes no permeado de soro auxiliaram no crescimento celular. Quanto aos cultivos com os herbicidas Jaguar® e Trueno®, a alga diminuiu sua concentração celular e o conteúdo lipídico, houve alteração dos parâmetros cinéticos e morfológicos (alteração na cor).

Para os testes de ecotoxicidade, obteve-se altas taxas de mortalidade para ambos os herbicidas avaliados, tanto com a *Artemia salina* quanto com a *Lactuca sativa*. Isso, indica a toxicidade desses agroquímicos e a importância dos testes de ecotoxicidade na avaliação dos riscos de contaminantes, como os herbicidas.

Destaca-se a importância do aproveitamento de subprodutos agroindustriais e industriais, como nutrientes para as microalgas, podendo gerar produtos de alto valor agregado.

## 4 AVALIAÇÃO DE ECOTOXICIDADE DE HERBICIDAS EM MICROALGAS: UMA VISÃO GERAL

### 4.1 INTRODUÇÃO

Os agroquímicos mais do que duplicam a produção de alimentos no último século. A demanda atual para aumentar a produção de alimentos (como resultado do crescimento da população mundial) aumenta o uso massivo de fertilizantes e pesticidas (CARVALHO, 2017). O uso de pesticidas também conhecidos como agrotóxicos, agroquímicos ou produtos fitossanitários aumenta junto com a produção agrícola (VASCONCELOS, 2018). A expansão da monocultura gera condições para propagar pragas e doenças.

Uma alta porcentagem os herbicidas aplicados nos campos de cultivo entram nos ecossistemas aquáticos de água doce, contaminando o meio ambiente e causando efeitos tóxicos que potencialmente prejudicam os organismos aquáticos (BALTAZAR et al., 2014). Conseqüentemente, a avaliação de segurança e a avaliação ecotoxicológica de tais produtos químicos têm sido o foco da pesquisa multidisciplinar global (MACHADO; SOARES, 2019).

A determinação de influências tóxicas de herbicidas em organismos aquáticos não-alvo é crucial para avaliar a contaminação ambiental (ŠPOLJARIĆ MARONIĆ et al., 2018). Pouco se sabe sobre a sensibilidade das microalgas a produtos fitossanitários. Em ambientes aquáticos, a cadeia alimentar aquática é baseada em microalgas. Além disso, as microalgas apresentam alta diversidade e são sensíveis a mudanças ambientais, aprimorando seu uso em estudos de avaliação de risco ambiental para avaliar contaminantes tóxicos (EBENEZER; KI, 2013a).

Bioensaios rápidos foram desenvolvidos para superar as restrições associadas aos métodos analíticos. Os bioensaios quantificam mudanças comportamentais ou fisiológicas manifestadas por organismos devido a distúrbios metabólicos induzidos por substâncias tóxicas. Esses ensaios geralmente usam células eucarióticas e procarióticas (bactérias), além de organismos multicelulares, como algas, plantas, crustáceos, mexilhões e peixes, (CHEN et al., 2017; IQBAL, 2016; IQBAL et al., 2017).

As microalgas são particularmente vulneráveis a herbicidas fungidos de impactos agrícolas (LORENTE et al., 2015). A resposta dos tóxicos nas microalgas é crucial para esses organismos e para os outros organismos da cadeia alimentar. As

microalgas estão sendo cada vez mais utilizadas em bioensaios de toxicidade para o gerenciamento ambiental de descargas químicas (MA et al., 2002). Compostos tóxicos resultaram em diferentes respostas e reações em espécies de microalgas. Portanto, a resposta diferencial de várias espécies de microalgas a diferentes herbicidas é muito importante, bem como a toxicidade comparativa de herbicidas em relação a diferentes organismos.

Devido à importância que vem sendo dada aos possíveis impactos causados pelos agrotóxicos na biodiversidade, esta pesquisa propõe uma revisão sistemática de estudos de alto impacto nos testes de ecotoxicidade de herbicidas que utilizam microalgas, para explorar as tendências desses dados. A análise também se concentra na rede de cooperação entre palavras-chave co-ocorrentes, países e coautoria, analisando publicações de 2010 a 2019. Este estudo é inédito em termos de avaliação das principais tendências observadas no tema. Além disso, comenta o uso potencial e existente de microalgas em testes de toxicidade de agroquímicos e mostra várias características identificadas em estudos de alto impacto existentes.

Uma revisão sistemática da literatura é um trabalho extenso. O *Methodi Ordinatio* utilizado neste estudo fornece uma lista ordenada que ajuda os pesquisadores a selecionar os artigos mais relevantes, de acordo com seus critérios. Com os presentes resultados, os padrões de pesquisa quantificados, domínios de conhecimento, tendências emergentes e estrutura intelectual nesse campo podem ser investigados, o que é útil para obter informações mais precisas e completas e oferecer *insights* sobre tópicos de pesquisa e avaliação de tendências sob diferentes perspectivas.

## 4.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 4.2.1 Mercado Agrícola Atual

O aumento da população mundial impulsionou o desenvolvimento agrícola, com a necessidade de produção de alimentos. Esse avanço na agricultura foi possível com o uso de agroquímicos que permitiram duplicar a produção de alimentos. Hoje, a necessidade de aumentar ainda mais a produção de alimentos visto uma rápida e crescente população humana, mantém o uso de pesticidas e fertilizantes (ALEXANDRATOS; BRUINSMA, 2012; CARVALHO, 2017).



Estados Unidos da América, União Europeia, Brasil e China são os maiores produtores mundiais de produtos agrícolas e usuários de pesticidas (DONLEY, 2019). A colheita de grãos no Brasil aumentou de 149 milhões de toneladas (MT) em 2010 para 241,3 MT na safra 2018/2019, seu melhor resultado de todos os tempos (STAR, 2019). A previsão foi feita pela Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB). As quatro nações juntas tem os maiores valores de exportação de qualquer outro produtor agrícola mundial, e isso tem grande impacto econômico em manter alta produtividade (KEENAN et al., 2015). Segundo FAO (2015) uma em cada nove pessoas no mundo não tem comida suficiente para uma vida saudável e ativa. As classes mais pobres vivem ainda nos dias de hoje com problemas de insegurança alimentar, por não terem acesso aos alimentos necessários para uma boa alimentação. Os problemas com isso, tendem a serem ainda maiores nos próximos anos. Considera-se a expansão das cidades, restrições com uso da terra e aumento do crescimento populacional e do consumo que virão a dificultar ainda mais, o atendimento da demanda populacional quanto a alimentação (SAATH; FACHINELLO, 2018).

De acordo com a demanda populacional, as projeções realizadas indicam que o crescimento acontecerá de forma mais acelerada nos próximos anos, e, em consequência, a demanda por alimentos também aumentará. A ONU (2012) destaca que a população mundial chegará em 2024 a um número superior a 8 bilhões de pessoas e em 2050 será maior que 9,5 bilhões. Além disso, o aumento da população urbana no mundo e o crescimento da renda por pessoa deve aumentar a demanda por alimentos.

Por outro lado, as expansões das terras agrícolas tendem a ser restringidas para uso agropecuário. Segundo FAO (2013) as áreas disponíveis estão centradas em poucos países. Apenas, a América Latina e África-Subsaariana possuem terras maiores áreas para expansão (cerca de 90%). China e EUA não tem mais novos terrenos.

Com o aumento populacional e todas essas questões envolvidas, principalmente com o aumento irracional do uso de pesticidas e fertilizantes, as pesquisas mundiais se concentram na contaminação. Os impactos que esses produtos trazem aos solos, ecossistemas terrestres e aquáticos, efeitos tóxicos aos seres humanos e biota não humana preocupam (CARVALHO, 2017; VASCONCELOS, 2018).

#### 4.2.2 Uso de Agroquímicos

Agroquímicos significa o mesmo que defensivo agrícola, agrotóxico, pesticida, praguicida ou biocida. Todos os termos são utilizados, porém agroquímicos e defensivos agrícolas são mais usuais no setor industrial, e os demais por agricultores, pesquisadores e ecologistas (MARTINS, 2000).

O uso de agroquímicos é uma das peças principais na manutenção da produtividade e da rentabilidade do agronegócio (VELASCO; CAPANEMA, 2006). Devido a isso, sua produção mundial aumentou a uma taxa de cerca de 11% ao ano, de 0,2 milhão de toneladas na década de 1950 para mais de 5 milhões de toneladas em 2000 (FAO, 2017).

Os pesticidas, ou produtos químicos para proteção de culturas, incluem vários grupos de compostos, como organo-cloro, organofosfato, carbamato, piretróides, reguladores de crescimento, neonicotinóides e agora biopesticidas, que foram desenvolvidos um após o outro. Para todos os tipos de pesticidas as vendas subiram, porém os herbicidas foram os que mais se expandiram, seguidos pelos inseticidas e fungicidas (FAO, 2017). O aumento da venda e aplicação desses produtos cresceu junto com a colheita de grãos, que de 149 milhões de toneladas em 2010 passou para 238 milhões em 2017. Outro fato é a expansão da monocultura, que modifica o equilíbrio do ecossistema e afeta a biodiversidade, aumentando número de doenças e pragas (VASCONCELOS, 2018).

Embora os pesticidas e agroquímicos de modo geral, tem ajudado no aumento da produtividade, seu uso provoca preocupações com os problemas e danos provocados por eles. Contaminam solos, águas subterrâneas e são perigo para os trabalhadores que lidam com esses produtos, além das comunidades próximas as plantações (BALTAZAR et al., 2014). Segundo relatório da ONU (ONU, 2017) estimou-se que cerca de 200.000 pessoas do mundo todo morrem a cada ano por intoxicação

aguda por pesticidas, principalmente pessoas envolvidas diretamente com o trabalho ou de comunidade próximas a áreas plantadas.

#### 4.2.3 Estudos de Ecotoxicidade Usando Microalgas

Na última década, um alto número de compostos orgânicos foi encontrado nos ecossistemas aquáticos, em parte devido à melhoria dos métodos analíticos para sua determinação, mas também devido ao aumento da frequência e das concentrações. Além disso, alguns deles são chamados de compostos de interesse emergente (CEC), principalmente devido ao fato de poderem causar danos em organismos não-alvo. O regulamento para essas substâncias leva em consideração sua ocorrência, destino ambiental e toxicidade (MACHADO; SOARES, 2019). A avaliação de segurança e ecotoxicológica de produtos químicos é foco de pesquisas multidisciplinar global.

Para avaliar a contaminação ambiental a determinação de influência de herbicidas em organismos aquáticos não-alvo é fundamental (ŠPOLJARIĆ MARONIĆ et al., 2018). Os testes de ecotoxicidade permitem avaliar a contaminação ambiental por diferentes fontes poluidoras, conseguindo determinar efeitos sinérgicos e antagônicos (ALVES, 2014; FRANCO et al., 2018). Os bioensaios quantificam as mudanças de comportamento e fisiologia manifestadas por organismos por distúrbios metabólicos que induzem as substâncias tóxicas (CHEN et al., 2017). Dentre os grupos de organismos usados nesses ensaios, tem-se: microalgas, microcrustáceos, peixes, bactérias, equinoides, poliquetas e oligoquetas, representando uma diversidade de ecossistemas (MAGALHÃES; FILHO, 2008). Não se tem muito conhecimento sobre a sensibilidade de microalgas em produtos fitossanitários, contudo, em ambientes aquáticos a cadeia alimentar é baseada nestes microrganismos (EBENEZER; KI, 2014). O equilíbrio e a função dos ecossistemas aquáticos são impactados pela diversidade e biomassa das microalgas, que têm papel fundamental na estabilização e equilíbrio dos ecossistemas (QIAN et al., 2010).

As microalgas são organismos frequentemente usados em estudos de ecotoxicidade por apresentarem: ampla distribuição geográfica, alta sensibilidade a alterações pequenas nas condições ambientais, pequena variabilidade genética, bom conhecimento dos nutrientes que são necessários, ciclo de vida curto, permitindo um rápido crescimento (COSTA et al., 2008). Além disso, são particularmente vulneráveis a herbicidas e não necessitam de áreas usadas na agricultura para o cultivo

(LORENTE et al., 2015).

A recuperação de efluentes com espécies metálicas através de algas apresenta como vantagens a redução do custo da operação e a alta eficiência na remoção dos contaminantes (VIDOTTI; ROLLEMBERG, 2004). A remoção acontece biologicamente, onde os microrganismos irão acumular nitrogênio e fósforo e transformar em substâncias de reservas que podem converter-se em produtos com valor comercial. Além disso, as microalgas conseguem assimilar os nutrientes solúveis em quantidades maiores do que as necessárias para se desenvolver. Dessa forma, além de serem capazes de absorver contaminantes, possuem o potencial de depurar águas residuais (DINIS; MONTEIRO; BOAVENTURA, 2004).

Uma das cepas mais aplicadas a esse tipo de tratamento é a *C. vulgaris*, tendo em vista de que são algas de fácil adaptação e preparo, sensibilidade a substâncias tóxicas e de baixo custo (SILVA et al., 2009). Monteiro e Fernandes (2014), utilizaram *C. vulgaris* resultante de biorremediação de águas ruças (extração de azeite), tendo como objetivo caracterização toxicológica. Constatou-se a diminuição da toxicidade do efluente e aumento na biomassa.

Martínez-Ruiz e Martínez-Jerónimo (2018) relataram efeitos tóxicos do herbicida 2,4-D na cianobactéria *Microcystis aeruginosa* e na microalga verde *Ankistrodesmus falcatus*. A alga verde tolerou altas concentrações de herbicida e a cianobactéria teve sensibilidade. O crescimento da população com herbicida inibido, ativou os mecanismos com macromoléculas e produziu pigmentos fotossintéticos. Em *A. falcatus*, o 2,4-D aumentou a presença de armazenamento lipídico e a parede celular e a membrana foram afetadas.

Machado e Soares (2019), avaliaram a toxicidade de metolaclopro usando alga *Pseudokirchneriella subcapitata* e *Dunaliella tertiolecta*. A *P. subcapitata* apresentou maior sensibilidade ao poluente, indicada como fundamental em avaliações de ecotoxicidade de águas doces.

Stone et al., (2019), investigou quatro espécies de microalga doce tropical (*Chlorella* sp. 12, *Monoraphidium arcuatum*, *Nannochlorops* sp. e *Pediastrum duplex*) num ensaio de toxicidade. Os herbicidas em estudo foram Atrazina e Imazapic, a fim de avaliar a sensibilidade do ensaio de toxicidade de múltiplas espécies. Este estudo foi o primeiro a desenvolver um teste de toxicidade multiespécies tropical de microalgas para aplicação em águas doces. Esta ferramenta mostra-se eficaz, podendo ser usada para gerar dados que irão auxiliar a tomada de decisão ambiental,

além de realizar avaliações de risco de contaminantes em ambientes de águas doce tropicais.

#### 4.2.4 *Methodi Ordinatio*

O aumento do número de publicações científicas e periódicos ao longo dos anos se deve a dois principais fatores: novas tecnologias que possibilitam pesquisas e formas de investigar fatos cientificamente, o que auxilia no surgimento de novos estudos; necessidade de especialização e construção de conhecimentos (BHUPATIRAJU et al., 2012). Hoje, a muitas formas de encontrar informações, sobre os mais diversos assuntos, e por isso, é tarefa do estudante e pesquisador selecionar fontes e informações relevantes da pesquisa (SMALL; BOYACK; KLAVANS, 2014).

A metodologia *Methodi Ordinatio* desenvolvida por Pagani, Kovaleski e Resende (2015), baseia-se no desenvolvimento de um método para selecionar, coletar, classificar e ler sistematicamente artigos científicos publicados em periódicos. Além disso, analisar três critérios para o ranqueamento dessas pesquisas: ano de publicação, número de citações e fator de impacto. O método é baseado na primeira parte pela metodologia *ProKnow-C* e a segunda parte foi realizada por meio de pesquisa na literatura para fundamentação dos critérios a fim de construir um portfólio. A metodologia de seleção de portfólio, *Methodi Ordinatio* emprega uma equação de classificação de documentos, o *Index Ordinatio (InOrdinatio)*, conforme sua relevância científica. Baseia-se em nove fases, sendo as primeiras cinco uma adaptação para substituir os critérios do ProKnow-C do número de citações dos artigos para priorizar as publicações e ordenar de acordo com os três critérios. Esse método apresenta solução de classificação de documentos de forma eficaz (PAGANI; KOVALESKI; RESENDE, 2015).

### 4.3 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

A metodologia *Methodi Ordinatio* (DE CAMPOS et al., 2018) foi utilizada para realizar uma revisão sistemática baseada em artigos de alto impacto para apoiar o campo de pesquisa. A sequência abaixo descreve nove fases da *Methodi Ordinatio* para atingir o objetivo do estudo:

Fase 1: O significado da pesquisa: avaliar a ecotoxicidade de herbicidas em

microalgas (AEHM);

Fase 2: Pesquisa preliminar com palavras-chave: usou-se a base de dados Web of Science (WoS), Science Direct e Scopus para pesquisar e revisar artigos de 2000 e 2019. As palavras-chave e operadores booleanos foram determinados como (*microalgae\**) OU (*cyanobacteria*) E (*herbicide* OU *pesticide*) E (*toxicity test\** OU *ecotoxicity test\** OU *toxicity assessment\** OU *ecotoxicity assessment\**) com o campo tópico, que inclui título, resumo e palavras-chave. Foram encontrados 35.225 resultados no Science Direct, 148 no Scopus e 31.641 no WoS.

