

FACULDADE CATÓLICA SALESIANA DO ESPÍRITO SANTO

FREDERICO PACHECO MILITÃO

**EFEITO DE DIFERENTES INTENSIDADES LUMINOSAS NO CRESCIMENTO EM
BIOMASSA DE *Tetrastrum heteracanthum* (NORDSTEDT) CHODAT COMO
SUBSÍDIO PARA A PRODUÇÃO DE BODIESEL**

VITÓRIA - ES

2013

FREDERICO PACHECO MILITÃO

**EFEITO DE DIFERENTES INTENSIDADES LUMINOSAS NO CRESCIMENTO EM
BIOMASSA DE *Tetrastrum heteracanthum* (NORDSTEDT) CHODAT COMO
SUBSÍDIO PARA A PRODUÇÃO DE BIODIESEL**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade Católica Salesiana do Espírito Santo, como requisito obrigatório para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. MSc. Danilo Camargo Santos

VITÓRIA - ES

2013

FREDERICO PACHECO MILITÃO

EFEITO DE DIFERENTES INTENSIDADES LUMINOSAS NO CRESCIMENTO EM BIOMASSA DE *Tetrastrum heteracanthum* (NORDSTEDT) CHODAT COMO SUBSÍDIO PARA A PRODUÇÃO DE BODIESEL

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade Católica Salesiana do Espírito Santo, como requisito obrigatório para obtenção do título de Bacharel em Ciências biológicas.

Aprovado em _____ de _____ de 2013, por:

Prof. MSc. Danilo Camargo Santos, FCSES – Orientador

Prof^a. Dra. Selma Aparecida Hebling, FCSES

Prof^a. M.^a Larissa Bassani de Oliveira, UFES

Á Deus, aos meus pais, irmãos e amigos.

“Tudo surgiu da água.
Tudo é mantido pela água.”
(Goethe)

AGRADECIMENTOS

Á Deus em primeiro lugar por toda a sabedoria a mim concedida, por sempre me guiar no melhor caminho e pela força nos momentos difíceis.

Aos meus pais, João e Marilene, pelo amor e apoio incondicional, e aos meus irmãos Luíza e Rafael. Amo vocês.

Aos meus muitos orientadores: Fabíola, Larissa, Thaís e Danilo. Que com toda paciência, carinho e compreensão contribuíram para meu crescimento como biólogo, e a cada etapa deste trabalho me passaram um pouco dos seus conhecimentos, conhecimento este que com certeza fez toda a diferença. Obrigado pela amizade.

A Fabíola Chrystian, por ter me ensinado sobre o mundo das microalgas fazendo com que eu me apaixonasse. Foi ótimo te conhecer e ser seu monitor !!

A Larissa Bassani, por ter acreditado no meu potencial e idealizado este projeto, obrigado pelos conselhos, pela preocupação, zelo e carinho.

A Thais Almeida, por ter me acompanhado durante todo o desenvolvimento deste experimento, ensinamentos, conversas e carinho.

Ao Danilo Camargo, meu orientador atual, pela ajuda no período da escrita, por aturar os meus devaneios e momentos de desespero!

Á professora doutora, Valéria de Oliveira Fernandes por ter sido tão gentil e prestativa me recebendo como estagiário em seu laboratório há um ano e meio atrás. Obrigado também pelos muitos ensinamentos, pelos momentos de descontração, incentivo e compreensão.

Á Pâmela, minha amiga de todas as horas nessa jornada, um agradecimento mais que especial pela amizade sincera. Obrigado por ter passado todos os momentos comigo, momentos de alegrias, tristezas, desespero e aprendizado. Por ter sido minha companhia nos fins de semana, ano novo e natal passados dentro do laboratório! Com certeza, eles foram mais divertidos com você!

Ao Laboratório de Taxonomia e Ecologia de Algas Continentais (LATEAC), pelo espaço físico, materiais e equipamentos.

A Franciny e Raissa, ninfa e abelha rainha, com quem muito aprendi. Obrigado pelas tardes no laboratório, pelas conversas, pelos conselhos e principalmente pela amizade. Vocês são incríveis!

Aos amigos do cultivo Victor, Bruno e Edson, por toda a ajuda prestada e pelos ensinamentos necessários no início, muito obrigado.

Nayara, pela amizade e carinho durante esses quatro anos de curso, monitorias e estágio juntos, Sandra, Lorena (Bah), Brener, Stéfano, Gustavo e aos demais companheiros de LATEAC, obrigado pelos momentos de muita conversa, diversão, desespero e também de aprendizado juntos.

Ao professor doutor Nelson Roberto Antoniosi Filho, coordenador do laboratório LAMES da Universidade Federal de Goiás e a sua mestranda Dayane Cristina Costa pela enorme contribuição para os resultados finais desta pesquisa e pela disposição em esclarecer minhas dúvidas, muito obrigado.

Ao professor doutor Geraldo Rogério F. Cuzzuol e a seus alunos pelo uso das centrifugas e aos demais laboratórios e alunos, mestrandos e doutorandos da botânica por estarem sempre disponíveis á ajudar.

Aos membros constituintes da banca, que aceitaram de bom grado contribuir para o melhoramento deste trabalho.

Á Bethinha, que com toda certeza sempre alegrou minhas tardes com seus casos e brincadeiras, obrigado pelo famoso cafezinho no fim da tarde e por todo o carinho.

Aos meus amigos: Cecília, Marcella, Bruno, Otávio, Vinicius e Rayani. Obrigado por todo o incentivo, às vezes acreditando mais em mim do que eu mesmo, e por todos os momentos juntos nesses quatro anos!

A todos que de alguma forma, direta ou indireta, me deram força e contribuíram para que eu chegasse até aqui, muito obrigado.

RESUMO

O crescente interesse por cultivo de microalgas se deve a sua importância ambiental, e também por produzirem compostos de interesse comercial, como biocombustíveis a base de lipídeos. Este trabalho busca conhecer a melhor intensidade luminosa para incremento de biomassa da microalga *Tetrastrum heteracanthum* (Nordstedt) Chodat 1895, possível fonte de biocombustível, e com isso diminuir os custos e o tempo de geração do cultivo em larga escala. A cepa foi isolada de amostras da Lagoa Juara, Serra (ES), por meio da técnica de pipetagem e diluições sucessivas. Os três tratamentos (7300, 3800 e 1200 lux) foram triplicados e realizados em meio ASM1, temperatura de $26^{\circ}\text{C} \pm 2$, pH 7,4, fotoperíodo de 24h/24h de luz e aeração manual diária por 48 dias. A determinação da biomassa foi realizada pelos métodos de contagem direta em câmaras de Fuchs Rosenthal em microscópio óptico, espectrofotometria e peso seco. A extração dos lipídeos totais seguiu o protocolo de Bligh e Dyer (1959) e o perfil dos ácidos graxos foi determinado pelo laboratório LAMES, da Universidade Federal de Goiás. Houve melhor taxa de crescimento, maior rendimento máximo e menor tempo de duplicação na intensidade luminosa de 7300 lux, seguido por 3800 lux e 1200 lux respectivamente, sendo que nenhum tratamento atingiu a fase estacionária de crescimento ao término do experimento. Sua composição lipídica se mostrou adequada e potencial fonte para biodiesel a base de óleos microalgais, sendo constituída por 28,6% de ácidos graxos saturados, 35,5% de monoinsaturados (MUFA), 28,3% diinsaturados (DUFA), 7% de triinsaturados (TUFA) e 2,4% poliinsaturados (PUFA). Desta forma, conclui-se que *Tetrastrum heteracanthum* é sensível e tem seu crescimento prejudicado quando em baixas luminosidades. A melhor luminosidade para cultivo dessa espécie para produção de biodiesel é de 3800 lux, tendo em vista o incremento da biomassa, velocidade de crescimento e menor custo de produção.

Palavras-chave: Cultivo. Chlorophyceae. Microalga. Combustível. Luz.

