

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

MATEUS RODRIGUEZ PEREIRA

**AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE MICROALGAS NA PRESENÇA DE
MATERIAL POROSO Á BASE DE AMIDO IMPREGNADO COM ÓXIDO DE
ZINCO**

Bagé

2022

MATEUS RODRIGUEZ PEREIRA

**AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE MICROALGAS NA PRESENÇA DE
MATERIAL POROSO À BASE DE AMIDO IMPREGNADO COM ÓXIDO DE
ZINCO**

Trabalho de Conclusão de Curso I apresentado ao Curso de Bacharelado em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Bacharel em Engenharia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Fernando Marques
Duarte Filho

Coorientador: Prof. Dr. Wladimir Hernandez
Flores

**Bagé
2022**

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais).

P436a Pereira, Mateus Rodriguez

Avaliação do crescimento de microalgas na presença de material poroso à base de amido impregnado com óxido de zinco / Mateus Rodriguez Pereira.

83 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação)-- Universidade Federal do Pampa, ENGENHARIA DE ALIMENTOS, 2022.

"Orientação: Paulo Fernando Marques Duarte Filho ".



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal do Pampa

MATEUS RODRIGUEZ PEREIRA

**AVALIAÇÃO DO CULTIVO DE MICROALGAS NA PRESENÇA DE MATERIAL POROSO À
BASE DE AMIDO IMPREGNADO COM ÓXIDO DE ZINCO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Engenharia de Alimentos da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Bacharel em Engenharia de Alimentos.

Trabalho de Conclusão de Curso defendido e aprovado em: 21/03/2022

Banca examinadora:

Prof. Dr. Paulo Fernando Marques Duarte Filho

Orientador

UNIPAMPA

Prof. Dr. Wladimir Hernandez Flores

UNIPAMPA

Prof. Dra. Miriane Lucas Azevedo

UNIPAMPA

TAE Dra. Shana Pires Ferreira

UNIPAMPA



Assinado eletronicamente por **MIRIANE LUCAS AZEVEDO, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 21/03/2022, às 17:41, conforme horário oficial de Brasília, de acordo com as normativas legais aplicáveis.



Assinado eletronicamente por **SHANA PIRES FERREIRA, Técnico em Alimentos e Laticínios**, em 21/03/2022, às 17:46, conforme horário oficial de Brasília, de acordo com as normativas legais aplicáveis.



Assinado eletronicamente por **WLADIMIR HERNANDEZ FLORES, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 21/03/2022, às 17:50, conforme horário oficial de Brasília, de acordo com as normativas legais aplicáveis.



Assinado eletronicamente por **PAULO FERNANDO MARQUES DUARTE FILHO, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 23/03/2022, às 18:07, conforme horário oficial de Brasília, de acordo com as normativas legais aplicáveis.



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unipampa.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0759165** e o código CRC **38F16C4E**.

Referência: Processo nº 23100.004768/2022-43 SEI nº 0759165

Dedico este trabalho a minha família, amigos, mestres e colegas que de alguma forma me ajudaram fazendo com que a jornada na Universidade Federal do Pampa fosse repleta de lembranças especiais.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente queria agradecer a minha mãe e ao meu pai por todo carinho, compreensão e principalmente pelo apoio emocional e financeiro durante a graduação.

A minha família por acreditarem no meu potencial e me incentivarem durante o processo de aprendizagem.

A minha namorada Emily Rosa, por estar do meu lado nos momentos mais difíceis dando-me forças para continuar visando o cumprimento do meu objetivo.

A Rafaela Moura pela amizade, irmandade e fraternidade durante a graduação, fazendo com que essa trajetória fosse muito mais leve.

Aos professores e professoras, em especial ao Prof. Paulo e Prof. Wladimir por todos ensinamentos e conselhos passados, aos quais carregarei comigo durante toda minha carreira.

Aos técnicos dos laboratórios, em especial ao João Thomaz por todo amparo durante as etapas práticas da graduação.

Aos funcionários terceirizados, tais como: porteiros, seguranças, equipe de limpeza, etc. por garantir as melhores condições de permanência dentro do campus.

Aos colegas de curso pelo companheirismo.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, fica o meu muito obrigado.

*“Faça o teu melhor, na condição que você tem,
enquanto você não tem condições melhores,
para fazer melhor ainda”.*

Mário Sérgio Cortella

RESUMO

As microalgas constituem um grupo heterogêneo de organismos, majoritariamente aquáticos e comumente microscópios unicelulares, estes micro-organismos possuem a capacidade de sintetizar sua própria matéria orgânica, devido a essa característica são consideradas produtoras primárias nos ambientes em que estão inseridas, os quais normalmente são água epicontinentais e oceanos. A nanotecnologia tem se apresentado como uma ferramenta potencial em diversos setores, dos quais podem-se destacar: sensores químicos, filtros solares, produtos para a indústria cosmética entre outras aplicações. Contudo, surge uma questão de ordem ambiental, tendo em vista que nanopartículas em especial de óxido de zinco podem trazer consequências danosas para ambientes aquáticos. O amido é um polissacarídeo encontrado em vegetais na forma de reserva de energia, possui ampla disponibilidade e baixo custo, além de características mecânicas, térmicas, capacidade de moldagem e biodegradabilidade. Devido a estes atributos diversos estudos enfatizam o uso desse material para produção de compostos poliméricos, destacando a produção de matrizes biopoliméricas capazes de controlar a liberação de ativos tais como fertilizantes, pesticidas, fármacos e antimicrobianos. O cultivo de microalgas em meios de cultura contendo nanopartículas apresenta-se como ferramenta importante para estudos sobre toxicidade. Nesse sentido, este trabalho teve por objetivo avaliar o crescimento das microalgas *Synechococcus nidulans* e *Spirulina platensis* em meio de cultivo contendo nanopartículas de óxido de zinco ancorada em matriz porosa à base de amido. Para isso, as microalgas foram cultivadas em meio Zarrouk contendo matrizes porosas à base de amido impregnadas com nanopartículas de óxido de zinco nas concentrações de 2 e 20 mg.L⁻¹ por um período de 9 dias. Foi realizado um planejamento fatorial 2³, englobando os fatores: concentração de óxido de zinco, espécie de microalga e fonte de zinco. Foram avaliados parâmetros cinéticos de crescimento, como crescimento celular, velocidade específica máxima de crescimento celular, tempo de geração, produtividade e pH. Primeiramente foi comprovado através da difração de raio-X que matrizes porosas à base de amido são capazes de ancorar compostos, neste caso partículas com diferentes escalas. Os resultados obtidos para quantificação da biomassa microalgal demonstraram que a microalga *Synechococcus nidulans* apresentou maior multiplicação celular quando comparada a *Spirulina platensis* ao ser cultivada em meio contendo material poroso à base de amido impregnado com óxido de zinco, apresentando valores de concentração celular de 0,7961 g.L⁻¹ para *Synechococcus nidulans* e 0,5346 g.L⁻¹ para a *Spirulina platensis* ao fim do cultivo nos mesmos parâmetros. Também foi analisando o tempo de geração das microalgas sendo os menores valores apresentados pelos

ensaios que continham *Synechococcus nidulans* e óxido de zinco comercial em sua composição nas concentrações 2 e 20 mg.L⁻¹ respectivamente, 0,8590 e 0,8936 d⁻¹. Por sua vez o pH se demonstrou coerente aos ensaios de concentração celular visto que seu aumento foi diretamente proporcional a quantidade de biomassa do meio, sendo o valor mais alto 12,1, obtido pelo ensaio contendo *Synechococcus nidulans* exposta a material poroso à base de amido impregnado com óxido de zinco comercial.

Palavras-Chave: Amido. Nanopartículas de ZnO. *Synechococcus nidulans*. *Spirulina platensis*.

RESUMEN

Las microalgas constituyen un grupo heterogéneo de organismos, en su mayoría acuáticos y comúnmente microscopios unicelulares, estos microorganismos tienen la capacidad de sintetizar su propia materia orgánica, debido a esta característica se les considera productores primarios en los ambientes en los que se insertan, que por lo general son aguas epicontinentales y océanos. La nanotecnología se ha presentado como una herramienta potencial en varios sectores, de los cuales podemos destacar: sensores químicos, filtros solares, productos para la industria cosmética, entre otras aplicaciones. Sin embargo, surge un problema ambiental, considerando que las nanopartículas, especialmente el óxido de zinc, pueden tener consecuencias nocivas para los ambientes acuáticos. El almidón es un polisacárido que se encuentra en los vegetales en forma de reserva energética, tiene amplia disponibilidad y bajo costo, además de características mecánicas y térmicas, capacidad de moldeo y biodegradabilidad. Debido a estos atributos, varios estudios enfatizan el uso de este material para la producción de compuestos poliméricos, destacándose la producción de matrices biopoliméricas capaces de controlar la liberación de activos como fertilizantes, pesticidas, medicamentos y antimicrobianos. El cultivo de microalgas en medios de cultivo que contienen nanopartículas es una herramienta importante para los estudios de toxicidad. En este sentido, este trabajo tuvo como objetivo evaluar el crecimiento de las microalgas *Synechococcus nidulans* y *Spirulina platensis* en un medio de cultivo que contiene nanopartículas de óxido de zinc ancladas en una matriz porosa a base de almidón. Para ello, las microalgas fueron cultivadas en medio Zarrouk que contenía matrices porosas a base de almidón impregnadas con nanopartículas de óxido de zinc a concentraciones de 2 y 20 mg.L⁻¹ por un período de 9 días. Se realizó un diseño factorial 2³, englobando los factores: concentración de óxido de zinc, especie de microalgas y fuente de zinc. Se evaluaron parámetros cinéticos de crecimiento tales como crecimiento celular, tasa máxima de crecimiento celular específico, tiempo de generación, productividad y pH. En primer lugar, se comprobó mediante difracción de rayos X que las matrices porosas a base de almidón son capaces de anclar compuestos, en este caso partículas con diferentes escalas. Los resultados obtenidos para la cuantificación de la biomasa de microalgas mostraron que la microalga *Synechococcus nidulans* mostró una mayor multiplicación celular en comparación con *Spirulina platensis* cuando se cultivó en un medio que contenía material poroso a base de almidón impregnado con óxido de zinc, con valores de concentración celular de 0.7961 g.L⁻¹ para *Synechococcus nidulans* y 0.5346 g.L⁻¹ para *Spirulina platensis* al final del cultivo bajo los mismos parámetros. También se analizó el

tiempo de generación de las microalgas, presentando los valores más bajos los ensayos que contenían *Synechococcus nidulans* y óxido de zinc comercial en su composición a concentraciones de 2 y 20 mg.L⁻¹, respectivamente, 0.8590 y 0.8936 d⁻¹. A su vez, el pH se mostró consistente con los ensayos de concentración celular, ya que su incremento fue directamente proporcional a la cantidad de biomasa en el medio, siendo el valor más alto de 12,1, obtenido por el ensayo que contenía *Synechococcus nidulans* expuesto a material poroso a base de sobre almidón impregnado con óxido de zinc comercial.

Palabras claves: Almidón. Nanopartículas de ZnO. *Synechococcus nidulans*. *Spirulina platensis*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fases de crescimento de um micro-organismo em função do tempo.	24
Figura 2 - Cultura de <i>Spirulina platensis</i> comercializada por Algae-Lab.	28
Figura 3 - Cultura de <i>Synechococcus nidulans</i> do acervo ecotox.	29
Figura 4 - Escala comparativa enfatizando estruturas nanométricas.	33
Figura 5 - Imagem de nanopartículas de óxido de zinco, obtidas através de Microscopia eletrônica de varredura.	34
Figura 6 - Representação da estrutura molecular da amilose e amilopectina.	36
Figura 7 - Representação esquemática do processo de gelatinização do amido.	38
Figura 8 - Sólido poroso com ilustração dos diferentes tipos de poros: abertos (a, b, c), fechados (d) e rugosidade da superfície (e).	40
Figura 9 - Manutenção dos inóculos das microalgas <i>Spirulina platensis</i> e <i>Synechococcus nidulans</i>	43
Figura 10 - Processo de obtenção das nanopartículas de ZnO.	46
Figura 11 - Processo de obtenção da matriz porosa à base de amido impregnada com óxido de zinco.	48
Figura 12 - Matrizes porosas à base de amido impregnadas com óxido de zinco onde: (a) Matriz impregnada com nanopartículas de óxido de zinco. (b) matriz impregnada com óxido de zinco comercial.	50
Figura 13 - Difratomogramas de Raios-X das matrizes impregnadas com nanopartículas de ZnO.	51
Figura 14 - Microscopia de Força Atômica na superfície da matriz à base de amido impregnada com nanopartículas de ZnO.	52
Figura 15 - Microscopia de Força Atômica na superfície da matriz unicamente à base de amido.	53
Figura 16 - Curvas de crescimento celular da microalga <i>Spirulina platensis</i> em função do tempo.	54
Figura 17 - Curvas de crescimento celular da microalga <i>Synechococcus nidulans</i> em função do tempo.	56
Figura 18 - Erlenmeyers dos cultivos das microalgas no 3º dia de experimento. (a) Ensaios 5 e 6; (b) Ensaios 1 e 2; (c) Ensaios 7 e 8; (d) Ensaios 3 e 4;	57
Figura 19 - Erlenmeyers dos cultivos das microalgas no 7º dia de experimento. (a) Ensaio 1 e 2; (b) Ensaios 3 e 4; (c) Ensaios 5 e 6; (d) Ensaios 7 e 8.	58

Figura 20 – Gráfico ilustrando os efeitos mais relevantes para o crescimento das microalgas durante o experimento.	59
Figura 21 - Gráfico representando as interações entre os fatores analisados.	60
Figura 22 - Gráfico dos valores absolutos dos efeitos analisados.	60
Figura 23 – Gráfico do pH em função do tempo dos ensaios contendo a microalga <i>Spirulina platensis</i>	65
Figura 24 - Curvas do pH em função do tempo dos ensaios contendo a microalga <i>Synechococcus nidulans</i>	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Diferentes proporções de amilose e amilopectina de acordo com a fonte amilácea.	36
Tabela 2 - Faixas de temperatura de gelatinização para diferentes fontes de amido.....	38
Tabela 3 - Composição química do meio Zarrouk.	43
Tabela 4 - Planejamento fatorial 2 ³	44
Tabela 5 - Valores obtidos através da regressão do modelo proposto.....	61
Tabela 6 - Valores da intensidade dos efeitos e suas interações no crescimento celular.	62
Tabela 7 - Parâmetros cinéticos de crescimento.....	64

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Trabalhos encontrados na literatura utilizando microalgas como bioindicador.....30

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BOD – Demanda bioquímica de oxigênio

CO₂ – Dióxido de carbono

DRX – Difração de raios X

FWHM – *Full Width at Half Maximum*

IUPAC – *International Union of Pure and Applied Chemistry*

nm – Nanômetros

NPs – Nanopartículas

NP-Ag – Nanopartículas de prata

NP-CuO – Nanopartículas de óxido de cobre

NP-ZnO – Nanopartículas de óxido de zinco

O₂ – Oxigênio

PAR – *Photosynthetically Active Radiation*

P_{máx} – Produtividade máxima

T_g – Tempo de geração

X_{máx} – Concentração de biomassa máxima

ZnO – Óxido de zinco

μ_{máx} – Velocidade específica máxima de crescimento

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 CONCEITOS GERAIS E REVISÃO DE LITERATURA	23
2.1 Microalgas	23
2.1.1 Condições de Cultivo	24
2.1.1.1 Fatores químicos que influenciam o cultivo de microalgas	25
2.1.1.2 Fatores físicos que influenciam o cultivo de microalgas	26
2.1.2 Microalga <i>Spirulina platensis</i>	27
2.1.3 Microalga <i>Synechococcus nidulans</i>	29
2.1.4 Potencial das microalgas como bioindicador	29
2.2 Nanotecnologia	32
2.2.1 Nanopartículas de ZnO	33
2.2.2 Interação das NP-ZnO com as microalgas	34
2.3 Amido	35
2.3.1 Gelatinização	37
2.3.2 Retrogradação	38
2.3.3 Degradação e porosidade	39
2.3.4 Aplicação de matrizes poliméricas	40
3.1 Materiais	42
3.1.1 Inóculo	42
3.1.2 Amido	42
3.1.3 Óxido de zinco	42
3.2 Métodos	42
3.2.1 Micro-organismos	42
3.2.2 Meio de Cultivo	42
3.2.3 Delineamento experimental	44
3.2.4 Determinações analíticas	45
3.2.5 Análise Estatística	45
3.2.6 Nanopartículas de ZnO	45
3.2.6.1 Preparação da solução	45
3.2.6.2 Secagem	46
3.2.6.3 Calcinação	46

3.2.6.4 Formação das nanopartículas.....	46
3.2.7 Preparação da matriz porosa impregnada de ZnO.....	47
3.2.8 Caracterização das matrizes porosas impregnadas com ZnO	48
4 APRESENTAÇÃO DA PESQUISA E ANÁLISE DOS RESULTADOS	50
4.1 Caracterização das matrizes porosas impregnadas com ZnO	50
4.1.1 Difração de Raios X (DRX).....	51
4.1.2 Microscopia de Força Atômica.....	52
4.2 Análise do crescimento celular nos cultivos das microalgas.....	53
4.2.1 Análise do planejamento fatorial	58
4.2.2 Parâmetros cinéticos de crescimento	63
4.2.3 Análise do pH dos cultivos das microalgas.....	65
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	68
REFERÊNCIAS	69
ANEXOS	83

1 INTRODUÇÃO

As microalgas fitoplanctônicas são classificadas como produtores primários. Organismos que apresentam tal classificação constituem a base da cadeia alimentar herbívora do ecossistema aquático, em virtude de as microalgas ocuparem esta posição elas podem ser consideradas vias de acesso de substâncias tóxicas, como íons metálicos desse modo, ao absorverem substâncias tóxicas geram a poluição do ecossistema, podendo causar a intoxicação de humanos através do consumo de organismos contaminados (LOMBARDI; VIEIRA; SARTORI, 2002; NOGUEIRA *et al.*, 2009). Além do potencial de contaminação, outro problema que surge em relação as nanopartículas em ambientes aquáticos é a modificação da composição das biomoléculas gerando células de baixo valor nutricional e conseqüentemente comprometendo o balanço energético do meio (KILHAM *et al.*, 1997).

Devido ao seu alto teor de proteínas contendo aminoácidos essenciais, a microalga *Spirulina platensis* tem sido vastamente estudada objetivando suas diversas funcionalidades nutricionais (MACHADO, *et al.*, 2017). Por sua vez a microalga *Synechococcus nidulans* apresenta teores representativos de clorofila, carotenoides e outros metabolitos biologicamente ativos (DA SILVA VAZ; DE CHIARO FERREIRA; DUARTE FILHO, 2013).

Quando ocorre a interação entre as microalgas e as nanopartículas de ZnO no ambiente aquático, a nanopartícula compromete as funções fisiológicas do micro-organismo, diminuindo a capacidade de multiplicação celular, fotossíntese e produção de clorofila (MELEGARI *et al.*, 2013; CHELONI; MARTI; SLAVEYKOVA, 2016). Em sua pesquisa, Furtado (2018) observou a possibilidade de utilização de microalgas como bioindicadores, verificando a correlação entre a população de tal micro-organismo e os fatores físicos e químicos na Lagoa dos Índios, Macapá, Amapá.

A nanotecnologia refere-se a um campo da tecnologia que tem como principal objetivo o estudo da caracterização, fabricação, manipulação e aplicação de sistemas biológicos e não biológicos em escala nanométrica (NNI, 2007). A utilização do prefixo nano ocorre devido a uma escala de medida em que um nanômetro equivale a um bilionésimo de metro ou um milionésimo de milímetro (PAULA DE SOUZA G, 2015).

O avanço tecnológico proporcionou com que a nanotecnologia seja implementada na indústria de alimentos, desta forma suas aplicações nesta área incluem purificação de água, encapsulamento de nutrientes e detecção de micro-organismos. Segundo Ranjan *et al.* (2014), a nanotecnologia pode ser utilizada para o melhoramento sensorial, distribuição direcionada de compostos bioativos presentes em nutracêuticos, sensores nanoestruturados, embalagens inteligentes e agentes antimicrobianos.

O emprego de nanopartículas metálicas como agente antibacteriano aparece como alternativa aos habituais organoclorados e derivados de arsênio, amplamente utilizados para tal propósito. O uso de estruturas nanométricas apresenta vantagens do ponto de vista de eficácia, pois a elevada relação entre a área superficial e o volume exibida pelas nanopartículas possibilita que pequenas concentrações do composto metálico sejam suficientes para proporcionar expressivas propriedades antibacterianas (ZIELIŃSKA *et al.*, 2009). Segundo Porto *et al.* (2017), nanopartículas de óxido de zinco em concentrações de 50 mg.L⁻¹ foram suficientes para inibir o crescimento da bactéria Gram negativa *Escherichia coli*. Paralelamente, a nanotecnologia vem sendo estudada no âmbito da medicina, visto que nanopartículas metálicas possibilitam a realização do transporte de medicamentos, auxiliando o tratamento de doenças severas como o câncer (MOGHIMI; HUNTER; MURRAY, 2005).

A consequência causada devido as inúmeras aplicações das nanopartículas metálicas tais como, eletrodos de células de combustíveis, transporte de medicamentos, sistemas catalíticos, emulsões de micropartículas, polímeros e biomateriais, é a segurança ambiental, dando ênfase a ambientes aquáticos (PAUL; ROBESON, 2008; FARRÉ *et al.*, 2009). Tal preocupação é causada devido ao fato de que nesses ecossistemas diversas vezes são descartados inadequadamente rejeitos industriais, criando um impacto negativo, podendo acarretar danos à saúde humana (NAVARRO *et al.*, 2008).

O amido é abundantemente encontrado em diversas espécies vegetais, tal composto é considerado um carboidrato de reserva, apresentando-se em grandes concentrações nos grãos de cereais (40% a 90% do peso seco), leguminosas (30% a 50% do peso seco), tubérculos (65% a 85%) e frutas imaturas ou verdes (40% a 70% do peso seco) (LAJOLO; MENEZES, 2006).