Fase 3: Definição de combinações de palavras-chave e banco de dados: De acordo com os resultados anteriores, as palavras-chave foram redefinidas para: A pesquisa foi composta de palavras usando operadores booleanos e símbolos curinga. A combinação final de palavras-chave foi definida como: (*microalgae\**) E (*herbicide*) E (*ecotoxicity test\**) OU (*ecotoxicity assessment\**).

Fase 4: Pesquisa final no banco de dados: O período da pesquisa foi redefinido para os últimos dez anos (2010-2019), considerando apenas pesquisas mais recentes. Os resultados dos 3 bancos de dados foram exportados por formato BibText para análise posterior por ferramentas como gerenciador de referências Mendeley e VOSviewer. Foram encontrados 12 resultados no Science Direct, 5 no Scopus e 142 no WoS.

Fase 5: Processo de filtragem: A fase anterior resultou em grande número de estudos. Posteriormente, foi realizada uma filtragem para selecionar as publicações mais relevantes. Depois de eliminar duplicatas e trabalhos não categorizados como artigo, restaram 147. Após filtros de título e resumo, como haviam estudos que não estavam vinculados com os tópicos de interesse deste estudo, restaram 40 artigos e, portanto, restaram 84 estudos.

Fase 6: Identificação do fator de impacto (FI), ano de publicação e citações: o ano de publicação foi extraído dos dois bancos de dados (Science Direct, Scopus e WoS). As citações foram extraídas do Google Acadêmico. Martín-Martín et al., (2018) evidenciaram que o Google Acadêmico encontra expressivamente mais citações do que Scopus e WoS em todos os campos de assunto. O fator de impacto foi alcançado a partir do *Clarivate Analytics Journal Citation Reports (JCR)* (ANALYTICS, 2019).

Fase 7: Ordenação dos estudos usando o índice *InOrdinatio*: Após concluir as etapas de 1 a 6, uma planilha foi utilizada para aplicar o índice *InOrdinatio* desenvolvido por Pagani, Kovaleski e Resende (2015). Esse coeficiente considera o total de citações, o FI normalizado, um fator alfa ( $\alpha$ ) cujo valor é definido pelo pesquisador de 1 a 10

(onde quanto mais próximo de  $\alpha$  é de 10, mais importante é que os documentos tenham sido publicados no ano atual), o ano de publicação e o ano atual da pesquisa para classificação dos documentos. Um  $\alpha$  próximo de 1 resultou em carteiras com papeis clássicos. Se artigos recentes são mais importantes para o estudo, o valor de  $\alpha$  deve ser próximo de 10. Este estudo testou a equação de InOrdinatio com  $\alpha$  igual a 5, 6, 8 e 10 e selecionou um  $\alpha$  igual a 5 para fornecer um equilíbrio no tempo, não favorecendo recentes artigos publicados relevantes que apresentem citações.

Fase 8: Localizando artigos completos: Artigos com um índice InOrdinatio superior a 30 foram identificados como pesquisas de alto impacto nos últimos dez anos, resultado em 20 artigos para análise completa.

Fase 9: Leitura e análise sistemática dos artigos.

Para realizar a análise completa do portfólio final, foram consideradas algumas características, embora nem todos os artigos tenham abrangido todos os tópicos analisados. Além do ano de publicação, autores, revista, FI da revista e número de citações, as demais características observadas e avaliadas foram: assunto do artigo (sobre o que se tratava), testes de toxicidade relacionados, herbicidas estudados, microalgas utilizadas, países onde foi realizada a pesquisa, principais recomendações, conclusões e quaisquer outras observações feitas pelos autores.

As visualizações da rede bibliométrica e o mapeamento de resultados específicos foram realizados usando o software VOSviewer (ECK; WALTMAN, 2020; VAN ECK; WALTMAN, 2010, 2018), uma ferramenta de análise de rede bibliométrica gratuita, selecionada por sua funcionalidade de visualização de rede de colaboração e mineração de texto. Os mapas foram criados com base em dados da rede, incluindo periódicos e publicações científicas, países, pesquisadores, palavras-chave, baseadas em redes de co-autoria, co-ocorrência e citação extraídas dos bancos de dados. No mapa de visualização de rede, os itens são indicados por um rótulo, um círculo e linhas. O rótulo e círculo grandes mostram os itens mais importantes. Quanto maior o círculo, maior a contribuição desse item e mais próximo e espesso o vínculo entre dois itens, maior o relacionamento. Resumidamente, o tamanho dos itens depende do peso do item. É determinado pela cor de um item ao qual o cluster pertence.

## 4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.4.1 Construção de um Portfólio Bibliográfico Sobre EAHM Usando o *Methodi Ordinatio*

Bibliometria não pode medir diretamente artigos, mas é um indicador de qualidade, uma vez que fornece números de publicações em todo o mundo (como os países, maiores referências e maiores artigos citados). Os pesquisadores devem determinar a relevância de novos problemas para evoluir o conhecimento para a inovação em cada área. Este estudo apresenta os resultados fornecidos pelo conjunto final de 20 artigos (Tabela 12) considerados de alto impacto por todo o conjunto de critérios de exclusão e apoio pelo *Methodi Ordinatio*.

O estudo mais relevante neste assunto, com base no índice *InOrdinatio*, foi publicada por Abbas et al. (ABBAS et al., 2018) no *Journal of Science of The Total Environment*. É uma revisão com base em avaliações de ecotoxicidade usando *Vibrio fischeri*. O alto índice de *InOrdinatio* de 153 alcançado é devido à associação de: uma pesquisa recente (publicado em 2018), uma alta FI do jornal (SE = 5,589) e um elevado número de citações deste estudo (113 citações). O jornal com maior número de publicações neste portfólio foi *Science of The Total Environment*, com 28,6% dos artigos, seguido de *Ecotoxicology* e *Environmental Safety* com 14,3% das publicações.

Considerando o índice *InOrdinatio*, os dez artigos mais relevantes no campo EAHM são a partir de 2018 ou 2019, o que confirma-o como um recente campo de investigação. Estes artigos também foram publicados em Revistas com alta FI, 2,635 a 6,393.



Tabela 13 - Lista dos 20 artigos classificados por índice InOrdinatio

| Referência                                | Jornal  | FI    | Citações | InOrdinatio |
|---|---|-------|----------|-------------|
| (ABBAS et al., 2018)                      | <i>Science of The Total Environment</i>                       | 5.589 | 113      | 153         |
| (VILLAVERDE et al., 2018a)                | <i>Science of The Total Environment</i>                       | 5.589 | 17       | 57          |
| (MARTÍNEZ-RUIZ; MARTÍNEZ-JERÓNIMO, 2018b) | <i>Science of The Total Environment</i>                       | 5.589 | 9        | 49          |
| (SMYTHERS et al., 2019)                   | <i>Chemosphere</i>  | 5.108 | 4        | 49          |
| (ZHAO et al., 2018)                       | <i>Ecotoxicology and Environmental Safety</i>                 | 4.527 | 9        | 49          |
| (MACHADO; SOARES, 2019c)                  | <i>Journal of Applied Phycology</i>                           | 2.635 | 4        | 49          |
| (TUREMIS et al., 2018)                    | <i>Sensors and Actuators B: Chemical</i>                      | 6.393 | 8        | 48          |
| (VIEGAS et al., 2019)                     | <i>Science of The Total Environment</i>                       | 5.589 | 3        | 48          |
| (STONE et al., 2019a)                     | <i>Environmental Pollution</i>                                | 5.714 | 1        | 46          |
| (IUMMATO et al., 2019)                    | <i>Ecotoxicology and Environmental Safety</i>                 | 4.527 | 1        | 46          |
| (ŠPOLJARIĆ MARONIĆ et al., 2018)          | <i>Science of The Total Environment</i>                       | 5.589 | 5        | 45          |
| (DU et al., 2017)                         | <i>Environmental Science and Pollution Research</i>           | 2.914 | 10       | 45          |
| (MIERZEJEWSKA; BARAN; URBANIAK, 2019)     | <i>Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology</i> | 1.627 | 0        | 45          |
| (ESPERANZA et al., 2016)                  | <i>Science of The Total Environment</i>                       | 5.589 | 14       | 44          |
| (IRIEL et al., 2014)                      | <i>Photochemistry and Photobiology</i>                        | 2.338 | 20       | 40          |
| (PRADO et al., 2012)                      | <i>Ecotoxicology and Environmental Safety</i>                 | 4.527 | 28       | 38          |
| (SILVA et al., 2015)                      | <i>Plos One</i>   | 2.776 | 13       | 38          |
| (GE et al., 2014)                         | <i>Aquatic Toxicology</i>                                     | 3.794 | 16       | 36          |
| (BALTAZAR et al., 2014)                   | <i>Aquatic Toxicology</i>                                     | 3.794 | 12       | 32          |
| (EBENEZER; KI, 2013b)                     | <i>Journal of Microbiology</i>                                | 2.319 | 16       | 31          |

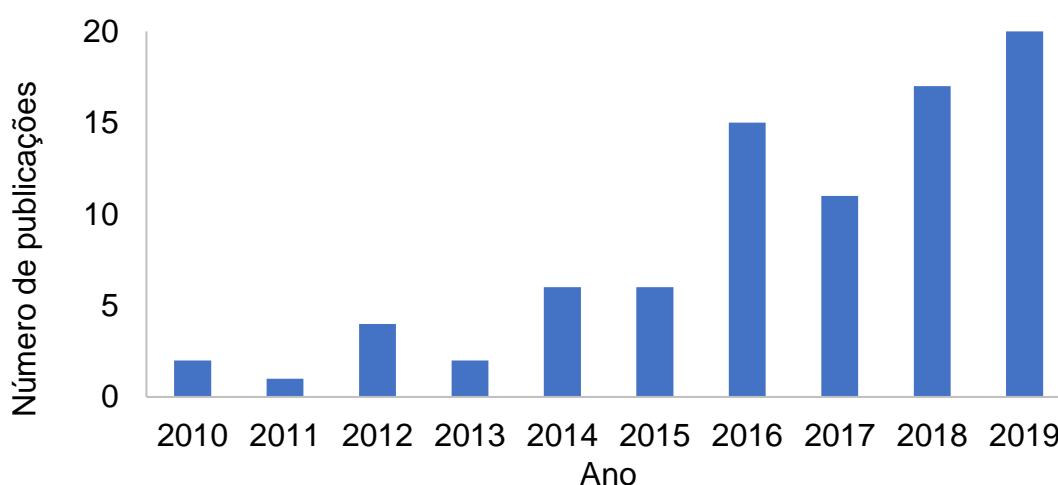
Por fim, foi possível selecionar um número variável de papéis gerados pelo índice *InOrdinatio* gerado e com base no valor  $\alpha$ , definido para compor o portfólio. A lista de 20 trabalhos apresentados nesta pesquisa não é uma proposta limitativa. O objetivo é apoiar estudos e propor o uso de uma metodologia multicritério como o *InOrdinatio* para obter um portfólio bibliográfico pertinente e relevante. A lista apoia os

pesquisadores em seus processos de pesquisa, durante a revisão sistemática da literatura, facilitando o trabalho.

#### 4.4.2 Análise bibliométrica de EAHM

O tópico avaliação de ecotoxicidade de herbicidas utilizando microalgas é novo e busca desenvolvimento. De acordo, a Gráfico 2 mostra os 84 artigos obtidos na fase 5 do *Methodi Ordinatio*, divididos por ano de publicação. Os resultados obtidos do portfólio final mostram a tendência de crescimento exponencial nesse campo de estudos. 2019 foi o ano com produção científica máxima (23,8%), dez vezes maior em comparação a 2010. Houve uma tendência de alta nas publicações nos últimos anos, principalmente desde 2016. Como não houve fase estacionária observada nas publicações, a maturidade em ainda não foi alcançado conhecimento, o que ressalta a importância desse assunto e a necessidade de mais estudos.

**Gráfico 2 - Número de publicações por ano obtidas na fase 5 da *Methodi Ordinatio***

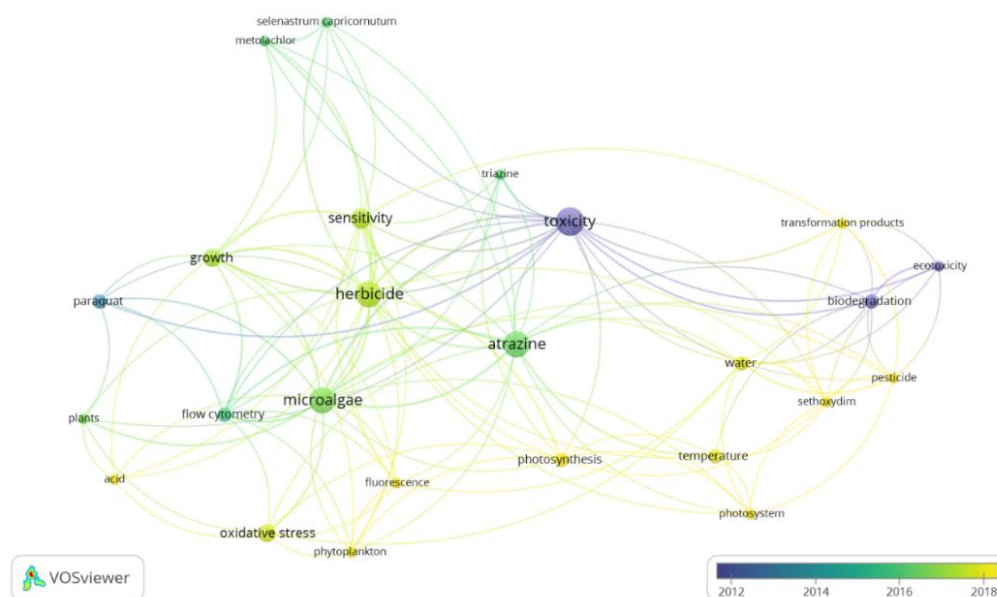


**Fonte: Elaborado pela autora (2019)**

As palavras-chave são pontos importantes a serem considerados para uma publicação em artigo e a análise de co-palavras pode ser usada para identificar pontos de acesso e tópicos de pesquisa, além de monitorar as fronteiras de pesquisa de um determinado domínio do conhecimento (YU et al., 2017). A análise da repetição de palavras-chave e sua interconexão nos artigos publicados pode ser usada para verificar tendências de pesquisa em determinados campos da EAHM. O mapa de co-ocorrência de texto foi construído por meio da ferramenta VOSviewer (Figura 34),

considerando 2 como número mínimo de ocorrências de palavras-chave. Das 209 palavras-chave, 26 atingem o limite. As palavras-chave *toxicity*, *herbicide*, *microalgae* e *atrazine* foram as mais frequentes nos títulos e resumos desses artigos. Os herbicidas mais relacionados às microalgas foram atrazina, paraquat e triazina. Os termos em azul escuro (biodegradação, ecotoxicidade e toxicidade) estão sujeitos aos primeiros estudos de alto impacto, de acordo com os filtros aplicados neste estudo. Os termos em tons de amarelo e verde representam as abordagens mais recentes, aparecendo apenas nos últimos anos. Assim, pesquisas de alto impacto estão sendo realizadas na avaliação da ecotoxicidade dos herbicidas atrazina (IRIEL et al., 2014) (STONE et al., 2019), metolacolor (ŠPOLJARIĆ MARONIĆ et al., 2018) (MACHADO; SOARES, 2019), paraquat (PRADO et al., 2012) (BALTAZAR et al., 2014) e triazina (GE et al., 2014) (SILVA et al., 2015) usando microalgas.

**Figura 24 - Mapa bibliométrico construído pelo VOSviewer com base na co-ocorrência da palavra-chave EAHM em uma linha do tempo e suas inter-relações**

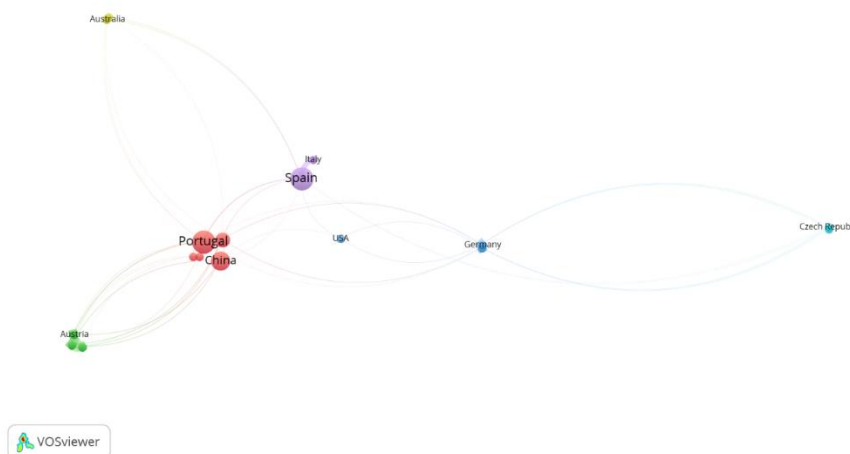


A análise baseada na origem dos autores dessas publicações é essencial para entender a distribuição geográfica com os maiores índices de publicação sobre esse tema. O acoplamento bibliográfico entre os 17 países dos artigos é ilustrado no mapa de rede da Figura 35. Foram obtidos cinco grupos (cores). Espanha e Portugal aparecem como os países com mais publicações (4) e citações (49 e 22,

respectivamente), seguidos pela China. Os outros países têm apenas uma publicação no tema estudado. O Brasil está entre as maiores potências mundiais em *commodities* agrícolas e consome uma quantidade substancial de herbicidas para proteger as plantações. No entanto, não foram encontradas publicações originárias naquele país sobre esse assunto.