ABSTRACT

The growing interest in microalgae cultivation is due to its environmental importance, and also to its capacity of producing compounds commercially interesting, such as the lipidic biofuels. This research aims to know the best light intensity which stimulates the biomass growth of the microalgae *Tetrastrum heteracanthum* (Norderstedt) Chodat 1895, which is a possible source of biofuel, and thereby reduce the costs and generation time for large-scale cultivations. The strain was isolated from a live Juara lagoon sample, Serra (ES), using pipetting and successive dilutions technique. The three treatments (7300, 3800 and 1200 lux) were triplicated and cultivated in ASM1 culture medium, in 26 ± 2 ° C of temperature, pH 7.4, 24h/24h photoperiod of light, with daily manual aeration for 48 days. The biomass measures were done by direct counting in Fuchs Rosenthal chamber, using an optical microscope, spectrophotometer and dry weight. The total lipid extraction was done based in the Bligh and Dyer (1959) protocol and the fatty acid profile was determined by laboratory LAMES, Universidade Federal de Goiás. The results showed that the better growth rate, maximum yield and shorter doubling time were obtained by 7300 lux, followed by 3800 lux and 1200 lux, respectively. All treatments did not reach the stationary growth phase in the end of the experiment. *T. heteracanthum* lipid composition is adequate as a potential source for microalgae oil biodiesel production and consisted of 28.6 % of saturated fatty acids, 35.5 % monounsaturated (MUFA), 28.3 % diunsaturated (DUFA), 7 % triunsaturated (TUFA) and 2.4% polyunsaturated (PUFA). Finally, we concluded that *Tetrastrum heteracanthum* is sensitive in front low light intensities. The best light intensity to cultivate this specie for potential use in the production of biodiesel is 3800 lux, with an increased biomass growth rate and lower cost of production.

Keywords: Cultivation. Chlorophyceae. Microalgae. Fuel. Light.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 - Lagoa Juara, Serra, ES	37
Figura 02 - Microalga <i>Tetrastrum heteracanthum</i> . Fotografia retirada em microscópio óptico com aumento de 1000x. A, B e C – Estruturas de <i>T. heteracanthum</i> ; D – Aspecto da colônia.....	40
Figura 03 - Sala de cultivo do laboratório de taxonomia e ecologia de algas continentais (LATEAC/UFES).....	42
Figura 04 - Processo de filtragem do peso seco. A e B – Quite filtração, bomba á vácuo e kitassato; C – Filtros após a filtragem da amostra.....	44
Figura 05 - Extração de lipídeos totais. A – Lipídeo total extraído no final do processo; B – Lipídeo extraído no início do processo; e C – Início do processo, com utilização de uma capela de fluxo.....	45
Figura 06 - Processo de centrifugação da cultura. A) Antes e B) depois da centrifugação	47
Figura 07 - Liofilização da biomassa para análise do perfil dos ácidos graxos da microalga <i>Tetrastrum heteracanthum</i>	48
Figura 08 - Curva de quantificação para ésteres metílicos de ácidos graxos do óleo de soja	49
Figura 09 - Curva de crescimento dos três diferentes tratamentos (7300lux, 3800lux e 1200lux) com o respectivo desvio padrão, baseada na contagem direta por câmera de Fuchs Rosenthal.....	53
Figura 10 - Aspecto microscópico culturas, microfotografia em microscópio óptico com aumento de 1000x. A – Células em processo de divisão; b – Colônia formando aglomerados de células; c e d – células com tamanhos anormais	57
Figura 11 - Aspecto macroscópico da cultura, dia 45 de cultivo	57
Figura 12 - Quantidade de lipídeos totais nos diferentes tratamentos	58
Figura 13 - Relação linear entra peso seco e Cel.mL ⁻¹ dos três tratamentos, A (3800 lux), B(1200 lux) e C (7300 lux)	59
Figura 14 - Curva de crescimento baseada no peso seco por dias de cultivo	60
Figura 15 - Cromatograma apresentando os principais ácidos graxos constituintes da microalga <i>Tetrastrum heteracanthum</i> . Onde P, O, L e Ln representam os ácidos graxos palmítico, oleico, linoleico e linolênico, respectivamente	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 - Composição das soluções estoque do meio ASM1	41
Tabela 02 - Valores de Taxa de crescimento (μ), tempo de duplicação em dias (G) e rendimento máximo (R) para a cultura de <i>Tetrastrum heteracanthum</i> submetidos a diferentes intensidades luminosas. Tratamentos com médias não seguidas pela mesma letra diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade de erro	55
Tabela 03 - Perfil de ácidos graxos da microalga <i>T. heteracanthum</i>	61
Tabela 04 - Teores totais de ácidos graxos saturados.....	62
Tabela 05 - Massa de óleo da microalga <i>Tetrastrum heteracanthum</i> em comparação com a soja	62
Tabela 06 - Rendimento em óleo na microalga.....	63
Tabela 07 - Perfil de ácidos graxos do óleo de soja	63
Tabela 08 - Comparação entre Teores totais de ácidos graxos entre a Chlorophyceae <i>Tetrastrum heteracanthum</i> e outras sete espécies	73

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 REFERENCIAL TEÓRICO	27
3 METODOLOGIA.....	37
3.1 CAMPO.....	37
3.2 ISOLAMENTO	38
3.3 MICROALGA ISOLADA.....	39
3.4 MEIO DE CULTURA.....	40
3.5 TIPO DE CULTIVO	41
3.6 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	41
3.7 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO.....	43
3.7.1 Espectrofotometria	43
3.7.2 Peso seco	44
3.8 EXTRAÇÃO DE LIPÍDEOS TOTAIS.....	45
3.9 CENTRIFUGAÇÃO.....	46
3.10 CONGELAMENTO E LIOFILIZAÇÃO.....	47
3.11 PERFIL DOS ÁCIDOS GRAXOS.....	48
3.11.1 Curva de quantificação dos ésteres.....	49
3.12 INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS	50
3.13 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	51
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO DA PESQUISA.....	53
4.1 RESULTADOS.....	53
4.1.1 Aspecto das culturas.....	56
4.1.2 Lipídeos totais.....	58
4.1.3 Peso seco	58
4.1.4 Análise do perfil de ácidos graxos.....	60
4.2 DISCUSSÃO.....	63
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	75
REFERÊNCIAS	77

1 INTRODUÇÃO

As algas estão entre os organismos vivos mais primitivos da história da Terra, tendo a sua origem datada do período Pré-cambriano, há três bilhões e meio de anos (BOLD; WYNNE, 1985). Em 1753, Lineu propôs “alga” como uma categoria taxonômica, porém, hoje esse termo é usado para designar uma grande variedade de organismos fotoautotróficos, clorofilados, criptógamos e talófitos, e já não possui nenhum valor taxonômico, sendo rebaixado a um agrupamento taxonômico (BICUDO; MENEZES, 2006).

Algas fitoplanctônicas são organismos microscópicos fotossintetizantes que vivem em suspensão na zona eufótica da coluna d’água em movimentação passiva. Por serem autotróficos, são os principais responsáveis pela produção primária dos ambientes aquáticos marinhos, dulcícolas ou salobros (REYNOLDS, 2006). Além disso, eles atuam como os principais componentes da base da cadeia alimentar dos ambientes aquáticos. Comumente as algas fitoplanctônicas são bioindicadoras da qualidade da água, devido à rápida resposta às variações ambientais (ESTEVES, 1998) e por possuírem um ciclo de vida curto.

A Classe Chlorophyceae, pertencente à Divisão Chlorophyta, é uma das mais frequentes do fitoplâncton, seus representantes apresentam coloração esverdeada por possuírem as clorofilas “a” e “b” como pigmentos principais. Possui cerca 8000 espécies descritas, acredita-se que este número seja muito maior atualmente, sendo que 90% são de ambientes lacustres, principalmente lagos e lagoas mesotróficos ou eutróficos (ESTEVES, 1998; FOTT, 1971; RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2007). Dentre os agrupamentos taxonômicos algais, a Divisão Chlorophyta é uma das mais visadas para a extração de óleo algáceo, devido ao seu rápido crescimento, fácil adaptação às variações ambientais e também por ser facilmente cultivável (TEIXEIRA; MORALES, 2006).