Diversas pesquisas enfatizando o uso do amido no setor de materiais vêm sendo realizadas visando sua aplicabilidade na formulação de produtos, podendo ser citados: produção de embalagens, materiais cerâmicos, espumas biodegradáveis e biofilmes (CLARINDO, 2013; SOYKEABKAEW; THANOMSILP; SUWANTONG, 2015; AZEVEDO; DE SÁ; FUNGARO, 2018). Polímeros naturais tais como: amido e glúten são matérias primas potenciais para serem utilizadas como matriz em biocompósitos devido a sua biodegradabilidade, disponibilidade e custo relativamente baixo (YU, L.; DEAN; LI, 2006).

De acordo com o contexto anteriormente citado, este trabalho teve como objetivo principal avaliar o crescimento das microalgas *Synechococcus nidulans* e *Spirulina platensis* em meio de cultivo contendo nanopartículas de ZnO impregnadas em matriz porosa a base de amido. Sendo os objetivos específicos:

- Preparar as nanopartículas e a matriz porosa a base de amido;
- Caracterizar a matriz porosa e as NP-ZnO na matriz para obter suas características estruturais e morfológicas;
- Cultivar as microalgas em meio de cultura contendo as NP-ZnO impregnadas na matriz porosa a base de amido;
- Obter os parâmetros cinéticos de crescimento, velocidade específica de crescimento celular, tempo de geração, produtividade em biomassa dos cultivos realizados em meio contendo as NP-ZnO/matriz porosa;
- Contribuir para maiores informações a respeito dos danos causados pelas nanopartículas de ZnO em ambientes aquáticos.

Nas seções subsequentes serão abordados o referencial teórico das principais características apresentadas pelo micro-organismo quando submetido ao meio de cultivo contendo nanopartículas de ZnO impregnadas em matrizes de amido. Além disso, apresenta a metodologia utilizada para manutenção das microalgas, bem como a produção de matrizes poliméricas a base de amido impregnadas com nanopartículas de ZnO, os resultados obtidos nos experimentos realizados juntamente com as discussões pertinentes ao tempo culminando na conclusão do Trabalho de Conclusão de Curso II.

2 CONCEITOS GERAIS E REVISÃO DE LITERATURA

Este capítulo tem o propósito de expor um panorama geral dos parâmetros de desenvolvimento e de cultivo de microalgas, em especial a *Synechococcus nidulas* e a *Spirulina platensis*, o potencial desses micro-organismos como bioindicadores, os principais fenômenos envolvidos na produção de matrizes biopolímericas e de forma sucinta será relatado o emprego de nanotecnologia no tratamento de efluentes e a citotoxicidade de nanopartículas em ambientes aquáticos.

2.1 Microalgas

As microalgas constituem um grupo heterogêneo de organismos, majoritariamente aquáticos e comumente microscópios unicelulares. Englobados na denominação de microalgas, estão inclusos organismos que apresentam dois tipos de estrutura celular: estrutura procariótica (*Cyanophita* e *Prochlorophita*) e estrutura eucariótica (*Chlorophita*, *Euglenophyta*, *Rhodophyta*, *Haptophyta*, *Heterokontophyta*, *Cryptophyta* e *Dinophyta*) (HOEK *et al.*, 1995). Independentemente das desigualdades estruturais e morfológicas entre os representantes de cada divisão, ambos apresentam a parte fisiológica similar, possuindo um metabolismo análogo ao das plantas (ABALDE ALONSO *et al.*, 1995).

Tradicionalmente a classificação dada a estes micro-organismos têm em conta os tipos de pigmentos, a natureza química dos produtos de reserva e os constituintes da parede celular, porém alguns aspectos morfológicos e citológicos também estão sendo considerados, tais como a ocorrência de células flageladas, a estrutura dos flagelos, os processos de formação do núcleo e da divisão celular, a presença e a caracterização de envoltório do(s) cloroplasto(s) e a possível conexão entre o retículo endoplasmático e a membrana nuclear (HU, 2004; TOMASELLI, 2004).

Segundo Abalde Alonso *et al.* (1995) e Chisti (2007), as microalgas são seres fotoautotróficos, isto é, capazes de sintetizar a matéria orgânica necessária para a sua manutenção, desenvolvimento e reprodução celular. A matéria orgânica sintetizada pelas microalgas é realizada através do mecanismo de fotossíntese, fenômeno no qual se faz necessário fontes de carbono, água, luz e pigmentos assimiladores, sendo o principal a clorofila. Devido a estes fatores as microalgas são consideradas produtoras. De acordo com os dados analisados por Chisti (2004) as microalgas são os principais produtores primários do mundo, sendo responsáveis por pelo menos 60% da produção de matéria orgânica.

Os lugares mais propícios para o desenvolvimento de microalgas são em meio marinho e em águas epicontinentais, podendo ser cultivadas em diversos sistemas industriais ou

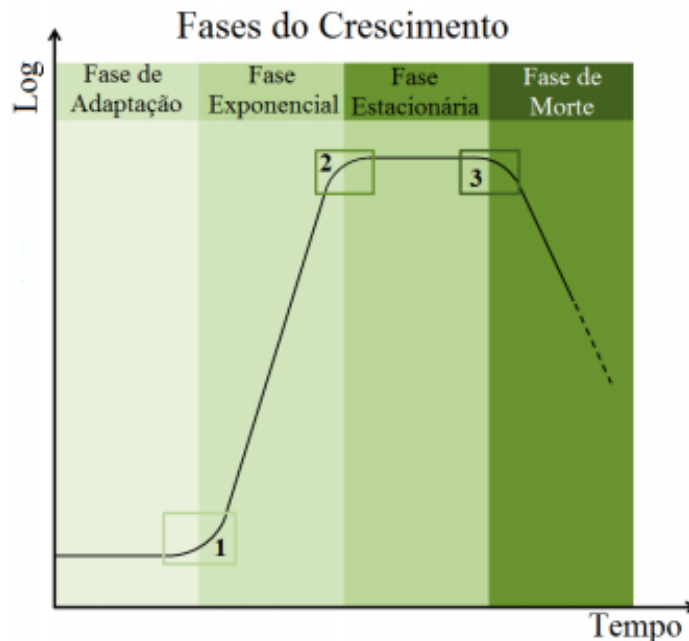
laboratoriais denominados fotobiorreatores, visando o aumento de produtividade através do controle das condições de cultivo (CHISTI, 2004; ZITTELLI *et al.*, 2013).

2.1.1 Condições de Cultivo

O desenvolvimento de uma população de microalgas é resultado de uma interação entre fatores biológicos, físicos e químicos, tal premissa é válida tanto para o ambiente natural, como no cultivo controlado (RAVEN, 1993). Os fatores biológicos englobam as próprias taxas metabólicas da espécie cultivada, enquanto que nos fatores físico-químicos são estudados, a luminosidade, agitação, temperatura, salinidade e disponibilidade de nutrientes (GUILLARD, 1975; HELLEBUST, 1985; KREMER; THOMAS; LITCHMAN, 2017).

Uma curva característica do crescimento de micro-organismos inclui, basicamente, quatro fases: Adaptação (Lag), Exponencial (Log), Estacionária, Declínio ou Morte, como demonstra a Figura 1.

Figura 1 - Fases de crescimento de um micro-organismo em função do tempo.



Fonte: Adaptado de Borzani *et al.* (2001)

No gráfico ilustrado na Figura 1, têm-se:

- Fase de adaptação: o micro-organismo realiza a adaptação metabólica a um novo meio visando o crescimento celular. No ponto 1 temos o mesmo número de células em crescimento quanto em desenvolvimento.

- Fase Exponencial (Log): a velocidade de crescimento é máxima e constante, com duplicação celular. No ponto 2 ocorre a redução da velocidade específica máxima de crescimento, devido à escassez nutricional.
- Fase Estacionária: interrupção da divisão celular, a taxa de morte se iguala a taxa de crescimento. No ponto 3 a taxa de morte supera a taxa de crescimento.
- Fase de Declínio ou Morte: perda irreversível da capacidade de crescimento, diminuição da população (BORZANI *et al.*, 2001).

2.1.1.1 Fatores químicos que influenciam o cultivo de microalgas

A biomassa microalgal é amplamente rica em carbono, este elemento é responsável por 50% da composição do micro-organismo em questão, se fazendo presente em proteínas, lipídios, carboidratos e vitaminas (DE OLIVEIRA, 2006). A principal rota utilizada pelas microalgas para fixação do carbono é a fotossíntese, tendo como fonte o CO₂ que por sua vez também é ministrado através da injeção de ar, produzindo borbulhamento, contribuindo para agitação do cultivo (BECKER W, 1994; SASI, 2009). Algumas espécies de microalgas como *Spirulina* e a *Chlorella vulgaris*, combinam a fotossíntese e a assimilação heterotrófica de componentes orgânicos, esse fenômeno é denominado mixotrofia (LIANG; SARKANY; CUI, 2009). A adição de bicarbonato (HCO₃) visando a heterotrofia, deve ser realizada ao longo de todo o processo de cultivo, visto que a baixa solubilidade desse composto pode gerar insuficiência nutricional (ZARROUK, 1966).

O pH influencia diretamente e indiretamente no cultivo de microalgas, o fator indireto ocorre em virtude da oscilação de solubilidade do CO₂ e dos minerais em meio aquoso, na questão direta para maioria das microalgas a faixa ideal de potencial hidrogeniônico é entre 5 e 9 (BECKER, 2004).

O crescimento da população de microalgas gera um aumento gradativo no pH do meio, a elevação desse valor ocorre devido a atividade biológica das células, o que produz uma redução no conteúdo de carbono inorgânico dissolvido devido ao consumo necessário para o crescimento, esse acontecimento desequilibra o sistema-tampão carbonato-bicarbonato, desta forma a mensuração do pH pode ser utilizada como indicador de crescimento celular (BERENGUEL *et al.*, 2004).

De acordo com Richmond (2004), o nitrogênio é o principal nutriente com exceção do carbono, isso ocorre devido a que em meios com deficiência em nitrogênio as microalgas desviam a rota metabólica do carbono da formação de proteínas para a produção de carboidratos, lipídios e compostos bioativos. De modo geral, o nitrogênio é abastecido na forma

de sais de amônia, nitratos e ureia. O fósforo é outro nutriente imprescindível, visto que nos processos metabólicos celulares participa da transferência de energia intracelular, reações de divisão celular e síntese de ácidos nucleicos (KAPLAN; REINHOLD, 1999).

Devido a função osmótica das microalgas, a concentração de sais orgânicos dissolvidos no meio tem potencial de afetar seu crescimento. A tolerância de sal varia de acordo com a espécie, existindo micro-organismos que não toleram concentrações milimolares do composto e outros que sobrevivem em soluções saturadas (MATA; MARTINS; CAETANO, 2010).

2.1.1.2 Fatores físicos que influenciam o cultivo de microalgas

O fator temperatura é responsável por afetar os processos metabólicos de fotossíntese e respiração das microalgas, esse parâmetro juntamente com a luminosidade também é considerado primordial para a fixação de CO₂ e evolução do O₂, desta forma é de extrema importância conhecer a faixa ótima de temperatura da espécie cultivada visando um maior crescimento celular (VENKATARAMAN, 1997).

Os fatores que explicam os efeitos da temperatura no crescimento celular das microalgas são: a ação na estrutura dos componentes celulares, em especial proteínas e lipídios e a relação entre os coeficientes de temperatura com a taxa de reação metabólica (FAINTUCH, 1989).

A temperatura ideal para o cultivo de microalgas varia entre as espécies e também de acordo com a finalidade da produção. Em ambiente tropical, De Oliveira (2006) sugere uma faixa de temperatura ótima entre 20 a 25°C, enquanto que Lopes e colaboradores (2007) estipulam a faixa entre 25 a 35°C, para microalgas nos mesmos ambientes.

A luminosidade é considerada um dos fatores mais importantes na multiplicação celular das microalgas, visto que as variáveis de intensidade luminosa e comprimento de onda podem afetar o micro-organismo de diversas maneiras. A faixa espectral ideal para o cultivo das microalgas se encontra entre 400 e 700 nanômetros, que corresponde a radiação fotossinteticamente ativa (PAR). Altas intensidades luminosas podem destruir os cloroplastos, organelas responsáveis pela fotossíntese, quando utilizadas por longos períodos de tempo, gerando o fenômeno de fotoinibição, definido como a perda da capacidade de realizar fotossíntese devido aos danos causados por intensidade de luminosa acima da requerida (POWELL; CHADDOCK; DIXON, 1965; VENKATARAMAN, 1997).

O comprimento de onda inadequado aumenta a produção de compostos reativos prejudiciais, além de danificar a estrutura celular causando a morte da microalga quando os valores apresentados estiverem na faixa do ultravioleta (MÜLLER; LI; NIYOGI, 2001). O fotoperíodo, que tem como definição a periodicidade do fornecimento de luz, também é

considerado um fator determinante na produção de biomassa microalgal sendo os mais estudados 12h claro/12h escuro, 18h claro/6h escuro e 24h claro e 0h escuro (PRATES *et al.*, 2018; SIRISUK *et al.*, 2018). Alguns estudos realizam de cultivos com 24 horas de fase escura, sem utilização de fotoperíodo, ou seja, a microalga é cultivada sem realização de fotossíntese, sendo sua assimilação de carbono através de mecanismos de heterotrofia (SILVEIRA *et al.*, 2015).

A agitação constante do meio proporciona uma exposição homogênea a luz de todas as microalgas, aumenta a disponibilidade de nutrientes devido ao manutenção da suspensão dos compostos, também evita a sedimentação dos micro-organismos o que promoveria a subexposição luminosa para as camadas inferiores e elevada exposição para as camadas superiores (COUTTEAU; SORGELOOS, 1992; BECKER W, 1994). Devido a esses fatores a agitação é de extrema importância, sendo amplamente utilizada na forma de aeração como supracitada no texto.

2.1.2 Microalga *Spirulina platensis*

A *Spirulina platensis* é um micro-organismo procarionte, pertencente da divisão *Cyanophyta*, conhecidas popularmente como algas verde azuladas. Sua unidade estrutural é formada por um filamento, denominado tricoma, disposto de forma helicoidal estável. O tamanho médio apresentado por essa microalga varia entre 6 e 12 μm de diâmetro e 100 e 200 μm de comprimento (VENKATARAMAN, 1997). Na Figura 2, pode-se observar a microalga *Spirulina platensis* com auxílio da microscopia.

Figura 2 - Cultura de *Spirulina platensis* comercializada por Algae-Lab.



Fonte: Algae-lab (2021).

Assim como qualquer cianobactéria a *Spirulina platensis* pode sofrer mutações durante certas condições de crescimento. Segundo Wang e Zhao (2005) o processo de variação celular a nível genético denominado linearização, pode gerar células de *Spirulina* lineares, também foi constatado que uma célula linear parece ser mais resistente a situações de estresse e elevadas intensidades luminosas, quando comparada a célula na forma helicoidal.

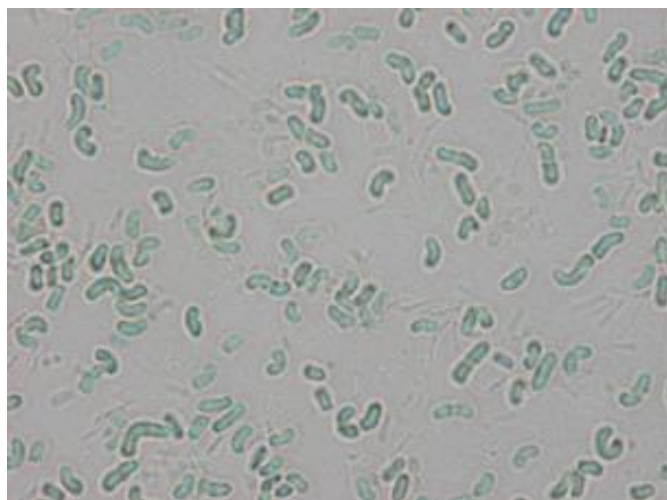
A reprodução do micro-organismo é realizada através da quebra dos tricomas em pequenos filamentos denominados hormogônios, os quais apresentam diferenças de: tamanho celular, vacúolos de gás e ausência de heterocistos quando comparados a suas células parentais (VONSHAK; TOMASELLI, 2000).

A composição centesimal da *Spirulina platensis* é rica em nutrientes, devido a essa característica este microrganismo vem sendo muito estudado na utilização como suplemento alimentar. Em seu trabalho, Belay (1997) constatou que a *Spirulina* apresenta entre 60 e 70% de proteínas, 15 a 20% de carboidratos, 5 a 8% de lipídios, além de minerais como o ferro, cálcio, cromo, magnésio e vitaminas A, C, e E em sua composição. Um fator que é considerado uma vantagem quanto a preservação da integridade dos ácidos graxos poliinsaturados e vitaminas presentes na microalga do gênero *Spirulina* é a constituição da parede celular do micro-organismo, a qual é formada por mucopolissacarídeos responsável pela proteção celular (TOMASELLI, 1997).

2.3.3 Microalga *Synechococcus nidulans*

A *Synechococcus nidulans* é uma microalga pertencente ao grupo das cianobactérias, enquadrada no gênero *Synechococcus*, apresentando formato celular de cocóide, além de estrutura unicelular e procariótica. O tamanho apresentado por este micro-organismo varia entre 0,8 a 1,5 μm de diâmetro. Na questão reprodutiva se assemelham as bactérias, multiplicando-se assexuadamente através da fissão binária transversal (MARGULIS *et al.*, 2001). Na Figura 3, observa-se em microscópio uma cultura de *Synechococcus nidulans*.

Figura 3 - Cultura de *Synechococcus nidulans* do acervo ecotox.



Fonte: Ecotox (2021).

Este micro-organismo é um dos maiores contribuintes para produção primária dos oceanos, tendo uma participação de aproximadamente 39% da composição planctônica mundial (MOISAN; BLATTNER; MAKINEN, 2010).

Devido as altas concentrações de carbono em sua estrutura, diversos estudos vêm sendo realizados visando a utilização desta microalga para a produção de biodiesel (CHISTI, 2007; CUELLAR-BERMUDEZ *et al.*, 2015). Segundo pesquisas realizadas na área de efluentes, as microalgas do gênero *Synechococcus* possuem a habilidade de auxiliar no tratamento de águas residuárias, principalmente no quesito de remoção de compostos amoniacais e metais pesados através da biossorção (DE QUADROS; DUARTE FILHO; JUNGES, 2019; SRIMONGKOL *et al.*, 2019).

2.3.4 Potencial das microalgas como bioindicador

A utilização do termo bioindicação teve início na Alemanha, a partir dos anos 1960 (MARKERT; WECKERT, 1993). A palavra bioindicador deriva de duas palavras *bio*:

organismos e *indicador*: guias, indicantes ou sinais que indicam algo, desta forma define-se bioindicador como um organismo que está sinalizando determinada característica do ambiente em que ele se encontra (LIMA, 2000).

Avaliar o comportamento da contaminação do ambiente, ou seja, monitorar a sua ação através de organismos vivos é denominado de bioindicação. Nos métodos de bioindicação, o comportamento do organismo frente a um agente estressor é utilizado na avaliação da qualidade de um dado volume ou área, sendo assim a ação desses micro-organismos pode ser utilizada para mensurar os impactos negativos decorrentes das atividades antrópicas nos ecossistemas (MARKERT; WECKERT, 1993; LIMA, 2000).

As microalgas são amplamente utilizadas em pesquisas de monitoramento ambiental por estruturarem a produtividade primária dos ecossistemas aquáticos e por serem os primeiros seres vivos a sinalizarem os impactos em corpos de água, viabilizando ações de correção na gestão frente a efeitos tóxicos. Além disso, os ensaios que empregam as microalgas como bioindicadores são geralmente sensíveis, rápidos e econômicos (MARCONE, 2011). No Quadro 1 estão sintetizados alguns trabalhos encontrados na literatura relacionando o uso de microalgas como bioindicadores da toxicidade de nanopartículas, os parâmetros para avaliar os efeitos causados pela interação entre o íon metálico e o microrganismo, as classes de nanopartículas avaliadas e sua respectiva concentração.

Quadro 1 - Trabalhos encontrados na literatura utilizando microalgas como bioindicador

(continua)

Organismo	Parâmetros analisados	Nanopartícula utilizada	Concentração de nanopartículas ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Referência bibliográfica
<i>Chlorella vulgaris</i>	Crescimento Estresse oxidativo Fotossíntese	Fe_2O_3	$1,25 \times 10^4$ a $4,0 \times 10^5$	(BARHOUMI; DEWEZ, 2013)

Quadro 1 - Trabalhos encontrados na literatura utilizando microalgas como bioindicador

(conclusão)

Organismo	Parâmetros analisados	Nanopartícula utilizada	Concentração de nanopartículas ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Referência bibliográfica
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Crescimento (biomassa) Estresse oxidativo	CuO	8 e 8×10^2	(CHELONI; MARTI; SLAVEYKOVA, 2016)
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Atividade da esterase Crescimento Estresse oxidativo Fotossíntese	Cr ₂ O ₃	10^4 a 10^7	(COSTA <i>et al.</i> , 2016)
<i>Chlorella sorokiniana</i>	Crescimento Viabilidade celular Fotossíntese	CuO	$5,7 \times 10^{-1}$ a $6,35 \times 10^2$	(BARRETO, 2018)
<i>Lyngbya majuscula</i>	Clorofila a Peso seco	CuO	2×10^3 a 4×10^4	(EL-KASSAS; OKBAH, 2017)
<i>Raphidocelis subcapitata</i>	Fotossíntese Estresse oxidativo Crescimento	Fe ₃ O ₄ CuFe ₂ O ₄ CoFe ₂ O ₄	10^2 a 10^5	(MELO, 2017)
<i>Synechococcus. nidulans</i> e <i>Spirulina platensis</i>	Concentração de biomassa Velocidade de crescimento Produtividade máxima de biomassa	ZnO	10^4 e 2×10^4	(DE QUADROS; DUARTE FILHO; HERNANDEZ FLORES, 2020)

2.2 Nanotecnologia

A nanotecnologia é um setor inovador, em constante crescimento econômico e científico, alavancada pela busca incessante por materiais com propriedades e características particulares. Devido aos avanços obtidos a nanotecnologia se tornou multidisciplinar podendo ser aplicada na: saúde, agricultura, energia, indústria, dentre outras (GRILLO; ROSA; FRACETO, 2015).