Essa abordagem parece ser abordada globalmente, uma vez que alguns estudos são da Europa (Áustria, Croácia, República Tcheca, Inglaterra, Alemanha, Itália, Polônia, Portugal, Espanha), América (Argentina, México, EUA), Ásia (China, Paquistão, Qatar, Coréia do Sul) e Oceania (Austrália). No entanto, pode-se observar uma enorme contribuição da Europa para o desenvolvimento do tema, uma vez que mais de 70% dos 20 artigos são europeus. Também é necessário aumentar a relação entre pesquisa e publicação nesses e em outros países

**Figura 255 - Mapa bibliométrico das colaborações dos principais países com base no acoplamento bibliográfico nas publicações da EAHM**

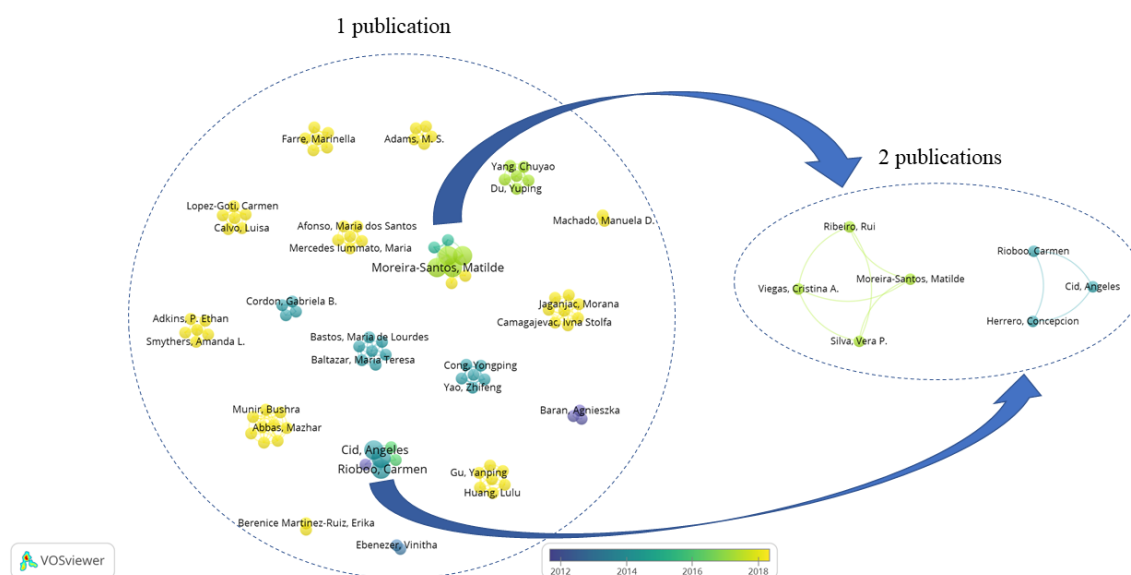


**Fonte: Elaborado pela autora (2019)**

Por fim, a Figura 36 mostra os autores que vêm realizando pesquisas sobre o tema e suas redes de colaboração. O *cluster* de publicação diferencia cada grupo de autores. Dos 99 autores, os maiores itens conectados consistiram em 9 da mesma publicação (ABBAS et al., 2018). De todos os autores identificados em pelo menos 1 publicação, apenas 7 apresentam 2 publicações (Figura 34). Esse número reduzido de pesquisadores focados nessa área de estudo provavelmente se deve ao corpo de estudos especializados da literatura. Os principais achados de Silva, Moreira-Santos,

Ribeiro e Viegas concentram-se na ecotoxicidade da terbutilazina em *Arthrobacter aurescens* (Viegas et al., 2019) (SILVA et al., 2015). As publicações de Rioboo, Herrero e Cid preocupam-se com o uso das microalgas *Chlamydomonas moewusii* como modelo para estudos ecotoxicológicos de atrazina (ESPERANZA et al., 2016; PRADO et al., 2012). Estes últimos também são os autores com mais citações (32). Nenhuma extensa rede de colaboração de autores foi observada. Esse comportamento mostra falta de interconexão entre os grupos de pesquisadores que trabalham com o tema, em todo o mundo.

**Figura 266 - Mapa bibliométrico de co-autoria baseado em publicações da EAHM**



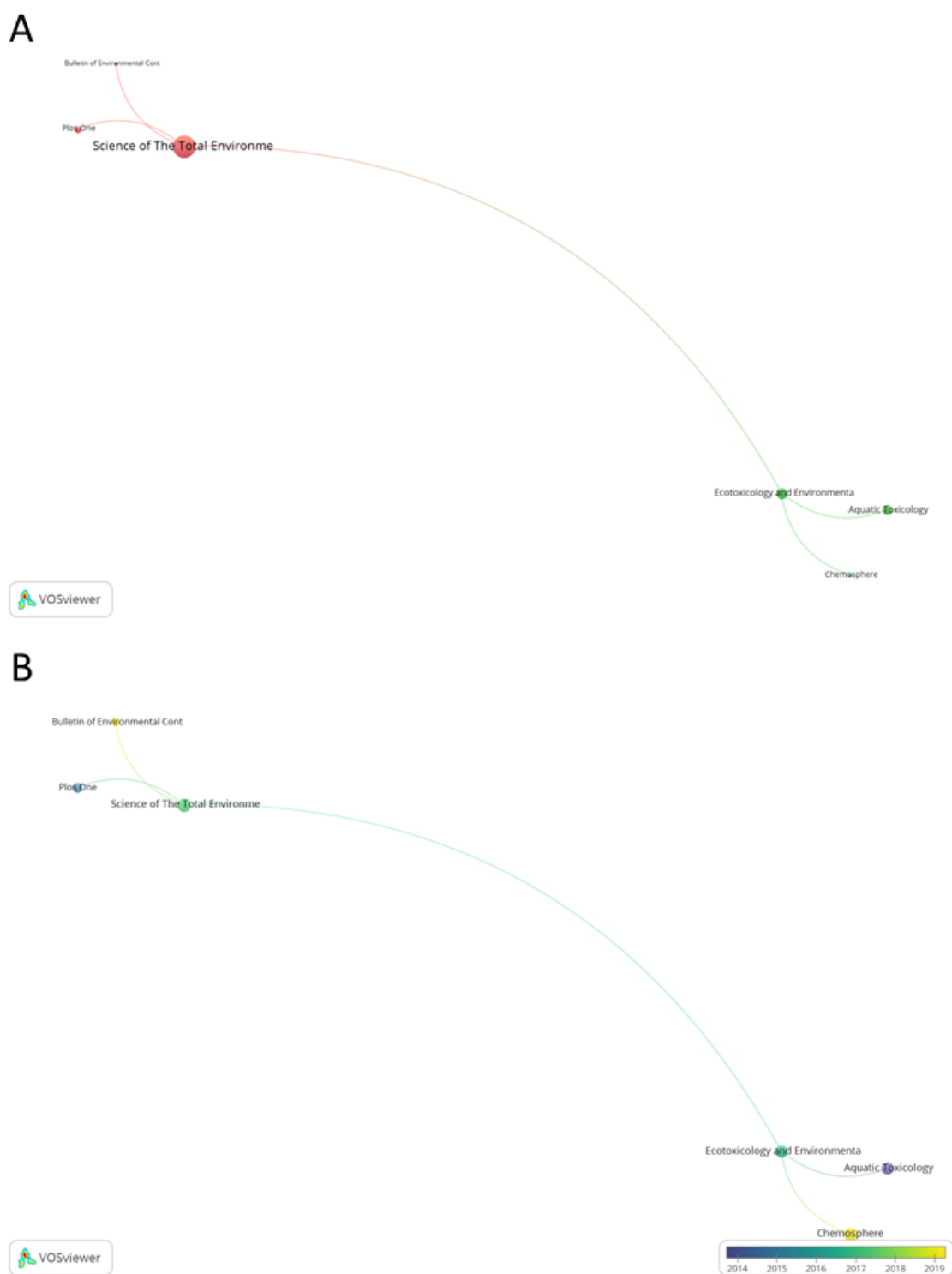
Fonte: Elaborado pela autora (2019)

Este estudo também analisou quais periódicos os pesquisadores mais usam para publicar seus trabalhos. Os diários mais influentes nesse campo são mostrados na Figura 37, feitos a partir das citações do portfólio. Os 20 documentos foram publicados em 12 periódicos. A revista que mais publicou artigos de alto impacto sobre esse tópico de pesquisa é a *Science of The Total Environment* (6 documentos e 161 citações) representada pelo maior círculo vermelho, seguida por *Ecotoxicology* e *Environmental Safety* (3 documentos e 38 citações) e *Aquatic Toxicology* (2 documentos e 28 citações). Esses resultados confirmam a importância desses periódicos, por serem a opção preferida de publicação das pesquisas.

Também podemos observar claramente dois aglomerados, centralizados em *Ecotoxicology* e *Environmental Safety* (verde) e *Science of The Total Environment*

(vermelho), que mostra a rede de publicações e citações desses periódicos (Figura 37A)

**Figura 277 - Mapa bibliométrico baseado na citação dos principais periódicos das publicações da EAHM: (A) mapa bibliométrico baseado no FI; (B) ano médio das publicações da EAHM dos principais periódicos**



Fonte: Elaborado pela autora (2019)

Comparando o FI dos periódicos e o ano das publicações, os mesmos agrupamentos da Figura 37A são observados na Figura 37B. De acordo com a classificação dos periódicos, realizada pela *Clarivate Analytics* no JCR do ano de 2019, (ANALYTICS, 2019) a *Science of The Total Environment* aparece com um FI de 5,589 pontos, o *Chemosphere* apresenta 5,108 e *Ecotoxicology e Environmental Safety*, 4,527 pontos. Esses periódicos apresentam uma publicação média no ano de 2017, 2019 e 2016, respectivamente, enfatizando as publicações recentes sobre o campo na EAHM por esses periódicos. Esses três periódicos também aparecem nos cinco principais artigos do ranking, apresentados na Tabela 12 pelo índice *InOrdinatio*, o que confirma a importância da Ordenação da Metodologia para construir um portfólio bibliográfico com base em estudos relevantes. O FI é um dos 5 princípios que *Methodi Ordinatio* usa para classificar os trabalhos, mas tem um baixo peso no índice *InOrdinatio*. Os pesquisadores preferem publicar em um periódico com alto FI como garantia de visibilidade dos estudos e seriedade no processo de investigação. A análise das informações bibliométricas fornece o suporte para decidir as melhores opções para divulgar os resultados do trabalho de pesquisa.

#### 4.4.3 Destaques de Revisão: Quais os Estudos de Alto Impacto Sobre EAHM

Houve poucos esforços para avaliar a vulnerabilidade relativa das microalgas ao estresse tóxico em relação à de outros organismos aquáticos. As espécies de microalgas respondem amplamente de maneira diferente aos agroquímicos, conforme relatado abaixo. Poucos relatórios foram publicados comparando a toxicidade de herbicidas em relação a vários organismos-teste (EBENEZER; KI, 2014; FAIRCHILD; RUESSLER; CARLSON, 1998; GE et al., 2014; KYRIAKOPOULOU; ANASTASIADOU; MACHERA, 2009; MARTÍNEZ-RUIZ; MARTÍNEZ-JERÓNIMO, 2018). Relativamente poucos relatórios foram envolvidos com resposta diferencial de várias espécies de algas a herbicidas (BI et al., 2018; EBENEZER; KI, 2013a; MA et al., 2002; MACHADO; SOARES, 2019; STONE et al., 2019). A Tabela 14 destaca algumas microalgas usadas como organismo de teste na avaliação de ecotoxicidade de herbicidas.

Tabela 14 - Avaliação de ecotoxicidade de vários herbicidas utilizando espécies de microalgas

| Organismo teste                    | Tóxico   | EC <sub>50</sub>   | Referência                               |
|------------------------------------|--|--|--|
| <i>Ankistrodesmus falcatus</i>     | 2,4-D  | 1353800 µg L <sup>-1</sup>   | (MARTÍNEZ-RUIZ; MARTÍNEZ-JERÓNIMO, 2018) |
| <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>   | Atrazine   | 0,231 µM   | (ESPERANZA et al., 2016)                 |
| <i>Chlorella</i> sp. 12            | Atrazine   | NC   | (STONE et al., 2019)                     |
| <i>Monoraphidium arcuatum</i>      |  | 160 µg L <sup>-1</sup>   |  |
| <i>Nannochloropsis-like</i> sp.    |  | 800 µg L <sup>-1</sup>   |  |
| <i>Pediastrum duplex</i>           |  | 50 µg L <sup>-1</sup>  |  |
| <i>Chlorella</i> sp. 12            | Imazapic   | ND   |  |
| <i>Monoraphidium arcuatum</i>      |  | >1100 µg L <sup>-1</sup>   |  |
| <i>Nannochloropsis-like</i> sp.    |  | >1100 µg L <sup>-1</sup>   |  |
| <i>Pediastrum duplex</i>           |  | >1100 µg L <sup>-1</sup>   |  |
| <i>Selenastrum capricornutum</i> , | Atrazine, metribuzin, alachlor, metolachlor          | 117 µg L <sup>-1</sup><br>43 µg L <sup>-1</sup><br>10 µg L <sup>-1</sup><br>84 µg L <sup>-1</sup>            | (FAIRCHILD; RUESSLER; CARLSON, 1998)     |
| <i>Chlorella vulgaris</i>          | Atrazine, metribuzin, alachlor, metolachlor          | 94 µg L <sup>-1</sup><br>31 µg L <sup>-1</sup><br>26 µg L <sup>-1</sup><br>203 µg L <sup>-1</sup>            |  |
| <i>Chlamydomonas reinhardi</i> ,   | Atrazine, metribuzin, alachlor, metolachlor          | 176 µg L <sup>-1</sup><br>23 µg L <sup>-1</sup><br>460 µg L <sup>-1</sup><br>1138 µg L <sup>-1</sup>         |  |
| <i>Scenedesmus quadricauda</i> ,   | Atrazine, metribuzin, alachlor, metolachlor          | 169 µg L <sup>-1</sup><br>152 µg L <sup>-1</sup><br>1328 µg L <sup>-1</sup><br>>3000 µg L <sup>-1</sup>      |  |
| <i>Microcystis</i> sp.,            | Atrazine, metribuzin, alachlor, metolachlor          | 90 µg L <sup>-1</sup><br>100 µg L <sup>-1</sup><br>>3000 µg L <sup>-1</sup><br>>3000 µg L <sup>-1</sup>      |  |
| <i>Anabaena flosque</i>            | Atrazine, metribuzin, alachlor, metolachlor          | >3000 µg L <sup>-1</sup><br>>3000 µg L <sup>-1</sup><br>>3000 µg L <sup>-1</sup><br>>3000 µg L <sup>-1</sup> |  |
| <i>Selenastrum capricornutum</i>   | Atrazine, butachlor, halosulfuron-methyl, mesotrione | 76 µg L <sup>-1</sup><br>110 µg L <sup>-1</sup><br>6,5 µg L <sup>-1</sup><br>3620 µg L <sup>-1</sup>         | (ZHAO et al., 2018)                      |



|  |   |  |                                   |
|--|---|--|-----------------------------------|
|  |   | 6,68 mol L <sup>-1</sup>   |                                   |
|  |   | 7,72 mol L <sup>-1</sup>   |                                   |
|  |   | 7,80 mol L <sup>-1</sup>   |                                   |
|  |   | 7,33 mol L <sup>-1</sup>   |                                   |
| <i>Selenastrum capricornutum</i>   | Atrazine, diuron, fenuron, monolinuron, monuron, prometon, prometryn, simetryn  | 6,30 mol L <sup>-1</sup>   | (GE et al., 2014)                 |
|  |   | 6,03 mol L <sup>-1</sup>   |                                   |
|  |   | 7,18 mol L <sup>-1</sup>   |                                   |
|  |   | 7,42 mol L <sup>-1</sup>   |                                   |
| <i>Chlorella kessleri</i>  | Glyphosate  | 55620 µg.L <sup>-1</sup>   | (Romero et al., 2011)             |
| <i>Scenedesmus vacuolatus</i>  | Glyphosate  | 4900 µg.L <sup>-1</sup>  | (IUMMATO et al., 2019)            |
| <i>Dunaliella tertiolecta</i> ,<br><i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>                    | Metolachlor   | 11,3x10 <sup>3</sup> µg.L <sup>-1</sup><br>118 µg.L <sup>-1</sup>        | (MACHADO; SOARES, 2019c)          |
| <i>Parachlorella kessleri</i>  | Metolachlor   | 1090 µg L <sup>-1</sup>  | (ŠPOLJARIĆ MARONIĆ et al., 2018). |
| <i>Scenedesmus vacuolatus</i>  | Metolachlor   | 598 µg L <sup>-1</sup>   | (VALLOTTON et al., 2008)          |
| <i>Tetraselmis suecica</i> ,<br><i>Ditylum brightwellii</i> ,<br><i>Prorocentrum minimum</i> | Metolachlor   | 1,3 µg.L <sup>-1</sup><br>25 µg.L <sup>-1</sup><br>45 µg.L <sup>-1</sup> | (EBENEZER; KI, 2013)              |
| <i>Chlamydomonas moewusii</i>  | Paraquat  | ND   | (PRADO et al., 2012)              |
| <i>Chlorella vulgaris</i>  | Paraquat  | 525,483 µg L <sup>-1</sup>   | (BALTAZAR et al., 2014)           |
| <i>Chlorella vulgaris</i>  | Poast   | ND   | (SMYTHERS et al., 2019)           |
| <i>Nannochloris oculata</i>  | Sethoxydim, cyhalofop, Bensulfuron-methyl, Simazine, Diuron, Diquat, Carfentrazone-ethyl, Fluridone, Mesotrione, Clomazone, Glyphosate, Glufosinate, Glufosinate, Pendimethalin, S-metolachlor, Isoxaben, Dichlobenil, Dinoterb, Thiobencarb, Ethofumesate, 2,4-D | ND   | (DENG et al., 2015)               |

NC: não calculado; ND: não determinado

*Dunaliella tertiolecta* é capaz de crescer em condições extremas de salinidade e não possui parede celular rígida (BOROWITZKA; SIVA, 2007), facilitando a

passagem de poluentes para a célula, sendo uma alternativa interessante na avaliação da toxicidade de compostos presentes em águas marinhas (MANZO et al., 2013). *Pseudokirchneriella subcapitata*, comum em águas doces, é facilmente cultivada em condições de laboratório, é bastante sensível a uma grande variedade de substâncias tóxicas (CHO et al., 2009) (TSOLCHA et al., 2016) e é um organismo de teste sugerido pelos métodos padrão dos EUA (US-EPA, 2012) e União Europeia (OCDE, 2011).