O cultivo de microalgas tem sido uma importante ferramenta para elucidar diversos aspectos da biologia das espécies, principalmente quanto à variabilidade morfológica, a plasticidade fenotípica, características bioquímicas, metabolismo vegetativo e reprodutivo, ciclo de vida, contribuindo assim para aumentar o conhecimento sobre a ecologia e taxonomia desses organismos. Além disso, o desenvolvimento das pesquisas com culturas algais tem proporcionado o uso cada

vez maior de microalgas em testes de toxicidade, melhorando assim a avaliação dos impactos ambientais causados por algumas substâncias que são derramadas em ambientes aquáticos (LOURENÇO, 2006).

O aumento gradativo no interesse por cultivo de microalgas se deve não só por sua importância ambiental e biológica, mas também por sua produção de compostos de relevância comercial como proteínas, carboidratos, vitaminas, ácidos graxos poli-insaturados, e pigmentos como carotenóides e clorofila (DERNER; OHSE; VILLELA, 2006). Nos últimos anos as pesquisas com microalgas para fins comerciais se expandiram, e houve um aumento nas investigações que buscam a produção de biodiesel tendo como fonte estes microrganismos, uma vez identificado seu potencial como matéria prima (LOURENÇO, 2006).

A demanda crescente por formas de energia limpa ou menos degradáveis para a substituição de combustíveis fósseis levou, em todo mundo, o lançamento de programas para a produção de biocombustíveis. Os biocombustíveis vêm sendo vistos como uma ótima alternativa para substituir os combustíveis fósseis, não apenas por provirem de fontes renováveis e sustentáveis, mas também por sua composição livre de enxofre e compostos aromáticos (FERRARI; OLIVEIRA; SCABIO, 2005).

O biocombustível nos dias de hoje é produzido em grande escala por plantas oleaginosas como a soja, girassol e a palma. Porém, o uso de microalgas pode ser uma alternativa interessante, tendo em vista que algumas linhagens algais produzem grande quantidade de óleo, apresentando uma taxa rápida de crescimento, permite o uso de terras não aráveis. Finalmente, as microalgas não competem por áreas cultiváveis destinadas a alimentação humana (PAULILLO; JATOBÁ; CECHINEL, 2009).

Sabe-se que o desenvolvimento das microalgas pode ser afetado por fatores bióticos (taxa de crescimento, parasitismo, alelopatia e herbivoria) e abióticos (temperatura, pH, incidência de luminosidade, velocidade de correnteza e concentrações de nutrientes). Dentre esses fatores abióticos, a concentração de nutrientes e a luminosidade são fatores determinantes no desenvolvimento desses organismos uma vez que influenciam no processo fotossintético (ESTEVES, 2011; GUILLARD; MORTON, 2003).

A intensidade luminosa é um dos fatores ambientais que afeta diretamente as microalgas, visto que influencia na formação de compostos orgânicos via processo fotossintético e, conseqüentemente, a densidade e composição bioquímica e celular (ERIKSEN; GEEST; IVERSEN, 1996; JORGE et al., 1999). Os efeitos da radiação luminosa na composição bioquímica das microalgas estão relacionados com os processos de fotoaclimatação ou fotoadaptação (HU, 2004), uma vez que, altas intensidades luminosas tendem a aumentar a produção de polissacarídeos nas células algais (HU, 2004).

Além disso, em ambientes aquáticos a radiação luminosa também afeta o desenvolvimento das algas e influencia a disposição do fitoplâncton ao longo da coluna d'água, sendo que algumas algas podem migrar verticalmente (passiva ou ativamente) de modo a satisfazer sua necessidade por luz (ESTEVES, 1998).

Para as algas da Classe Chlorophyceae, quando a intensidade da luz é baixa, pigmentos como carotenoides e clorofilas "b" e "c", passam a agir como pigmentos acessórios, ou seja, capturam diferentes comprimentos de onda captando a energia luminosa e a repassa para as moléculas de clorofila "a" (OLAIZOLA; DUERR, 1990). Em luminosidades muito baixas, as clorofíceas, microalgas que não possuem grande variedade de pigmentos acessórios, não conseguem captar luz em diferentes intervalos de comprimento de onda, como as cianobactérias que possuem outros pigmentos como ficocianina e ficoeritrina, o que torna as clorofíceas organismos com maior demanda de luminosidade para uma produção satisfatória de compostos provenientes da fotossíntese. Por outro lado, sob altas intensidades luminosas, os pigmentos acessórios, principalmente os carotenóides, protegem a clorofila "a" contra a foto-oxidação. Porém, quando em luminosidades excessivamente altas, se a alga não for capaz de aumentar a concentração de pigmentos acessórios ou de produzir pigmentos mais especializados, ela pode entrar em colapso e morrer (OLAIZOLA; DUERR, 1990). Por fim, apesar de ser um fator importante, a luz em excesso pode causar fotoinibição, provocando diminuição da capacidade fotossintética o que também resultaria no decréscimo da biomassa (CAMACHO et al., 2003).

A radiação luminosa em intensidades muito elevadas pode causar a morte das células pela formação de peróxido de hidrogênio (extremamente tóxica para as

algas) quando junto de oxigênio. Essa reação é conhecida como foto-oxidação ou morte fotooxidativa (HIRAYAMA; UEDA; SUGATA, 1996).

As condições de cultivo podem ser alteradas para otimizar ou induzir a produção de maiores concentrações das substâncias de interesse, como proteínas, pigmentos, carboidratos e ácidos graxos (LOURENÇO, 2006). No Estado do Espírito Santo, não existem pesquisas publicadas sobre cultivo de clorofíceas isoladas a partir de ambientes capixabas, ou que testem em laboratório a influência na variação de fatores ambientais no desenvolvimento de alguma alga de interesse econômico.

A Universidade do Espírito Santo (UFES) participa, através do Laboratório de Taxonomia e Ecologia de Algas Continentais (LATEAC), do Departamento de Ciências Biológicas/CCHN, do projeto intitulado “MICROALGAS– Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação em Tecnologia para Produção e uso de Biodieséis Derivados de Óleos de Microalgas”, aprovado pela FINEP/MCT. Este projeto tem como objetivo estudar espécies locais de várias regiões do Brasil, visto que uma grande variedade de microalgas ainda não foi explorada bioquímica e metabolicamente.

O LATEAC (UFES) em nome de sua coordenadora, Prof. Dra. Valéria de Oliveira Fernandes, convidou a Faculdade Católica Salesiana do Espírito Santo, a integrar, através de seus alunos, o projeto supracitado, de forma que parte das atividades foram desenvolvidas na UFES e parte nos laboratórios da Faculdade Salesiana, permitindo desta forma ampla contribuição para formação dos alunos envolvidos e estabelecendo uma parceria de grande valia para o enriquecimento técnico-científico das instituições.

Tendo em vista o exposto, a presente pesquisa busca estudar o efeito de diferentes intensidades luminosas sobre o crescimento em biomassa de uma microalga da Classe Chlorophyceae, *Tetrastrum heteracanthum* (Nordstedt) Chodat. Contribuindo para a busca de novas espécies promissoras para a obtenção do biocombustível e diminuir os custos do processo de obtenção do mesmo, a fim de tornar seu uso viável frente aos combustíveis produzidos a base de petróleo. Os objetivos específicos deste trabalho são: 1) Obter uma cepa da microalga da Classe Chlorophyceae *Tetrastrum heteracanthum* em meio líquido ASM1, a fim de obter biomassa para a realização dos testes; 2) Avaliar o crescimento das culturas

submetidas a diferentes intensidades luminosas (7300 lux, 3800 lux, 1200 lux), por um período de 45 dias através de espectrofotometria, em coletas diárias; 3) Comparar a variação na quantidade de lipídeos totais dos tratamentos e; 4) Verificar a melhor resposta apresentada pela microalga para seu cultivo.