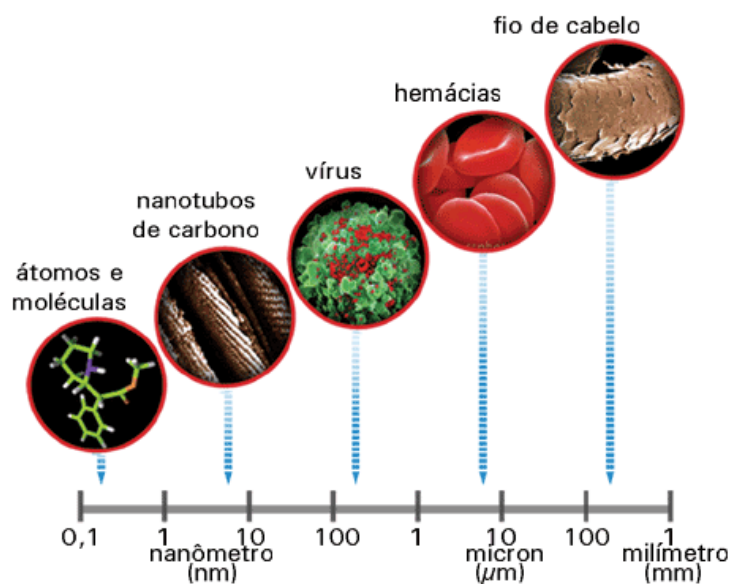
O marco histórico da nanociência ocorreu há 62 anos quando em 29 de dezembro de 1959 o pesquisador americano Richard P. Feynman recitou o seu famoso discurso intitulado de “*There's Plenty of Room at the Bottom*”, o qual propunha ideias visionárias sobre a produção de partículas em escala nanométrica a partir da manipulação atômica, sendo a primeira pessoa a pesquisar a respeito de um novo mundo na proporção dos nanômetros (GODDARD III *et al.*, 2007).

A necessidade do estudo das nanoestruturas se deve não somente ao fato da redução de escala dos materiais, mas principalmente pela possibilidade de produzir partículas complexas capazes de aprimorar a funcionalidade em um determinado processo (MARTINS *et al.*, 2007).

Segundo Mamani e colaboradores (2009) ocorrem mudanças nas nanopartículas devido aos efeitos quânticos, devido a essa constatação podemos afirmar que as propriedades dos materiais e elementos químicos se alteram drasticamente quando reduzidos a dimensões nanométricas. Apenas com a redução de tamanho e sem alteração de substância, verificou-se que os materiais apresentam novas propriedades e características derivadas de sua elevada proporção entre área superficial e volume, sendo elas condutividade, resistência mecânica e térmica, aumento da capacidade de interação, dentre outras.

Na Figura 4, compara-se as dimensões de uma estrutura nanométrica com micromoléculas e estruturas milimétricas.

Figura 4 - Escala comparativa enfatizando estruturas nanométricas.



Fonte: Nanomateriais (2021).

Existem diversos benefícios na utilização de nanopartículas, porém, os resíduos gerados na produção das nanopartículas geram preocupação, visto que a alteração de algumas propriedades pode causar interações desconhecidas aos sistemas biológicos. A contaminação do meio ambiente por nanomateriais com grande área superficial, alta resistência mecânica e potencial catalisador pode resultar na deposição de compostos tóxicos na superfície de nanopartículas, sendo transportado ao meio ambiente ou acumulado ao longo da cadeia alimentar, gerando reações químicas indesejáveis ao meio ambiente (QUINA, 2004).

2.2.1 Nanopartículas de ZnO

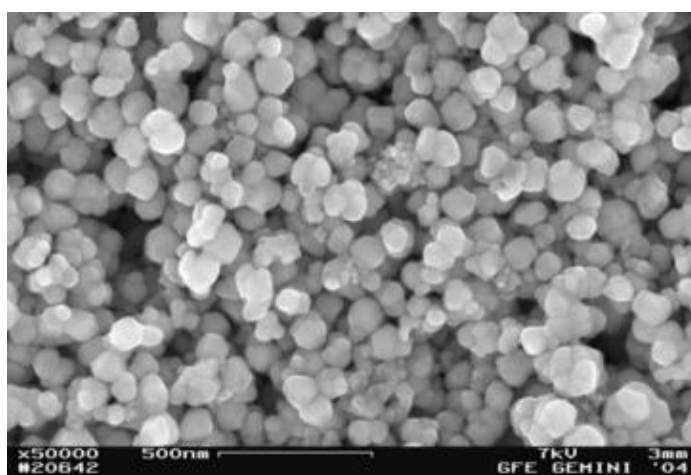
Diversas classes de nanopartículas (NPs) podem ser encontradas na literatura, tais como NPs metálicas, NPs óxido metálicas e NPs poliméricas. Dentre estas citadas, as NPs óxido metálicas se destacam devido à sua diversidade de funções, concedido por suas características singulares. Dentre os óxidos metálicos, as nanopartículas de óxido de zinco geram interesse científico em decorrência das suas propriedades, como condutividade elétrica e térmica, absorção óptica e estabilidade em elevadas temperaturas, além de propriedades biológicas, como sua ação antimicrobiana (PORTO *et al.*, 2017; SOUZA, 2016).

O composto óxido de zinco (ZnO) é classificado como inorgânico, higroscópico, polar, semicondutor pertencente ao grupo II-VI. A denominação do grupo no qual o composto é incluído resulta da alocação do zinco e oxigênio na tabela periódica, respectivamente,

pertencentes aos grupos 12 (II B) e 16 (VI A). O metal (zinco) e o não-metal (oxigênio) são unidos principalmente através de ligação iônica, resultando em íons Zn^{2+} e O^{2-} que exercem atração eletrostática entre si (SOARES, 2018). Tal atração eletrostática permite o arranjo simétrico dos íons formando uma substância sólida cristalina, denominada retículo cristalino, no caso retículo cristalino de ZnO. Na natureza, o ZnO ocorre na forma mineral, de coloração vermelho-sangue e faixa amarelo alaranjada, denominada zincite (BRITANNICA, 2018).

Por sua vez o ZnO sintético apresenta pigmentação branca com alto poder de reflexão da luz, além de ter alto poder de absorção das radiações na região do ultravioleta, fato que justifica a sua aplicação em formulações de protetores solares (MAYRINCK *et al.*, 2014). Na Figura 5, pode-se observar através da microscopia de varredura as nanopartículas de óxido de Zinco com aumento de 50000 vezes.

Figura 5 - Imagem de nanopartículas de óxido de zinco, obtidas através de Microscopia eletrônica de varredura.



Fonte: Koplín *et al.*, (2006).

2.2.2 Interação das NP-ZnO com as microalgas

A atividade biológica das nanopartículas em relação a nanotoxicidade depende dos fatores físico-químicos, muitas vezes não analisados em estudos para a toxicologia convencional, sendo eles: concentração, tamanho da partícula, distribuição do tamanho, estado de aglomeração, forma da partícula, estrutura cristalina, composição química, área superficial, química superficial, carga superficial e porosidade (OBERDÖRSTER *et al.*, 2005).

Diversos estudos vêm sendo realizados buscando elucidar os mecanismos de toxicidade envolvidos na interação entre nanopartículas e o ecossistema aquático (VASEASHTA *et al.*, 2007; FARRÉ *et al.*, 2009).

Segundo Schierz *et al.* (2014) as nanopartículas tendem a formar grupos, dificilmente dispersos por meios mecânicos, sendo denominados de agregados de nanopartículas. Estes complexos causam efeitos diferentes daqueles apresentados por nanopartículas individuais.

Os efeitos tóxicos gerados pela interação das nanopartículas com as microalgas afetam principalmente a estrutura e metabolismo celular do micro-organismo através das características estruturais como forma e área superficial, além do poder antimicrobiano apresentado pelas nanopartículas de ZnO (ZIELIŃSKA *et al.*, 2009; PETERSEN *et al.*, 2015). Os efeitos tóxicos supracitados podem ser classificados em diretos e indiretos (LI; BRETT, 2013; QU; ALVAREZ; LI, 2013; PETERSEN *et al.*, 2015).

Os efeitos considerados diretos são os danos a morfologia do microrganismo, sejam eles nas paredes ou membranas celulares e a aglomeração das células do microrganismo junto a nanopartícula (MACHADO; SOARES, 2014; GALLETTI *et al.*, 2016; WANG, Y. *et al.*, 2016). Por sua vez os efeitos indiretos são gerados pela diminuição da quantidade de luz devido a área superficial ocupada pela nanopartícula, denominado de efeito de sombreamento, estresse oxidativo devido a produção de compostos reativos, danos ao material genético e mudança das condições ideais de crescimento devido a interação dos nutrientes com as nanopartículas presentes no meio (ARUOJA *et al.*, 2009; LONG *et al.*, 2012; LEI *et al.*, 2016;).

Entre os diversos efeitos citotóxicos causados pelas nanopartículas se destacam a alteração do metabolismo do microrganismo, efeito de sombreamento e a consequente inibição do crescimento (GONG *et al.*, 2011).

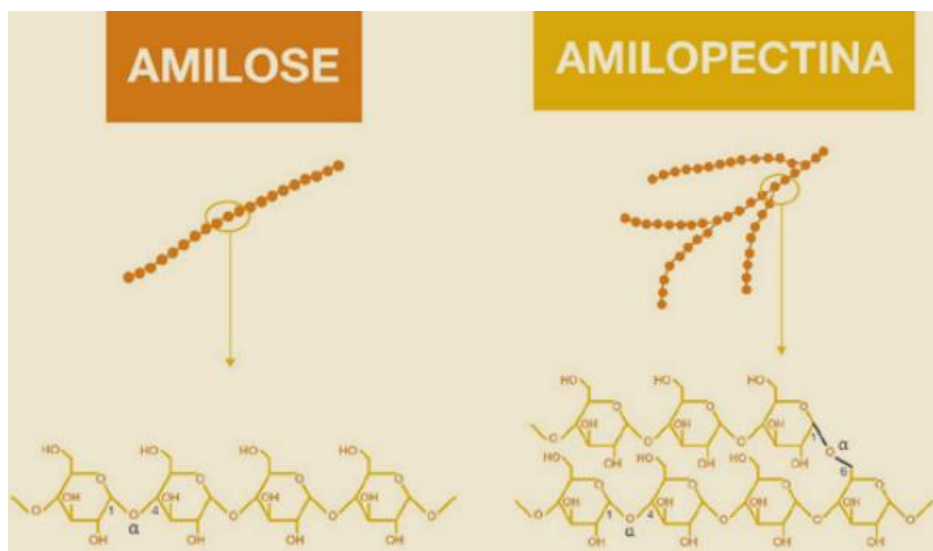
2.3 Amido

O amido é um polissacarídeo comumente encontrado de forma natural em sementes de arroz, trigo, milho ou em raízes e tubérculos como mandioca, batata e batata-doce. O amido possui propriedades que podem ser modificadas artificialmente visando modificar a geleificação, diminuir a retrogradação, aumentar a estabilidade, melhorar a textura e aumentar o poder emulsificante, propiciando uma maior aplicabilidade e rendimento na indústria de alimentos, este produto é denominado amido modificado. Devido as características apresentadas por ambas categorias de amido, este composto é amplamente utilizado como espessantes, géis, absorventes de umidade, adesivos, entre outros (BEMILLER, 1997; ROCHA; DEMIATE; FRANCO, 2008;).

Este polissacarídeo é constituído de grânulos heterogêneos, porosos e semicristalinos, apresentando uma formação estrutural composta por cadeias de amilose e amilopectina. A amilose é constituída por unidades de glicose unidas por ligações glicosídicas α -1,4, originando

uma cadeia linear. Já a amilopectina é formada por unidades de glicose unidas em α -1,4 e α 1,6, formando uma estrutura ramificada (MIZUKAMI; TAKEDA; HIZUKURI, 1999; TESTER; KARKALAS; QI, 2004). Na Figura 6, observa-se a representação das estruturas presentes no amido, amilose e amilopectina, bem como as ligações responsáveis pela ordenação do grânulo.

Figura 6 - Representação da estrutura molecular da amilose e amilopectina.



Fonte: Quiroga (2015).

As proporções em que essas estruturas aparecem se distinguem em relação às fontes botânicas, variedades de uma mesma espécie, podendo apresentar diferenças na mesma variedade, de acordo com o grau de maturação da planta. Dependendo dos fatores supracitados os valores comumente encontrados variam entre 20-30% de amilose (TESTER; KARKALAS; QI, 2004; WEBER; COLLARES-QUEIROZ; CHANG, 2009). A Tabela 1 apresenta as proporções de amilose e amilopectina de acordo com a origem do grânulo de amido.

Tabela 1 - Diferentes proporções de amilose e amilopectina de acordo com a fonte amilácea.

Fonte de amido	Amilose (%)	Amilopectina (%)
Arroz	25 – 30	70 – 75
Batata	18 - 23	77 - 82
Mandioca	16 - 24	76 - 84
Milho	25 - 28	72 - 75
Trigo	20 - 24	76 - 80

Fonte: Adaptado de Hoover (2001).

De acordo com os dados demonstrados na Tabela 1, podemos analisar as diferentes porcentagens de amilose e amilopectina em um grânulo das diferentes fontes de amido. A discrepância entre as proporções faz com que os géis formados apresentem cores e texturas distintas. Sendo as pastas ou géis formados pelos amidos de milho, trigo ou arroz, opacos devido a seus elevados teores de amilose e conseqüentemente alta taxa de sinérese. Já os géis obtidos das féculas da batata ou da mandioca não são tão opacos, essa característica é atribuída a taxa de sinérese (expulsão de água do interior do gel) ser menor que o anterior tornando o gel mais maleável (QUIROGA, 2015).

Além da capacidade de gelatinização e da fácil queima (degradação), os amidos são baratos, apresentam-se em grandes quantidades, sendo superado apenas pela celulose como elemento orgânico disponível na natureza, com facilidade de acesso e praticamente não produzem poluentes nos processos de transformação.

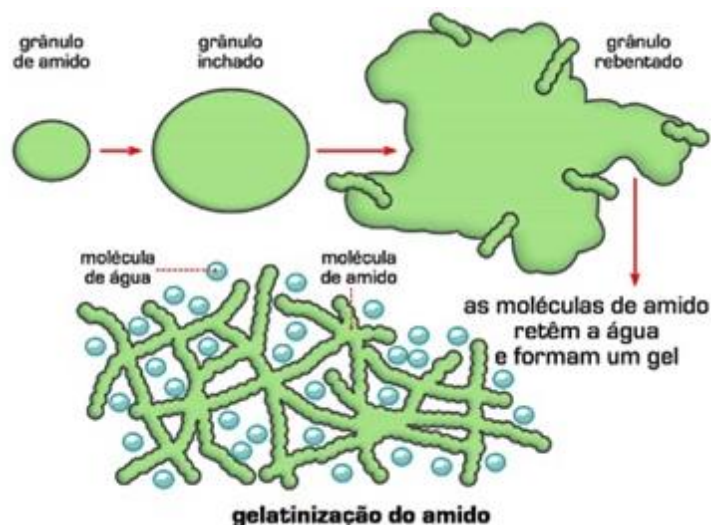
2.3.1 Gelatinização

Os grânulos de amido possuem a propriedade de reter pequenas quantidades de água, porém não são solúveis em soluções aquosas, de uma maneira explicativa, quando o amido entra em contato com água fria, os grânulos dilatam ligeiramente entre 10 a 20% devido à difusão e absorção de água, porém esse processo é considerado reversível através de secagem.

Todavia, quando os grânulos são aquecidos em água, eles dilatam irreversivelmente, nesse caso, a estrutura cristalina é rompida, pois há um relaxamento entre as ligações de hidrogênio e as moléculas de água. Como as moléculas de água interagem com os grupos hidroxilas da amilose e da amilopectina, ocorre um aumento no tamanho dos grânulos iniciando um movimento intenso de vibração molecular, levando ao rompimento das pontes de hidrogênio e por conseqüência da ordem molecular, liberando para o meio a amilose, aumentando a viscosidade dando início ao processo de gelatinização (MACGREGOR; FINCHER, 1993; HOOVER, 2001; SOARES, 2003; DAMODARAN; OWEN; KIRK, 2010). Na Figura 7, observa-se esquematicamente como ocorre o processo de gelatinização de acordo com as transformações sofridas pelo grânulo de amido.

Ao fim do processo de gelatinização a viscosidade do composto aumenta, pois as moléculas de amido retêm as moléculas de água, resultando em um gel. Parâmetros como a concentração de amido, pH, açúcares, gorduras, sais presentes e outros fatores devidos à natureza do amido, afetam a formação e as características do gel.

Figura 7 - Representação esquemática do processo de gelatinização do amido.



Fonte: Quiroga (2015).

A temperatura na qual o amido inicia mudanças estruturais é denominada de temperatura de gelatinização. Na realidade, nem todos os grânulos de amido começam o processo de gelatinização na mesma temperatura, sendo mais apropriado uma faixa de temperatura limitada. A variação das faixas de temperaturas varia de acordo com a origem botânica do amido ou fécula (POLESI, 2009). Na Tabela 2, pode-se observar as variações de temperatura para cada fonte de amido.

Tabela 2 - Faixas de temperatura de gelatinização para diferentes fontes de amido.

Amido	Faixa de temperatura de gelatinização
Arroz	61 – 77
Milho	62 - 72
Batata	56 - 66
Mandioca	59 - 71
Sorgo	68 - 75
Trigo	52 - 63

Fonte: Adaptado de Bobbio e colaboradores (2001).

2.3.2 Retrogradação

A retrogradação é o processo em que ocorre a reaproximação das moléculas pela diminuição de temperatura no processo de resfriamento do gel, nesse momento há liberação de

água existente entre as moléculas (sinérese) e a formação de pontes de hidrogênio intermoleculares. A origem da cristalização em frações da rede deve-se ao fato de que certas cadeias poliméricas do gel se reorganizam alinhando-se, sendo que este fenômeno ocorre quando parte do solvente é eliminado do gel, ocasionando a solidificação do mesmo. Logo, os processos de retrogradação ocorrem com maior facilidade em amidos com maior quantidade de amilose, resultando em um processo irreversível, implicando em uma redução de volume do grânulo, aumento da firmeza do gel (SINGH *et al.*, 2003).

Durante o processo de retrogradação as moléculas de amilopectina e amilose reagem de formas diferentes, sendo o processo da amilose mais rápido, reassociando as moléculas através de ligações de pontes de hidrogênio formando uma estrutura cristalina. A retrogradação da amilopectina é mais lenta, devido seu processo se iniciar no núcleo do cristal (YU, S.; MA; SUN, 2009; JIAMJARIYATAM; KONGPENSOOK; PRADIPASENA, 2015).

A sinérese pode ser utilizada para avaliar a estabilidade do gel de amido, mensurando a água que é expulsa após ciclos de congelamento e descongelamento. Essa estabilidade representada através da sinérese serve ainda como indicadora da retrogradação, quanto menor for a taxa de sinérese mais lento é o processo retrogradativo (JAYAKODY; HOOVER, 2002; LIU *et al.*, 2014).

Outros fatores que influenciam na retrogradação do amido além do teor de amilose são: fonte botânica do amido, relação amido-água, temperatura e tempo de armazenamento, pH, condições de aquecimento e resfriamento e a presença de constituintes não amiláceos (açúcares, lipídios, hidrocoloides e sais) (XU *et al.*, 2013).

2.3.3 Degradação e porosidade

Para obtenção de uma matriz porosa à base de amido, se faz necessário que o gel retrogradado seja degradado em altas temperaturas, desta forma as ligações entre os polissacarídeos são quebradas, surgindo espaços vazios dentro do material tornando-o poroso. A rede formada por inúmeros poros no material é denominada porosidade, sendo a definição de poro: interstícios hipotéticos entre as moléculas dos corpos. A estrutura porosa da matriz depende do tamanho das partículas, da forma e da maneira em que as partículas constituintes estão distribuídas pelo material (VAN VLACK, 1973).

Os poros podem ser classificados como abertos ou fechados, segundo sua disponibilidade a um fluido externo. Na Figura 8, ilustra-se diversos tipos de poros abertos (a, b, c) e fechados (d).

Figura 8 - Sólido poroso com ilustração dos diferentes tipos de poros: abertos (a, b, c), fechados (d) e rugosidade da superfície (e).



Fonte: Ferreira *et al.*, (2007).

Os poros fechados são inativos quanto ao fluxo de líquidos e gases, mas exercem influência sobre as propriedades mecânicas, a densidade e a condutividade térmica. Por outro lado, os poros abertos afetam diretamente, certas propriedades como permeabilidade, impermeabilidade ao vácuo e disponibilidade de superfície para reações catalíticas. A rugosidade da superfície (e) também pode ser considerada como porosidade. A *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) recomenda uma classificação para as faixas de tamanho, considerando as propriedades de adsorção. Assim, têm-se: microporos (< 2 nm); mesoporos (2- 50 nm) e macroporos (> 50 nm). Vários autores têm reiterado que tais limites de tamanho são, até certo ponto, artificiais, na medida em que resultam dos limites das técnicas de caracterização (ROUQUEROL *et al.*, 1994; GALDINO, 2011).

2.3.4 Aplicação de matrizes poliméricas

O amido é considerado um dos polímeros biodegradáveis mais promissores, devido sua atraente disponibilidade e custo (YU, L.; DEAN; LI, 2006). A grande variedade de polímeros existentes e a combinação destes permitem a obtenção de materiais com diversas propriedades. As distintas características mecânicas, térmicas, biodegradabilidade e capacidade de moldagem possibilitam diversas aplicações em inúmeros campos, dentre estes, destaca-se o uso como suporte para liberação de ativos. Além da função principal de suporte, os polímeros podem contribuir no retardamento da liberação dos compostos ativos inseridos, tais como fármacos, pesticidas, fertilizantes e antimicrobianos (LYRA *et al.*, 2007).