Abbas et al. (2018) destacaram que o bioensaio de inibição da bioluminescência de *Vibrio fischeri* pelo ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) foi validado para fornecer sensibilidade equivalente ou até alta, em comparação com os bioensaios de referência envolvendo algas, peixes e crustáceos. *Ankistrodesmus falcatus* é uma microalga clorofítica representativa, comparativamente grande, com uma forma acicular característica, que permite uma determinação mais fácil de alguns de seus efeitos morfológicos tóxicos. Esse fitoplâncton foi utilizado para estudos de toxicidade (MARTÍNEZ-RUIZ; MARTÍNEZ-JERÓNIMO, 2015) e também foi proposto para a produção de biocombustíveis (GEORGE et al., 2014). Martínez-Ruiz e Martínez-Jerónimo (2018) relataram os efeitos tóxicos do 2,4-D nas cianobactérias *Microcystis aeruginosa* e na microalga *Ankistrodesmus falcatus*. *Ankistrodesmus falcatus* foi tolerante a altas quantidades de 2,4-D, uma vez que as cianobactérias apresentaram maior sensibilidade comparável a outros fitoplânctons. O herbicida inibiu o crescimento populacional, ativou os mecanismos relacionados à produção de macromoléculas e pigmentos fotossintéticos e alterou a resposta enzimática antioxidante. Em *A. falcatus*, o 2,4-D aumentou a presença de armazenamento lipídico, afetou a parede e membrana celular e produziu deformação celular.

*Selenastrum capricornutum* é uma alga comum no teste de produtos químicos perigosos na água (CHO et al., 2007; GAO; TAM, 2011). Zhao et al. (2018) relataram toxicidade individual e combinada de quatro herbicidas (halossulfurão-metil, mesotriona, atrazina e butacloro) na microalga *S. capricornutum* fácil de cultivar usando a equação isobologram como índice de combinação. As misturas de halossulfurão-metil mais mesotriona e butacloro mais halossulfurão-metil mais mesotriona apresentaram resposta de sinergismo em *S. capricornutum*. A toxicidade gerada pelas misturas dos herbicidas pode causar sérios danos às microalgas nos ecossistemas aquáticos.

Mas não é elucidado como o sinergismo afeta espécies não-alvo em

ambientes aquáticos. A equação de *isobologram* pode ser um dispositivo útil para a determinação da toxicidade de herbicida em ambiente aquático. Alterações na fotossíntese também foram encontradas em células de *C. reinhardtii* expostas à atrazina, afetando os estados bioquímicos e fisiológicos das células da microalga (ESPERANZA et al., 2016). Fairchild, Ruessler e Carlson (1998) estudaram a sensibilidade de 6 espécies de algas (*Selenastrum capricornutum*, *Chlorella vulgaris*, *Chlamydomonas reinhardi*, *Scenedesmus quadricauda*, *Microcystis sp.* e *Anabaena flosque*) e 5 espécies de macrófitas aquáticas a 4 herbicidas comumente usados (alachlor, atrazina, metolaclo e metribuzina). As sensibilidades das algas aos herbicidas diminuíram na seguinte ordem: *Selenastrum capricornutum* > *Chlorella vulgaris* > *Chlamydomonas reinhardi* > *Microcystis sp.* > *Scenedesmus quadricauda* > *Anabaena flosque*. No entanto, os resultados mostraram que nenhuma espécie era consistentemente sensível e que planta aquática pode ser necessária para obter uma avaliação precisa dos riscos desses herbicidas.

Existem poucos estudos publicados de sensibilidades de algas à atrazina e ao imazapic que fazem uso de testes multiespécies, baixas densidades celulares iniciais, concentrações medidas de herbicidas, água mole baixa em nutrientes e o ponto final da taxa de crescimento populacional. A necessidade de informações ambientalmente relevantes mais confiáveis sobre a toxicidade de herbicidas foi destacada em uma revisão realizada por Pesce et al. (2011) (2011). Esta revisão resumiu vários estudos de mesocosmo e biofilme que investigaram mudanças nas comunidades aquáticas, incluindo diatomáceas perifíton, fitoplâncton e bentônica, após exposição a herbicidas (individualmente ou como misturas de herbicidas). Os estudos in situ e de mesocosmo com comunidades de microalgas podem ser demorados e caros, mas o teste de várias espécies desenvolvido fornece uma alternativa confiável em tempo e custo-benefício para avaliar a toxicidade de herbicidas para o fitoplâncton em mesocosmos. Stone et al. (2019) investigaram 4 espécies de microalgas (*Pediastrum duplex*, *Nannochloropsis sp.*, *Monoraphidium arcuatum* e *Chlorella sp. 12*) em testes de toxicidade multiespécies com base na taxa de divisão celular. Dois herbicidas com diferentes modos de ação (atrazina e imazápico) foram utilizados para realizar a sensibilidade do teste de toxicidade. A atrazina (um inibidor da PSII) foi mais tóxica para todas as espécies do que a imazápica (um inibidor da ALS). Este foi o primeiro estudo que desenvolveu uma ferramenta eficaz em termos de tempo e custo para o teste de toxicidade por

microalgas de várias espécies. Algumas pesquisas têm chamado a atenção para a toxicidade combinada de herbicidas (como atrazina + diuron em algas) em organismos não-alvo (GE et al., 2014). No entanto, para conhecimento, a toxicidade combinada dos herbicidas em microalgas é desconhecida. Assim, é essencial entender a toxicidade das misturas de herbicidas ao avaliar o risco potencial para os organismos aquáticos.

Iummato et al. (2019) avaliaram o estresse oxidativo e a morfologia da microalga *Scenedesmus* exposto ao glifosato. A exposição ao glifosato resultou em células maiores com maior tamanho de vacúolo, parede celular mais espessa e modificação no empilhamento de tilacóides. Estudos anteriores relataram várias alterações nas microalgas quando expostas ao glifosato: diminuição do teor de clorofila, inibição do crescimento celular, aumento dos vacúolos celulares, tamanho da célula e teor de proteínas (ROMERO; RÍOS DE MOLINA; JUÁREZ, 2011; SMEDBOL et al., 2018). Além disso, tem sido sugerido que o glifosato pode induzir estresse oxidativo em *Chlorella kessleri* (ROMERO; RÍOS DE MOLINA; JUÁREZ, 2011). *Scenedesmus vacuolatus* (anteriormente *Chlorella fusca* var. *Vacuolata*) está presente no fitoplâncton de vários ambientes de água doce. O S-metolaclo-ro afetou essa microalga modificando o conteúdo de fotossíntese, taxa de crescimento, proteína e clorofila e aumentando as defesas antioxidantes e a peroxidação lipídica (VALLOTTON et al., 2008). Machado e Soares (2019) avaliaram a toxicidade do metolaclo-ro em *Pseudokirchneriella subcapitata* (alga de água doce) e *Dunaliella tertiolecta* (alga marinha). *P. subcapitata* apresenta maior sensibilidade ao poluente, o que indica o valor dessa alga em testes de ecotoxicidade em águas doces. Também é relatado que o S-metolaclo-ro induz estresse oxidativo em *Parachlorella kessleri* (ŠPOLJARIĆ MARONIĆ et al., 2018). Ebenezer e Ki (2013) quantificaram os efeitos tóxicos do metolaclo-ro em 3 microalgas marinhas (*Tetraselmis suecica*, *Ditylum brightwellii* e *Prorocentrum minimum*). O *Prorocentrum minimum* foi o organismo mais sensível quando exposto ao metolaclo-ro, sendo sugerido como um organismo modelo em potencial para testes de ecotoxicidade em ambientes marinhos.

Prado et al. (2012) estudaram o sistema integrado de citometria de fluxo como técnica e *Chlamydomonas moewusii* como modelo de organismo para testes ecotoxicológicos, buscando biomarcadores sensíveis da citotoxicidade de contaminantes em corpos aquáticos. O Paraquat despolariza a membrana celular, aumenta o pH e a quantidade intracelular de cálcio. Esses efeitos podem estar ligados

ao estresse oxidativo induzido pelo Paraquat, devido ao aumento significativo dos níveis intracelulares de substâncias reativas de oxigênio observadas em culturas expostas a este herbicida. Baltazar et al. (2014) avaliam a toxicidade do Paraquat em comparação com o Paraquat contendo acetilsalicilato de lisina na formulação, utilizando *C. vulgaris* como organismo de teste. A formulação com Paraquat mais acetilsalicilato de lisina reduziu a toxicidade para *C. vulgaris*. Os herbicidas podem causar danos graves a organismos não-alvo, como microalgas, e a previsão de interações bióticas indesejadas ainda é um desafio.

Ge et al. (2014) investigaram os efeitos dos herbicidas triazina (atrazina, prometrina, prometina e simetrina) e fenilureia (diuron, fenuron, monolinuron e monuron), os cinco principais herbicidas utilizados na China em 2013 nas microalgas *Selenastrum capricornutum* e na bactéria *Photobacterium phosphoreum*. Este estudo propôs sugestões para composições de mistura de herbicidas para maximizar a atividade herbicida e minimizar o efeito de toxicidade.

Os efeitos de 22 herbicidas (relacionados na Tabela 13), representando 14 modos de ação, foram estudados em *Nannochloris oculata* e o crescimento e o conteúdo lipídico total foram examinados (DENG et al., 2015). O diuron (um inibidor do fotossistema II) foi o composto tóxico que mais afetou o crescimento de algas. Quando expostos ao metolacoloro, *Nannochloris oculata* também apresenta vários efeitos, como inibição do crescimento e da fotossíntese. Diquat em alta concentração reduziu significativamente o crescimento de algas e o conteúdo lipídico. O Sethoxydim em baixas concentrações não foi tóxico para a alga, mas diminuiu significativamente o conteúdo lipídico. Smythers et al. (2019) caracterizaram as reações de Poast (um herbicida que contém Sethoxydim) em *C. vulgaris*, um organismo unicelular de água doce não-alvo e espécies predominantes da comunidade fitoplanctônica. Os autores observaram que Poast fragmentou a membrana celular e danificou o aparelho fotossintético.

Antes da linha do tempo deste estudo (2010-2019), o ensaio Microtox® comparou a toxicidade de herbicidas (pendimetalina e S-metolacoloro mais terbutilazina) e fungicidas (tirame e tiofanato metílico) em 4 espécies marinhas: a bactéria *Vibrio fischeri*, a alga verde *Nannochloropsis oculata*, o crustáceo *Artemia franciscana* e o rotífero marinho *Brachionus plicatilis* (KYRIAKOPOULOU; ANASTASIADOU; MACHERA, 2009). Os resultados indicam que existem diferenças substanciais na sensibilidade entre as espécies quando expostas às mesmas

formulações. A alga verde marinha unicelular *Nannochloropsis occulata* foi a mais sensível dos organismos testados. A toxicidade de 12 pesticidas em diferentes espécies de algas foi examinada para *Chlorella pyrenoidosa* e *Scenedesmus obliquus*. O benomil apresentou maior toxicidade aguda para *C. pyrenoidosa* e *S. obliquus*. Dentre os outros pesticidas houveram respostas diferentes para as duas espécies de algas e a sensibilidade variou também (MA et al., 2002). Sinclair e Boxall (2003) empregaram diferentes abordagens para prever a ecotoxicidade aguda aquática em peixes, naftídeos e algas de 485 produtos de degradação de 60 pesticidas. A pesquisa demonstrou que uma proporção significativa de produtos de degradação (30%) era mais tóxica que o composto original. Harrington et al. (2005) relataram que a combinação de diuron e sedimentação poderia danificar o fotossistema microalgal II. O metolaclo ro inibiu o crescimento de *Scenedesmus acutus* devido à sua correlação com o efeito desse composto na síntese de ácidos graxos (COUDERCHET; SCHMALFUSS; BOGER, 1998).

Alguns estudos relacionaram o efeito de herbicidas no metabolismo das microalgas. Park et al. (2017) relataram que os fotossistemas de algas e o transporte de elétrons foram danificados quando expostos a herbicidas. O butacloro inibe enzimas como elongases, responsáveis pelo alongamento de ácidos graxos de cadeia longa e enzimas de ciclização de geranylgeranyl (GÖTZ; BÖGER, 2004). A mesotriona inibe a enzima 4-hidroxi-fenilpiruvato dioxigenase (HPPD), um constituinte da via bioquímica que modifica a tirosina em plastoquinona e  $\alpha$ -tocoferol (SUTTON et al., 2002). O halossulfurão-metil é um herbicida sulfonilureia que inibe as ações das enzimas acetolactato sintase (ALS), interrompendo o crescimento das plantas daninhas (DUBELMAN et al., 1997). Houve uma pesquisa limitada sobre a toxicidade do *Halosulfuron-metil* em microalgas. Como as microalgas e as cianobactérias têm algumas semelhanças, como em termos de produção de biocombustíveis, as microalgas são usadas para indicar os dois microorganismos em alguns estudos, como (NGUYEN; LINH; HANOI, 2016). O fenoxaprop-p-etil foi estudado quanto à ecotoxicidade em duas cianobactérias, *Microcystis aeruginosa* e *Microcystis viridis* e os resultados mostraram que o herbicida bloqueou a síntese de proteínas e clorofila a nas duas cianobactérias, portanto, inibiu seu crescimento (DU et al., 2017).

Alguns artigos do portfólio usaram softwares diferentes para determinar alguns parâmetros. Esperanza et al. (2016) utilizaram o programa de computador *CompuSyn* para calcular o valor de EC50, com base nos dados da taxa de

crescimento de *Chlamydomonas reinhardtii*. O mesmo programa foi utilizado por Zhao et al. (2018). Este programa de computador pode determinar a resposta da concentração, o valor do CI e o gráfico fa-CI representado pelo censo de IC e influenciado por uma concentração. Machado e Soares (2019) utilizaram o software TOXCALC (*Tidepool Scientific Software*) para calcular o EC pela interpolação linear. Villaverde et al. (2018) estima *endpoints* para o herbicida *clethodim* e seus fotoprodutos, empregando o *Toxicity Estimation Software Tool (T.E.S.T.)* v. 4.2.1. *TEST* foi usado para determinar propriedades físico-químicas adicionais (isto é, densidade, viscosidade, ponto de inflamação, tensão superficial e condutividade térmica) e pontos finais de ecotoxicidade.

As realizações deste estudo mostram o maior herbicida estudado em testes de ecotoxicidade usando várias microalgas, e podem fornecer uma base científica inestimável para o risco potencial previsto exato de herbicida para microalgas. Além de considerar não apenas a dose segura de produtos químicos únicos em algas, mas em organismos aquáticos, e também em sua combinação.

#### 4.5 CONCLUSÃO

Esse estudo forneceu um esboço abrangente dos testes de ecotoxicidade de herbicidas em microalgas por meio do método bibliométrico, que esclareceu a tendência emergente. O ranking dos vinte artigos mais relevantes foi identificado e avaliado por meio do *Methodi Ordinatio*, demonstrando os benefícios atuais de iniciar novas pesquisas e reduzindo o intervalo de tempo para compor um portfólio bibliográfico. Deste portfólio, algumas conclusões podem ser tiradas. As pesquisas nesse campo avançaram nos últimos anos e ainda estão em desenvolvimento. *Science of the Total Environment* é a fonte mais publicada e provavelmente a melhor fonte para os cientistas disseminarem trabalhos sobre o assunto estudado. As palavras-chave, análise de co-ocorrência e agrupamentos apontam na mesma direção e a pesquisa em testes de ecotoxicidade está notavelmente associada a herbicidas como atrazina paraquat e triazina.

Atualmente, vários testes de toxicidade por microalgas foram realizados usando uma única espécie de microalgas exposta a um único contaminante sob condições controladas de laboratório. Portanto, pesquisas futuras provavelmente devem se concentrar no desenvolvimento, otimização e validação da avaliação de

toxicidade por microalgas multiespécies para uma ampla gama de herbicidas. Acredita-se que este estudo traga uma contribuição razoável para o tópico abordado da literatura, uma vez que, na medida do nosso conhecimento, não foram encontrados estudos investigando a abordagem conjunta dos tópicos de interesse deste estudo, como no presente artigo.



## 5 CONCLUSÕES GERAIS

O estudo com microalgas cultivadas com resíduo agroindustrial e tolerante a herbicidas, realizado a partir de: pesquisa cienciométrica, experimentalmente e com o ranqueamento de estudos com o *Methodi Ordinatio*, possibilitou conhecer ainda mais esse mundo rico em sustentabilidade e aplicação biotecnológica.