Neste contexto, a hipótese do presente trabalho é que o crescimento e a produção de lipídeos totais das culturas microalgais serão maiores quando expostas a uma maior intensidade luminosa se comparados aos resultados dos tratamentos cultivados em menores intensidades luminosas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

Biodiesel é um mono-alquil éster de ácidos graxos, sendo um biocombustível derivado de origem renovável, produzido a partir de óleos vegetais ou gordura animal. Os óleos vegetais, por sua vez, podem ser obtidos de uma grande variedade de matérias-primas, sendo comumente derivados de sementes de plantas oleaginosas (como soja, girassol, colza, algodão, entre outros) e parte de seus frutos, sendo a palma a mais utilizada. Também é possível a utilização de óleos de descarte (fritura) e de origem animal (AZEREDO, 2012; DEMIRBAS, 2009; GONÇALVES; NOGUEIRA, 2007; KNOTHE, 2006a; KOWALSKI, 2010; MONTEIRO, 2009). De forma abrangente, o conceito de biocombustível considera tanto combustíveis sólidos quanto os líquidos ou gasosos (AZEREDO, 2012). O principal processo utilizado para a obtenção do biodiesel é a transesterificação, que consiste na reação química desses óleos de origem natural com álcool etílico ou metanol na presença de um catalizador inorgânico (DEMIRBAS, 2009; KNOTHE, 2006a; BRASIL, 2013).

Apesar dos combustíveis fósseis atualmente constituírem a principal fonte de energia mundial, a tendência é que, em um século, o consumo de petróleo passe de 30% para 5% devido ao esgotamento das reservas. Por outro lado, espera-se que o consumo de combustíveis a base de biomassa, ou biocombustíveis, avance de 2% para 20% ao longo mesmo período de tempo (FERRARI; OLIVEIRA; SCABIO, 2005; PAULILLO; JATOBÁ; CECHINEL, 2009). Neste cenário os biocombustíveis estão sendo vistos como uma potencial escolha à substituição dos combustíveis fósseis convencionais, não só por provirem de fontes renováveis, mas também por sua composição livre de enxofre e compostos aromáticos, pela menor emissão de partículas, pelo caráter não tóxico, pelo teor médio de oxigênio (em torno de 11%), maior ponto de fulgor e por serem biodegradáveis, o que os tornam menos agressivos ao meio ambiente (FERRARI; OLIVEIRA; SCABIO, 2005; PAULILLO; JATOBÁ; CECHINEL, 2009). Além disso, o biodiesel pode ser mesclado ao diesel a base de petróleo em qualquer proporção, minimizando seus efeitos danosos ao meio ambiente (BRASIL, 2006; KNOTHE, 2006a; BRASIL, 2013). A maior desvantagem em relação ao biodiesel é o aumento da liberação de óxidos de azoto (NOx) na atmosfera (MONTEIRO, 2009).

Embora o tema “biocombustíveis” tenha ganhado mais destaque no meio acadêmico nos últimos anos, a utilização de biocombustíveis se dá desde tempos antigos, na descoberta do fogo. A partir deste período a madeira se tornou o biocombustível sólido mundialmente utilizado, posteriormente seguido da descoberta de que óleos vegetais e gorduras animal e vegetal também serviam como combustível (AZEREDO, 2012). Por volta do final do século XVIII óleos de baleia e azeite de peixes eram utilizados nos postes de iluminação pública na cidade do Rio de Janeiro (SILVA, 2006).

O biodiesel foi descoberto por volta de 1900 quando o pesquisador e inventor Rudolph Diesel criou um motor com um novo sistema de funcionamento, denominado “ciclo diesel”, movido a base de óleo de amendoim. Entretanto o alto valor agregado na produção de sementes e a grande quantidade de petróleo disponível no início do século XX e seu fácil refinamento, resultou na troca dos óleos vegetais pelo óleo refinado a partir do petróleo (GONÇALVES; NOGUEIRA, 2007; MA; HANNA, 1999). Além da grande disponibilidade, a alta densidade energética contribuiu para que o petróleo se tornasse a matéria prima mais utilizada para fabricação de combustíveis (PAULILLO; JATOBÁ; CECHINEL, 2009).

Durante a Segunda Guerra Mundial se deu a primeira grande demanda por combustíveis naturais renováveis, devido ao fim do abastecimento de petróleo importado por parte de países produtores. Com o fim da guerra, a oferta de petróleo, provindo do Oriente Médio, tomou novamente conta do mercado, sendo esta interrompida na década de 70 com o choque do petróleo, em virtude da instabilidade política desses países (AZEREDO, 2012; KOWALSKI, 2010).

Diante deste cenário, diversas alternativas foram estudadas, buscando uma fonte alternativa economicamente acessível e menos poluidora. No Brasil foi criado o programa Pró-Álcool no ano de 1975, como estratégia para reduzir o consumo de derivados do petróleo e substituí-los por etanol, produzido a base de cana-de-açúcar (AZEREDO, 2012; OSAKI; BATALHA, 2011). Também no início da década de 70 o Brasil criou o Plano de Produção de Óleos Vegetais para Fins Energéticos (Pró-Óleo) e mais tarde em 1980 passou a ser o Programa Nacional de Óleos Vegetais para Fins Energéticos, com objetivo de estimular a mistura de 30% de biodiesel ao diesel convencional e uma substituição total do diesel a base de petróleo em longo prazo. Entretanto, a redução no preço do petróleo e o alto custo de produção do

biodiesel em relação ao diesel fóssil paralisaram os avanços desacelerando o programa (AZEREDO, 2012; OSAKI; BATALHA 2011; SERVIÇO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS, 2013).

Contudo, a demanda crescente por formas de energia limpa ou menos degradáveis para a substituição de combustíveis fósseis levou em todo mundo o lançamento e a retomada de programas para a produção de biocombustíveis (OSAKI; BATALHA, 2011).

As fontes vegetais mais utilizadas para a obtenção de biodiesel são as plantas oleaginosas, tais como a colza e girassol (Europa), soja (Estados Unidos e Brasil) e a palma (Malásia e Indonésia) (MONTEIRO, 2009). No Brasil as principais matérias-primas empregadas na produção de biodiesel são a soja, a mamona e o dendê, sendo que a soja corresponde a cerca de 90% da produção agrícola de óleos vegetais (CHIARANDA et al., 2005). Porém, de toda a soja produzida, aproximadamente 95% se destina ao mercado brasileiro de óleo vegetal para a alimentação humana (OSAKI; BATALHA, 2011).

Entretanto, a produção de biodiesel tendo como base as plantas oleaginosas convencionais, como a soja, destinadas em grande parte para a alimentação humana, é considerada um problema, visto que se tornaria necessário desviar parte das culturas desses vegetais, inicialmente destinados à alimentação humana e animal, para a produção de biodiesel. Além disso, pode ocorrer uma substituição de plantações em regiões de solo fértil, retirando vegetais não-oleaginosos que seriam destinados à alimentação e cultivando plantas oleaginosas para produção do biodiesel, o que poderia acarretar o aumento dos preços dos alimentos (OLIVEIRA, 2009).

Por essas razões, novas fontes para a extração de óleos para a produção de biodiesel vêm sendo estudadas e desenvolvidas. Dentre elas se destacam os estudos realizados com microalgas, as quais apresentam grande potencial energético (AZEREDO, 2012; MA; HANNA, 1999; PAULLILO et al., 2009), com índices de produtividade por área maior que dos cultivos tradicionais (MONTEIRO, 2009).