Diversos sistemas de liberação estão sendo estudados de acordo com o âmbito onde serão aplicados. Medicamentos encapsulados em matrizes poliméricas hidrofílicas mostraram um perfil de liberação controlada, com redução dos efeitos tóxicos. Isto se torna possível, devido a que sistemas de liberação prolongados podem ser moldados a fim de se manterem constantes durante o tratamento (XIE; BUSCHLE-DILLER, 2010).

No uso de fertilizantes, suportes poliméricos em forma de fibras mostraram a capacidade de liberar fertilizantes com taxa controlada e com diferentes concentrações de saturação (JAMNONGKAN; KAEWPIROM, 2010). Materiais fibrosos podem ser utilizados na liberação de fertilizantes, assim como cápsulas. A vantagem das fibras é a minimização da lixiviação quando comparado às cápsulas, o que reduz a perda de fertilizante e diminui a contaminação pelo excesso de particulado.

3 METODOLOGIA

Neste capítulo, estão descritas as metodologias utilizadas para manutenção das microalgas *Spirulina platensis* e *Synechococcus nidulans* anteriormente aos ensaios experimentais, para produção de nanopartículas de ZnO e para fabricação de matrizes poliméricas a base de amido. Além disso, será detalhada a metodologia de avaliação de crescimento celular das microalgas cultivadas em meio contendo matrizes porosas à base de amido impregnadas com nanopartículas de ZnO.

3.1 Materiais

3.1.1 Inóculo

Para realização dos ensaios foram utilizados Erlenmeyers de 500 ml contendo 270 ml de meio Zarrouk e 30 ml de inóculo, retirados de uma única cultura mãe.

3.1.2 Amido

Para a produção das matrizes porosas à base de amido utilizou-se a fécula de mandioca devido suas proporções entre amilose e amilopectina.

3.1.3 Óxido de zinco

Como fonte de óxido de zinco, utilizou-se óxido de zinco comercial em escala microscópica e nanopartículas de óxido de zinco obtidos pelo procedimento de sol-gel proteico em escala nanométrica.

3.2 Métodos

3.2.1 Micro-organismos

Neste estudo foram utilizadas as microalgas *Spirulina platensis* e *Synechococcus nidulans*, cedidas pelo Laboratório de Engenharia Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande – FURG.

3.2.2 Meio de Cultivo

As microalgas foram mantidas em meio Zarrouk (ZARROUK, 1966) a 28°C em estufa termostaticada do tipo BOD com fotoperíodo de 12 h em Erlenmeyer dotado de aeração. Os experimentos foram realizados no laboratório de Engenharia de Alimentos, pertencente a Universidade Federal do Pampa – UNIPAMPA. Na Figura 9, pode-se analisar visualmente o cultivo dos micro-organismos.

Figura 9 - Manutenção dos inóculos das microalgas *Spirulina platensis* e *Synechococcus nidulans*.



Fonte: Autor, 2021.

A composição química do meio Zarrouk é rica em macro e micronutrientes, tornando o fornecimento de nutrientes ideal para a manutenção, desenvolvimento e multiplicação celular das microalgas. Na Tabela 3, temos a composição química do meio Zarrouk adaptado e suas respectivas concentrações.

Tabela 3 - Composição química do meio Zarrouk.

Reagentes	Quantidades
NaHCO	16,8 g.L ⁻¹
K ₂ HPO ₄	0,5 g.L ⁻¹
NaNO ₃	2,5 g.L ⁻¹
K ₂ SO ₄	1,0 g.L ⁻¹
NaCl	1,0 g.L ⁻¹
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2 g.L ⁻¹
CaCl ₂	0,04 g.L ⁻¹
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01 g.L ⁻¹
EDTA	0,08 g.L ⁻¹
Solução A5*	1mL
Solução B6**	1mL

Fonte: Zarrouk (1966).

*Solução A5 (g.L⁻¹): H₃BO₃: 2,86; MnCl₂.4H₂O: 1,81; ZnSO₄.7H₂O: 0,222; CuCO₄.5H₂O: 0,079; MnO₃: 0,015.

**Solução B6 (g.L⁻¹): NH₄VO₃: 22,86; KCr(SO₄)₂. 12H₂O:192; NiSO₄. 6H₂O: 44,8; NaWO₄. 2H₂O: 17,94; 34 TiOSO₄. H₂SO₄. 8H₂O: 61,1; CO(NO₃)₂. 6H₂O: 43,98.

3.2.3 Delineamento experimental

Durante os ensaios experimentais as microalgas foram cultivadas em meio Zarrouk nos mesmos parâmetros supracitados, porém adicionados de matrizes porosas à base de amido impregnadas com nanopartículas de óxido de zinco, nas concentrações de 2 e 20 mg.L⁻¹ e em meio Zarrouk contendo matrizes porosas à base de amido impregnadas com ZnO comercial por um período de 9 dias. Foi realizado um planejamento fatorial 2³, no qual os fatores estudados foram: concentração de óxido de zinco, espécie de microalga e fonte de zinco. Na Tabela 4 é apresentada a matriz do Planejamento Fatorial 2³ utilizada, onde:

- X1 são as concentrações de ZnO: 2 mg/L (-1) e 20 mg/L (+1)
- X2 são as espécies de microalgas: *Spirulina platensis* (-1) e *Synechococcus nidulans* (+1)
- X3 são as fontes de fornecimento de zinco: Matriz porosa à base de amido impregnada com nanopartículas de ZnO (+1) e Matriz porosa à base de amido impregnada com ZnO comercial (-1)

Tabela 4 - Planejamento fatorial 2³.

(continua)

Ensaio	X1	X2	X3	Variáveis reais X1	Variáveis reais X2	Variáveis reais X3
1	-1	-1	-1	2 mg/L	<i>Spirulina platensis</i>	ZnO comercial
2	+1	-1	-1	20 mg/L	<i>Spirulina platensis</i>	ZnO comercial
3	-1	+1	-1	2 mg/L	<i>Synechococcus nidulans</i>	ZnO comercial
4	+1	+1	-1	20 mg/L	<i>Synechococcus nidulans</i>	ZnO comercial
5	-1	-1	+1	2 mg/L	<i>Spirulina platensis</i>	Nanopartícula de ZnO
6	+1	-1	+1	20 mg/L	<i>Spirulina platensis</i>	Nanopartícula de ZnO

Tabela 5 - Planejamento fatorial 2³.

							(conclusão)
7	-1	+1	+1	2 mg/L	<i>Synechococcus</i> <i>nidulans</i>	Nanopartícula de ZnO	
8	+1	+1	+1	20 mg/L	<i>Synechococcus</i> <i>nidulans</i>	Nanopartícula de ZnO	

Fonte: Autor (2021).

O delineamento experimental foi estruturado levando em consideração os resultados obtidos por De Quadros e colaboradores (2020).

3.2.4 Determinações analíticas

Foram determinados diariamente durante o cultivo o crescimento celular e o pH. O crescimento da biomassa foi monitorado através da densidade ótica das culturas a 670 nm em espectrofotômetro por meio de uma curva padrão previamente construída relacionando peso seco e densidade ótica, o pH por sua vez foi mensurado através de pHmetro.

3.2.5 Análise Estatística

O Planejamento Fatorial foi analisado por meio do auxílio do software R (R Core Team, 2021). Foram também realizadas o teste de comparação de médias Tukey com significância de 5%.

3.2.6 Nanopartículas de ZnO

O processo utilizado para a produção de nanopartículas de óxido de zinco foi o gel-sol proteico, o mesmo seguiu quatro etapas, sendo elas: preparação da solução, secagem, decomposição e formação das nanopartículas (MENESES; FLORES; SASAKI, 2007).

3.2.6.1 Preparação da solução

Nesta etapa foi realizada a dissolução de 2,5 gramas de colágeno em 40 mililitros de água ultrapura (Milli-Q / 18,2 MΩ.cm) na temperatura de 40°C, com agitação constante, durante um período de 30 minutos. Posteriormente foi adicionado gradualmente a quantia de 1 g da solução de nitrato de zinco, mantendo-se a agitação da mistura durante um intervalo de 20 min.

3.2.6.2 Secagem

A solução obtida foi submetida a secagem em estufa a 60°C, permanecendo nessa condição por 48 h.

3.2.6.3 Calcinação

Logo após o processo de secagem a resina resultante foi destinada a calcinação, esse processo consiste em submeter a amostra a uma temperatura de 250°C durante o período de 3 h, tal procedimento foi realizado em forno mufla com exaustão de ar.

3.2.6.4 Formação das nanopartículas

A etapa de formação de nanopartículas consiste na completa degradação e consequente eliminação do colágeno. Sabendo que os parâmetros do binômio tempo x temperatura são os determinantes do tamanho e da morfologia das nanopartículas, foi utilizada nesse trabalho a temperatura de 550°C durante um período de 3 h (ETCHEVERRY *et al.*, 2018). Na Figura 10, pode-se observar o processo para obtenção das nanopartículas de ZnO.

Figura 10 - Processo de obtenção das nanopartículas de ZnO.

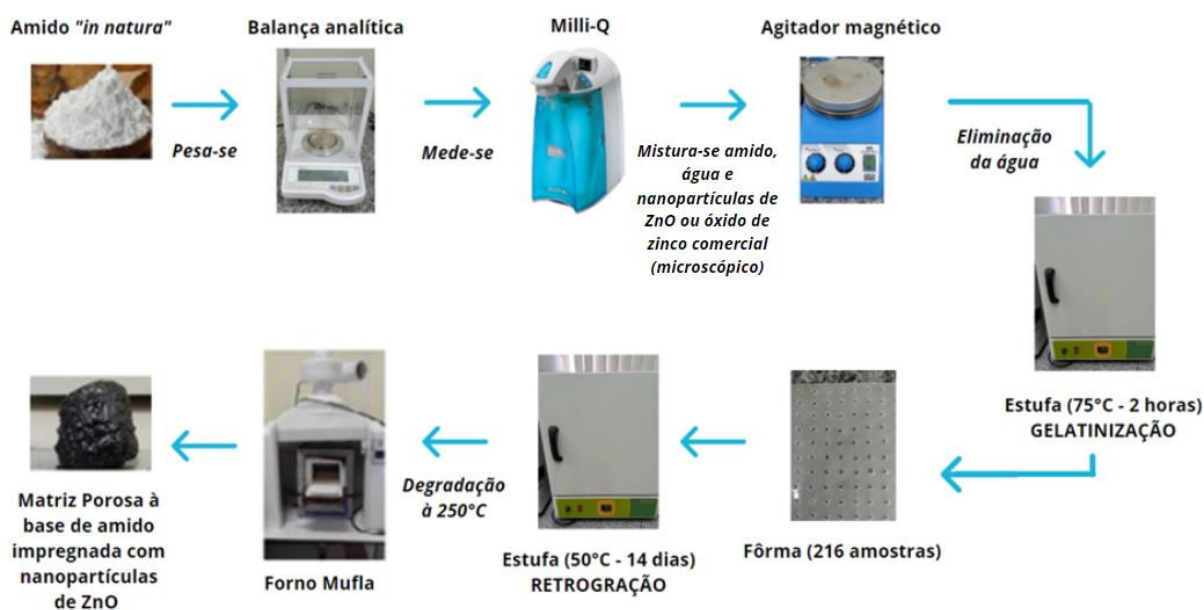


Fonte: Autor, 2021.

3.2.7 Preparação da matriz porosa impregnada de ZnO

Para a produção da matriz porosa de amido impregnada com nanopartículas de óxido de zinco, foram pesados em balança analítica e posteriormente misturadas as NP-ZnO (1 a 5% em massa de material sólido) a fécula de mandioca e após adicionado água ultrapura (Milli-Q / 18,2 MΩ.cm) na proporção de 80% em massa. Esse procedimento foi realizado em agitador magnético visando a dissolução completa da mistura. Após, a solução foi levada para estufa com circulação de ar com uma temperatura de 75°C por um período de 2 h objetivando o fenômeno de gelatinização do amido. A pasta resultante da gelatinização foi transferida para uma fôrma com capacidade de 216 amostras cilíndricas com dimensões de 3,5 mm de diâmetro por 3 mm de altura. O processo de retrogradação subsequente visa a retirada da água, sendo realizado em estufa com temperatura de 50°C durante um período de 14 dias em ambiente fechado, tendo como resultado discos com dimensões de 3,42 mm de diâmetro por 1,38 mm de altura, sendo esses valores médios para uma amostragem de 40 discos. A etapa final da produção das matrizes de amido impregnadas com nanopartículas de ZnO, consistiu na degradação das amostras a 250°C em forno mufla com exaustão de ar durante um período de 2 horas. O resultado final foram objetos aproximadamente esféricos com 4 mm de diâmetro em média contendo impregnado em suas paredes NP-ZnO. A impregnação da matriz porosa à base de amido com o óxido de zinco comercial segue o mesmo processo, tendo como diferença a substituição das NP-ZnO pelo material microscópico na etapa de mistura da solução. Na Figura 11, pode-se observar o procedimento realizado bem como os equipamentos utilizados no processo.

Figura 11 - Processo de obtenção da matriz porosa à base de amido impregnada com óxido de zinco.



Fonte: Autor (2021).

3.2.8 Caracterização das matrizes porosas impregnadas com ZnO

A caracterização estrutural das nanopartículas de óxido de zinco foi realizada por difração de raios X e os resultados foram avaliados utilizando os métodos de análise de perfil dos picos (Scherrer, Williamson-Hall, Size-strain plot e coeficiente de textura), também foi realizada microscopia de força atômica na superfície das matrizes com o intuito de caracterizar morfológicamente o material poroso. A técnica de difração de raios X (DRX) é o método experimental mais reconhecido utilizado para obtenção de parâmetros quanto a estrutura cristalina de materiais, sendo estabelecida e desenvolvida como técnica experimental ao longo do século passado.

As análises de DRX foram realizadas em equipamento Rigaku, modelo Ultima IV. Sendo utilizada como parâmetro de medida a geometria de Bragg-Bretano (Theta-2Theta) com radiação na linha K-alfa do cobre gerada com 40kV/20mA no tubo. A variação angular utilizada foi de 30° a 80° com passo de 0,05° e tempo de integração de 5 segundos. O objetivo da análise foi caracterizar a estrutura cristalográfica da matriz obtida e, mediante comparação com difratogramas publicados na literatura confirmar se o produto sintetizado era realmente óxido de zinco.

A microscopia de força atômica buscou caracterizar a morfologia das matrizes biopoliméricas, tendo suas imagens obtidas em equipamento Agilent, modelo 5500, operando

em temperatura ambiente, usando o modo contato, com sonda PPP-CONT (Nanosensors, constante de força 0,2 N/m, frequência de ressonância 13kHz). Para a captura das imagens utilizou-se o software PicoView 1.14.4 (Molecular Imaging Corporation) e para análise das mesmas o software Gwyddion 2.55.

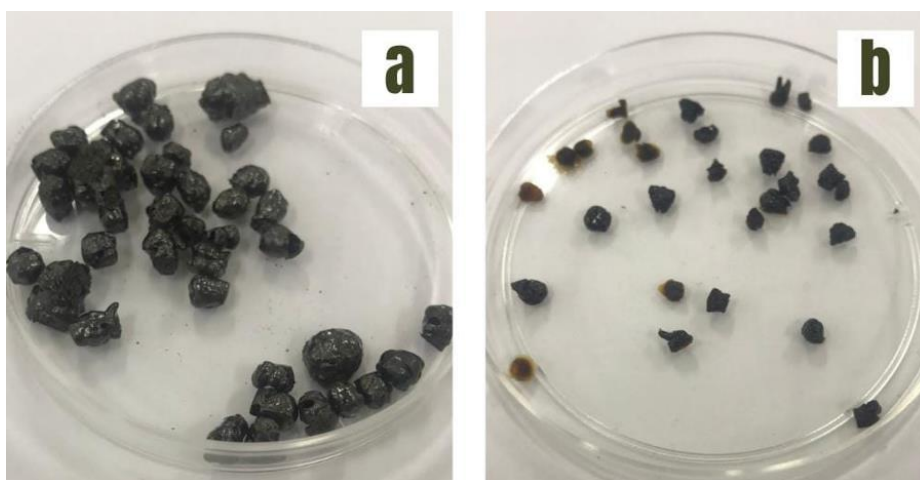
4 APRESENTAÇÃO DA PESQUISA E ANÁLISE DOS RESULTADOS

Conforme estabelecido nos objetivos deste trabalho, este capítulo tem como propósito expor os resultados obtidos na caracterização da matriz porosa à base de amido impregnada com óxido de zinco e os parâmetros de crescimento das microalgas em meio contendo matrizes porosas à base de amido impregnadas com ZnO, bem como, compara-los com dados obtidos por diferentes autores visando a discussão dos valores apresentados.

4.1 Caracterização das matrizes porosas impregnadas com ZnO

Os resultados obtidos pelas técnicas de caracterização estrutural e morfológica demonstraram o potencial uso das matrizes porosas à base de amido na impregnação de compostos. Na Figura 12 podemos observar os conjuntos das matrizes porosas à base de amido impregnadas com nanopartículas de óxido de zinco e óxido de zinco comercial.

Figura 12 - Matrizes porosas à base de amido impregnadas com óxido de zinco onde: (a) Matriz impregnada com nanopartículas de óxido de zinco. (b) matriz impregnada com óxido de zinco comercial.



Fonte: Autor, 2022.

Pela ilustração podemos visualizar que os pellets impregnados com nanopartículas de óxido de zinco apresentam tamanho maior, característica que não interfere no decorrer do experimento visto que a concentração de óxido de zinco em ambas matrizes é a mesma.

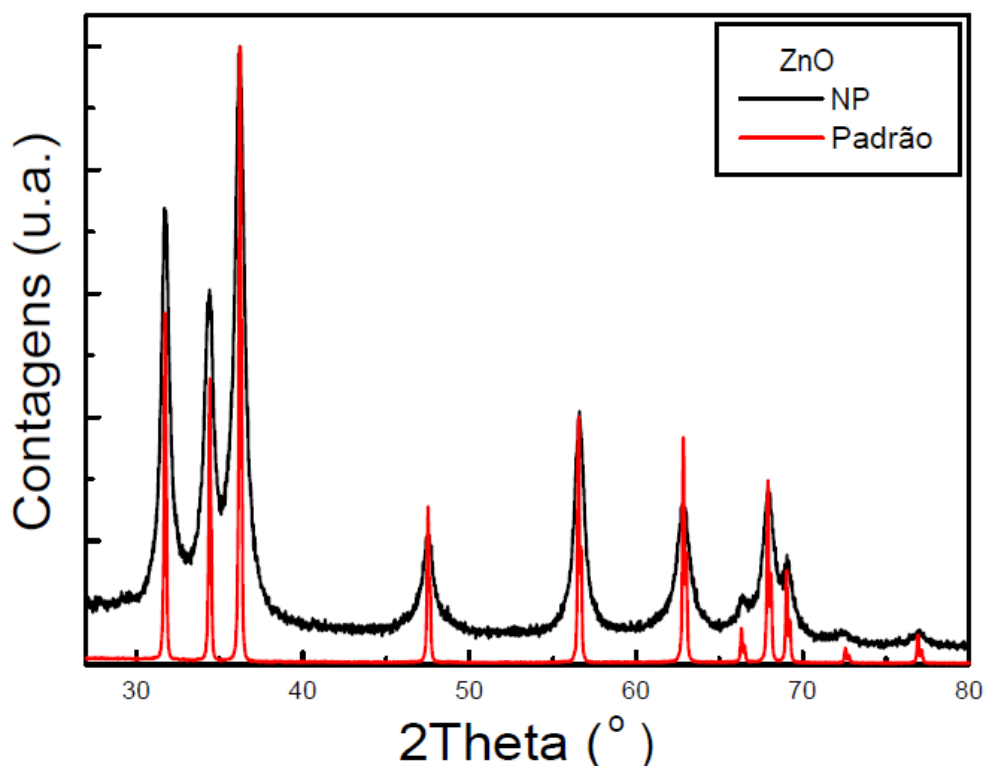
Nos parágrafos subsequentes serão apresentados os resultados obtidos das diferentes técnicas utilizadas para a caracterização das matrizes porosas à base de amido impregnadas com ZnO.

4.1.1 Difração de Raios X (DRX)

Para caracterização estrutural do amido e o acompanhamento das alterações durante o processo de formação do material poroso, e da impregnação do ZnO, utilizou-se a DRX explorando especificamente uma análise do perfil de linhas dos difratogramas.

Na Figura 13 são apresentados os difratogramas de raio-X para as amostras sintetizadas com nanopartículas de óxido de zinco.

Figura 13 - Difratogramas de Raios-X das matrizes impregnadas com nanopartículas de ZnO.



Fonte: Autor, 2022.

Pode-se visualizar que todos os picos de difração de Bragg, devidamente especificados nos difratogramas, são típicos de cristais de óxido de zinco com estrutura hexagonal (wurtzita), conforme reportado por Lee *et. al.* (2008) e Zanatta (2009). Desta forma podemos confirmar a presença de nanopartículas de óxido de zinco na matriz porosa à base de amido. A não existência de picos extra demonstram que os nanocristais de óxido de zinco sintetizados possuem elevado grau de pureza, e a cristalinidade do material parece não ter sido afetada pelos processos de gelatinização, retrogradação e degradação do amido.