A cienciométrica permitiu analisar as tendências de publicações científicas, lacunas e vieses, nos estudos de publicações com resíduos usados como substratos no cultivo de microalgas. Houve uma tendência de crescimento de publicações na área e os dois principais campos de pesquisa são: “Biotecnologia aplicada a Microbiologia” e “Combustíveis Energéticos”. O estudo indicou a importância de reutilizar um subproduto como matéria-prima para gerar um novo de valor agregado, o qual possui impacto econômico e socioambiental.

Com os experimentos realizados no cultivo de microalga, notou-se um bom desenvolvimento da cepa *C. vulgaris* IPR-7117 no PSP20. Com os herbicidas, o cultivo obteve menores concentrações celulares e conteúdo lipídico. Para os testes de ecotoxicidade com a *Artemia salina* e *Lactuca sativa*, alcançou índices de mortalidade altos no caso da *Artemia* e pouco índice de germinação para a *Lactuca*, indicando a alta toxicidade do meio com os herbicidas. Para trabalhos futuros, com a biomassa tolerante a herbicidas pode-se produzir um biofertilizante.

Para o último estudo sobre ecotoxicidade de herbicidas em microalgas pelo método bibliométrico, obteve-se o ranqueamento de 20 artigos por meio do *Methodi Ordinatio*. As pesquisas na área tiveram um avanço nos últimos anos e estão ainda em desenvolvimento, indicando a importância de pesquisas no desenvolvimento, otimização e validação dos métodos de avaliação de toxicidade por microalgas para ampla gama de herbicidas.

## REFERÊNCIAS

ABBAS, M.; ADIL,, M.; EHTISHAM-UL-HAQUE, S.; MUNIR, B.; YAMEEN, M.; GHAFFAR, A.; SHAR, G. A.; ASIF, T. M.; IQBAL, M. *Vibrio fischeri* bioluminescence inhibition assay for ecotoxicity assessment: a review. **Science of the Total Environment**, v. 626, p. 1295-1309, 2018.

ABREU, A. P.; FERNANDES, B.; VICENTE, A. A.; TEIXEIRA, J; DRAGONE, G. Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* using industrial dairy waste as organic carbon source. **Bioresource Technology**, v. 118, p. 61-66, 2012.

AGIRMAN, N.; KENDIRLIOGLU, G.; CETIN, A. K. The effects of four pesticides on the growth of *Chlorella vulgaris*. **Fresenius Environmental Bulletin**, v. 23, n. 6, p. 1418-1422, 2014.

AHMAD, N.; MEHMOOD, M.; MALIK, S. Recombinant Protein Production in Microalgae: Emerging Trends. **Protein & Peptide Letters**, v. 26, 2019.

AKERMAN, M. Measures of experience and scientometrics to evaluate the impact of scientific production. **Revista de Saúde Pública**, v. 47, n. 4, p. 1-5, 2013.

ALAYU, E.; YIRGU, Z. Advanced technologies for the treatment of wastewaters from agro-processing industries and cogeneration of by-products: a case of slaughterhouse, dairy and beverage industries. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 15, n. 7, p. 1581-1596, 2018.

ALEXANDRATOS, N.; BRUINSMA, J. World agriculture towards 2030/2050. The 2012 Revision. **ESA Working Paper No. 12-03**, 2012.

ALVES, L. A. G. DA C. Avaliação da Ecotoxicidade do Ibuprofeno e seus Metabolitos usando Microalgas. 2014.

ALVES, R. L. D. Projeto da rede de captação logística do soro de queijo produzido no estado de Minas Gerais. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 12 Suppl 1, n. 9, p. 1-29, 2005.

ANALYTICS, C. **Clarivate Analytics**. Disponível em:  
<[http://apps.webofknowledge.com/WOS\\_GeneralSearch\\_input.do?product=WOS&search\\_mode=GeneralSearch&SID=7BuS6AZ6aeoW1aZ9xPi&preferencesSaved=>](http://apps.webofknowledge.com/WOS_GeneralSearch_input.do?product=WOS&search_mode=GeneralSearch&SID=7BuS6AZ6aeoW1aZ9xPi&preferencesSaved=>)>. Acesso em: 15 dez. 2019.

ANDRADE, D. S.; COLOZZI FILHO, A. **Microalgas de águas continentais: Potencialidades e desafios do cultivo.** [s.l: s.n.]. v. 1

ANDRADE, M. R.; COSTA, J. A. V. Cultivo da microalga *Spirulina platensis* em fontes alternativas de nutrientes. **Ciência e agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 5, p. 1551-1556, 2008.

ANGELO, E. A.; ANDRADE, D. S.; FILHO, A. C. Cultivo não-fotoautotrófico de microalgas: uma visão geral. **Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 35, n. 1, p. 115, 2014.

ANI AZAMAN, S. N.; NAGAO, N.; YUSOFF, F. M.; TAN, S. W.; YEAP, S. K. A comparison of the morphological and biochemical characteristics of *Chlorella sorokiniana* and *Chlorella zofingiensis* cultured under photoautotrophic and mixotrophic conditions. **PeerJ**, v. 2017, n. 9, 2017.

ARANTES, P. B. Influência do herbicida glifosato (n-(fosfonometil)glicina) na formação de biomassa da alga *Pseudokirchneriella subcapitata* (Chlorophyceae) [s.l: s.n.].

ARAUJO, A.; RODRIGUES, L.; BRITO, L.; VALADARES, M.; OLIVEIRA, G. Avaliação da ecotoxicidade do glifosato, o ingrediente ativo de alguns herbicidas. v. 4, p. 2015, 2015.

ARAUJO, A. L. A. DOS S. C. DE. Cultivo da microalga *Scenedesmus* sp. em presença de nonilfenol etoxilado. p. 45, 2015.

ARENZON, A.; NETO, T. J. P.; GERBER, W. **Manual sobre toxicidade em efluentes industriais.** Porto Alegre/RS CEP SENAI de Artes Gráficas Henrique d'Ávila Bertaso, , 2011.

BABAEI, A.; MEHRNIA, M. R.; SHAVEGAN, J.; SARRAFZADEH, M.; AMINI, E. Evaluation of Nutrient Removal and Biomass Production Through Mixotrophic, Heterotrophic, and Photoautotrophic Cultivation of *Chlorella* in Nitrate and Ammonium Wastewater. **International Journal of Environmental Research**, v. 12, n. 2, p. 167-178, 13 maio 2018.

BALTAZAR, M. T.; DINIS-OLIVEIRA, R. J.; MARTINS, A.; BASTOS, M. L.; DUARTE, J. A.; GUILHERMINO, L.; CARVALHO, F. Lysine acetylsalicylate increases the safety of a paraquat formulation to freshwater primary producers: A case study with the microalga *Chlorella vulgaris*. **Aquatic Toxicology**, v. 146, p. 137-143, 2014.

BASTOS, A. **Pesquisadores identificam composto benéfico para a saúde em soro de leite**. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/4989705/pesquisadores-identificam-composto-benefico-para-a-saude-em-soro-de-leite>>. Acesso em: 10 fev. 2020.

BECKER, E. W.; VENKATARAMAN, L. V. Production and utilization of the blue-green alga *Spirulina* in India. **Biomass**, v. 4, n. 2, p. 105-125, 1984.

BELASCO, W. Algae burgers for a hungry world ? The rise and fall of *Chlorella* cuisine. **Technology and culture**, 1997.

BEN OUADA, S.; BEM ALI, R.; CIMETIERE, N.; LEBOULANGER, C.; BEN OUADA, H.; SAVADI, S. Biodegradation of diclofenac by two green microalgae: *Picocystis* sp. and *Graesiella* sp. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 186, n. September, p. 109769, 2019.

BERNARDO, A. C.; EDUCAÇÃO, P. D. P. TICs & EaD em Foco. São Luís, v.3 n. especial, mar. 2017. 2017.

BHARDWAJ, D.; ANSARI, M. W.; SAHOO, R. K.; TUTEJA, N. Biofertilizers function as key player in sustainable agriculture by improving soil fertility, plant tolerance and crop productivity. **Microbial Cell Factories**, v. 13, n. 1, p. 1-10, 2014.

BHUPATIRAJU, S.; NOMALER, O.; TRIULZI, G. VERSPAGEN, B. Knowledge flows - Analyzing the core literature of innovation, entrepreneurship and science and technology studies. **Research Policy**, v. 41, n. 7, p. 1205-1218, 2012.

BI, R.; ZENG, X.; MU, L.; HOU, L.; LIU, W.; LI, P.; CHEN, H.; LI, D.; BOUCHEZ, A.; TANG, J.; XIE, L. Sensitivities of seven algal species to triclosan, fluoxetine and their mixtures. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1-10, 2018.

BISCHOFF, H. W.; BOLD, H. C. **Some soil algae from enchanted rock and related algal species**. [s.l.] Koeltz, 1963.

BLIGH, E.G. AND DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, n. 8, 1959.

BOROWITZKA, M. A.; SIVA, C. J. The taxonomy of the genus *Dunaliella* (Chlorophyta, Dunaliellales) with emphasis on the marine and halophilic species. **Journal of Applied Phycology**, v. 19, n. 5, p. 567-590, 2007.

BRACHER, E. H.; PAULA, A.; CASSURIAGA, A.; NUNES, G. B.; ARRUDA, A.; ALBERTO, J. Perfil de crescimento das microalgas *Chlorella minutissima* e *Spirulina* sp. LEB 18 utilizando soro de leite como fonte de carbono. v. 55, p. 8-11, 2015.

BRAGA, M. V. DA C.; CUNHA, P.; DERNER, R. B.; OHSE, S.; SANTOS, M. E.; OZÓRIO, R. A.; LAMARCA, C. P. Crescimento de microalgas em sistema autotrófico estacionário. **Biotemas**, v. 21, n. 2, p. 7-18, 2013.

BRASIL, B. DOS S. A. F.; COSTA, L. Agroenergia em revista: microalgas. **Embrapa Agroenergia-Outras publicações técnicas (Infoteca-e)**, v. 10, 2016.

CAAMAÑO, E. C. **Efecto tóxico de un herbicida frecuente en Galicia sobre una microalga dulceacuícola** Universidad de Coruña. [s.l: s.n.].

CABRERA, L.; COSTA, F. P.; PRIMEL, E. G. Estimativa de risco de contaminação das águas por pesticidas na Região Sul do Estado do RS. **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 1982-1986, 2008.

CAMPOS, M. M. DE C. Estudo da remoção e toxicidade dos pesticidas atrazina e oxifluorfem pela cianobactéria *Microcystis Novacekii* em condições de cultivo. **Ciências Farmacêuticas**, 2009.

CARVALHO, F. P. Pesticides, environment, and food safety. **Food and Energy Security**, v. 6, n. 2, p. 48-60, 2017.

CASSURIAGA, A. P. A.; MORAIS, E. G.; FREITAS, B.C.; COSTA, J. A. V. Cultivo de *Spirulina* sp. leb 18 em fotobiorreator tubular horizontal para biofixação de CO<sub>2</sub>. v. 2, p. 763-770, 2015.

CEDENO, M.; YEPEZ TAMAYO, L. D.; RAMIREZ-CARDENAS, L. Processing a beverage using by-products of the dairy industry. **Enfoque UTE**, v. 9, n. 2, p. 59-69, 2018.

CHANDRA, R.; VENKATA MOHAN, S. Microalgal community and their growth conditions influence biohydrogen production during integration of dark-fermentation and photo-fermentation processes. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 36, n. 19, p. 12211-12219, 2011.

CHARLOT, B. Educação e Globalização: uma tentativa de colocar ordem no debate. **Sísifo**, v. 4, p. 129-136, 2007.

CHAVES, M. DE J. S. Validação de método analítico para determinação de 2,4-D em água natural superficial e avaliação da toxicidade deste herbicida e seu principal metabólito, 2017.

CHEN, C. **The CiteSpace Manual**. [s.l: s.n.].

CHEN, C. Manual do CiteSpace. **College of Computing and Informatics Drexel -- Drexel University**, n. 2014, p. 94, 2014.

CHEN, C.; DUBIN, R.; KIM, M. C. Emerging trends and new developments in regenerative medicine: a scientometric update (2000 - 2014). **Expert Opinion on Biological Therapy**, v. 14, n. 9, p. 1295-1317, 2014.

CHEN, G. Q.; CHEN, F. Growing phototrophic cells without light. **Biotechnology Letters**, v. 28, n. 9, p. 607-616, 2006.

CHEN, H.; QIU, T.; RONG, J.; HE, C.; WANG, Q. Microalgal biofuel revisited: An informatics-based analysis of developments to date and future prospects. **Applied Energy**, v. 155, p. 585-598, 2015.

CHEN, L.; LIU, T.; ZHANG, W.; CHEN, X.; WANG, J. Biodiesel production from algae oil high in free fatty acids by two-step catalytic conversion. **Bioresource Technology**, v. 111, p. 208-214, 2012.

CHEN, S. S.; SUN, Y.; TSANG, D. C. W.; GRAHAM, N. J. D.; OK, Y. S.; FENG, Y.; LI, X. D. Potential impact of flowback water from hydraulic fracturing on agricultural soil quality: Metal/metalloid bioaccessibility, Microtox bioassay, and enzyme activities. **Science of the Total Environment**, v. 579, p. 1419-1426, 2017.

CHINALIA, A. F.; REGALI-SELEGHIN, M. H.; CORREA, E. M. 2,4-D Toxicity : Cause , Effect and Control. **Terrestrial and Aquatic Environmental Toxicology**, v. 1, n. 2, p. 24-33, 2007.

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

CHO, C. W.; PHAM, T. P. T.; JEON, Y. C.; VIJAYARAGHAVAN, K.; CHOE, W. S.; YUN, Y. S. Toxicity of imidazolium salt with anion bromide to a phytoplankton *Selenastrum capricornutum*: Effect of alkyl-chain length. **Chemosphere**, v. 69, n. 6, p. 1003-1007, 2007.

CHO, C. W.; PHAM, T. P. T.; KIM, S.; KIM, Y. R.; JEON, Y. C.; YUN, Y. S. Toxicity assessment of common organic solvents using a biosensor based on algal photosynthetic activity measurement. **Journal of Applied Phycology**, v. 21, n. 6, p. 683-689, 2009.

CHOI, H. J. Dairy wastewater treatment using microalgae for potential biodiesel application. **Environmental Engineering Research**, v. 21, n. 4, p. 393-400, 2016.

CHOIX, F. J.; DE-BASHAN, L. E.; BASHAN, Y. Enhanced accumulation of starch and total carbohydrates in alginate-immobilized *Chlorella* spp. induced by *Azospirillum brasilense*: II. Heterotrophic conditions. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 51, n. 5, p. 300-309, 2012.

## C

HOJNACKA, K.; MARQUEZ-ROCHA, F.-J. Kinetic and Stoichiometric Relationships of the Energy and Carbon Metabolism in the Culture of Microalgae. p. 21-34, 2004.

CHRISTENSON, L.; SIMS, R. Production and harvesting of microalgae for wastewater treatment, biofuels, and bioproducts. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 6, p. 686-702, 2011.

COSTA, C. R.; OLIVI, P.; BOTTA, C. M. R.; ESPINDOLA, E. L. G. A toxicidade em ambientes aquáticos: Discussão e métodos de avaliação. **Quimica Nova**, v. 31, n. 7, p. 1820-1830, 2008.

COSTA, J. A. V.; COLLA, L. M.; FILHO, P. D.; KABKE, K.; WEBER, A. Modelling of *Spirulina platensis* growth in fresh water using response surface methodology. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 18, n. 7, p. 603-607, 2002.

COUDERCHET, M.; SCHMALFUSS, J.; BOGER, P. A specific and sensitive assay to quantify the herbicidal activity of chloroacetamides. **Pesticide Science**, v. 52, n. 4, p. 381-387, 1998.

CRUCIANI, D. E.; BAPTISTA, G. C.; CHRISTOFFOLETI, P. J.; MINAMI, K. Comportamento de herbicida em solo de várzea com drenagem subterrânea. **Scientia Agricola**, v. 53, p. 316-323, 1996.

CUI, Y.; LIU, Y.; MOU, J. Bibliometric analysis of organisational culture using CiteSpace. **South African Journal of Economic and Management Sciences**, v. 21, n. 1, p. 1-12, 2018.

D'AQUINO-ROSA, V. A.; ANDRADE, S. V. Efeito do roundup sobre culturas mistas de microalgas. **Biotemas**, p. 87-99, 1995.

DAL MAGRO, C.; DEON, M. C.; THOMÉ, A.; PICCIN, J. S.; COLLA, L. M. Biossorção passiva de cromo (VI) através da microalga *Spirulina platensis*. **Química Nova**, v. 36, n. 8, p. 1139-1145, 2013.

DE ALMEIDA, K. N.; ALVIM, T. C.; SOUZA, A. R. M.; LACERDA, G. E.; ALVIM, F. A. K. S.; ALVIM, J. C. Hidrólise enzimática da Lactose de permeado de soro. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 70, n. 2, p. 55, 2015.

DE CAMPOS, E. A. R.; PAGANI, R. N.; RESENDE, L. M.; PONTES, J. Construction and qualitative assessment of a bibliographic portfolio using the methodology Methodi Ordinatio. **Scientometrics**, v. 116, n. 2, p. 815-842, 2018.

DE MEDEIROS, D. C.; DE LIMA, B. A. B.; BARBOSA, M. R.; DOS ANJOS, R. S. B.; BORGES, R. D.; NETO, J. G. C.; MARQUES, L. F. Produção de mudas de alface com biofertilizantes e substratos. **Horticultura Brasileira**, v. 25, n. 3, p. 433-436, 2007.