O uso de microalgas pode ser uma alternativa, tendo em vista que algumas espécies produzem grande quantidade de óleo, além de apresentarem uma taxa de

crescimento rápida comparada às plantas terrestres. Elas também permitem o uso de terras impróprias para plantação, não cultiváveis, regiões com deficiência de água e condições climáticas extremas e não competem por áreas cultiváveis destinadas à alimentação humana. São organismos microscópicos unicelulares ou formadores de colônias ou filamentos, com ciclos de vida, em sua maioria, simples e curtos, o que os tornam facilmente cultiváveis. Dessa maneira, uma cultura de microalgas, por ser originada de um único indivíduo, teoricamente apresenta a mesma composição genômica e bioquímica dentro da cultura. Muitas espécies podem ser induzidas a produzir, em grandes quantidades, determinados compostos, tais como proteínas, lipídeos e carboidratos. Finalmente, outra vantagem em relação às plantas oleaginosas é que o cultivo de microalgas dispensa o uso de agrotóxicos (BERTOLDI; SANT'ANNA; OLIVEIRA, 2008; OHSE et al., 2007; PAULILLO; JATOBÁ; CECHINEL, 2009).

Entretanto, culturas de microalgas em escala comercial para a produção de biodiesel atualmente se torna muito custosa comparada com a produção atual de petróleo. Desta forma o desafio atual para o cultivo de microalgas associa-se a uma diminuição dos custos de produção de biodiesel em relação às plantas oleaginosas e ao isolamento e seleção de espécies promissoras de elevada acumulação de lipídeos (CAROLINO, 2011). Para se tornar conveniente o consumo de biocombustíveis à base de biomassa, estes precisam gerar mais energia do que a necessária para sua produção e os preços dos custos de produção e obtenção devem se igualar ou aproximar dos valores de obtenção do petróleo bruto (CHISTI, 2007; PAULILLO; JATOBÁ; CECHINEL, 2009).

As algas estão entre os organismos vivos mais primitivos da história da Terra, tendo a sua origem datada do período Pré-cambriano, há três bilhões e meio de anos (BOLD; WYNNE, 1985). Em 1753, Lineu propôs “alga” como uma categoria taxonômica, porém, hoje esse termo é usado para designar uma grande variedade de organismos fotoautotróficos, clorofilados, criptógamos e talófitos, e já não possui nenhum valor taxonômico, sendo rebaixado a um agrupamento taxonômico (BICUDO; MENEZES, 2006).

Algas fitoplanctônicas são organismos microscópicos fotossintetizantes que vivem em suspensão na zona eufótica da coluna d'água. Por serem autotróficos, são os principais responsáveis pela produção primária dos ambientes aquáticos marinhos,

dulcícolas ou salobros. Desempenhando, desta forma, um papel fundamental na manutenção da vida nestes ecossistemas (REYNOLDS, 2006; VIDOTTI; ROLLEMBERG, 2004). Além de serem os principais componentes da base da cadeia alimentar dos ambientes aquáticos, as algas fitoplanctônicas são bioindicadoras da qualidade da água, devido à rápida resposta às variações ambientais (ESTEVES, 1998). Outra grande importância é a possível formação de florações ou “blooms”, que geram efeitos prejudiciais para a biota e até mesmo para o homem (LOURENÇO, 2006).

A disposição da comunidade fitoplanctônica de determinada região ou ambiente, é reflexo de respostas e adaptações a diversos fatores bióticos e abióticos. O arranjo no qual as comunidades fitoplanctônicas se encontram reflete não só as interações entre os indivíduos da mesma, como também o efeito de variáveis ambientais sobre ela, sendo influenciada principalmente pela radiação, concentração de nutrientes inorgânicos, temperatura, pH e condutividade elétrica da água (HINO, 1979). É importante ressaltar que os ambientes naturais são heterogêneos em tempo e espaço e a comunidade fitoplanctônica responde a essas mudanças, o que faz com que ela esteja sempre em processo de organização e dessa forma não alcancem assim estágios climáticos (HUTCHINSON, 1967).

A Divisão Chlorophyta, que compreende as espécies conhecidas como algas verdes ou somente clorófitas é constituída por cerca de 17 mil espécies que variam desde indivíduos constituídos por uma única célula (unicelulares) à indivíduos talosos multicelulares (LOURENÇO, 2006). Os indivíduos desta Divisão são encontrados em todo o mundo, ou seja, são cosmopolitas, ocorrendo em diversos habitats como ambientes dulcícolas, marinhos, salobros e ambientes mais extremos como neve, folhas de plantas terrestres, troncos de árvores, salinas, desertos, cinzas vulcânicas e pêlos de animais, porém, principalmente os indivíduos microscópicos, que correspondem a maioria das espécies da Divisão Chlorophyta, são encontrados em ambientes dulcícolas (ESTEVES, 1998; LOURENÇO, 2006).

Uma infinidade de tipos morfológicos está presente nesta divisão, as formas variam de unicelulares cocóides, unicelulares monadais, colônias tetrasporais, coloniais cenóbios, filamentosos simples, filamentosos ramificados a formas macroscópicas (LOURENÇO, 2006).

De acordo com Esteves (1998) as Classes Chlorophyceae e Zygnemaphyceae são as classes de maior representatividade no fitoplâncton, em número de táxons descritos, para a Divisão Chlorophyta.

A Classe Chlorophyceae é uma das mais frequentes do fitoplâncton, apresentam coloração esverdeada por possuírem as clorofilas "a" e "b" como pigmentos principais. Possui aproximadamente 8000 espécies conhecidas, embora se estime que este número seja muito maior atualmente, sendo que 90% são de ambientes lacustres, principalmente lagos e lagoas mesotróficos ou eutróficos, esta classe é considerada de ocorrência cosmopolita (FOTT, 1971; ESTEVES, 1998; RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2007). Dentre os agrupamentos taxonômicos algais, a Classe Chlorophyceae é uma das mais visadas para a extração de óleo algáceo, devido ao seu rápido crescimento e fácil adaptação às variações ambientais e também por serem facilmente cultiváveis (TEIXEIRA; MORALES, 2006).

O cultivo de microalgas tem sido uma importante ferramenta para elucidar diversos aspectos da biologia das espécies principalmente quanto à variabilidade morfológica, a plasticidade fenotípica, características bioquímicas, ciclo de vida e assim contribuindo para aumentar o conhecimento sobre a ecologia e taxonomia das algas. Além disso, o avanço do cultivo tem proporcionado o uso cada vez maior de microalgas em testes de toxicidade melhorando assim a avaliação dos impactos ambientais causados por algumas substâncias que são derramadas em ambientes aquáticos (LOURENÇO, 2006).

O cultivo desses organismos teve início a cerca de 140 anos acompanhando o avanço nas áreas das ciências ambientais, microbiologia e fisiologia (LOURENÇO, 2006). Este mesmo autor divide a história do cultivo em dois importantes períodos, o primeiro período foi onde houve as descobertas fundamentais a respeito das microalgas e dos melhores métodos de como cultivá-las, iniciado no final do século XIX, principalmente entre os anos de 1870 a 1880, atribuindo a Famintzin (1871) o título de primeiro pesquisador a desenvolver estudos sobre cultivo de microalgas. O segundo grande período, o qual se estende até a atualidade, teve início entre meados dos anos 1940 e início de 1950, sem um marco histórico concreto separando-o do primeiro período. Este por sua vez é marcado pela diversificação dos estudos relacionados ao assunto e suas aplicações biotecnológicas (LOURENÇO, 2006).

O Brasil tem uma história muito recente na área de cultivo, tendo sua pesquisa difundida somente a partir de 1980, ao contrário de outros países como Alemanha, França e Holanda que iniciaram estudos com cultivo já no século XIX. No Brasil os primeiros estudos datam de 1976 realizados pelos pesquisadores Clóvis Teixeira e Armando A. H. Vieira na universidade de São Paulo. Não participando do desenvolvimento fundamental dos cultivos. No Brasil, atualmente, são contabilizados aproximadamente 45 laboratórios e coleções ligadas a cultivo de microalgas, estes laboratórios são de pequeno e médio porte e apenas cinco destes tem coleções de cultivo de microalgas com mais de 150 cepas de gêneros distintos (LOURENÇO, 2006).