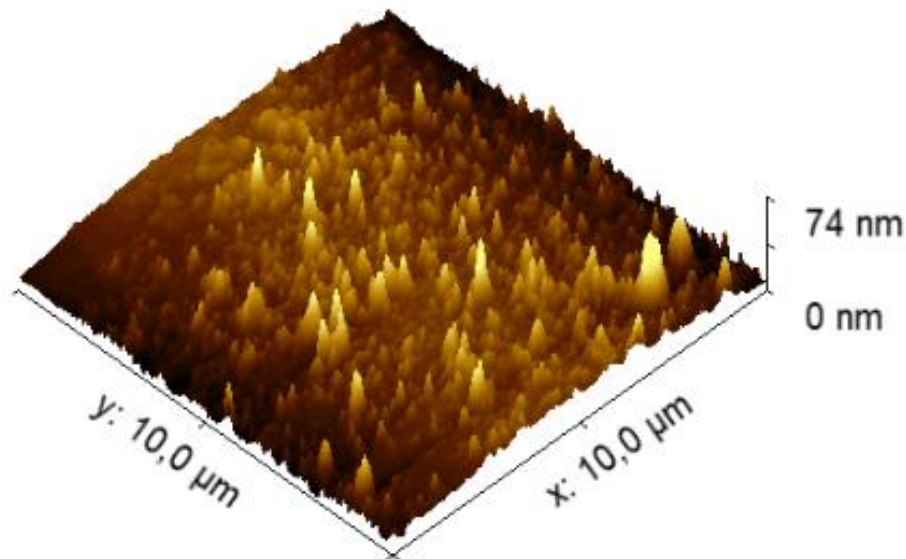
O alargamento dos picos está relacionado com o tamanho das partículas analisadas, sendo assim, quanto mais largo for um pico, menor será o tamanho das partículas (BECHERI

et al. 2007). Esta afirmação corrobora com o difratograma apresentado visto que foram analisadas partículas em escala “nano”, tendo como resposta picos estreitos.

4.1.2 Microscopia de Força Atômica

Para observar a influência do teor de nanopartículas de óxido de zinco na morfologia das matrizes à base de amido, foram utilizadas amostras sem adição de NP-ZnO e com adição de NP-ZnO na matriz biopolimérica. Nas figuras 14 e 15 observamos a caracterização das matrizes em uma determinada área e consequentemente temos a topografia do espaço analisado.

Figura 14 - Microscopia de Força Atômica na superfície da matriz à base de amido impregnada com nanopartículas de ZnO.



Fonte: Autor, 2022.

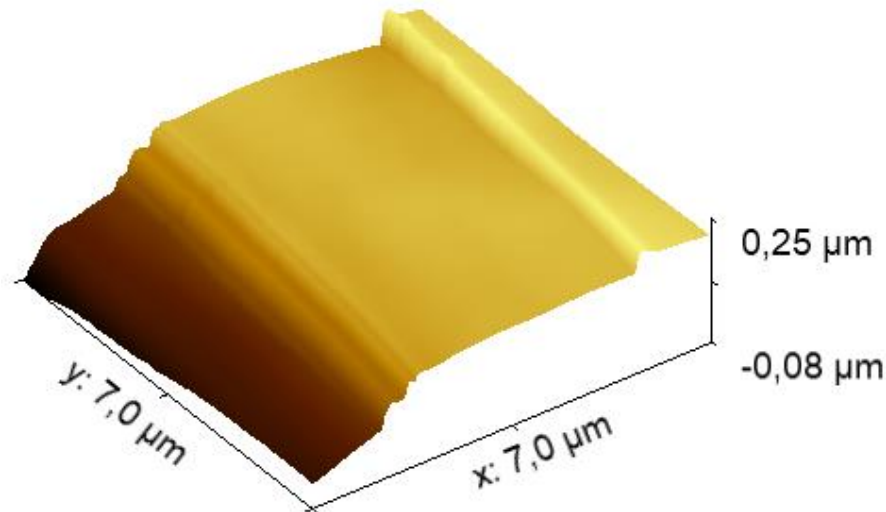
Com as imagens topográficas da figura 14, observa-se que as nanopartículas apresentam geometria próxima a esférica e que a distribuição desse sistema é uniforme. Apesar do tamanho das nanopartículas possuírem valores aproximados, elas podem estar distribuídas de forma mais dispersa ou mais aglomerada. Nessa imagem, as regiões mais escuras correspondem aos “vales” ou depressões das amostras. Quanto mais clara é a região, maior é a altura do ponto observado, sendo que o ponto mais claro em cada imagem corresponde ao máximo na escala do eixo z.

Confrontando as imagens obtidas com as apresentadas por Costa *et. al.* (2021), o qual analisou nanopartículas poliméricas observamos semelhanças na topografia, isto ocorre devido as características morfológicas das nanopartículas supracitas.

Ao analisar a Figura 15 onde temos a matriz de amido “*in natura*”, visualiza-se

depressões em sua superfície, tal topografia favorece a impregnação de diversos compostos em matrizes à base de amido, modificando suas características físicas e químicas.

Figura 15 - Microscopia de Força Atômica na superfície da matriz unicamente à base de amido.



Fonte: Autor, 2022.

Realizando uma comparação entre as figuras 14 e 15 é possível visualizar as alterações que ocorreram na superfície das amostras como consequência direta da adição das nanopartículas de óxido de zinco. Observa-se um aumento de rugosidade das superfícies a qual manifesta-se em proporção direta ao acréscimo de nanopartículas. Este aumento de rugosidade na superfície da amostra altera a porosidade do material facilitando a interação da matriz com o meio, além de refletir na condutividade do material.

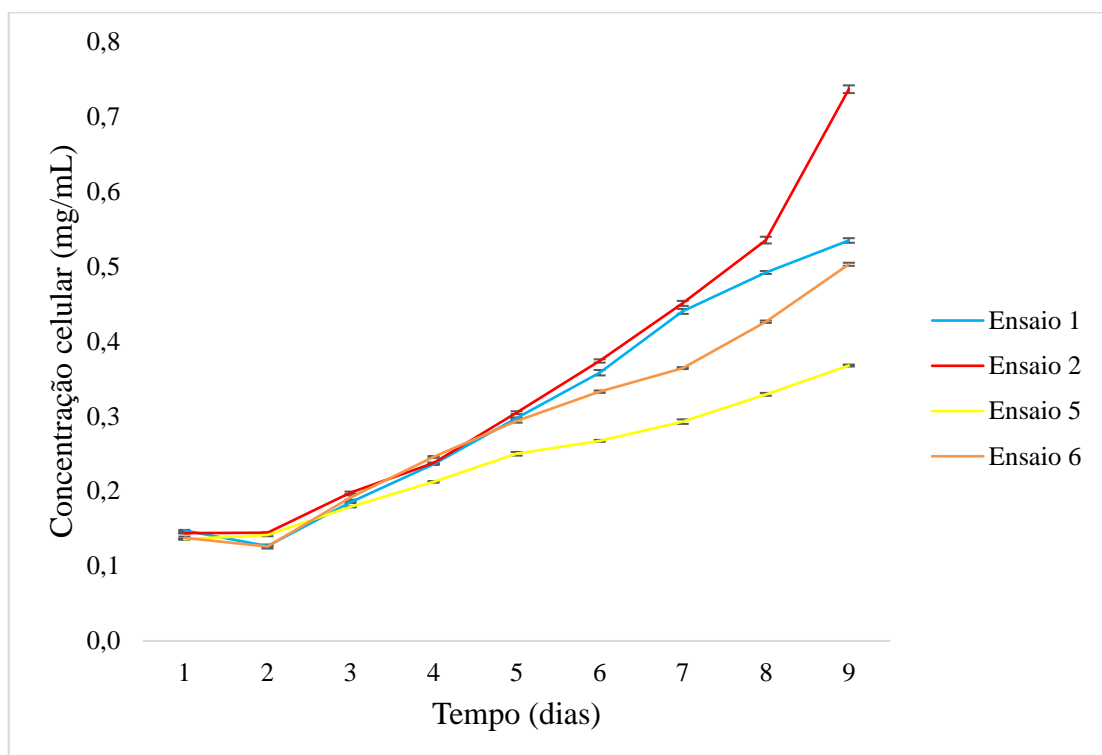
4.2 Análise do crescimento celular nos cultivos das microalgas

Para o estabelecimento do método de quantificação da densidade celular, foram utilizadas as leituras da absorvância das diferentes diluições da suspensão das microalgas preparadas a partir da solução mãe. As curvas de calibração foram previamente construídas a partir dos dados de absorvâncias obtidos para ambas as microalgas em função da densidade celular. Tais curvas estão exibidas nos anexos A e B.

Chiu *et al.* (2008) descreve que com a utilização do método de densidade óptica torna possível prever de forma bastante eficiente a densidade celular caso a regressão linear seja próxima a 1. Conforme observa-se nos anexos, a correlação linear testada apresentou um R^2 de 0,9828 para *Spirulina platensis* e 0,9691 para *Synechococcus nidulans*, tornando adequada a utilização das equações da reta de ambas curvas para o cálculo de concentração celular.

Após a realização das leituras e posterior cálculo utilizando a equação demonstrada no anexo A, a Figura 16 apresenta as curvas de concentração celular de *Spirulina platensis* ao longo do tempo de cultivo, de acordo com os parâmetros definidos no planejamento fatorial proposto.

Figura 16 - Curvas de crescimento celular da microalga *Spirulina platensis* em função do tempo.



Fonte: Autor, 2022.

Ao analisar esta Figura 16, pode-se observar que nas primeiras 24 horas de cultivo, foi verificada a presença de uma fase lag, ou seja, sem evidências de crescimento celular. Logo após o período de adaptação da microalga às novas condições impostas, a mesma apresentou crescimento, sendo a maior concentração de biomassa encontrada no 9º dia de experimento para os 4 ensaios testados.

Também pode-se constatar que o ensaio 2, adicionado de matrizes impregnadas com óxido de zinco comercial em concentrações de 20 mg.L^{-1} , obteve maior concentração de biomassa quando comparado ao ensaio 1, que possuía concentrações de 2 mg.L^{-1} . Podemos atribuir o fato de que maiores concentrações de óxido de zinco obtiveram maiores concentrações de biomassa a possíveis erros de leitura pelo espectrofotômetro, visto que pode ter sido mensurado pigmentos liberados pela própria microalga ou então compostos

provenientes da degradação das matrizes porosas à base de amido que integram o conjunto do ensaio. Este fato se repete para os ensaios contendo nanopartículas como fonte de óxido de zinco, como podemos analisar nas curvas 5 e 6, as quais apresentaram valores de concentração celular final de 0,3677 e 0,5028 g.L⁻¹ respectivamente. Observa-se que a menor concentração microalgal entre todos os ensaios para *Spirulina platensis* foi obtida no ensaio 5, demonstrando superioridade inibidora das nanopartículas em relação ao óxido de zinco microscópico.

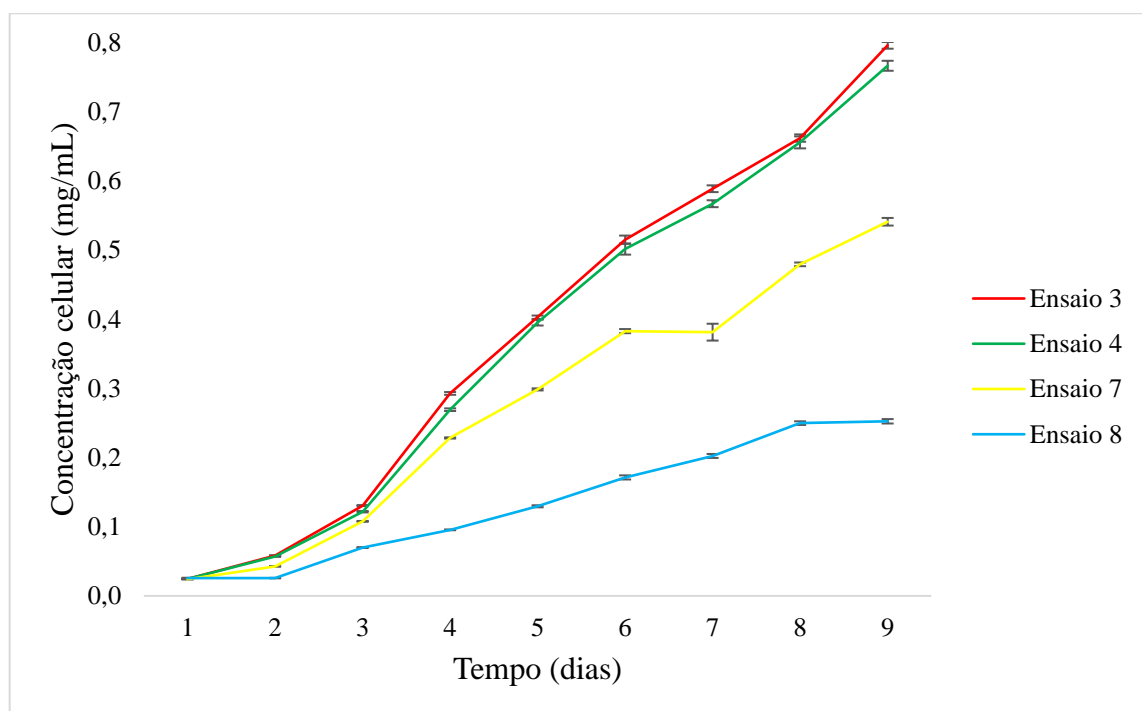
O estudo realizado por Ji, Long e Lin (2011) avaliou a toxicidade das nanopartículas de Al₂O₃, SiO₂, ZnO e TiO₂ para a espécie de microalga *Chlorella sp.* Os experimentos com o ZnO apresentaram maior índice de inibição do crescimento celular das microalgas para as partículas na forma nanométrica do que na forma micro, como é o caso do óxido de zinco comercial.

Melegari *et al.* (2013) avaliou a toxicidade de NP-CuO sobre a microalga *Chlamydomonas reinhardtii*, e verificou que o microrganismo estudado é capaz de responder a presença de NP-CuO, observando efeitos de inibição do crescimento celular no tempo de até 72h.

Por sua vez a figura 17, apresenta a concentração de biomassa ao decorrer do tempo da microalga *Synechococcus nidulans*, calculado através da equação presente no Anexo B.

Verifica-se que tal microalga mostrou-se mais resistente em relação a *Spirulina platensis* quando exposta as matrizes impregnadas com ZnO, resultado que também foi apresentado por De Quadros e colaboradores (2020), o qual observou crescimento constante e sem formação de grumos em meio contendo NP-ZnO em suspensão.

Figura 17 - Curvas de crescimento celular da microalga *Synechococcus nidulans* em função do tempo.



Fonte: Autor, 2022.

Com o auxílio da figura 17 observa-se que o ensaio 7, contendo matrizes impregnadas com nanopartículas de ZnO em concentração de 2 mg.L^{-1} , evidenciou um crescimento elevado após o sétimo dia. Podemos atribuir tal comportamento ao fato de que a microalga pode ter obtido nutrientes a partir da matriz de amido rica em carbono presente no meio e aumentado sua taxa metabólica. Por sua vez o ensaio 8, foi o único ensaio utilizando *Synechococcus nidulans* que apresentou uma fase lag característica no início do experimento, possivelmente gerada pela maior concentração de nanopartículas de ZnO impregnadas nas matrizes porosas à base de amido. Este ensaio também foi o que apresentou um menor crescimento celular, apresentando como valor final de concentração celular $0,2525 \text{ g.L}^{-1}$. Também podemos afirmar que este ensaio ao final dos 9 dias apresentava uma fase estacionária. Os ensaios 3 e 4 apresentaram curvas de crescimento semelhantes, ambos tinham presente em seu meio de cultivo matrizes porosas à base de amido impregnadas com óxido de zinco comercial, diferindo apenas nas concentrações, 2 e 20 mg.L^{-1} respectivamente.

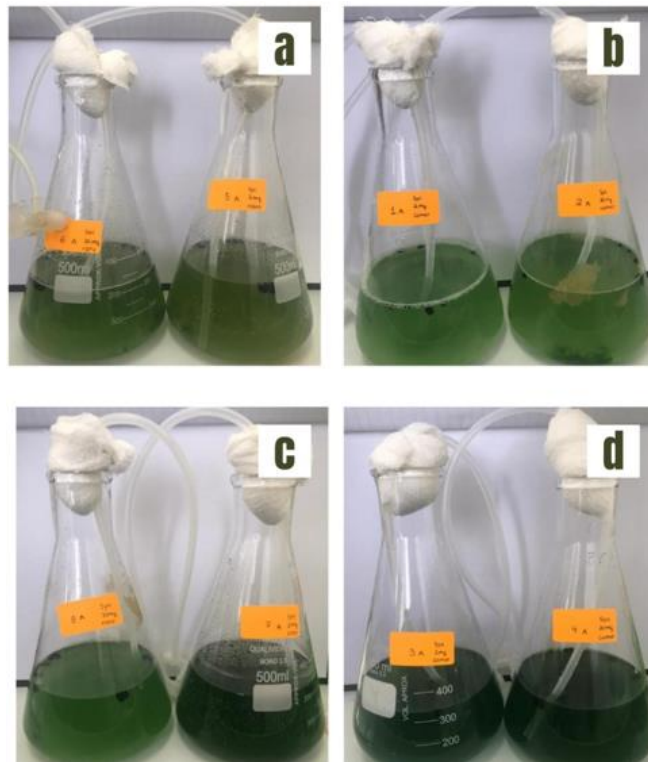
Ao comparar os resultados de concentração celular do presente trabalho com os dados obtidos por De Quadros e colaboradores (2018), podemos observar o poder citotóxico de todas as matrizes impregnadas com óxido de zinco, independente da concentração e da fonte. Visto

que a concentração celular apresentada foi de $2,72 \text{ g.L}^{-1}$, após 200 horas de cultivo e a maior concentração celular apresentada neste trabalho foi de $0,7961 \text{ g.L}^{-1}$ após 216 horas.

O efeito inibitório do zinco ocorre devido a que este composto afeta praticamente todos os processos fisiológicos do micro-organismo, como a divisão celular, funcionamento da membrana e fotossíntese. Além disso, esse micronutriente quando em excesso causa a competição para captação de outros íons metálicos, gerando uma deficiência de metais essenciais como cobre, ferro e magnésio. Isso gera o distúrbio na fotossíntese e consequentemente reduz a fixação de carbono e produção de energia. Como efeito final temos a redução da multiplicação celular. O distúrbio na fotossíntese gera indiretamente espécies reativas de oxigênio, e com o aumento dessas espécies dentro das células, ocorre a peroxidação de lipídeos, novamente levando a redução de fixação de carbono e produção de energia, ou seja, reduzindo o crescimento (KÜPPER; ANDRESEN, 2016).

Tendo como intuito a visualização do crescimento celular das microalgas, as Figuras 18 e 19 apresentam os Erlenmeyers onde foram cultivadas as microalgas elencadas de acordo com o planejamento fatorial correspondente.

Figura 18 - Erlenmeyers dos cultivos das microalgas no 3º dia de experimento. (a) Ensaios 5 e 6; (b) Ensaios 1 e 2; (c) Ensaios 7 e 8; (d) Ensaios 3 e 4;



Fonte: Autor, 2022.

Figura 19 - Erlenmeyers dos cultivos das microalgas no 7º dia de experimento. (a) Ensaio 1 e 2; (b) Ensaios 3 e 4; (c) Ensaios 5 e 6; (d) Ensaios 7 e 8.



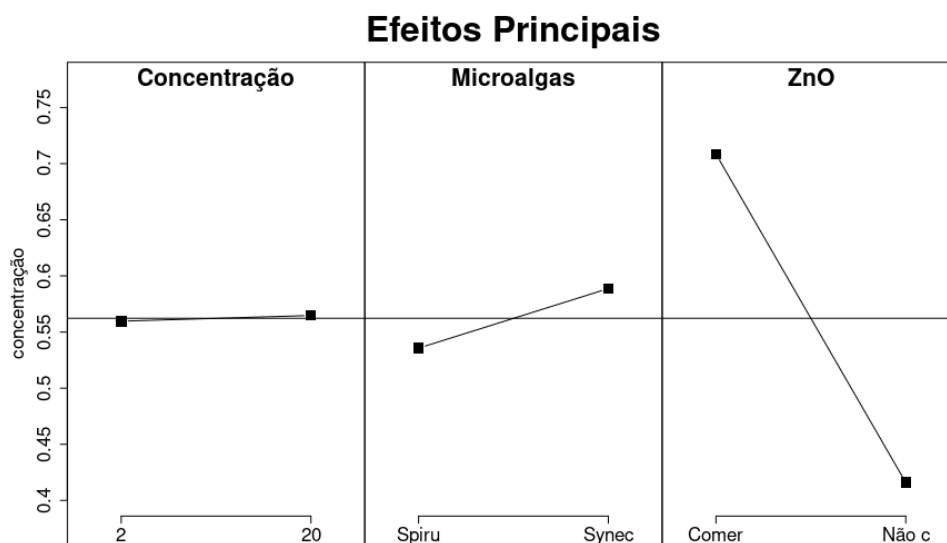
Fonte: Autor, 2022.

Observando tais figuras pode-se visualizar a diferença de coloração dos meios de cultivo, essa mudança ocorre devido ao crescimento da biomassa microalgal, influenciada pelas diferentes concentrações de ZnO presentes nas matrizes porosas, bem como a produção de pigmentos característicos do metabolismo das cianobactérias. Também podemos acrescentar que as matrizes podem vir a se decompor durante o experimento, possibilitando o escurecimento do meio. Sendo esta afirmação uma sugestão para trabalhos futuros que tenham como objetivo avaliar a interferência das matrizes porosas à base de amido no escurecimento do meio.

4.2.1 Análise do planejamento fatorial

O planejamento experimental foi analisado no software R (R Core Team, 2021). A variável resposta foi a concentração de biomassa obtida no último dia de cultivo. Na figura 20, apresentam-se os gráficos que demonstram os principais efeitos relativos aos parâmetros utilizados, demonstrando a relevância de cada um deles para o experimento.

Figura 20 – Gráfico ilustrando os efeitos mais relevantes para o crescimento das microalgas durante o experimento.