DE MELO, R. G.; DE ANDRADE, A. F.; BEZERRA, R. P.; CORREIA, D. S.; DE SOUZA, V. C.; BRASILEIRO-VIDAL, A. C.; VIANA MARQUES, D. A.; FIGUEIREDO PORTO, A. L. *Chlorella vulgaris* mixotrophic growth enhanced biomass productivity and reduced toxicity from agro-industrial by-products. **Chemosphere**, v. 204, p. 344-350, 2018.

DE MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. Perfil de ácidos graxos de microalgas cultivadas com dióxido de carbono. **Ciencia e Agrotecnologia**, v. 32, n. 4, p. 1245-1251, 2008.

DĘBOWSKI, M.; ZIELINSKI, M.; GRALA, A.; DUDEK, M. Algae biomass as an alternative substrate in biogas production technologies - Review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 27, p. 596-604, 2013.

DENG, L.; SENSEMAN, S. A.; GENTRY, T. J.; ZUBERER, D. A.; CAMARGO, E. R.; WEISS, T.; DEVARENNE, T. P. Effect of selected herbicides on growth and lipid content of *Nannochloris oculata*. **Journal of Aquatic Plant Management**, v. 53, p. 28-35, 2015.

DERNER, R. B.; OHSE, S.; MAURÍCIO, V.; CARVALHO, S. M.; FETT, R. Microalgae , products and applications. **Ciência Rural**, v. 36, n. 6, p. 1959-1967, 2006.



DERNER, R. B. Efeito de fontes de Carbono no crescimento e na composição bioquímica das microalgas *Chaetoceros muelleri* e *Thalassiosira fluviatilis*, com ênfase no teor de ácidos graxos poliinsaturados. p. 158, 2006.

DIAS, G.; HIPÓLITO, M.; SANTOS, F.; LOUREGA, R.; MATTIA, J.; FICHLER, P.; ALVES, J. Biorremediação de efluentes por meio da aplicação de microalgas - Uma revisão. **Química Nova**, v. 42, n. 8, p. 891-899, 2019.

DINIS, M. A.; MONTEIRO, Á.; BOAVENTURA, R. Tratamento de águas residuais: o papel das microalgas. **Revista da Faculdade de Ciência e Tecnologia**, v. 1, 2004.

DOMINGUES, M. R.; BERNARDI, M. R.; YURIE, E.; ONO, S.; ONO, M. A. Agrotóxicos : Risco à Saúde do Trabalhador Rural Pesticides : Risk to Rural Worker Health. **Seminário:ciencias biológicas e da saude**, v. 25, p. 45-54, 2004.

DONLEY, N. The USA lags behind other agricultural nations in banning harmful pesticides. **Environmental Health: A Global Access Science Source**, v. 18, n. 1, p. 1-12, 2019.

DOS SANTOS, G. C. G.; RODELLA, A. A. Efeito da adição de fontes de matéria orgânica como amenizantes do efeito tóxico de B, Zn, Cu, Mn e Pb no cultivo de *Brassica juncea*. **Revista Brasileira de Ciencia do Solo**, v. 31, n. 4, p. 793-804, 2007.

DOW AGROSCIENCES. Ficha de Informação de Segurança de Produto Químico - FISPQ Ficha de Informação de Segurança de Produto Químico - FISPQ. 2014.

DU, Y.; YE, J.; WU, L.; YANG, C.; WANG, L.; HU, X. Physiological effects and toxin release in *Microcystis aeruginosa* and *Microcystis viridis* exposed to herbicide fenoxaprop-p-ethyl. **Environmental Science And Pollution Research**, v. 24, n. 8, p. 7752-7763, mar. 2017.

DUBELMAN, A. M.; SOLSTEN, T. R.; FUJIWARA, H.; MEHRSHEIKH, A. Metabolism of Halosulfuron-methyl by Corn and Wheat. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 6, p. 2314-2321, 1997.

EBENEZER, V.; KI, J.-S. Quantification of toxic effects of the herbicide metolachlor on marine microalgae *Ditylum brightwellii* (Bacillariophyceae), *Prorocentrum minimum* (Dinophyceae), and *Tetraselmis suecica* (Chlorophyceae). **Journal of Microbiology**, v. 51, n. 1, p. 136-139, 2013.

EBENEZER, V.; KI, J. S. Quantification of toxic effects of the organochlorine insecticide endosulfan on marine green algae, diatom and dinoflagellate. **Indian Journal of Marine Sciences**, v. 43, n. 3, p. 393-399, 2014.

ECK, V.; WALTMAN. **VOSviewer**. Disponível em: <<https://www.vosviewer.com/>>. Acesso em: 16 jan. 2020.

EHIMEN, E. A.; SUN, Z.F.; CARRINGTON, C. G.; BIRCH, E. J.; EATON-RYE, J. J. Anaerobic digestion of microalgae residues resulting from the biodiesel production process. **Applied Energy**, v. 88, n. 10, p. 3454-3463, 2011.

EL-MASHAD, H. M. Kinetics of methane production from the codigestion of switchgrass and *Spirulina platensis* algae. **Bioresource Technology**, v. 132, p. 305-312, 2013.

ERIKSEN, N. T. The technology of microalgal culturing. **Biotechnology Letters**, v. 30, n. 9, p. 1525-1536, 2008.

ESPERANZA, M.; SEOANE, M.; RIOBOO, C.; HERRERO, C.; CID, A. Early alterations on photosynthesis-related parameters in *Chlamydomonas reinhardtii* cells exposed to atrazine: A multiple approach study. **Science Of The Total Environment**, v. 554, p. 237-245, jun. 2016.

ESPINOSA-GONZALEZ, I.; PARASHAR, A.; BRESSLER, D. C. Heterotrophic growth and lipid accumulation of *Chlorella protothecoides* in whey permeate, a dairy by-product stream, for biofuel production. **Bioresource Technology**, v. 155, p. 170-176, mar. 2014.

ESTEVEZ, F. D. A. Fundamentos de Limnologia. **Interface**, n. 2, p. 226, 1988.

EVANS, L. et al. Effect of organic carbon enrichment on the treatment efficiency of primary settled wastewater by *Chlorella vulgaris*. **Algal Research**, v. 24, n. May, p. 368-377, 2017.

FAIRCHILD, J. F.; RUESSLER, D. S.; CARLSON, A. R. Comparative sensitivity of five species of macrophytes and six species of algae to atrazine, metribuzin, alachlor, and metolachlor. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 17, n. 9, p. 1830-1834, 1998.

FALAGAS, M. E.; PITSOUNI, E. I.; MALIETZIS, G. A.; PAPPAS, G. Comparison of PubMed, Scopus, Web of Science, and Google Scholar: strengths and weaknesses. **The FASEB Journal**, v. 22, n. 2, p. 338-342, fev. 2008.

FAO. FAO Statistical Yearbook 2013: PART 2 Hunger dimensions. 2013.

FAO. **Strengthening the enabling environment for food security and nutrition.** [s.l: s.n.].

FAO. **FAO.** Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#home>>. Acesso em: 20 de dezembro de 2019.

FARASAT, M.; KHAVARI- NEJAD, R. A.; NABAVI, S. M. B.; NAMJOOYAN, F. Antioxidant properties of some filamentous green algae (Chaetomorpha Genus). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 56, n. 6, p. 921-927, 2013.

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

FAY, P. **The Blue-greens: (cyanophyta-cyanobacteria).** [s.l.] E. Arnold, 1983.

FERREIRA, S. P.; SOARES, L. DE S.; COSTA, J. A. V. Revisão: microalgas: uma fonte alternativa na obtenção de ácidos gordos essenciais Review: microalgae: an alternative source to obtain essential fatty acids. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 36, n. 3, p. 275-287, 2013.

FONTENOT, Q.; BONVILLAIN, C.; KILGEN, M.; BOOPATHY, R. Effects of temperature, salinity, and carbon: nitrogen ratio on sequencing batch reactor treating shrimp aquaculture wastewater. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 9, p. 1700-1703, 2007.

FORLANI, G.; PAVAN, M.; GRAMEK, M.; KAFARSKI, P.; LIPOK, J. Biochemical bases for a widespread tolerance of cyanobacteria to the phosphonate herbicide glyphosate. **Plant and Cell Physiology**, v. 49, n. 3, p. 443-456, 2008.

FRANCISCO, É. C.; FRANCO, T. T.; WAGNER, R.; JACOB-LOPES, E. Assessment of different carbohydrates as exogenous carbon source in cultivation of cyanobacteria. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 37, n. 8, p. 1497-1505, 2014.

FRANCO, H. A.; FILHO, S. T.; PÉREZ, D. V.; MAQUES, M. R. C. Avaliação do potencial de impacto do lixiviado de aterro sanitário sobre organismos aquáticos. **Gaia Scientia**, v. 12, n. 3, p. 109-116, 2018.

GAI, C.; ZHANG, Y.; CHEN, W. T.; ZHANG, P.; DONG, Y. An investigation of reaction pathways of hydrothermal liquefaction using *Chlorella pyrenoidosa* and *Spirulina platensis*. **Energy Conversion and Management**, v. 96, p. 330-339, 2015.

GAO, Q. T.; TAM, N. F. Y. Growth, photosynthesis and antioxidant responses of two microalgal species, *Chlorella vulgaris* and *Selenastrum capricornutum*, to nonylphenol stress. **Chemosphere**, v. 82, n. 3, p. 346-354, 2011.

GARCIA, J. C.; DE SOUZA, F. T. K. F.; PALÁCIO, S. M.; AMBRÓSIO, E.; SOUZA, M. T. F.; SANTOS, L. B.; DE CINQUE, A. V.; DE SOUZA, N. E. Toxicity assessment of textile effluents treated by advanced oxidative process (UV/TiO<sub>2</sub> and UV/TiO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) in the species *Artemia salina* L. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 185, n. 3, p. 2179-2187, 2013.

GASPAR, R.; PEREIRA, L.; NETO, J. M. Ecological reference conditions and quality states of marine macroalgae sensu Water Framework Directive: An example from the intertidal rocky shores of the Portuguese coastal waters. **Ecological Indicators**, v. 19, p. 24-38, 2012.

GE, H.; LIN, Z.; YAO, Z.; GAO, Y.; CONG, Y.; YU, H. Balance between herbicidal activity and toxicity effect: A case study of the joint effects of triazine and phenylurea herbicides on *Selenastrum capricornutum* and *Photobacterium phosphoreum*. **Aquatic Toxicology**, v. 150, p. 165-174, 2014.

GEORGE, B.; PANCHA, I.; DESAI, C.; CHOKSHI, K.; PALIWAL, C.; GHOSH, T.; MISHRA, S. Effects of different media composition, light intensity and photoperiod on morphology and physiology of freshwater microalgae *Ankistrodesmus falcatus* - A potential strain for bio-fuel production. **Bioresource Technology**, v. 171, p. 367-374, 2014.

GEORGIANNA, D.; MAYFIELD, S. P. Exploiting diversity and synthetic biology for the production of algal biofuels. **Nature**, v. 488, n. 7411, p. 329-335, 2012.  
GIRARD, J.-M. et al. Mixotrophic cultivation of green microalgae *Scenedesmus obliquus* on cheese whey permeate for biodiesel production. **Algal Research-Biomass Biofuels And Bioproducts**, v. 5, p. 241-248, jul. 2014.

GONZÁLEZ SISO, M. I. The biotechnological utilization of cheese whey: A review. **Bioresource Technology**, v. 57, n. 1, p. 1-11, 1996.

GÖTZ, T.; BÖGER, P. The very-long-chain fatty acid synthase is inhibited by chloroacetamides. **Zeitschrift für Naturforschung - Section C Journal of Biosciences**, v. 59, n. 7-8, p. 549-553, 2004.

GUILLARD, R. L. **Culture of marine invertebrate animals**. [s.l: s.n.].

HARRINGTON, L.; FABRICIUS, K.; EAGLESHAM, G.; NEGRI, A. Synergistic effects of diuron and sedimentation on photosynthesis and survival of crustose coralline algae. **Marine Pollution Bulletin**, v. 51, n. 1-4, p. 415-427, 2005.

HARUN, R.; SINGH, M.; FORDE, G. M.; DANQUAH, M. K. Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 3, p. 1037-1047, 2010.

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

HEREDIA-ARROYO, T.; WEI, W.; RUAN, R.; HU, B. Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* and its potential application for the oil accumulation from non-sugar materials. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, n. 5, p. 2245-2253, 2011.

HILL, J.; NELSON, E.; TILMAN, D.; POLASKY, S.; TIFFANY, D. Environmental, economic, and energetic costs and benefits of biodiesel and ethanol biofuels. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 30, p. 11206-11210, 2006.

HIRSCH, J. E. An index to quantify an individual 's scientific research output. v. 102, n. 46, p. 16569-16572, 2005.

HOEK, C. VAN DEN; MANN, D. G.; JAHNS, H. M. **Algae: An Introduction to Phycology**. [s.l.] Cambridge University Press, 1995.

HOFFMANN, J. P. Wastewater treatment with suspended and nonsuspended algae. **Journal of Phycology**, v. 34, n. 5, p. 757-763, 1998.

HUANG, M. L.; HUNG, Y. H.; YANG, Z. S. Validation of a method using Taguchi, response surface, neural network, and genetic algorithm. **Measurement: Journal of the International Measurement Confederation**, v. 94, p. 284-294, 2016.

HUNDT, K.; REDDY, B. V. Algal biodiesel production from power plant exhaust and its potential to replace petrodiesel and reduce greenhouse gas emissions. **International Journal of Low-Carbon Technologies**, v. 6, n. 4, p. 294-298, 2011.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos** Instituto Adolfo Lutz. São Paulo: [s.n.].

IP, P. F.; WONG, K. H.; CHEN, F. Enhanced production of astaxanthin by the green microalga *Chlorella zofingiensis* in mixotrophic culture. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 11, p. 1761-1766, 2004.

IQBAL, M. Vicia faba bioassay for environmental toxicity monitoring: A review. **Chemosphere**, v. 144, p. 785-802, 2016.

IQBAL, M. et al. Mutagenicity and cytotoxicity evaluation of photo-catalytically treated petroleum refinery wastewater using an array of bioassays. **Chemosphere**, v. 168, p. 590-598, 2017.

IRIEL, A.; NOVO, J. M.; CORDON, G. B.; LAGORIO, M. G. Atrazine and Methyl Viologen Effects on Chlorophyll-a Fluorescence Revisited-Implications in Photosystems Emission and Ecotoxicity Assessment. **Photochemistry And Photobiology**, v. 90, n. 1, p. 107-112, jan. 2014.

IUMMATO, M. M.; FASSIANO, A.; GRAZIANO, M.; DOS SANTOS, A. M.; DEL CARMEN RÍOS DE MOLINA, M.; JUÁREZ, Á. B. Effect of glyphosate on the growth, morphology, ultrastructure and metabolism of *Scenedesmus vacuolatus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 172, p. 471-479, 2019.

JARDIM, I. C. S. F.; DE ALMEIDA ANDRADE, J.; DE QUEIROZ, S. C. D. N. Resíduos de agrotóxicos em alimentos: uma preocupação ambiental global - um enfoque às maçãs. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 996-1012, 2009.

JOHN, R. P.; ANISHA, G. S.; NAMPOOTHIRI, K. M.; PANDEY, A. Micro and macroalgal biomass: A renewable source for bioethanol. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 1, p. 186-193, 2011.

KANG, Z.; KIM, B. H.; RAMANAN, R.; CHOI, J. E.; YANG, J. W.; OH, H. M.; KIM, H. S. A cost analysis of microalgal biomass and biodiesel production in open raceways treating municipal wastewater and under optimum light wavelength. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, n. 1, p. 109-118, 2015.

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

KEENAN, R. J.; REAMS, G. A.; ACHARD, F.; DE FREITAS, J. V.; GRAINGER, A.; LINDQUIST, E. Dynamics of global forest area: Results from the FAO Global Forest Resources Assessment 2015. **Forest Ecology and Management**, v. 352, p. 9-20, 2015.

KEYMER, P.; RUFFELL, I. PRATT, S.; LANT, P. High pressure thermal hydrolysis as pre-treatment to increase the methane yield during anaerobic digestion of microalgae. **Bioresource Technology**, v. 131, p. 128-133, 2013.

KIM, J.; LINGARAJU, B. P.; RHEAUME, R.; LEE, J. Y.; SIDDIQUI, K. F. Removal of ammonia from wastewater effluent by *Chlorella vulgaris*. **Tsinghua Science and Technology**, v. 15, n. 4, p. 391-396, 2010.

KLAASSEN, C.; WATKINS, J. **Essentials of Toxicology**. [s.l: s.n.].

KLEIN, B. C.; BONOMI, A.; FILHO, R. M. Integration of microalgae production with industrial biofuel facilities: A critical review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 82, n. June 2017, p. 1376-1392, 2018.

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

KOLLER, M.; MUHR, A.; BRAUNEGG, G. Microalgae as versatile cellular factories for valued products. **Algal Research**, v. 6, p. 52-63, 1 out. 2014.

KUMARI, R.; KAUR, I.; BHATNAGAR, A. K. Effect of aqueous extract of *Sargassum johnstonii* Setchell & Gardner on growth, yield and quality of *Lycopersicon esculentum* Mill. **Journal of Applied Phycology**, v. 23, n. 3, SI, p. 623-633, jun. 2011.