O aumento gradativo no interesse por cultivo de microalgas se deve não só por sua importância ambiental e biológica, mas também por sua produção de compostos de relevância comercial como proteínas, carboidratos, vitaminas, ácidos graxos poli-insaturados, e pigmentos como carotenóides e clorofila (DERNER; OHSE; VILLELA, 2006).

Os cultivos em grande escala de microalgas estão voltados em sua maioria para a obtenção de proteínas usadas como suplemento alimentar tanto na alimentação de animais como na humana. Estas podem ser encontradas em formulações em pó, tabletes, cápsulas, extratos, misturados a alimentos industrializados como biscoitos, doces e bebidas (LOURENÇO, 2006). O uso da cianobactéria *Spirulina* (*Arthrospira platensis*) como fonte de alimento para humanos e animais ocorre há pelo menos 700 anos, pelo seu alto teor proteico (RICHMOND, 2004). São cinco os gêneros de microalgas mais usados na alimentação humana: *Aphanizomenon* e *Arthrospira* (cianobactérias), *Chlorella*, *Dunaliella* e *Scenedesmus* (Chlorophyceae) (RICHMOND, 2000 *apud* LOURENÇO, 2006). Estas microalgas além do seu alto valor nutricional apresentam ainda certas propriedades benéficas como supressão de hipertensão e a promoção do crescimento intestinal de *Lactobacillus* (LOURENÇO, 2006).

O cultivo de microalgas também se aplica na indústria farmacêutica, de corantes e na de cosméticos. Através do cultivo para aproveitamento de pigmentos como os carotenoides, os quais alguns deles, principalmente astaxantina e betacaroteno, podem ser aproveitados como corantes de alimentos e rações e também como substância antioxidante e fonte de vitamina A (LOURENÇO, 2006). Outros

pigmentos também são comercializados, como por exemplo as ficobilinas, produzidas por algumas algas como as dos grupos cianobactérias e as criptófitas. Esses pigmentos apresentam coloração azulada, sendo chamados de ficocianinas, e avermelhadas, as ficoeritrinas. As ficobilinas são empregadas na indústria como corantes na indústria de alimentos, como matéria-prima para a produção de cosméticos e também em ensaios imunológicos. Esta última através da produção de corantes fluorescentes (BECKER, 2004; LOURENÇO, 2006). A cianobactéria *Arthrospira* e as algas vermelhas unicelulares *Porphyridium* e *Rhodella*, são algumas das principais fontes de ficobilinas (LOURENÇO, 2006). Além dos usos supracitados, espécies de microalgas podem produzir uma série de moléculas bioativas com efeito antibióticos, anticancerígenos, anti-inflamatórias, antivirais, redutoras de colesterol, enzimáticas e entre outras (DERNER; OHSE; VILLELA, 2006).

Como potencial fonte de biodiesel, as microalgas mais estudadas para utilização em larga escala são: as Chlorophyceae *Platymonas* sp., e *Botryococcus braunii*, a Chlorodendrophyceae *Tetraselmis suecica*, as Coscinodiscophyceae *Cyoclotella* sp. e *Cyoclotella cryptica*, e a Trebouxiophyceae *Chlorella protothecoides* (MONTEIRO, 2009).

Sabe-se que o desenvolvimento das microalgas pode ser afetado por fatores bióticos (taxa de crescimento, parasitismo, alelopatia e herbivoria) e abióticos (temperatura, pH, incidência de luminosidade, velocidade de correnteza e concentrações de nutrientes). Dentre esses fatores abióticos, a concentração de nutrientes e a luminosidade são fatores determinantes no desenvolvimento desses organismos uma vez que influenciam no processo fotossintético (ESTEVES, 2011; GUILLARD; MORTON, 2003).

A intensidade luminosa é um dos fatores ambientais que afeta diretamente as microalgas, visto que influencia na formação de compostos orgânicos via processo fotossintético, e conseqüentemente a densidade e composição bioquímica e celular (ERIKSEN; GEEST; IVERSEN, 1996; JORGE et al., 1999). Os efeitos da radiação luminosa na composição bioquímica das microalgas estão relacionados com os processos de fotoaclimatação ou fotoadaptação (HU, 2004), uma vez que, altas intensidades luminosas tendem a aumentar a produção de polissacarídeos nas

células algais (HU, 2004). Em cultivo, a luminosidade adequada também proporciona crescimento da população algal, porém, podem ocorrer mudanças no desenvolvimento das algas ao longo do tempo, visto que, à medida que aumenta a densidade celular, a intensidade luminosa por célula diminui o que resulta na redução do crescimento da microalga (ERIKSEN; GEEST; IVERSEN, 1996; JORGE et al., 1999).

Em ambientes aquáticos a radiação luminosa também afeta o desenvolvimento de algas e influencia a disposição do fitoplâncton ao longo da coluna d'água, sendo que algumas algas podem migrar verticalmente de modo a satisfazer sua necessidade por luz (ESTEVES, 1998).

Para as algas da Classe Chlorophyceae, quando a intensidade da luz é baixa, pigmentos como carotenoides e clorofilas "b" e "c", passam a funcionar como pigmentos acessórios, dessa forma, capturam diferentes comprimentos de onda captando a energia luminosa e a repassa para as moléculas de clorofila "a" (OLAIZOLA; DUERR, 1990). Em luminosidades muito baixas, as clorófitas, microalgas que não possuem grande variedade de pigmentos acessórios, não conseguem captar luz em diferentes intervalos de comprimento de onda, como as cianobactérias que possuem outros pigmentos como ficocianina e ficoeritrina, o que torna as clorófitas organismos com maior demanda de luminosidade para uma produção satisfatória de compostos provenientes da fotossíntese. Por outro lado, sob altas intensidades luminosas, os pigmentos acessórios, principalmente os carotenoides, protegem a clorofila "a" contra a foto-oxidação. Porém, quando em luminosidades excessivamente altas, se a alga não for capaz de aumentar a concentração de pigmentos acessórios ou de produzir pigmentos mais especializados, ela pode entrar em colapso e morrer (OLAIZOLA; DUERR, 1990). Por fim, apesar de ser um fator importante, a luz em excesso pode causar fotoinibição, provocando diminuição da capacidade fotossintética o que também resultaria no decréscimo da biomassa (CAMACHO et al., 2003).

A radiação luminosa em intensidades muito elevadas pode causar a morte das células pela formação de peróxido de hidrogênio (extremamente tóxica para as algas) quando junto de oxigênio. Essa reação é conhecida como foto-oxidação ou morte fotooxidativa (HIRAYAMA; UEDA; SUGATA, 1996).

Fator este comprovado em trabalhos como o de Sorokin e Krauss(1958), que demonstrou ocorrer fotoinibição em *Scenedesmus obliquus*, o ponto de saturação da luz para essa alga foi de 500 footcandles, que corresponde a aproximadamente 5382 lux, nesse ponto *S. obliquus* atingiu uma taxa de crescimento de 2,2. O crescimento caiu pela metade quando a intensidade luminosa passou para 4500 footcandles ou 48437 lux aproximadamente, quando ocorreu a fotoinibição.

No experimento de Bouterfas, Belkoura e Dauta (2006), que trabalharam com as microalgas *Selenastrum minutum*, *Coelastrum microporum* e *Cosmarium subprotumidum*, todas da Classe Chlorophyceae, em intensidades luminosas entre 30 e 456 $\mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$ (ou 1620 e 24624 lux) em duas temperaturas diferentes, 25°C e 35°C, observaram fotoinibição do crescimento após uma intensidade luminosa ótima, sendo 365, 390 e 360 $\mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$ para *Selenastrum minutum*, *Coelastrum microporum* e *Cosmarium subprotumidum*, respectivamente, através do decréscimo dos valores da taxa de crescimento mais ou menos rapidamente, dependendo da temperatura.

3 METODOLOGIA

Neste capítulo estão apresentadas as metodologias utilizadas na realização desta pesquisa. O experimento foi dividido em duas etapas, a etapa de campo, necessária para coleta do material, e a etapa laboratorial, etapa principal e com maior duração, onde se concentram os objetivos desta pesquisa.