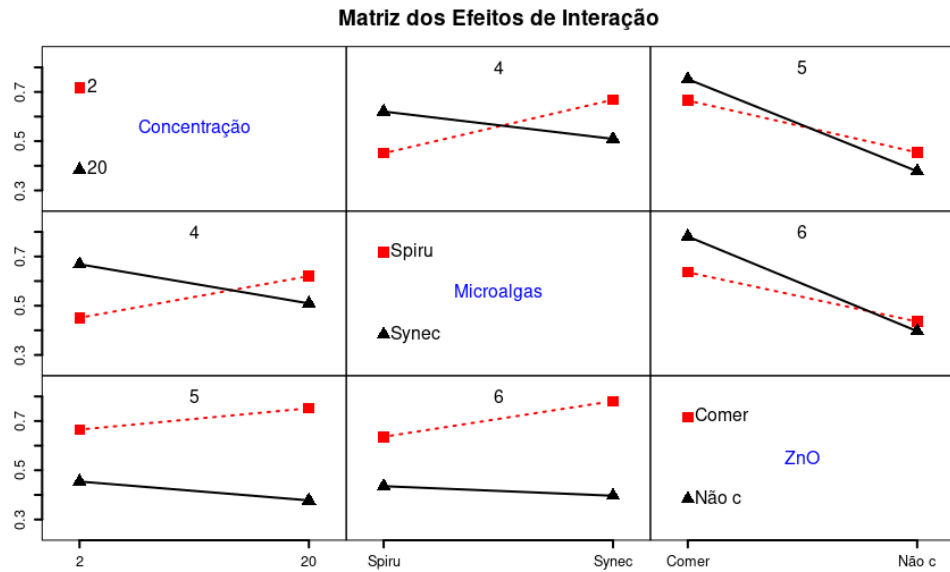


Fonte: Autor, 2022.

Pode-se observar que a variável que mais influenciou foi a fonte de ZnO, sendo as matrizes impregnadas com nanopartículas a com maior nível de toxicidade comparada as que continham óxido de zinco comercial, estas apresentaram maior concentração de biomassa. A microalga *Synechococcus nidulans* apresentou maior concentração de biomassa, demonstrando maior capacidade de assimilar os compostos nocivos. Já o fator concentração de óxido de zinco não apresentou efeito significativo.

Na Figura 21, visualiza-se os resultados obtidos quando analisamos a interação entre os fatores utilizados, sendo eles: espécie de microalga, concentração de ZnO e fonte de ZnO.

Figura 21 - Gráfico representando as interações entre os fatores analisados.

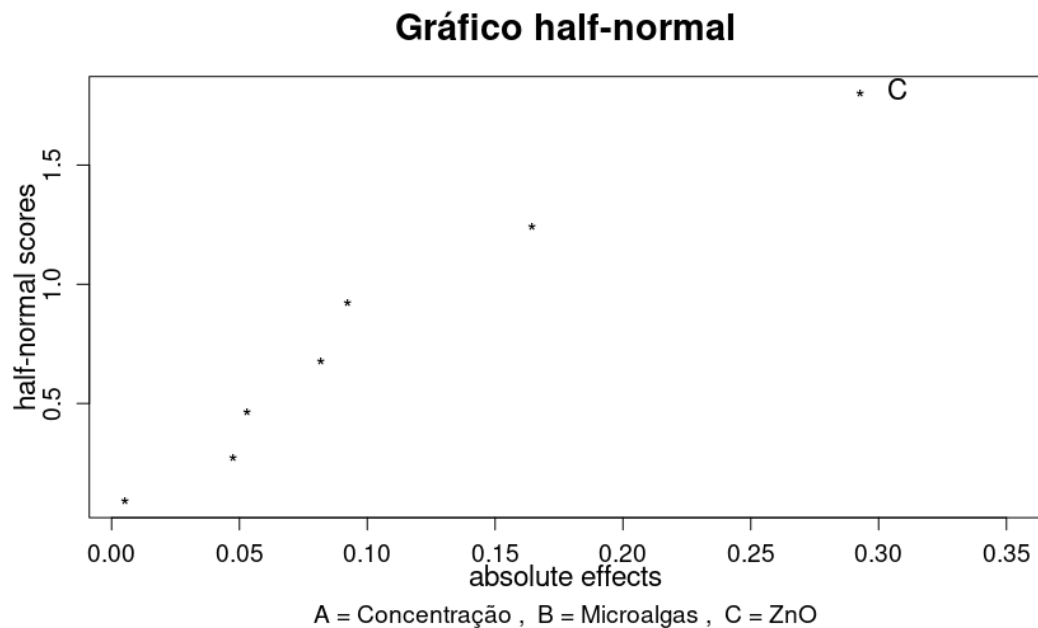


Fonte: Autor, 2022.

Pode-se observar que as interações entre os fatores concentração de óxido de zinco:espécie de microalgas e espécie de microalgas:fonte de óxido de zinco foram as mais significativas tendo em vista o cruzamento das curvas.

Visando quantificar os efeitos responsáveis por afetar o crescimento da concentração celular das microalgas, temos a Figura 22, que expressa em módulo a significância dos efeitos perante o experimento.

Figura 22 - Gráfico dos valores absolutos dos efeitos analisados.



Fonte: Autor, 2022.

Conforme a visualização do gráfico pode-se afirmar que o efeito com maior significância foi a fonte de ZnO. Sendo este o responsável pela maior influência durante os experimentos.

Para obtermos a quantificação dos efeitos foi aplicada uma análise de regressão do modelo, desta forma obteve-se os valores descritos na Tabela 5.

Tabela 6 - Valores obtidos através da regressão do modelo proposto.

Coefficientes	Estimativa	Erro padrão	Valor t	p-valor
Intercep.	0.562	0.005	96.230	$< 2e^{-16}$
Concentração de óxido de zinco	0.002	0.005	0.435	0.669
Espécie de microalga	0.026	0.005	4.543	0.000
Fonte de zinco	-0.146	0.005	-25.040	$7.39e^{-15}$
Concentração de óxido de zinco:espécie de Microalga	-0.082	0.005	-14.057	$8.64e^{-11}$
Concentração de óxido de zinco:fonte de Zinco	-0.040	0.005	-6.982	$2.21e^{-06}$
Espécie de microalga:fonte de Zinco	-0.045	0.005	-7.866	$4.59e^{-07}$

Fonte: Autor, 2022.

Observando a tabela acima, pode-se verificar que individualmente, os efeitos espécie de microalga e fonte de zinco influenciaram significativamente a resposta concentração de biomassa ($p < 0,05$), assim como todas as interações de segunda ordem foram significativas ($p < 0,05$), ou seja, a resposta depende do nível (-1, +1) em que se encontra a espécie de microalga e a fonte de zinco. Somente a concentração de óxido de zinco não apresentou efeito significativo para a variável resposta ($p > 0,05$). Os dados apresentaram excelente ajuste ao modelo proposto com $R^2 = 0,976$.

Em estudo realizado por De Melo (2017), no qual foi avaliado os efeitos de nanopartículas magnéticas em microalgas da espécie microalga *Raphidocelis subcapitata*, foi evidenciado que apenas concentrações elevadas com valores entre 50 a 100 mg/L de nanopartículas de Fe_3O_4 causaram redução significativa no crescimento.

Os resultados obtidos por Ribeiro (2020), indicaram que o cultivo com exposição a nanopartículas de prata induziu um efeito inibitório no crescimento celular de *C. vulgaris*. Onde após 24 horas de exposição, já foi possível evidenciar uma redução na densidade celular nas maiores concentrações do agente inibidor. A densidade celular da *C. vulgaris* diminuiu em 2% na concentração de NP-Ag de 10 μ M/mL e em 20% na concentração de 100 μ M/mL quando comparadas ao controle negativo. Ao fim das 96 horas de exposição, a densidade celular diminuiu 3,5% em 10 μ M/mL e 37% em 100 μ M/mL em comparação ao controle. A análise da exposição do AgNO₃ nas microalgas mostrou que a concentração de 10 μ M/mL foi biocida do início ao fim do experimento.

Em comparação com os estudos supracitados podemos analisar que normalmente as maiores concentrações de nanopartículas possuem maior poder citotóxico, porém Ribeiro (2020) evidenciou prolongamento do efeito inibidor em concentrações menores, tal premissa pode ter sido responsável pelos valores de concentração não demonstrarem relevância nos efeitos analisados no presente trabalho. Corroborando essas informações em ensaios realizados por Monteiro *et. al.* (2019), analisando o poder citotóxico de nanobastões de ouro em diferentes espécies de microalgas (*Raphidocelis subcapitata* e *Chlorella vulgaris*), foi observado que quando aumentada a concentração de nanobastões de ouro não há diferenças significativas na taxa de crescimento celular.

Na tabela 6, elencou-se os valores da intensidade e a direção em que eles se direcionam com a utilização dos sinais negativo e positivo dos principais efeitos e de suas interações.

Tabela 7 - Valores da intensidade dos efeitos e suas interações no crescimento celular.

Fator	Valor
Concentração de óxido de zinco	0.005
Espécie de microalga	0.053
Fonte de zinco	-0.292
Concentração de óxido de zinco:espécie de microalgas	-0.164
Concentração de nanopartícula:fonte de zinco	-0.081
Espécie de microalga:fonte de zinco	-0.091

Fonte: Autor, 2022.

Ao observar os efeitos, percebe-se que a fonte de zinco apresentou efeito negativo, ou seja, quando as microalgas são cultivadas em meio contendo matrizes impregnadas com óxido

de zinco comercial apresentam melhor resposta de concentração de biomassa. Já o fator espécie de microalga apresentou efeito positivo. Isso quer dizer que se alteramos do nível -1 (*Spirulina platensis*) para o nível +1 (*Synechococcus nidulans*) se obtém melhor resposta de concentração de biomassa. Todas as interações apresentaram efeitos negativos.

Em estudos realizados por Barhoumi e Dewez, (2013), a liberação e bioacumulação de íons metálicos contribuíram para a toxicidade em *C. vulgaris* submetidas às NPs Fe₃O₄ e NPs cobalto/zinco/cobre. No entanto, para esses autores, é difícil determinar se esse mecanismo é a única contribuição para a toxicidade em *C. vulgaris*, visto que NPs ligadas à parede celular podem alterar de forma direta trocas celulares entre as células e o meio. Barhoumi e Dewez (2013) também observaram que a taxa de divisão celular foi inibida de forma mais significativa pelas NPs Fe₃O₄ do que pelas NPs cobalto/zinco/ferro concluindo que o ferro causou peroxidação lipídica pela geração de radicais livres nas células, fato que não ocorre nas nanopartículas utilizadas no presente trabalho.

A constituição da parede celular das algas é formada basicamente de polissacarídeos e glicoproteínas, agindo como uma barreira para a entrada de compostos. A espessura da parede celular, de 5 a 20 nm, e sua permeabilidade parcial, limitam a entrada de moléculas grandes. No entanto, em processos de divisão celular as paredes celulares recém-sintetizadas podem apresentar maior permeabilidade, o que facilitaria a entrada das NPs devido seu tamanho reduzido. O contato das células com as NPs também induz à formação de poros maiores nas paredes celulares, o que pode contribuir de forma significativa para a maior internalização dessas partículas e consequente efeito tóxico (NAVARRO et al., 2008).

Um dos motivos que tem sido apontado na literatura para os efeitos deletérios das NPs metálicas no cultivo de microalgas é a formação de espécies reativas de oxigênio, que por sua vez levam a oxidações de aparatos celulares, culminando na perda da homeostase celular (NAVARRO et al., 2008; WANG et al., 2016).

4.2.2 Parâmetros cinéticos de crescimento

Na Tabela 7, temos dispostos os parâmetros cinéticos de crescimento para ambas microalgas, esses valores nos mostram o comportamento fisiológico do micro-organismo em relação ao meio onde ele se encontra, tornando possível a análise dos indicadores prejudiciais às cianobactérias.

Tabela 8 - Parâmetros cinéticos de crescimento.

Ensaio	$X_{\text{máx}}$ (g L ⁻¹)	$P_{\text{máx}}$ (g L ⁻¹ d ⁻¹)	$\mu_{\text{máx}}$ (d ⁻¹)	T_g (d)
1	$0,5346 \pm 3,0 \times 10^{-3}$ abc	$0,0430 \pm 4,0 \times 10^{-4}$	$0,2365 \pm 0,02$	$2,9308 \pm 0,4$
2	$0,7365 \pm 5,1 \times 10^{-3}$ ab	$0,0658 \pm 5,0 \times 10^{-4}$	$0,2268 \pm 0,01$	$3,0562 \pm 0,2$
3	$0,7961 \pm 4,8 \times 10^{-3}$ a	$0,0857 \pm 5,0 \times 10^{-4}$	$0,8069 \pm 0,02$	$0,8590 \pm 0,4$
4	$0,7665 \pm 7,2 \times 10^{-3}$ ab	$0,0824 \pm 8,0 \times 10^{-4}$	$0,7756 \pm 0,03$	$0,8936 \pm 0,3$
5	$0,3677 \pm 1,3 \times 10^{-3}$ bc	$0,0257 \pm 6,0 \times 10^{-5}$	$0,1669 \pm 0,03$	$4,1530 \pm 0,6$
6	$0,5028 \pm 2,0 \times 10^{-3}$ abc	$0,0405 \pm 4,0 \times 10^{-4}$	$0,2134 \pm 0,03$	$3,2481 \pm 0,5$
7	$0,5410 \pm 5,5 \times 10^{-3}$ abc	$0,0574 \pm 6,0 \times 10^{-4}$	$0,2583 \pm 0,02$	$2,6834 \pm 0,5$
8	$0,2525 \pm 3,1 \times 10^{-3}$ c	$0,0251 \pm 4,0 \times 10^{-4}$	$0,1886 \pm 0,01$	$3,6752 \pm 0,2$

Fonte: Autor, 2022.

Para o parâmetro de concentração celular foi realizado o Teste Tukey com significância de 5% no software R (R Code Team, 2021). Neste teste foram utilizados os valores de concentração média de biomassa obtida ao final do experimento.

Após a determinação da diferença mínima significativa, realizou-se a comparação múltipla aos pares, gerando um valor denominado como margem de igualdade. Ao definir a margem de igualdade analisou-se a diferença entre os valores da concentração de um tratamento em relação a diferença mínima significativa, caso este seja maior, as médias são consideradas diferentes. Os resultados obtidos foram apresentados na Tabela 7 através de letras seguidas dos valores de concentração celular, sendo resultados que possuem letras iguais não apresentam diferenças significativas a nível de 5%. O ensaio 8 apresentou diferenças significativa quando comparado a todos os outros experimentos, tal fato podendo ser atribuído ao baixo valor de biomassa apresentado, ocasionado pela forte inibição do crescimento celular por parte das nanopartículas de ZnO em concentração de 20mg/L.

Os valores obtidos para $\mu_{\text{máx}}$ representam a velocidade máxima de crescimento da microalga, atingida na fase Log de crescimento microbiano. Comparando-se os resultados observa-se que na maioria dos casos o valor de $\mu_{\text{máx}}$ foi maior em meio contendo a microalga *Synechococcus nidulans* e principalmente nos em que a fonte do óxido de zinco era macroscópica. Este fato pode indicar que a cinética de crescimento das microalgas *Spirulina platensis* e *Synechococcus nidulans* é prejudicada em maior escala quando submetida a cultivos em meios contendo material poroso impregnado com nanopartículas de ZnO. Essa afirmação corrobora com a revisão bibliográfica realizada, visto que materiais nanométricos possuem uma maior área superficial para possível interação, quando comparados a materiais em escala macro.

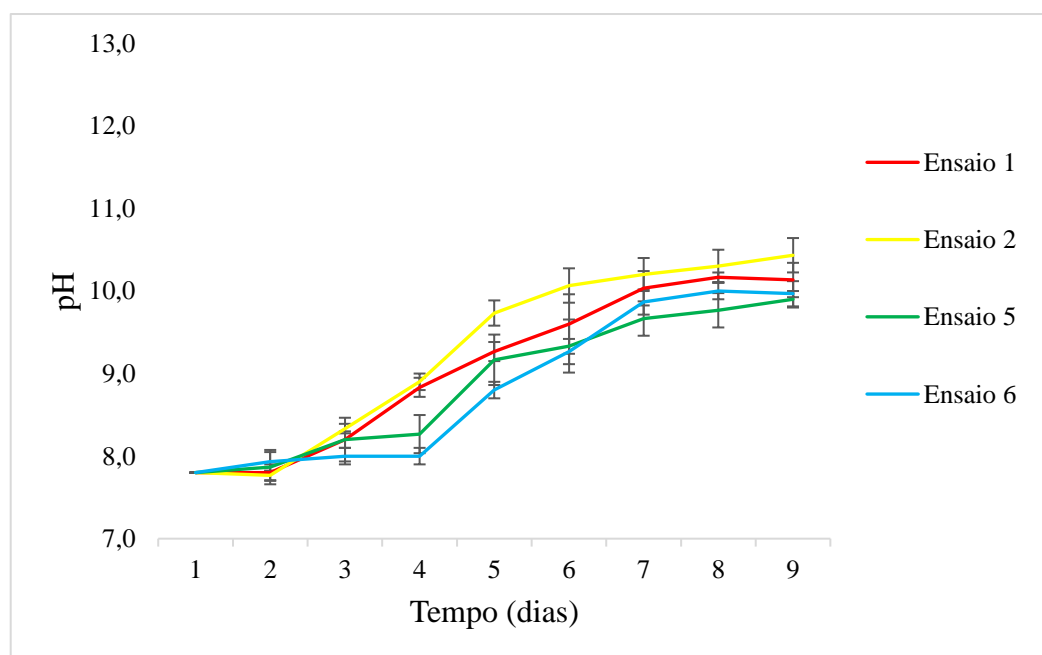
Em relação ao tempo de geração, o qual representa o tempo em que a cianobactéria leva para dobrar sua biomassa (GOSWAMI, R; KALITA, M., 2011), ressalta-se na Tabela 7 os baixos valores apresentados pela *Synechococcus nidulans* quando cultivada em meio contendo material poroso à base de amido contendo óxido de zinco comercial, demonstrando sua boa capacidade de multiplicação exposta a esse agente estressor. Por sua vez a *Spirulina platensis* apresentou elevados valores de tempo de geração, constatando uma maior toxicidade do ZnO comercial para o crescimento deste micro-organismo.

A produtividade máxima relaciona a concentração de biomassa com o tempo de cultivo, desta forma podemos analisar a concentração celular por unidade de tempo. Tais valores mostraram-se coerentes, visto que todos os parâmetros cinéticos estão interligados entre si.

4.2.3 Análise do pH dos cultivos das microalgas.

O pH é um dos parâmetros mais importantes pois influencia na disponibilidade dos metais traços, tanto no contexto de seu sequestro quanto na sua biodisponibilidade e também o crescimento microalgal. Sua variação durante os experimentos pode ser visualizada na Figura 23, no qual estão demonstradas as curvas de pH em função do tempo, para a microalga *Spirulina platensis*.

Figura 23 – Gráfico do pH em função do tempo dos ensaios contendo a microalga *Spirulina platensis*.

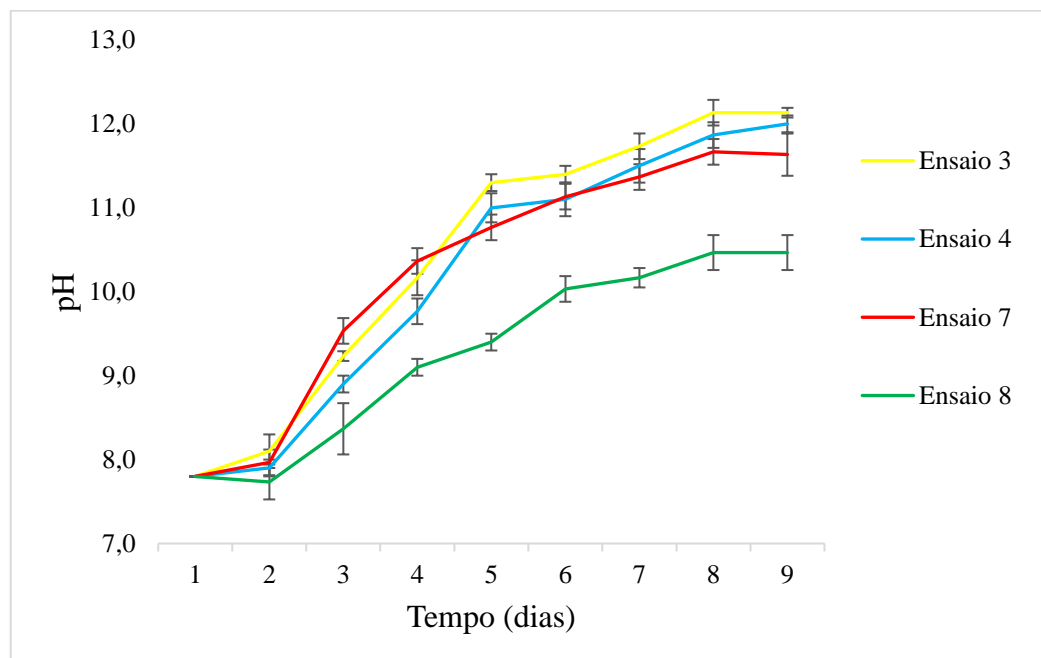


Fonte: Autor, 2022.

Percebe-se que a faixa de pH iniciou-se em 7,8 para todos os cultivos, atingindo o maior valor no cultivo onde foi utilizado matrizes impregnadas com ZnO comercial em concentração de 20 mg/L com 10,4 de potencial hidrogênico. Por sua vez, o menor valor de pH registrado ao fim do experimento foi 9,9 obtido no cultivo onde foram utilizadas matrizes poliméricas impregnadas com nanopartículas de ZnO em concentração de 2 mg/L. Essa afirmação é compatível com as curvas de crescimento de biomassa apresentadas, visto que quanto maior for a multiplicação celular maior será o pH do meio devido a suas funções metabólicas. Para a multiplicação celular da microalga ser adequada o pH do cultivo deve ser mantido alcalino, pois esta microalga cresce de forma natural em ambientes com elevada salinidade e alcalinidade (VONSHAK, 1997). Segundo Costa *et al.* (2002), o cultivo de *Spirulina sp.* deve ser realizado em pH entre 8,3 e 11,0, pois nesta faixa a cianobactéria possui maior taxa fotossintética. Sendo assim o crescimento da microalga *Spirulina platensis* se manteve numa faixa ideal de pH.

Por sua vez, os valores de pH obtidos no cultivo de *Synechococcus nidulans* foram utilizados para a construção do gráfico exposto na Figura 24, no qual estão demonstradas as curvas de pH em função do tempo.

Figura 24 - Curvas do pH em função do tempo dos ensaios contendo a microalga *Synechococcus nidulans*.