KUMSIRI, B.; PEKKOH, J.; PATHROM-AREE, W.; LUMYONG, S.; PUMAS, C. Synergistic effect of co-culture of microalga and actinomycete in diluted chicken manure digestate for lipid production. **Algal Research**, v. 33, n. May, p. 239-247, 2018.

KWIETNIEWSKA, E.; TYS, J. Process characteristics, inhibition factors and methane yields of anaerobic digestion process, with particular focus on microalgal biomass fermentation. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 34, p. 491-500, 2014.

KYRIAKOPOULOU, K.; ANASTASIADOU, P.; MACHERA, K. Comparative toxicities of fungicide and herbicide formulations on freshwater and marine species. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 82, n. 3, p. 290-295, 2009.

LACERDA, L. M. C. F. Otimização de sistemas de microalgas para mitigação de dióxido de carbono e produção de biodiesel. p. 260, 2013.

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

LEE, Y. K. Microalgal mass culture systems and methods: Their limitation and potential. **Journal of Applied Phycology**, v. 13, n. 4, p. 307-315, 2001.

LEMOS, J. DE S. **Desenvolvimento de sistema de tratamento e reciclagem de meio de cultivo de microalgas para produção de biodiesel**. [s.l.: s.n.].

LENCASTRE, K. G. S. DA S. Mapeamento Da Produção De Soro De Queijo No Estado Do Rio De Janeiro: Potencial Para Produção De Etanol. 2012.

LI, Y.; ZHOU, W.; HU, B.; MIN, M.; CHEN, P.; RUAN, R. R. Integration of algae cultivation as biodiesel production feedstock with municipal wastewater treatment: Strains screening and significance evaluation of environmental factors. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 23, p. 10861-10867, 2011.

LIANG, Y.; SARKANY, N.; CUI, Y. Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. **Biotechnology Letters**, v. 31, n. 7, p. 1043-1049, 2009.

LIU, J.; HUANG, J.; FAN, K. W.; JIANG, Y.; ZHONG, Y.; SUN, Z.; CHEN, F. Production potential of *Chlorella zofingienensis* as a feedstock for biodiesel. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 22, p. 8658-8663, 2010.

LOPES, E. J. **Sequestro de dióxido de carbono e fotobiorreatores**, 2007.



LORENTE, C.; CAUSAPÉ, J.; GLUD, R. N.; HANCKE, K.; MERCHÁN, D.; MUÑIZ, S.; VAL, J.; NAVARRO, E. Impacts of agricultural irrigation on nearby freshwater ecosystems: The seasonal influence of triazine herbicides in benthic algal communities. **Science of the Total Environment**, v. 503-504, p. 151-158, 2015.

LUCAS, W. J. Photosynthetic Fixation of <sup>14</sup>Carbon by Internodal Cells of Chara corallina. **Journal of Experimental Botany**, v. 26, n. 3, p. 331-346, 1975.

LUCAS, W. J. Alkaline Band Formation in Chara corallina. **Plant Physiology**, v. 63, n. 2, p. 248-254, 1979.

MA, J.; ZHENG, R.; XU, L.; WANG, S. Differential sensitivity of two green algae, Scenedesmus obliquus and Chlorella pyrenoidosa, to 12 pesticides. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 52, n. 1, p. 57-61, 2002.

MACHADO, M. D.; SOARES, E. V. Sensitivity of freshwater and marine green algae to three compounds of emerging concern. **Journal of Applied Phycology**, v. 31, n. 1, p. 399-408, 2019.

MACIAS-CHAPULA, C. A. O papel da informetria e da cienciometria e sua perspectiva nacional e internacional. **Ciência da Informação**, v. 27, n. 2, p. nd-nd, 1998.

MAGALHÃES, D. DE P.; FILHO, A. DA S. F. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. In: **Oecologia Brasiliensis**. [s.l: s.n.]. v. 12p. 355-381.

MAGDOULI, S.; BRAR, S. K.; BLAIS, J. F. Co-culture for lipid production: Advances and challenges. **Biomass and Bioenergy**, v. 92, p. 20-30, 2016.

MALLICK, N. Biotechnological potential of immobilized algae for wastewater N, P and metal removal: A review. **BioMetals**, v. 15, n. 4, p. 377-390, 2002.

MANIRAKIZA, P.; COVACI, A.; SCHEPENS, P. Comparative Study on Total Lipid Determination using Soxhlet, Roese-Gottlieb, Bligh & Dyer, and Modified Bligh & Dyer Extraction Methods. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 14, n. 1, p. 93-100, 2001.

MANZO, S.; MIGLIETTA, M. L.; RAMETTA, G.; BUONO, S.; DI FRANCIA, G. Toxic effects of ZnO nanoparticles towards marine algae *Dunaliella tertiolecta*. **Science of the Total Environment**, v. 445-446, p. 371-376, 2013.

MAPA, A. Jaguar ®. p. 1-14, 2017.

MARIANO, A. P. De Solos E De Águas Subterrâneas Contaminados. 2006.

MARKOU, G.; GEORGAKAKIS, D. Cultivation of filamentous cyanobacteria (blue-green algae) in agro-industrial wastes and wastewaters: A review. **Applied Energy**, v. 88, n. 10, p. 3389-3401, 2011.

MAROUBO, L. A.; CAVIGLIONE, J. H.; ANDRADE, D. DE S. A temperatura do cultivo altera a produção de microalgas: o potencial de produção de bioenergia no Paraná. **Fortalecendo as Parcerias Sul-Sul**, p. 277, 2016.

MARQUES, F. **Produção científica acessível**. Disponível em: <<https://revistapesquisa.fapesp.br/2017/09/22/producao-cientifica-acessivel/>>. Acesso em: 18 dez. 2019.

MARQUES, P. A. A.; BALDOTTO, P. V.; SANTOS, A. C. P.; OLIVEIRA, L. Qualidade de mudas de alface formadas em bandejas de isopor com diferentes números de células. **Horticultura Brasileira**, v. 21, n. 4, p. 649-651, 2003.

MARTÍN-MARTÍN, A.; ORDUNA-MALEA, E.; THELWALL, M.; DELGADO LÓPEZ-CÓZAR, E. Google Scholar, Web of Science, and Scopus: A systematic comparison of citations in 252 subject categories. **Journal of Informetrics**, v. 12, n. 4, p. 1160-1177, 2018.

MARTÍNEZ-RUIZ, E. B.; MARTÍNEZ-JERÓNIMO, F. Nickel has biochemical, physiological, and structural effects on the green microalga *Ankistrodesmus falcatus*: An integrative study. **Aquatic Toxicology**, v. 169, p. 27-36, 2015.

MARTÍNEZ-RUIZ, E. B.; MARTÍNEZ-JERÓNIMO, F. Exposure to the herbicide 2,4-D produces different toxic effects in two different phytoplankters: A green microalga (*Ankistrodesmus falcatus*) and a toxigenic cyanobacterium (*Microcystis aeruginosa*). **Science of the Total Environment**, v. 619-620, p. 1566-1578, 2018.

MARTINS, J.; OLIVA TELES, L.; VASCONCELOS, V. Assays with *Daphnia magna* and *Danio rerio* as alert systems in aquatic toxicology. **Environment International**, v. 33, n. 3, p. 414-425, 2007.

MARTINS, P. R. **Trajetórias Tecnológicas e Meio Ambiente: A indústria de Agroquímicos/Transgênicos no Brasil**, 2000.

MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 1, p. 217-232, 2010.

MAYO, A. W.; NOIKE, T. Response of mixed cultures of *Chlorella vulgaris* and heterotrophic bacteria to variation of pH. **Wat. Sci. Tech**, v. 30, n. 285-294, 1994.

MIAO, M. S.; YAO, X. D.; SHU, L.; YAN, Y. J.; WANG, Z.; LI, N.; CUI, X. T.; LIN, Y. M.; KONG, Q. Mixotrophic growth and biochemical analysis of *Chlorella vulgaris* cultivated with synthetic domestic wastewater. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 113, p. 120-125, 2016.

MIERZEJEWSKA, E.; BARAN, A.; URBANIAK, M. Biodegradation Potential and Ecotoxicity Assessment in Soil Extracts Amended with Phenoxy Acid Herbicide (2,4-D) and a Structurally-Similar Plant Secondary Metabolite (Ferulic Acid). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, 2019.

MILLER, A.; COLMAN, B. Evidence for HC03- Transport by the Blue-Green Alga (Cyanobacterium) *Coccochloris peniocystis*'. **Plant Physiol**, p. 397-402, 1980.

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

MOHAMMAD MIRZAIE, M. A.; KALBASI, M.; GHOBADIAN, B.; MOUSAVI, S. M. Kinetic modeling of mixotrophic growth of *Chlorella vulgaris* as a new feedstock for biolubricant. **Journal of Applied Phycology**, v. 28, n. 5, p. 2707-2717, 2016.

MOLLEA, C.; MARMO, L.; BOSCO, F. Valorisation of Cheese Whey, a By-Product from the Dairy Industry. **Food Industry**, 2013.

MONTEIRO, M. D. A.; FERNANDES, C. **Processos de Biorremediação Diana Aurora Moreira Monteiro**. [s.l.] Escola Superior de Tecnologia e Gestão do Instituto Politécnico de Bragança, 2014.

MOSTAFA, S. S. M.; SHALABY, E. A.; MAHMOUD, G. I. Cultivating Microalgae in Domestic Wastewater for Biodiesel Production. **Notulae Scientia Biologicae**, v. 4, n. 1, p. 56-65, 2012.

MOURTHÉ, K. Obtenção de biomassa de *Arthrospira platensis* (Spirulina ) utilizando do soro de leite. p. 85, 2010.

NASCIMENTO, A. P.; RODRIGUES, B.; ROQUE, B. R. F.; RISSI, C. D.; FREITAS, D.; QUIMENTÃO, F.; HONÓRIO, G.; MARTINS, J. R.; SILVA, J. H. N.; LUCCA, J.; MANZANO, M.; SILVA, M. J.; VEDOVELLO, P.; BETTANI, S. R.; RODRIGUES, S. M.; BRITO, N. N. Study of Chronic Toxicity of the Glyphosate Herbicide on Seeds of Parsley, Lettuce and Coriander / Estudo Da Toxicidade Crônica Do Herbicida Glifosato Para As Sementes De Salsa, Alface E Coentro. **Revista Brasileira de Engenharia de Biosistemas**, v. 3, n. 2, p. 149, 2009.

NGUYEN, M. A.; LINH, A.; HANOI, H. A review on microalgae and cyanobacteria in biofuel production. **Economies and finances**, p. 1-36, 2016.

NOBILE, F. Irrigação com duas qualidades de água e tipos de fertilizações no solo e em cana-de-açúcar. **Aleph**, 2009.

NUNES, L.; SANTOS, M. G. DOS. Caracterização físico-química de soros obtidos de diferentes tipos de queijo. p. 1-18, 2015.

O&APOS;GRADY, J.; MORGAN, J. A. Heterotrophic growth and lipid production of *Chlorella protothecoides* on glycerol. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 34, n. 1, p. 121-125, 2011.

OLIVEIRA, A. C. DE. Produção de biomassa de microalgas *Scenedesmus* sp. em efluente de bovinocultura biodigerido. 2013.

ONU. **ONU**. Disponível em:

<<https://www.un.org/development/desa/publications/world-population-prospects-2019-highlights.html>>.

ONU. **Pesticidas matam 200 mil pessoas por intoxicação aguda todo ano, alertam especialistas**. Disponível em: <<https://nacoesunidas.org/pesticidas-matam-200-mil-pessoas-por-intoxicacao-aguda-todo-ano-alertam-especialistas/>>. Acesso em: 15 jan. 2020.

OZMIHCI, S.; KARGI, F. Kinetics of batch ethanol fermentation of cheese-whey powder (CWP) solution as function of substrate and yeast concentrations. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 16, p. 2978-2984, 2007.

PAGANI, R. N.; KOVALESKI, J. L.; RESENDE, L. M. Methodi Ordinatio: a proposed methodology to select and rank relevant scientific papers encompassing the impact factor, number of citation, and year of publication. **Scientometrics**, v. 105, n. 3, p. 2109-2135, 2015.

PALÁCIO, S. M.; NOGUEIRA, D. A.; MANENTI, D. R.; MÓDENES, A. N.; ESPINOZA-QUIÑONES, F. R.; BORBA, F. H. Estudo Da Toxicidade De Efluente Têxtil Tratado Por Foto-Fenton Artificial Utilizando As Espécies Lactuca Sativa E Artemia Salina. **Engevista**, v. 14, n. 2, p. 127-134, 2012.

PANDEY, A. **Bioresource Technology**. Disponível em: <<https://www.journals.elsevier.com/bioresource-technology>>. Acesso em: 20 dez. 2019.

PARK, J.; BROWN, M. T.; DEPUYDT, S.; KIM, J. K.; WON, D. S.; HAN, T. Comparing the acute sensitivity of growth and photosynthetic endpoints in three Lemna species exposed to four herbicides. **Environmental Pollution**, v. 220, p. 818-827, 2017.

PARK, K. Y.; LIM, B. R.; LEE, K. Growth of microalgae in diluted process water of the animal wastewater treatment plant. **Water Science and Technology**, v. 59, n. 11, p. 2111-2116, 2009.

PASKULIAKOVA, A.; MCGOWAN, T.; TONRY, S.; TOUZET, N. Microalgal bioremediation of nitrogenous compounds in landfill leachate - The importance of micronutrient balance in the treatment of leachates of variable composition. **Algal Research**, v. 32, n. June 2017, p. 162-171, 2018.

PATIDAR, S. K.; KIM, S. H.; KIM, J. H.; PARK, J.; PARK, B. S.; HAN, M. S. Pelagibaca bermudensis promotes biofuel competence of Tetraselmis striata in a broad range of abiotic stressors: Dynamics of quorum-sensing precursors and strategic improvement in lipid productivity. **Biotechnology for Biofuels**, v. 11, n. 1, p. 1-16, 2018.

PENG, L.; NGO, H. H.; GUO, W. S.; LIU, Y.; WANG, D.; SONG, S.; WEI, W.; NGHIEM, L. D.; NI, B. J. A novel mechanistic model for nitrogen removal in algal-bacterial photo sequencing batch reactors. **Bioresource Technology**, v. 267, n. May, p. 502-509, 2018.

PERREIRA, M. I. B. Avaliação do cultivo mixotrófico da *Spirulina platensis* (*Arthrospira Platensis*) utilizando soro de queijo mozzarella de búfala como fonte de carbono orgânico. 2017.

PESCE, S.; BOUCHEZ, A.; MONTUELLE, B. **Effects of organic herbicides on phototrophic microbial communities in freshwater ecosystems**. [s.l: s.n.]. v. 2014

PETERSON, H. G.; BOUTIN, C.; MARTIN, P. A.; FREEMARK, K. E.; RUECKER, N. J.; MOODY, M. J. Aquatic phyto-toxicity of 23 pesticides applied at Expected Environmental Concentrations. **Environmental Protection**, v. 28, p. 275-292, 1994.

PILHION, R. Vers une politique européenne de l'enseignement des langues Towards a European policy for language teaching. **Revue internationale d'éducation de Sèvres**, n. 47, p. 27-35, 2008.

PIMENTEL, M. P.; SILVA-JÚNIOR, F. C. G.; SANTAELLA, S. T.; LOTUFO, L. V. C. O Uso de *Artemia* sp. como Organismo-Teste para Avaliação da Toxicidade das Águas Residuárias do Beneficiamento da Castanha de Caju Antes e Após Tratamento em Reator Biológico Experimental. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, v. 6, n. 1, p. 15-22, 2011.

PINTO, F. A.; FONSECA, L. M.; ABREU, L. R.; SOUZA, M. R.; OLIVEIRA, D. L. S.; CLEMENTINO, L. A. ANDRADE, E. H. P. Método da espectroscopia no infravermelho para análise dos soros de queijos de minas padrão e prato. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, n. 4, p. 1039-1042, 2011.

PIOVESAN, M. **Tratamento de efluentes industriais utilizando eletrofloculação com eletrodos de alumínio e ferro**. [s.l: s.n.].

PLAPPALLY, A. K.; LIENHARD V, J. H. Energy requirements for water production, treatment, end use, reclamation, and disposal. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, n. 7, p. 4818-4848, 2012.

PRADO, R. et al. Screening acute cytotoxicity biomarkers using a microalga as test organism. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 86, p. 219-226, 2012.

PRIMO, T. A. R. C., CANTO, F. Q., MONTEIRO, I. B., ABREU, T. A. M., HENRIQUE, A. S., WILLEMANN, D. P., NEVES, F. F. CULTIVO DE *Chlorella* sp. - utilização de fertilizantes agrícolas comerciais para elaboração de meios de cultura. v. 1, p. 4-5, 2015.

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

QIAN, H.; LI, J.; PAN, X.; SUN, Z.; YE, C.; JIN, G.; FU, Z. Effects of Streptomycin on Growth of Algae *Chlorella vulgaris* and *Microcystis aeruginosa*. **Far Eastern Entomologist**, 2010.

QU, R. J.; WANG, X. H.; FENG, M. B.; LI, Y.; LIU, H. X.; WANG, L. S.; WANG, Z. Y. The toxicity of cadmium to three aquatic organisms (*Photobacterium phosphoreum*, *Daphnia magna* and *Carassius auratus*) under different pH levels. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 95, p. 83-90, 2013.

RADMANN, E. M.; COSTA, J. A. V. Conteúdo lipídico e composição de ácidos graxos de microalgas expostas aos gases CO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub> e NO. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1609-1612, 2008.