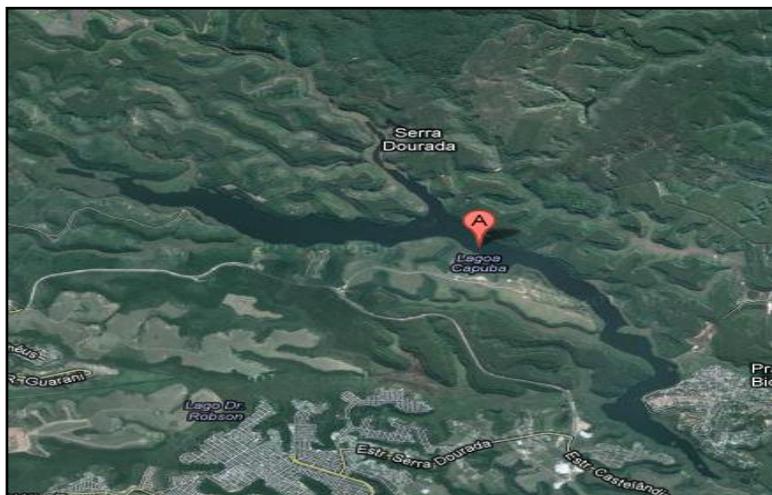
3.1 CAMPO

A lagoa Juara, pertencente à bacia do rio Jacaraípe, localiza-se na região metropolitana da Grande Vitória (Serra, ES) apresenta grande importância socioeconômica regional e vem sendo submetida a inúmeros impactos, como lançamento de efluentes *in natura*, lançados nos córregos afluentes. É um grande depositário de biodiversidade de microalgas fitoplanctônicas (OLIVEIRA; FERNANDES, 2011).

A coleta foi realizada com auxílio de rede de plâncton com 20 µm de abertura de malha, por meio de arrastos horizontais na sub-superfície da coluna d'água em pontos próximos a margem do ambiente, para se obter uma amostra concentrada (BICUDO; MENEZES, 2006).

Foram coletadas amostras de água na lagoa Juara (Figura 01), em setembro de 2012, para isolamento do táxon estudado.

Figura 01 - Lagoa Juara, Serra, ES.



Fonte: Google Mapas, 2013.

3.2 ISOLAMENTO

As amostras vivas foram coletadas e imediatamente acondicionadas em frascos de vidro, sendo mantidas vivas para posterior identificação e isolamento dos táxons.

A microalga foi isolada através do método de pipetagem e diluições sucessivas, adequado para o isolamento de células relativamente grandes de tamanho superior a 10 μm (LOURENÇO, 2006). Essa técnica consiste na análise de uma pequena gota da amostra em microscópio óptico, no caso Olympus CX-41. Com o auxílio de uma pipeta de Pasteur de vidro com ponta afinada manualmente para se formar um capilar, uma pequena quantidade de líquido contendo a alga de interesse é transferida para outra gota contendo somente meio de cultura. Sucessivas transferências são feitas até que se tenha na gota apenas o indivíduo da espécie de interesse. Por fim, o indivíduo é inoculado em um microtubo plástico, com capacidade de 2mL, contendo 1mL de meio líquido ASM1. Esse meio de cultura, apesar de ser preferencialmente usado em cultivo de cianobactérias (LOURENÇO, 2006), apresentou bons resultados no cultivo de microalgas da classe Chlorophyceae em estudos prévios realizados no laboratório LATEACe também foi o que apresentou maior crescimento de *Tetrastrum heteracanthum* em testes preliminares realizados entre BBM, CHU e ASM1 na cultura inóculo. Após a transição final da espécie isolada para o microtubo segue um período de incubação de alguns dias ou semanas, em que os microtubos *ependorfs* são mantidos em estufas em condições adequadas de crescimento, para que aconteça a multiplicação das células e confirmação do isolamento (LOURENÇO, 2006). Os *ependorfs* e o meio de cultura foram previamente esterilizados em autoclave a 121°C por 30 minutos.

Esse método garante a formação de uma cultura clonal, onde, todos os indivíduos são, inicialmente, geneticamente semelhantes entre si. Esse tipo de cultura é ideal, pois seus indivíduos devem se comportar de maneira semelhante a diferentes condições gerando resultados mais homogêneos (LOURENÇO, 2006). Além de clonal é considerado unialgal, por conter apenas uma espécie de microalga.

3.3 MICROALGA ISOLADA

O táxon isolado, *Tetrastrum heteracanthum* (Nordstedt) Chodat 1895 (Figura 02), foi identificado em nível de Gênero seguindo como base Bicudo e Menezes (2006) para nível genérico e Godinho, González e Bicudo (2010) para específico.

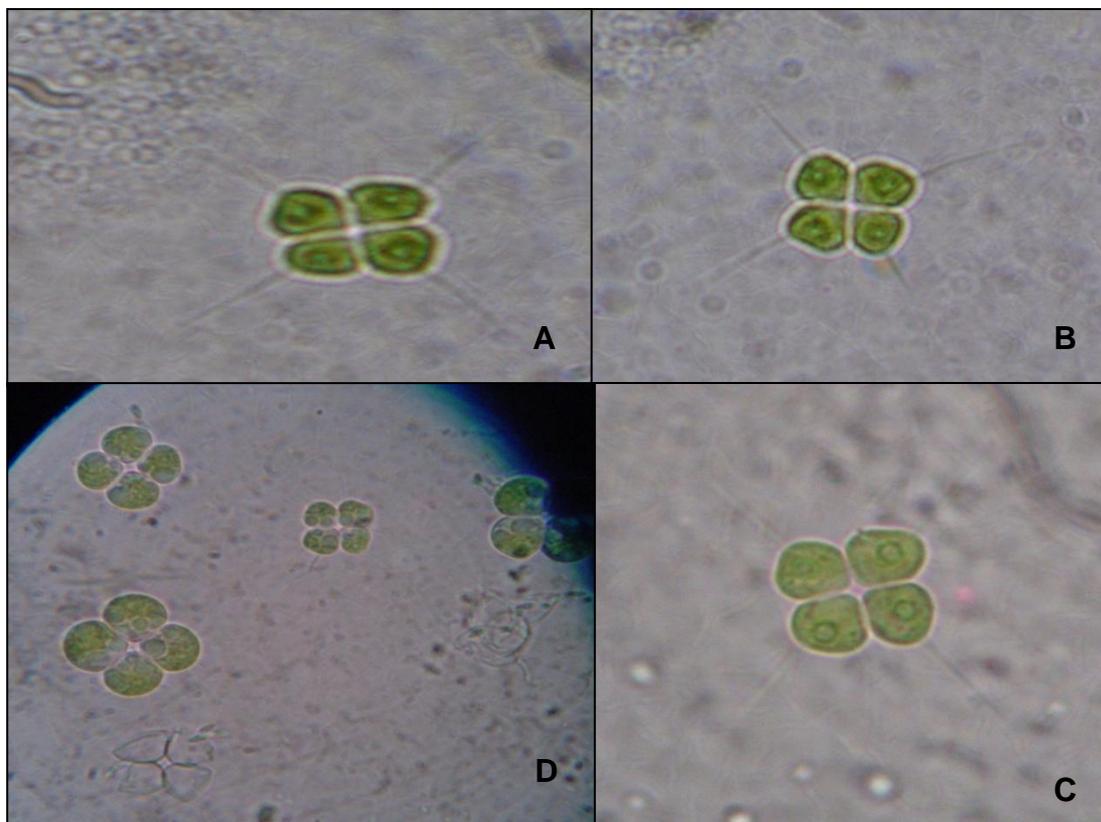
O Gênero *Tetrastrum* compreende indivíduos formadores de colônias, cada uma com quatro células dispostas em volta de um meato, espaço central romboide, formando um quadrado ou losango. A colônia formada é plana e de vida livre. As células constituintes das colônias podem possuir uma forma elipsoidal, triangular com as extremidades arredondadas ou um formato cordiforme, possuindo de um a quatro espinhos na extremidade livre da célula, dependendo da espécie em questão, assim como o número de cloroplastos, que pode variar de um a quatro, este cloroplasto apresenta um formato disciforme, podendo ou não possuir um pirenoide central (AHLSTROM; TIFFANY, 1934; BICUDO; MENEZES, 2006; GODINHO; GONZÁLEZ; BICUDO, 2010).