Fonte: Autor, 2022.

Realizando a análise das curvas de pH em função do tempo constata-se o crescimento e a alcalinização do meio no cultivo, devido a que todos experimentos iniciaram com pH 7,8

chegando no maior valor apresentado com 12,1 de potencial hidrogênico, no ensaio contendo matrizes impregnadas com óxido de zinco comercial em concentração de 2 mg/L e ao menor valor de 10,5 no ensaio contendo matrizes impregnadas com nanopartículas de óxido de zinco em concentração de 20 m/L. Esse crescimento também foi constatado por Soares (2014) que analisou o crescimento do pH em diferentes valores iniciais do parâmetro.

Segundo estudos realizados em diversas espécies de cianobactérias por Pinto (2016), a linhagem *Synechococcus* ao final do cultivo, apresentou os maiores valores de pH, estes estando na faixa de 11,0 aproximadamente, se assemelhando aos valores obtidos no presente trabalho. Ao realizar a comparação entre as microalgas *Spirulina platensis* e *Synechococcus nidulans* também podemos constatar que a *Synechococcus* apresentou um valor de pH mais alto ao final dos cultivos.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com a realização do presente trabalho, conclui-se que é possível obter um material poroso a base de amido impregnado com nanopartículas de óxido de zinco ou óxido de zinco comercial microscópico. Esta premissa nos oferece a possibilidade de fornecer diversas aplicações para esse material, visto que os resultados obtidos através das análises de difração de raio-X e microscopia de força atômica demonstraram grande incorporação do composto impregnado nas matrizes porosas à base de amido.

Ao observar-se o crescimento celular das microalgas foi possível evidenciar que a microalga *Synechococcus nidulans* apresentou maior resistência as nanopartículas de ZnO quando comparada a *Spirulina platensis*. Demonstrando os maiores valores de concentração celular $0,5410 \text{ g.L}^{-1}$ e $0,5028 \text{ g.L}^{-1}$, respectivamente.

O parâmetro cinético de crescimento tempo de geração, apresentou seu menor valor nos ensaios que continham a microalga *Synechococcus nidulans* cultivada em meio adicionado de matrizes porosas à base de amido impregnadas com óxido de zinco microscópico, sendo os resultados obtidos para as concentrações 2 mg.L^{-1} e 20 mg.L^{-1} , 0,8590 dias e 0,8936 respectivamente, podendo ser considerados estaticamente iguais dentro do desvio padrão encontrado. O menor resultado de tempo de geração obtido, demonstrando a menor capacidade de multiplicação celular foi apresentado no ensaio contendo a microalga *Spirulina platensis* exposta a matrizes impregnadas com nanopartículas de óxido de zinco em concentração de 2 mg.L^{-1} . Levando o tempo de 4,1530 dias para dobrar sua biomassa.

A velocidade específica máxima de crescimento apresentou os resultados mais altos para a microalga *Synechococcus nidulans*, com valores de 0,8069 e $0,7756 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ para os ensaios onde a fonte de óxido de zinco era microscópica.

Com os resultados obtidos pode-se concluir que a microalga *Synechococcus nidulans* mostrou-se mais resistente quando comparada a *Spirulina platensis*, também pode-se observar que as estruturas porosas à base de amido impregnadas com nanopartículas de óxido de zinco obtiveram maior poder inibitório de crescimento microalgal, tal feito podendo ser atribuído a maior área superficial disponível para interação do material nanométrico.

Conclui-se que diante dos resultados obtidos o trabalho apresenta possibilidade de continuidade em pesquisas relacionadas ao efeito causado pelo amido presente no material poroso na multiplicação celular das microalgas bem como as possíveis mutações geradas pela exposição destes micro-organismos a agentes inibidores como o óxido de zinco.

REFERÊNCIAS

- ABALDE ALONSO, J. E., *et al.* **Microalgas: Cultivo y aplicaciones**. [S. l.]: Universidade da Coruña. Servizo de Publicacións, 1995. Disponível em: <https://doi.org/10.17979/spudc.9788497497695>. Acesso em: 18 ago. 2021.
- ALGAE-LAB. Disponível em: <https://algae-lab.com>. Acesso: 24 jul. 2021.
- ARUOJA, V. *et al.* Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO₂ to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*. **Science of The Total Environment**, [s. l.], v. 407, n. 4, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.10.053>. Acesso em: 18 ago. 2021.
- AZEVEDO, L. C.; DE SÁ, A. S. C.; FUNGARO, D. A. Propriedades do amido e suas aplicações em biopolímeros. **Cadernos de Prospecção**, [s. l.], v. 11, p. 351, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.9771/cp.v11i2.23173>. Acesso em: 11 jul. 2021.
- BARHOUMI, L.; DEWEZ, D. Toxicity of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles on Green Alga *Chlorella vulgaris*. **BioMed Research International**, [s. l.], v. 2013, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2013/647974>. Acesso em: 25 ago. 2021.
- BARRETO, D. M. **Fisiologia de *Chlorella Sorokiniana* e *Ankistrodesmus Densus*: efeitos e dinâmica de nanopartículas de cobre**. 2018. São Carlos, 2018. Disponível em: <https://repositorio.ufscar.br/handle/ufscar/10444>. Acesso at: 25 Aug. 2021.
- BECHHERI, A., DÜRR, M., LO NOSTRO, P. *et al.* Synthesis and characterization of zinc oxide nanoparticles: application to textiles as UV-absorbers. **J Nanopart Res** **10**, 679–689 (2008). Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11051-007-9318-3>. Acesso em: 22 fev. 2022.
- BECKER, W. Microalgae in Human and Animal Nutrition. *In*: **Handbook of microalgal culture**. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/9780470995280.ch18>. Acesso em: 11 ago. 2021.
- BECKER W. **Microalgae: Biotechnology and Microbiology**. Cambridge: Cambridge University Press, 1994. v. 10. Disponível em: <https://www.cambridge.org/br/academic/subjects/life-sciences/plant-science/microalgae-biotechnology-and-microbiology?format=HB&isbn=9780521350204>. Acesso em 12 ago. 2021.
- BELAY, A. Mass Culture of *Spirulina* Outdoors —The Earthrise Farms Experience. *In*: VONSHAK, Avigad (org.). ***Spirulina platensis* (Arthrospira): Physiology, Cell Biology and Biotechnologym**. London: Taylor and Francis, 1997. p. 131–158. Disponível em: <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201302876334>. Acesso em: 20 ago. 2021.
- BEMILLER, J. N. Starch Modification: Challenges and Prospects. **Starch - Stärke**, [s. l.], v. 49, n. 4, 1997. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/star.19970490402>. Acesso em: 30 ago. 2021.

- BERENGUEL, M. *et al.* Model predictive control of pH in tubular photobioreactors. **Journal of Process Control**, [s. l.], v. 14, n. 4, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jprocont.2003.07.001>. Acesso em: 11 ago. 2021.
- BOBBIO, P. A; BOBBIO, F. O. **Química do Processamento de Alimentos**. 3. ed. São Paulo: Livraria Varela, 2001.
- BORZANI, W. *et al.* **Biotechnologia industrial: engenharia bioquímica**. São Paulo: Edgard Blucher, 2001. v. 4. Disponível em: <https://www.blucher.com.br/livro/detalhes/biotechnologia-industrial-vol-4-192>. Acesso em 7 ago. 2021.
- BRITANNICA, T. Editors of Encyclopaedia. **Zincite**. In: ENCYCLOPEDIA BRITANNICA. [S. l.: s. n.], 2018. Disponível em: <https://www.britannica.com/science/zincite>. Acesso em: 7 set. 2021.
- CHELONI, G.; MARTI, E.; SLAVEYKOVA, V. I. Interactive effects of copper oxide nanoparticles and light to green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. **Aquatic Toxicology**, [s. l.], v. 170, p. 120–128, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.11.018>. Acesso em: 11 jul. 2021.
- CHISTI, Yusuf. **Biodiesel from microalgae**. [S. l.: s. n.], 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.02.001>. Acesso em: 9 ago. 2021.
- CHISTI, Y. Microalgae: our marine forests. **Biotechnology Advances**, [s. l.], v. 22, n. 7, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2004.04.001>. Acesso em: 11 ago. 2021.
- CHIU, S.-Y. *et al.* Reduction of CO₂ by a high-density culture of *Chlorella* sp. in a semicontinuous photobioreactor. **Bioresource technology**, v. 99, n. 9, p. 3389-96, 2008. Disponível em: [doi:10.1016/j.biortech.2007.08.013](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.08.013). Acesso em: 07 mar. 2022.
- CLARINDO, A. de S.; **Biocompósito hidrofóbico utilizando amido modificado e celulose**. Florianópolis-SC: [s. n.], 2013. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/128962/327884.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 11 jul. 2021.
- COSTA, C. H. da *et al.* Effect of chromium oxide (III) nanoparticles on the production of reactive oxygen species and photosystem II activity in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. **Science of The Total Environment**, [s. l.], v. 565, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.01.028>. Acesso em: 25 ago. 2021.
- COSTA, I.C., AZEVEDO, S.G., SANCHES, E.A., *et al.* Caracterização de nanopartículas poliméricas preenchidas com óleo essencial de *Piper nigrum* por microscopia de força atômica. **Revista Matéria**, v.26, n.2, 2021. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rmat/a/q3QLKkyPHBqLC5x69bTKVwD/?lang=pt&format=pdf>. Acesso em 28 fev. 2022.
- COSTA, J. A. V.; COLLA, L. M.; DUARTE FILHO, P.; KABKE, K.; WEBER, A. Modeling of *Spirulina platensis* growth in fresh water using response surface methodology. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, v. 18, p. 603-607, 2002. Disponível em:

<https://link.springer.com/article/10.1023/A:1016822717583>. Acesso em: 01 mar. 2022.

COUTTEAU, P; SORGELOOS, P. The use of algal substitutes and the requirement for live algae in the hatchery and nursery rearing of bivalve molluscs: an international survey. **Journal of Shellfish Research**, [s. l.], v. 11, n. 2, p. 467–476, 1992. Disponível em: <https://www.semanticscholar.org/paper/The-use-of-algal-substitutes-and-the-requirement-in-Coutteau-Sorgeloos/41412dfd076858acf06fa6e1f725d865d9d59c3a>. Acesso em: 15 ago. 2021.

CUELLAR-BERMUDEZ, S. P. *et al.* Photosynthetic bioenergy utilizing CO₂: an approach on flue gases utilization for third generation biofuels. **Journal of Cleaner Production**, [s. l.], v. 98, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2014.03.034>. Acesso em: 17 ago. 2021.

CULLITY, BD, STOCK, SR: Elements of X-ray diffraction, 3rd ed. **Prentice Hall Publication**, Índia (2001). Disponível em: <https://www.scholars.northwestern.edu/en/publications/elements-of-x-ray-diffraction-third-edition>. Acesso em: 22 fev. 2022.

DA SILVA V. B.; DE CHIARO, F. M.; DUARTE FILHO, P. Extração de metabólitos secundários da microalga “*Synechococcus nidulans*”. **Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão**, [s. l.], v. v. 3, n. 2, 2013. Disponível em: <https://periodicos.unipampa.edu.br/index.php/SIEPE/article/view/61123>. Acesso em: 28 jun. 2021.

DAMODARAN, S.; OWEN R, F.; KIRK L, P. **Química de alimentos de Fennema**. 4^a ed. [S. l.]: Artmed, 2010.

DE OLIVEIRA, L. S. **Cultivo de Microalgas Marinhas - Princípios e Aplicações**. São Carlos - SP: Rima, 2006.

DE QUADROS, J.; DUARTE FILHO, F. M.; FLORES, W. H. Efeitos citotóxicos de nanopartículas de óxido de zinco sobre cianobactérias. **Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão**, [s. l.], v. 11, n. 2, 2020. Disponível em: <https://periodicos.unipampa.edu.br/index.php/SIEPE/article/view/101542>. Acesso em: 26 ago. 2021.

ECOTOX. Disponível em: <https://www.ecotox.ibot.cas.cz>. Acesso: 21 jun. 2021.

EL-KASSAS, H. Y.; OKBAH, M. A. E. Phytotoxic effects of seaweed mediated copper nanoparticles against the harmful alga: *Lyngbya majuscula*. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, [s. l.], v. 15, n. 1, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2017.01.002>. Acesso em: 25 ago. 2021.

ETCHEVERRY, L. P. *et al.* Annealing effects on the structural and optical properties of ZnO nanostructures. **Materials Research**, [s. l.], v. 21, n. 2, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1980-5373-mr-2017-0936>. Acesso em: 1 ago. 2021.

FAINTUCH, B.L. **Análise comparativa da produção de biomassa a partir de três cianobactérias empregando distintas fontes nitrogenadas**. 1989. São Paulo, 1989. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/>. Acesso em: 12 ago. 2021.

FARRÉ, M. *et al.* Ecotoxicity and analysis of nanomaterials in the aquatic environment. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, [s. l.], v. 393, n. 1, p. 81–95, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00216-008-2458-1>. Acesso em: 28 jun. 2021.

FERREIRA, O. P. *et al.* Ecomateriais: desenvolvimento e aplicação de materiais porosos funcionais para proteção ambiental. **Química Nova**, [s. l.], v. 30, n. 2, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000200039>. Acesso em: 5 set. 2021.

FRANKLIN, N. M. *et al.* Comparative Toxicity of Nanoparticulate ZnO, Bulk ZnO, and ZnCl₂ to a Freshwater Microalga (*Pseudokirchneriella subcapitata*): The Importance of Particle Solubility. **Environmental Science & Technology**, [s. l.], v. 41, n. 24, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/es071445r>. Acesso em: 18 ago. 2021.

FURTADO, M. F. de M. **Potencial para bioindicação e bioprospecção em microalgas e cianobactérias na Lagoa dos Índios, Macapá, Amapá**. 2018. Macapá, 2018. Disponível em: <http://repositorio.unifap.br:80/jspui/handle/123456789/346>. Acesso em: 28 jun. 2021.

GALDINO, A. G. de S. **Produção e caracterização de arcabouços porosos de compósitos hidroxiapatita-titânia (HÁ-TiO₂) para uso em engenharia tecidual ossea**. 2011. Campinas - SP, 2011. Disponível em: <http://repositorio.unicamp.br/jspui/handle/REPOSIP/263456>. Acesso em: 5 set. 2021.

GALLETTI, A. *et al.* Effects of titanium dioxide nanoparticles derived from consumer products on the marine diatom *Thalassiosira pseudonana*. **Environmental Science and Pollution Research**, [s. l.], v. 23, n. 20, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7556-6>. Acesso em: 18 ago. 2021.

GODDARD III, W. A. *et al.* There's Plenty of Room at the Bottom: An Invitation to Enter a New Field of Physics. *In: Handbook of nanoscience, engineering and technology*. 2nd editioned. [S. l.]: CRC Press, 2007. p. 1–10. Disponível em: <https://doi.org/10.1201/9781420007848>. Acesso em: 24 ago. 2021.

GONG, N. *et al.* Biototoxicity of nickel oxide nanoparticles and bio-remediation by microalgae *Chlorella vulgaris*. **Chemosphere**, [s. l.], v. 83, n. 4, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.12.059>. Acesso em: 18 ago. 2021.

GOSWAMI, R.C.D; KALITA, M.C. *Scenedesmus dimorphus* and *Scenedesmus quadricauda*: two potent indigenous microalgae strains for biomass production and CO₂ mitigation - A study on their growth behavior and lipid productivity under different concentration of urea as nitrogen source. **J. Algal Biomass. Utln 2**: 42–49. 2011. Disponível em: <https://www.semanticscholar.org/paper/Scenedesmus-dimorphus-and-Scenedesmus-quadricauda-%3A-Goswami-Kalita/98746c87f372e744d9ba4071fb23867f6abd7d>. Acesso em: 8 mar. 2022.

GRILLO, R.; ROSA, A. H.; FRACETO, L. F. Engineered nanoparticles and organic matter: A review of the state-of-the-art. **Chemosphere**, [s. l.], v. 119, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.07.049>. Acesso em 15 jul. 2021.

GUILLARD, R. L. Culture of Phytoplankton for Feeding Marine Invertebrates. *In: Culture of marine invertebrate animals*. Boston, MA: Springer US, 1975. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-1-4615-8714-9_3. Acesso em: 11 ago. 2021.

HELLEBUST, J. A. Mechanisms of response to salinity in halotolerant microalgae. **Plant and Soil**, [s. l.], v. 89, n. 1–3, 1985. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/BF02182234>. Acesso em: 11 ago. 2021.

HOEK, C. *et al.* **Algae: An Introduction to Phycology**. Cambridge Universityed. London: [s. n.], 1995. *E-book*. Acesso em 18 jul. 2021.

HOOVER, R. Composition, molecular structure, and physicochemical properties of tuber and root starches: a review. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 45, n. 3, 2001. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(00\)00260-5](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(00)00260-5). Acesso em: 30 ago. 2021.

HU, Q. Industrial Production of Microalgal Cell-Mass and Secondary Products - Major Industrial Species: *Arthrospira (Spirulina) Platensis*. *In: RICHMOND, Amos (org.). Handbook of Microalgal Culture*. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/9780470995280.ch12>. Acesso em: 11 ago. 2021.

JAMNONGKAN, T.; KAEWPIROM, S. Controlled-Release Fertilizer Based on Chitosan Hydrogel: Phosphorus Release Kinetics. **Science journal Ubonratchathani University**, [s. l.], v. 1, n. 1, p. 43–50, 2010. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/45258204_Controlled-Release_Fertilizer_Based_on_Chitosan_Hydrogel_Phosphorus_Release_Kinetics. Acesso em: 13 set. 2021.

JAYAKODY, L; HOOVER, R. The effect of lintnerization on cereal starch granules. **Food Research International**, [s. l.], v. 35, n. 7, 2002. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(01\)00204-6](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(01)00204-6). Acesso em: 1 set. 2021.

JIAMJARIYATAM, R.; KONGPENSOOK, V.; PRADIPASENA, P. Effects of amylose content, cooling rate and aging time on properties and characteristics of rice starch gels and puffed products. **Journal of Cereal Science**, [s. l.], v. 61, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2014.10.001>. Acesso em: 1 set. 2021.

JL, J.; JONG, Z.; LIN, D. Toxicity of oxide nanoparticles to the green algae *Chlorella sp.* **Chemical Engineering Journal**, v. 170, n. 2-3, p. 525-530. 2011. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1385894710011101>. Acesso em 28 fev. 2022.

KAPLAN, A.; REINHOLD, L. CO₂ concentrating mechanisms in photosynthetic microorganisms. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, [s. l.], v. 50, n. 1, 1999. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.50.1.539>. Acesso em: 16 ago. 2021.

K. RAMAKANTH, Basic of Diffraction and Its Application. I.K. **International Publishing House Pvt. Ltd**, New Dehli, 2007.

KILHAM, S. *et al.* **Effects of nutrient limitation on biochemical constituents of *Ankistrodesmus falcatus*** *Freshwater Biology*. Philadelphia: [s. n.], 1997. Disponível em: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2427.1997.00231.x>. Acesso em: 11 jul. 2021.

KOPLIN, T. *et al.* Workflow for high throughput screening of gas sensing materials. **Sensors**, [s. l.], v. 6, n. 4, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/s6040298>. Acesso em: 7 set. 2021.

KREMER, C. T.; THOMAS, M. K.; LITCHMAN, E. Temperature- and size-scaling of phytoplankton population growth rates: Reconciling the Eppley curve and the metabolic theory of ecology. **Limnology and Oceanography**, [s. l.], v. 62, n. 4, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/lno.10523>. Acesso em: 11 ago. 2021.

KÜPPER, H.; ANDRESEN, E. Mechanisms of metal toxicity in plants. *Metallomics*, [S.L.], v. 8, n. 3, p. 269-285, 2016. **Oxford University Press (OUP)**. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1039/c5mt00244c>. Acesso em: 10 mar. 2022.

LAJOLO, F.M.; MENEZES, E.W. **Carboidratos en alimentos regionales iberoamericanos**. 1ªed. São Paulo: EDUSP, 2006. *E-book*. Disponível em: <https://www.edusp.com.br/livros/carboidratos-en-alimentos-regionales-iberoamericanos/>. Acesso em 11 ago. 2021.

LEE, S., JEONG, S., KIM, D., *et al.*, "ZnO Nanoparticles with Controlled Shapes and Sizes Prepared Using a Simple Polyol Synthesis", **Superlattice. Microst.**, v. 43, pp.330-339, 2008. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0749603608000189?via%3Dihub>. Acesso em 28 fev. 2022.

LEI, C. *et al.* Toxicity of iron-based nanoparticles to green algae: Effects of particle size, crystal phase, oxidation state and environmental aging. **Environmental Pollution**, [s. l.], v. 218, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.07.030>. Acesso em: 18 ago. 2021.

LI, B.; BRETT, M. T. The influence of dissolved phosphorus molecular form on recalcitrance and bioavailability. **Environmental Pollution**, [s. l.], v. 182, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.06.024>. Acesso em: 18 ago. 2021.

LIANG, Y.; SARKANY, N.; CUI, Y. Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. **Biotechnology Letters**, [s. l.], v. 31, n. 7, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10529-009-9975-7>. Acesso em: 11 ago. 2021.

LIMA, J. Santana. Processos biológicos e o biomonitoramento: aspectos bioquímicos e morfológicos. In: MAIA, N.B; MARTOS, H.L; BARELLA, W. (org.). **Indicadores ambientais: conceitos e aplicações**. São Paulo: EDUC, 2001. p. 95–115. Disponível em: <https://www.bdpa.cnptia.embrapa.br/consulta/busca?b=ad&id=308108&biblioteca=vazio&bu>

sca=autoria:%22H.%22&qFacets=autoria:%22H.%22&sort=&paginacao=t&paginaAtual=1481. Acesso: 30 ago. 2021.

LIU, J. *et al.* Functional, physicochemical properties and structure of cross-linked oxidized maize starch. **Food Hydrocolloids**, [s. l.], v. 36, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.08.013>. Acesso em: 1 set. 2021.