RAMIREZ, N. N. V.; FARENZENA, M.; TRIERWEILER, J. O. Growth of microalgae *Scenedesmus* sp in ethanol vinasse. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 57, n. 5, p. 630-635, 2014.

RANGEL, C. DE O. **Influência da luz e ureia no crescimento e conteúdo de clorofila da biomassa de *Spirulina platensis***, 2000.

RAZERA, J. C. C. Contribuições da cienciometria para a área brasileira de Educação em Ciências. **Ciência & Educação (Bauru)**, v. 22, n. 3, p. 557-560, 2016.

RAZZAK, S. A.; ALI, S. A. M.; HOSSAIN, M. M.; DELASA, H. Biological CO<sub>2</sub> fixation with production of microalgae in wastewater - A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 76, n. February, p. 379-390, 2017.

RICHMOND, A. **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. Oxford, UK: Blackwell Publishing, 2004.

RODRIGUES, M. S. Avaliação do cultivo de *Spirulina platensis* utilizando simultaneamente nitrato de potássio e cloreto de amônio como fontes de nitrogênio. p. 149, 2008.

ROMERO, D. M.; RÍOS DE MOLINA, M. C.; JUÁREZ, Á. B. Oxidative stress induced by a commercial glyphosate formulation in a tolerant strain of *Chlorella kessleri*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, n. 4, p. 741-747, 2011.

RONCO, A. E. **Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas**. [s.l: s.n.].

SAATH, K. C. DE O.; FACHINELLO, A. L. Crescimento da Demanda Mundial de Alimentos e Restrições do Fator Terra no Brasil. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v. 56, n. 2, p. 195-212, 2018.

SAFI, C.; ZEBIB, B.; MERAH, O.; PONTALIER, P. Y.; VACA-GARCIA, C. Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 35, p. 265-278, 2014.

SAITO, I. Produção de hidrolisados e fibras a partir de resíduo da industrialização da mandioca submetido a pré-tratamento hidrotérmico. **Aleph**, 2005.

SALATI, S.; DÍMPORZANO, G.; MENIN, B.; VERONESI, D.; SCAGLIA, B.; ABBRUSCATO, P.; MARIANI, P.; ADANI, F. Mixotrophic cultivation of *Chlorella* for local protein production using agro-food by-products. **Bioresource Technology**, v. 230, p. 82-89, 2017.

SANTOS, R. DOS; KOBASHI, N. Bibliometria, cientometria, infometria: conceitos e aplicações. **Tendências da Pesquisa brasileira em Ciência da Informação**, v. 2, n. 1, p. 155-172, 2009.

SANTOS, W. J. R. DOS; FRANÇA, R. S. S. R. DE; ANSCHAU, A. Determinação espectrofotométrica dos herbicidas Jaguar e Trueno. **Congresso de Ciência e Tecnologia - UTFPR Dois Vizinhos**, 2017.

SANTOS, K. B.; SAMPAIO, T. C.S.; ARAUJO, A. B. N.; SILVA, D. C. **Análise de fitotoxicidade do herbicida glifosato (Roundup)**, 2019.

SAYGIDEGER, S. D.; OKKAY, O. Effect of 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid on growth, protein and chlorophyll-a content of *Chlorella vulgaris* and *Spirulina platensis* cells. **Journal of Environmental Biology**, v. 29, n. 2, p. 175-178, 2008.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotechnologia Industrial - Engenharia Bioquímica**. [s.l: s.n.]. v. 2

SCHMITZ, R.; MAGRO, C. D.; COLLA, L. M. Aplicações Ambientais De Microalgas. **Revista CIATEC-UPF**, v. 4, n. 1, p. 48-60, 2013.



SEMPREBOM, T. **Biofertilizantes, microalgas e o desenvolvimento em plantas terrestres**. Disponível em: <<http://profissaobiotec.com.br/biofertilizantes-microalgas-e-o-desenvolvimento-de-plantas-terrestres/>>. Acesso em: 16 nov. 2019.

SHING, W. L.; HWANG, T. Y.; YI, K. W.; HAN, L. J.; HOCK, O. G. Using the Responses of Green Algae *Spirogyra* as Bioindicator for Metals and Pesticides Pollution. **Journal Of Environmental Science And Management**, v. 21, n. 2, p. 1-6, 2018.

SILVA, A.; FIGUEIREDO, S. A.; SALES, M. G.; DELERUE-MATOS, C. Ecotoxicity tests using the green algae *Chlorella vulgaris* — A useful tool in hazardous effluents management. v. 167, p. 179-185, 2009.

SILVA, D. C. V. R. DA; POMPÊO, M.; PAIVA, T. C. B. DE. A ecotoxicologia no Contexto atual no Brasil. **Ecologia de reservatórios e interfaces**, p. 340-353, 2015.

SILVA, N. F. P. DA. Crescimento de Microalgas em Águas Residuais : Produção de Biomassa e Remoção de Nutrientes. **Dissertação (Mestrado em Engenharia do Ambiente) - Faculdade de Engenharia Universidade do Porto**, p. 86, 2014.

SILVA, R. DE O. P.; BUENO, C. R. F.; SÁ, P. B. Z. R. Aspectos relativos à produção de soro de leite no brasil, 2007-2016. **Informações Econômicas, SP**, v. 47, p. 2007-2016, 2017.

SILVA, V. P.; MOREIRA-SANTOS, M.; MATEUS, C.; TEIXEIRA, T.; RIBEIRO, R.; VIEGAS, C. A. Evaluation of *Arthrobacter aurescens* Strain TC1 as Bioaugmentation Bacterium in Soils Contaminated with the Herbicidal Substance Terbutylazine. **Plos One**, v. 10, n. 12, dez. 2015.

SILVEIRA, E. O.; MOURA, D.; RIEGER, A.; MACHADO, E. L.; LUTTERBECK, C. A. Performance of an integrated system combining microalgae and vertical flow constructed wetlands for urban wastewater treatment. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 25, p. 20469-20478, 2017.

SINCLAIR, C. J.; BOXALL, A. B. A. Assessing the ecotoxicity of pesticide transformation products. **Environmental Science and Technology**, v. 37, n. 20, p. 4617-4625, 2003.

SIVAGURUNATHAN, P.; KUMAR, G.; KOBAYASHI, T.; XU, K.; KIM, S. H.; NGUYEN, D. D.; CHANG, S. W. Co-digestion of untreated macro and microalgal biomass for biohydrogen production: Impact of inoculum augmentation and microbial insights. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 43, n. 25, p. 11484-11492, 2018.

SMALL, H.; BOYACK, K. W.; KLAVANS, R. Identifying emerging topics in science and technology. **Research Policy**, v. 43, n. 8, p. 1450-1467, 2014.

SMEDBOL, É.; GOMES, M. P.; PAQUET, S.; LABRECQUE, M.; LEPAGE, L.; LUCOTTE, M.; JUNEAU, P. Effects of low concentrations of glyphosate-based herbicide factor 540® on an agricultural stream freshwater phytoplankton community. **Chemosphere**, v. 192, p. 133-141, 2018.

SMITHERS, G. W. Whey and whey proteins-From "gutter-to-gold". **International Dairy Journal**, v. 18, n. 7, p. 695-704, 2008.

SMYTHERS, A. L.; GARMANY, A.; PERRY, N. L.; HIGGINBOTHAM, E. L.; ADKINS, P. E.; KOLLING, D. R. J. Characterizing the effect of Poast on *Chlorella vulgaris*, a non-target organism. **Chemosphere**, v. 219, p. 704-712, 2019.

SOARES, D. Avaliação do crescimento celular e da produtividade de lipídeos de microalgas marinhas em diferentes regimes de cultivo. 2010.

SOBRERO, M. C.; RONCO, A. Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga *Lactuca sativa* L. **Imta**, p. 55-67, 2004.

SOUSA, D. T. DE; NOCITI, L. A. S.; SILVA E CASTRO, L. H. Pesticides Waste in Soil Over Germination and Growth of Lettuce (*Lactuca Sativa*) and Radish (*Raphanus Sativus*). **Nucleus**, v. 11, n. 2, p. 301-306, 2014.

SPÍNOLA, M. V. Inhibición de la enzima fitoeno desaturasa y acumulación de fitoeno en microalgas : el iRNA como mecanismo de silenciamiento génico. **Files.Bartolomevazquezbernal**. ..., p. 724, 2010.

ŠPOLJARIĆ MARONIĆ, D.; STOLFA, C. I.; HORVATIC, J.; ZUNA, P. T.; STEVIC, F.; ZARKOVIC, N.; WAEG, G.; JAGANJAC, M. S-metolachlor promotes oxidative stress in green microalga *Parachlorella kessleri* - A potential environmental and health risk for higher organisms. **Science of the Total Environment**, v. 637-638, p. 41-49, 2018.

STAR, N. CONAB estimates record grain harvest for 2018/2019. 2019.

STONE, S.; ADAMS, M. S.; STAUBER, J. L.; JOLLEY, D. F.; WARNE, M. S.J. Development and application of a multispecies toxicity test with tropical freshwater microalgae. **Environmental Pollution**, v. 250, p. 97-106, 2019.

SUTTON, P.; RICHARDS, C.; BUREN, L.; GLASGOW, L. Activity of mesotrione on resistant weeds in maize. **Pest Management Science**, v. 58, n. 9, p. 981-984, 2002.

TEIXEIRA, L. V.; FONSECA, L. M. Perfil físico-químico do soro de queijos mozzarella e minas-padrão produzidos em várias regiões do estado de Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 1, p. 243-250, 2008.

TREVIÑO, I. F. **Estudios taxonómicos en algas verdes cocales del sur de España**. [s.l: s.n.]. v. 151

TSOLCHA, O. N.; TEKERLEKOPOULOU, A. G.; AKRATOS, C. S.; BELLOU, S.; AGGELIS, G.; KATSIAPI, M.; MOUSTAKA-GOUNI, M.; VAYENAS, D. V. Treatment of second cheese whey effluents using a Choricystis-based system with simultaneous lipid production. **Journal Of Chemical Technology And Biotechnology**, v. 91, n. 8, p. 2349-2359, 2016.

TUREMIS, M.; SILLETI, S.; PEZZOTTI, G.; SANCHIS, J.; FARRÉ, M.; GIARDI, M. T. Optical biosensor based on the microalga-paramecium symbiosis for improved marine monitoring. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 270, p. 424-432, 2018.

UGGETTI, E.; SIALVE, B.; LATRILLE, E.; STEYER, J. P. Anaerobic digestate as substrate for microalgae culture: The role of ammonium concentration on the microalgae productivity. **Bioresource Technology**, v. 152, p. 437-443, 2014.

UYSAL, O.; UYSAL, F. O.; EKINCI, K. Evaluation of Microalgae as Microbial Fertilizer. **European Journal of Sustainable Development**, v. 4, n. 2, p. 77-82, 2015.

VALLOTTON, N.; MOSER, D.; EGGEN, R. I. L.; JUNGHANS, M.; CHÈVRE, N. S-metolachlor pulse exposure on the alga *Scenedesmus vacuolatus*: effects during exposure and the subsequent recovery. **Chemosphere**, v. 73, n. 3, p. 395-400, 2008.

VAN ECK, N. J.; WALTMAN, L. Software survey: VOSviewer, a computer program for bibliometric mapping. **Scientometrics**, v. 84, n. 2, p. 523-538, 2010.

VAN ECK, N. J.; WALTMAN, L. VOSviewer Manual - version 1.6.8. n. April, p. 1-51, 2018.

VASCONCELOS, Y. **Pesticides in the balance**. Disponível em: <<https://revistapesquisa.fapesp.br/en/2019/02/25/pesticides-in-the-balance/>>. Acesso em: 10 fev. 2020.

VANTI, N. A. P. Da bibliometria à webometria: uma exploração conceitual dos mecanismos utilizados para medir o registro da informação e a difusão do conhecimento. **Ciência da Informação**, v. 31, n. 2, p. 369-379, 2002.

VELASCO, L.; CAPANEMA, L. **O setor de agroquímicos**, 2006.

VELASQUEZ-ORTA, S. B.; CURTIS, T. P.; LOGAN, B. E. Energy from algae using microbial fuel cells. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 103, n. 6, p. 1068-1076, 2009.

VIDOTTI, E. C.; ROLLEMBERG, M. D. C. E. Algas: Da economia nos ambientes aquáticos à bioremediação e à química analítica. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 139-145, 2004.

VIEGAS, C. A.; SILVA, V. P.; VARELA, V. M.; CORREIA, V.; RIBEIRO, R.; MOREIRA-SANTOS, M. Evaluating formulation and storage of *Arthrobacter aurescens* strain TC1 as a bioremediation tool for terbuthylazine contaminated soils: Efficacy on abatement of aquatic ecotoxicity. **Science Of The Total Environment**, v. 668, p. 714-722, jun. 2019.

VILLAVERDE, J. J.; SEVILLA-MORAN, B.; LOPEZ-GOTI, C.; CALVO, L.; LUIS, A. P. J.; SANDIN-ESPANA, P. Photolysis of clethodim herbicide and a formulation in aquatic environments: Fate and ecotoxicity assessment of photoproducts by QSAR models. **Science of the Total Environment**, v. 615, p. 643-651, 2018.

VINATEA, J. **Artemia - um ser vivo excepcional**. Disponível em: <<https://panoramadaaquicultura.com.br/artemia-um-ser-vivo-excepcional/>>. Acesso em: 14 fev. 2020.

WARD, A. J.; LEWIS, D. M.; GREEN, F. B. Anaerobic digestion of algae biomass: A review. **Algal Research**, v. 5, n. 1, p. 204-214, 2014.

WU, Y. H.; HU, H. Y.; YU, Y.; ZHANG, T. Y.; ZHU, S. F.; ZHUANG, L. F.; ZHANG, X.; LU, Y. Microalgal species for sustainable biomass/lipid production using wastewater as resource: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 33, p. 675-688, 2014.

WU, Y.; LIN, C.; YUAN, L. Characteristics of six cladocerans in relation to ecotoxicity testing. **Ecological Indicators**, v. 7, n. 4, p. 768-775, 2007.

YADAVALLI, R.; HEGGERS, G. R. V. N. Two stage treatment of dairy effluent using immobilized *Chlorella pyrenoidosa*. **Journal Of Environmental Health Science And Engineering**, v. 11, 2013.

YANG, C.; HUA, Q.; SHIMIZU, K. Energetics and carbon metabolism during growth of microalgal cells under photoautotrophic, mixotrophic and cyclic light-autotrophic/dark-heterotrophic conditions. **Biochemical Engineering Journal**, v. 6, n. 2, p. 87-102, 2000.

YANG, S.; LIU, G; MENG, Y.; WANG, P.; ZHOU, S.; SHANG, H. Utilization of xylose as a carbon source for mixotrophic growth of *Scenedesmus obliquus*. **Bioresource Technology**, v. 172, p. 180-185, 2014.

YE, C. Bibliometrical analysis of international big data research: Based on citespace and VOSviewer. **International Conference on Natural Computation, Fuzzy Systems and Knowledge Discovery**, p. 927-932, 2018.

YEH, K. L.; CHANG, J. S. Effects of cultivation conditions and media composition on cell growth and lipid productivity of indigenous microalga *Chlorella vulgaris* ESP-31. **Bioresource Technology**, v. 105, p. 120-127, 2012.

YU, D.; XU, Z.; PEDRYCZ, W.; WANG, W. Information sciences 1968-2016: A retrospective analysis with text mining and bibliometric. **Information Sciences**, v. 418-419, p. 619-634, 2017.

ZHAO, F.; XIANG, Q.; ZHOU, Y.; XU, X.; QIU, X.; YU, Y.; AHMAD, F. Evaluation of the toxicity of herbicide topramezone to *Chlorella vulgaris*: Oxidative stress, cell morphology and photosynthetic activity. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 143, p. 129-135, 2017.

ZHAO, F.; LI, Y.; HUANG, L.; GU, Y.; ZHANG, H.; ZENG, D.; TAN, H. Individual and combined toxicity of atrazine, butachlor, halosulfuron-methyl and mesotrione on the microalga *Selenastrum capricornutum*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 148, p. 969-975, 2018.

ZHEN, G.; LU, X.; KOBAYASHI, T.; LI, Y. Y.; XU, K.; ZHAO, Y. Mesophilic anaerobic co-digestion of waste activated sludge and *Egeria densa*: Performance assessment and kinetic analysis. **Applied Energy**, v. 148, p. 78-86, 2015.

ZHEN, G.; LU, X.; KOBAYASHI, T.; KUMAR, G.; XU, K. Anaerobic co-digestion on improving methane production from mixed microalgae (*Scenedesmus* sp., *Chlorella* sp.) and food waste: Kinetic modeling and synergistic impact evaluation. **Chemical Engineering Journal**, v. 299, p. 332-341, 2016.

ZHOU, W.; CHEN, P.; MIN, M.; MA, X.; WANG, J.; GRIFFITH, R.; HUSSAIN, F.; PENG, P.; XIE, Q.; LI, Y.; SHI, J.; MENG, J.; RUAN, R. Environment-enhancing algal biofuel production using wastewaters. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 36, p. 256-269, 2014.

ZHU, L.; WANG, Z.; SHU, Q.; TAKALA, J.; HILTUNEN, E.; FENG, P.; YUAN, Z. Nutrient removal and biodiesel production by integration of freshwater algae cultivation with piggery wastewater treatment. **Water Research**, v. 47, n. 13, p. 4294-4302, 2013.

ZIMERMANN, J. D. F. Cultivo da microalga *Galdieria sulphuraria* em permeado de soro de leite. 2019.