LOMBARDI, A. T.; VIEIRA, A. A. H.; SARTORI, L. A. **Mucilaginous capsule adsorption and intracellular uptake of copper by kirchneriella aperta (Chlorococcales)**. J. Phicol. São Carlos-SP, Brasil: [s. n.], 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.2002.00126.x>. Acesso em: 11 jul. 2021.

LONG, Z. *et al.* Systematic and Quantitative Investigation of the Mechanism of Carbon Nanotubes' Toxicity toward Algae. **Environmental Science & Technology**, [s. l.], v. 46, n. 15, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/es301802g>. Acesso em: 18 ago. 2021.

LOPES, J. E.; FRANCO, T. T. **Sequestro de dióxido de carbono em fotobiorreatores**. 2007. Campinas - SP, 2007. Disponível em: http://repositorio.unicamp.br/jspui/bitstream/REPOSIP/266247/1/Lopes_EduardoJacob_D.pdf. Acesso em: 12 ago. 2021.

LYRA, M. A. M. *et al.* Sistemas matriciais hidrofílicos e mucoadesivos para liberação controlada de fármacos. **Latin American Journal of Pharmacy**, [s. l.], v. 26, n. 5, p. 784–793, 2007. Disponível em: <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/7550>. Acesso em: 13 set. 2021.

MACGREGOR, A.W; FINCHER, G. B. Carbohydrates of the barley grain. *In*: **Chemistry and technology**. Paul - Minnesota: AACC, 1993. p. 73–128.

MACHADO, A. *et al.* Uma abordagem sobre caracterização e avaliação do potencial antioxidante de extratos fenólicos de microalgas *Spirulina* sp. LEB-18 e *Chlorella* pyrenoidosa. **Revista de Ciências Agrárias**, [s. l.], v. 40, n. 1, p. 264–278, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.19084/RCA16011>. Acesso em: 28 jun. 2021.

MACHADO, M. D.; SOARES, E. Modification of cell volume and proliferative capacity of *Pseudokirchneriella subcapitata* cells exposed to metal stress. **Aquatic Toxicology**, [s. l.], v. 147, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.11.017>. Acesso em: 18 ago. 2021.

MAMANI, J. B.; DE SOUZA, G. E.; DE MOYA, C. S. **Estruturas e propriedades de nanopartículas preparadas via Sol-Gel**. 2009. São Paulo, 2009. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/43/43134/tde-24082009-090624/publico/JavierBustamanteMamani.pdf>. Acesso em: 24 ago. 2021.

MARCONE, G. **Avaliação da ecotoxicidade de nanopartículas de dióxido de titânio e prata**. 1–176 f. 2011. Campinas, SP, 2011. Disponível em: <http://www.repositorio.unicamp.br/handle/REPOSIP/249642>. Acesso em: 18 ago. 2021.

MARGULIS, L. *et al.* **Cinco Reinos - Um Guia Ilustrado dos Filos da Vida na Terra**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

MARKERT, B.; WECKERT, V. Time-and-site integrated long-term biomonitoring of chemical elements by means of mosses. **Toxicological & Environmental Chemistry**, [s. l.], v. 40, n. 1–4, 1993. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/02772249309357930>. Acesso em: 25 ago. 2021.

MARTINS, P. R. *et al.* **Revolução invisível: Desenvolvimento da nanotecnologia no Brasil**. São Paulo: Xamã, 2007. v. 1.

MATA, T. M.; MARTINS, A.; CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [s. l.], v. 14, n. 1, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.07.020>. Acesso em: 12 ago. 2021.

MAYRINCK, C. *et al.* Synthesis, Properties and Applications of Nanostructured Zinc Oxide. **Revista Virtual de Química**, [s. l.], v. 6, n. 5, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.5935/1984-6835.20140078>. Acesso em: 7 set. 2021.

MELEGARI, S. *et al.* Evaluation of toxicity and oxidative stress induced by copper oxide nanoparticles in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. **Aquatic Toxicology**, [s. l.], v. 142–143, p. 431–440, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.09.015>. Acesso em: 11 jul. 2021.

MELO, D. de. **Efeitos de nanopartículas magnéticas sobre a microalga *Raphidocelis subcapitata***. p. 151. 2017. São Carlos, 2017. Disponível em: <https://repositorio.ufscar.br/handle/ufscar/10904>. Acesso em: 25 ago. 2021.

MENESES, C. T.; FLORES, W. H.; SASAKI, J. M. Direct Observation of the Formation of Nanoparticles by in situ Time-Resolved X-ray Absorption Spectroscopy. **Chemical Materials**. [s. l.], v. 19, n. 5, p. 1024–1027, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/cm0621996>. Acesso em 4 set. 2021.

MIZUKAMI, H.; TAKEDA, Y.; HIZUKURI, S. Structure of the hot-water soluble components in the starch granules of new Japanese rice cultivars. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 38, n. 4, p. 329–335, 1999. Disponível em: <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201302934687>. Acesso em: 30 ago. 2021.

MOGHIMI, S. M.; HUNTER, A. C.; MURRAY, J. C. Nanomedicine: current status and future prospects. **The FASEB Journal**, [s. l.], v. 19, n. 3, p. 311–330, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1096/fj.04-2747rev>. Acesso em: 11 jul. 2021.

MOISAN, T. A.; BLATTNER, K. L.; MAKINEN, C. P. Influences of temperature and nutrients on *Synechococcus* abundance and biomass in the southern Mid-Atlantic Bight. **Continental Shelf Research**, [s. l.], v. 30, n. 12, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.csr.2010.04.005>. Acesso em: 17 ago. 2021.

MONTEIRO, C., *et al.* Effects of long-term exposure to colloidal gold nanorods on freshwater microalgae. **Ciência do Meio Ambiente**. p. 70-79, (2019). Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.05.052>. Acesso em: 07 mar. 2022.

MÜLLER, P; LI, X. P; NIYOGI, K. Non-Photochemical Quenching. A Response to Excess Light Energy. **Plant Physiology**, [s. l.], v. 125, n. 4, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1104/pp.125.4.1558>. Acesso em: 15 ago. 2021.

NAVARRO, E. *et al.* Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi. **Ecotoxicology**. [s. l.], v. 17, p. 372-386, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10646-008-0214-0>. Acesso em 27 ago. 2021.

NNI. **The National Nanotechnology Initiative: Research and Development Leading to a Revolution in Technology and Industry. Supplement to the President's FY 2008 Budget**. [S. l.: s. n.], 2007. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/235132636>. Acesso em 20 jul. 2021.

NOGUEIRA, P. F. M. *et al.* The effects of Anabaena spiroides exopolysaccharides on copper accumulation in an aquatic food chain. **Aquatic Toxicology**, [s. l.], v. 93, n. 2–3, p. 125–130, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.04.001>. Acesso em: 11 jul. 2021.

NANOMATERIAIS. Disponível em: <https://nanomateriais.wordpress.com>. Acesso: 30 jun. 2021.

OBBERDÖRSTER, G. *et al.* Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. **Particle and Fibre Toxicology**, [s. l.], v. 2, n. 1, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1743-8977-2-8>. Acesso em: 18 ago. 2021.

PAUL, D. R.; ROBESON, L. M. **Polymer nanotechnology: Nanocomposites**. [S. l.]: Elsevier BV, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2008.04.017>. Acesso em: 11 jul. 2021.

DE SOUZA, P. G. **Nanotechnology and nanoscience: general aspects, applications and perspectives in the context of Brazil**. [S. l.: s. n.], 2015. Disponível em: <http://munlait.wordpress.com/category/biotecnologia/page/3/>. Acesso em 22 ago. 2021.

PETERSEN, E. J. *et al.* Adapting OECD Aquatic Toxicity Tests for Use with Manufactured Nanomaterials: Key Issues and Consensus Recommendations. **Environmental Science & Technology**, [s. l.], v. 49, n. 16, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b00997>. Acesso em: 18 ago. 2021.

PINTO, G, N. Caracterização taxonômica e respostas fisiológicas em cianobactérias morfológicamente distintas. **Dissertação de pós graduação**. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, MG, 2016. Disponível em: <https://www.locus.ufv.br/bitstream/123456789/10008/1/texto%20completo.pdf>. Acesso em: 28 fev. 2022.

POLESI, L. F. **Amido resistente obtido a partir de amido de leguminosas e de seus hidrolisados**. 2009. Piracicaba - SP, 2009. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11141/tde-09092009-150507/pt-br.php>. Acesso em 20 jul. 2021.

PORTO, R. *et al.* Nanopartículas de óxido de zinco sintetizadas pelo método poliol: Caracterização e avaliação da atividade antibacteriana. **Revista Matéria**, [s. l.], v. 22, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1517-707620170005.0248>. Acesso em: 30 jun. 2021.

POWELL, C. K.; CHADDOCK, J. B.; DIXON, J. R. The motion of algae in turbulent flow. **Biotechnology and Bioengineering**, [s. l.], v. 7, n. 2, 1965. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/bit.260070209>. Acesso em: 15 ago. 2021.

PRATES, D. *et al.* Spirulina cultivated under different light emitting diodes: Enhanced cell growth and phycocyanin production. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 256, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.01.122>. Acesso em: 16 ago. 2021.

QU, X.; ALVAREZ, P.; LI, Q. Applications of nanotechnology in water and wastewater treatment. **Water Research**, [s. l.], v. 47, n. 12, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.09.058>. Acesso em: 18 ago. 2021.

QUADROS, J. de; DUARTE FILHO, P.; JUNGES, F. Bioissorção de metais pesados utilizando a microalga *Synechococcus nidulans*. In: **Pesquisa científica e inovação tecnológica nas engenharias**. [S. l.]: Atena Editora, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.22533/at.ed.02820060120>. Acesso em: 17 ago. 2021.

QUADROS, J. de. *et al.* Utilização de microalga para bioissorção do metal pesado chumbo PB. **Anais do 10º Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e extensão – SIEPE**. Universidade Federal do Pampa. Santana do Livramento, 2018. Disponível em: https://guri.unipampa.edu.br/uploads/evt/arq_trabalhos/16671/seer_16671.pdf. Acesso em: 9 mar. 2022.

QUINA, F. Nanotecnologia e o meio ambiente: perspectivas e riscos. **Química Nova**, [s. l.], v. 27, n. 6, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422004000600031>. Acesso em: 24 ago. 2021.

QUIROGA, A. L. B. Amidos Estrutura e Fontes. **Food Ingredients Brasil**, [s. l.], v. 35, p. 31–56, 2015. Disponível em: https://revista-fi.com.br/upload_arquivos/201606/2016060971570001466691578.pdf. Acesso: 28 jun. 2021.

RANJAN, S. *et al.* **Nanoscience and nanotechnologies in food industries: Opportunities and research trends**. [S. l.]: Kluwer Academic Publishers, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11051-014-2464-5>. Acesso em: 8 ago. 2021.

RAVEN, J. A. Limits on growth rates. **Nature**, [s. l.], v. 361, n. 6409, 1993. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/361209a0>. Acesso em: 11 ago. 2021.

R Core Team (2021). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponível em: <https://www.R-project.org/>. Acesso em: 9 mar. 2022.

RIBEIRO, B. M. Efeitos de nanopartículas de prata biossintetizadas por *Aspergillus niger* em diferentes níveis tróficos. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual Paulista - UNESP. Instituto de Biociências, São Vicente – SP. 2020. Disponível em:

https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/192577/ribeiro_bm_me_svic_int.pdf?sequence=3&isAllowed=y. Acesso em: 08 mar. 2022.

RICHMOND, A. Principles for attaining maximal microalgal productivity in photobioreactors: an overview. **Hydrobiologia**, [s. l.], v. 512, n. 1–3, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1023/B:HYDR.0000020365.06145.36>. Acesso em: 12 ago. 2021.

ROCHA, T.; DEMIATE, I.; FRANCO, C. Características estruturais e físico-químicas de amidos de mandioca-salsa (*Arracacia xanthorrhiza*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, [s. l.], v. 28, n. 3, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0101-20612008000300018>. Acesso em: 30 ago. 2021.

ROUQUEROL, J. *et al.* Recommendations for the characterization of porous solids (Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, [s. l.], v. 66, n. 8, 1994. Disponível em: <https://doi.org/10.1351/pac199466081739>. Acesso em: 5 set. 2021.

SASI, D. **Biokinetic behaviour of *Chlorella vulgaris* in a continuously stirred bioreactor and a circulating loop photobioreactor**. 2009. Saskatoon, Canadá, 2009. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10388/etd-09172009-091508>. Acesso em: 11 ago. 2021.

SCHIERZ, A. *et al.* Fate of single walled carbon nanotubes in wetland ecosystems. **Environmental Science: Nano journal**. [s. l.], v. 1, n. 6, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/C4EN00063C>. Acesso em: 18 ago. 2021.

SILVA, G. *et al.* Características físico-químicas de amidos modificados de grau alimentício comercializados no Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, [s. l.], v. 26, n. 1, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0101-20612006000100030>. Acesso em: 30 ago. 2021.

SILVA, R. F. da. A Difração de Raios X: uma Técnica de Investigação da Estrutura Cristalina de Materiais. **Revista Processos Químicos**, 14(27), 73-82, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.19142/rpq.v14i27.577>. Acesso em: 24 fev. 2022.

SILVEIRA, J. B.; LORENSI, R. S.; COELHO, T. T. Otimização de condições de cultivo heterotrófico de microalgas. Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação científica, **Blucher Chemical Engineering Proceedings**. Vol. 1, p. 984-990, 2015. Disponível em: <https://www.proceedings.blucher.com.br/article-details/otimizao-de-condies-de-cultivo-heterotrfico-de-microalgas-19763>. Acesso em: 22/03/2021.

SINGH, N. *et al.* Morphological, thermal and rheological properties of starches from different botanical sources. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 81, n. 2, 2003. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00416-8](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00416-8). Acesso em: 1 set. 2021.

SIRISUK, P. *et al.* Effects of wavelength mixing ratio and photoperiod on microalgal biomass and lipid production in a two-phase culture system using LED illumination. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 253, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.01.020>. Acesso em: 16 ago. 2021.

SOARES, D. C. Potencial biotecnológico da microalga *Synechococcus nidulans* para tratamento de águas ácidas de drenagem da região de mineração em Candiota-RS. Trabalho

de conclusão de curso de Pós graduação. Unipampa. Bagé, 2014. Disponível em: <https://dspace.unipampa.edu.br>. Acesso em: 01 mar. 2022.

SOARES, R. Caracterização parcial de amido em cultivares brasileiros de cevada (*Hordeum vulgare* L.). 2003. Florianópolis, 2003.

SOARES, R. V. Estudo das propriedades óticas e elétricas de filmes finos de óxido de zinco. 2018. São Paulo, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.11606/D.43.2018.tde-13062018-195831>. Acesso em: 7 set. 2021.

SOUZA, M. Incorporação de nanopartículas de óxido de zinco a um cimento de ionômero de vidro por meio da calcinação: avaliação de propriedades mecânicas e físicas. 2016. Araraquara - SP, 2016. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/138572>. Acesso em: 7 set. 2021.

SOYKEABKAEW, N.; THANOMSILP, C.; SUWANTONG, O. **A review: Starch-based composite foams**. [S. l.]: Elsevier Ltd, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.compositesa.2015.08.014>. Acesso em: 29 jun. 2021.

SRIMONGKOL, P. *et al.* Ability of marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. VDW to remove ammonium from brackish aquaculture wastewater. **Agricultural Water Management**, [s. l.], v. 212, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2018.09.006>. Acesso em: 17 ago. 2021.

TESTER, R. F.; KARKALAS, J.; QI, X. Starch-composition, fine structure and architecture. **Journal of Cereal Science**, [s. l.], v. 39, n. 2, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2003.12.001>. Acesso em: 30 ago. 2021.

TOMASELLI, L. Morphology, ultrastructure and taxonomy of *Arthrospira* (*Spirulina*). In: ***Spirulina Platensis (Arthrospira) Physiology, Cell-biology and Biotechnology***. London: Taylor & Francis, 1997. p. 1–16.

TOMASELLI, L. The Microalgal Cell. In: **Handbook of Microalgal Culture**. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/9780470995280.ch1>. Acesso em: 11 ago. 2021.

VAN VLACK, L. H. **Propriedades dos materiais cerâmicos**. São Paulo: Edgard Blucher, 1973. Disponível em: <https://www.estantevirtual.com.br/livros/lawrence-h-van-vlack/propriedades-dos-materiais-ceramicos/2135799068>. Acesso: 2 set. 2021.

VASEASHTA, A. *et al.* Nanostructures in environmental pollution detection, monitoring, and remediation. **Science and Technology of Advanced Materials**, [s. l.], v. 8, n. 1–2, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.stam.2006.11.003>. Acesso em: 18 ago. 2021.

VENKATARAMAN, L.V. *Spirulina platensis* (*Arthrospira*): Physiology, Cell Biology and Biotechnology. **Journal of Applied Phycology**, [s. l.], v. 9, n. 3, p. 295–296, 1997. Disponível em: <https://doi.org/10.1023/A:1007911009912>. Acesso em: 12 ago. 2021.

VONSHAK, A.; TOMASELLI, L. Arthrospira (Spirulina): Systematics and Ecophysiology. *In: THE ECOLOGY OF CYANOBACTERIA*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2000. Disponível em: https://doi.org/10.1007/0-306-46855-7_18. Acesso em: 16 ago. 2021.

WANG, Y. *et al.* TiO² nanoparticles in the marine environment: Physical effects responsible for the toxicity on algae *Phaeodactylum tricornutum*. **Science of The Total Environment**, [s. l.], v. 565, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.03.164>. Acesso em: 18 ago. 2021.

WANG, Z. P.; ZHAO, Y. Morphological reversion of *Spirulina (arthrospira) platensis (cyanophyta)*: from linear to helical. **Journal of Phycology**, [s. l.], v. 41, n. 3, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2005.00087.x>. Acesso em: 16 ago. 2021.

WEBER, F. H.; COLLARES-QUEIROZ, F. P.; CHANG, Y. K. Caracterização físico-química, reológica, morfológica e térmica dos amidos de milho normal, ceroso e com alto teor de amilose. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, [s. l.], v. 29, n. 4, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0101-20612009000400008>. Acesso em: 30 ago. 2021.

XIE, Z.; BUSCHLE-DILLER, G. Electrospun poly (D, L-lactide) fibers for drug delivery: The influence of cosolvent and the mechanism of drug release. **Journal of Applied Polymer Science**, [s. l.], v. 115, n. 1, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/app.31026>. Acesso em: 13 set. 2021.

XU, J. *et al.* Effect of spring dextrin on retrogradation of wheat and corn starch gels. **Food Hydrocolloids**, [s. l.], v. 33, n. 2, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.03.013>. Acesso em: 1 set. 2021.

YU, L.; DEAN, K.; LI, L. Polymer blends and composites from renewable resources. **Progress in Polymer Science**, [s. l.], v. 31, n. 6, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2006.03.002>. Acesso em: 13 Sep. 2021.

YU, S.; MA, Y.; SUN, D. Impact of amylose content on starch retrogradation and texture of cooked milled rice during storage. **Journal of Cereal Science**, [s. l.], v. 50, n. 2, p. 139–144, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2009.04.003>. Acesso em: 1 set. 2021.

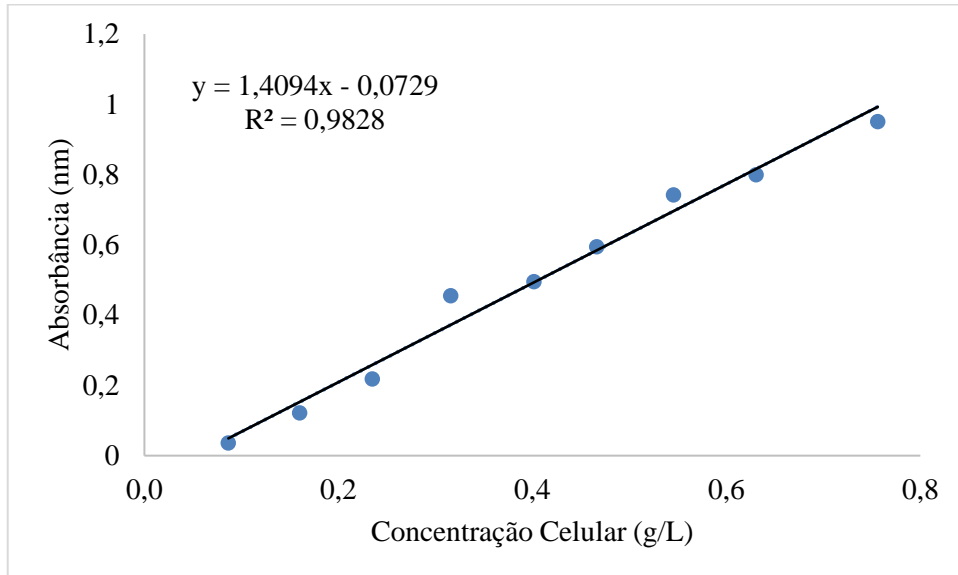
ZANATTA, C.S. **Preparação e Caracterização de Óxido de Zinco Nanoestruturado**. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais, Universidade Estadual Paulista, Bauru, 2009. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/88364>. Acesso em: 28 fev. 2022.

ZARROUK, C. **Contribution à l'étude d'une cyanophycée: influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et photosynthèse de Spirulina maxima Geitler**. 1966. Paris, 1966. Disponível em: <https://www.scienceopen.com/document?vid=aaef3fb0-8dd2-4e9f-9b1a-815bf6944e0c>. Acesso em: 20 jul. 2021.

ZIELIŃSKA, A. *et al.* Preparation of silver nanoparticles with controlled particle size. *In: , 2009. Procedia Chemistry*. [S. l.: s. n.], 2009. p. 1560–1566. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.proche.2009.11.004>. Acesso at: 27 jun. 2021.

ZITTELLI, G, C. *et al.* Photobioreactors for Mass Production of Microalgae. *In*: RICHMOND, Amos; HU, Qiang (org.). **Handbook of Microalgal Culture**. Oxford, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/9781118567166.ch13>. Acesso em: 11 ago. 2021.

ANEXOS

ANEXO A – Curva padrão da microalga *Spirulina platensis*.ANEXO B – Curva padrão da microalga *Synechococcus nidulans*.