O Gênero *Tetrastrum* é constituído por cerca de dez espécies conhecidas e identificadas para o fitoplâncton e para o metafíton do mundo inteiro. Cinco espécies do Gênero já foram descritas em território brasileiro sendo elas, *Tetrastrum elegans*, *Tetrastrum glabrum*, *Tetrastrum heteracanthum*, *Tetrastrum mitrae* e *Tetrastrum staurogeniaeforme* (AHLSTROM; TIFFANY, 1934; BICUDO; MENEZES, 2006; GODINHO; GONZÁLEZ; BICUDO, 2010).

Tetrastrum heteracanthum pertence à Classe Chlorophyceae, Família Scenedesmaceae. Corresponde a um cenóbio plano, com células dispostas cruciadamente em volta de um meato central. Suas células apresentam a extremidade livre arredondada e margens internas quase retas apresentando de 3 a 7,6 µm de diâmetro (GODINHO; GONZÁLEZ; BICUDO, 2010).

Esta espécie se difere das demais espécies do gênero *Tetrastrum* por apresentar dois espinhos polares de tamanhos diferentes, que variam de 3 a 10,8 µm de comprimento, dispostos na margem livre de cada uma das quatro células que formam o cenóbio. Apresenta também um cloroplasto parietal por célula e um pirenoide central por cloroplasto, estrutura utilizada para armazenar amido (GODINHO; GONZÁLEZ; BICUDO, 2010).

Figura 02 – Microalga *Tetrastrum heteracanthum*. Fotografia retirada em microscópio óptico com aumento de 1000x. A, B e C – Estruturas de *T. heteracanthum*; D – Aspecto da colônia.



Fonte: Arquivo próprio.

3.4 MEIO DE CULTURA

Para a realização deste experimento foi utilizado o meio de cultura ASM1 (GORHAM; MCLACHLAN; HAMMER, 1964), um meio de cultura caracterizado como definido, por ser preparado a partir de água de elevada pureza (destilada, deionizada ou ultrapura) à qual são adicionados diferentes elementos químicos, dentre esses macro e micronutrientes importantes para o desenvolvimento das microalgas (LOURENÇO, 2006). O meio ASM1 possui 4 soluções estoque chamadas de A, B, C e D que são previamente preparadas (Tabela 1). As soluções estoque são adicionadas na água de elevada pureza, como citado acima, nas proporções de 20 mL, 2mL, 0,1 mL e 0,4 mL para A, B, C e D respectivamente. A solução estoque A é adicionada em 200 mL de água destilada e as soluções estoque B, C e D em 100 mL.

Tabela 1 – Composição das soluções estoque do meio ASM 1.

SOLUÇÃO A	PESO (g)	SOLUÇÃO B	PESO (g)	SOLUÇÃO C	PESO (g)	SOLUÇÃO D	PESO (g)
NaNO ₃ /NH ₄ Cl ₂	1,70	K ₂ HPO ₄	0,87	H ₃ BO ₃	2,48	EDTA. Na ₂	1,86
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,41	Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	1,78	MnCl ₂ .4H ₂ O	1,39		
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,49			FeCl ₃ .6H ₂ O	1,08		
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,29			ZnCl ₂	0,335		
				CoCl ₂ .6H ₂ O	0,019		
				CuCl ₂ .2H ₂ O	0,0014		

Fonte: Adaptado de Gorham, Mclachlan e Hammer (1964).

3.5 TIPO DE CULTIVO

O cultivo realizado é classificado como cultivo em batelada ou estanques. Nesse tipo de cultivo acontecem modificações intensas na composição do meio ao longo do tempo de cultivo, uma vez que as células são inoculadas no meio de cultura fresco e a partir daí nenhum outro nutriente é adicionado ao longo do desenvolvimento do cultivo. A cultura é encerrada quando os nutrientes do meio se esgotam. Outra característica do cultivo em batelada é que se é possível identificar as fases de crescimento do cultivo, que geralmente são cinco: Adaptação, fase de crescimento exponencial, fase de redução do crescimento, fase estacionária e fase de declínio ou senescência (LOURENÇO, 2006).

3.6 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Para a realização deste experimento foi testado o crescimento do organismo algal em diferentes intensidades luminosas, previamente determinadas em laboratório buscando as melhores respostas de aumento de biomassa, foram utilizadas, para simular diferentes intensidades luminosas, lâmpadas fluorescentes 40W do tipo "Daylight". Com isso foram estabelecidos três tratamentos, sendo um em uma intensidade luminosa alta (7300 lux) o tratamento C, outro em uma considerada normal (3800 lux) o tratamento A e um em intensidade luminosa baixa (1200 lux) o

tratamento B. Para atingir o valor de 1200 lux as lâmpadas foram envolvidas por sombrite com 50% de passagem de luz. Tais intensidades luminosas foram escolhidas buscando manter uma diferença considerável entre os três tratamentos, dentro das possibilidades físicas do laboratório. Os níveis de luminosidades foram determinados com auxílio de luxímetro digital da marca ICEL Manaus, modelo LD-550.

O cultivo foi realizado em erlenmeyers de 1 litro contendo 730 mL de meio ASM1, com pH previamente ajustado entre 7,0 e 7,05. O volume do inóculo foi determinado seguindo como base a metodologia utilizada por Lira e outros (2012) que estipula um valor de 10% de inóculo do volume de meio inicial utilizado. Neste caso o inóculo inicial foi de 73 mL de cultura da microalga. Totalizando 803 mL de cultura finais por unidade experimental. A densidade inicial do inóculo foi de $107,727,00 \text{ Cel. mL}^{-1}$.

Este estudo foi realizado na sala de cultivo do Laboratório de Taxonomia e Ecologia de Algas Continentais (LATEAC- UFES) (Figura 03). O ambiente foi mantido a uma temperatura de $27 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 24 h de luz. O experimento teve uma duração de 45 dias sem aspersão de ar ou CO_2 , com agitação manual de duas a três vezes por dia para evitar o auto sombreamento das células. Cada tratamento foi realizado em triplicata, totalizando nove unidades experimentais.

Figura 03 - Sala de cultivo do laboratório de taxonomia e ecologia de algas continentais (LATEAC/UFES).



Fonte: Arquivo próprio.

3.7 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO

Para a determinação do crescimento celular das nove unidades experimentais foram utilizadas duas metodologias, espectrofotometria e contagem direta por meio de câmara de Fuchs-Rosenthal em microscópio óptico comum, que determinam densidade celular e uma segunda metodologia de Peso seco que determina biomassa celular.

3.7.1 Espectrofotometria

A determinação da densidade celular foi efetuada a partir do dia 0 (zero) com coletas de alíquotas de 10 mL em todas as nove unidades experimentais. Essas amostras foram lidas, todas em duplicata para obtenção de uma média, em espectrofotômetro com comprimento de onda de 570 nm para avaliação da absorbância do material em suspensão, visto que, esse comprimento situa-se numa faixa distante da absorção máxima de luz pelas clorofilas e carotenóides. A absorbância registrada é pouco ou nada influenciada pelos pigmentos fotossintéticos, conferindo, fundamentalmente, à obstrução física da passagem de luz pelas células suspensas. A aplicação da densidade óptica para estimar o crescimento microalgal consiste na obstrução física da luz pelas células. Quanto maior a densidade de células na amostra, maior será a absorbância (absorção de luz) e menor será a transmitância (passagem de luz pela amostra) (LOURENÇO, 2006).

Posteriormente essas alíquotas foram fixadas em solução de lugol acético 5% para determinação da densidade celular realizada por contagem direta em hemocitômetros, neste estudo foi utilizado contagem em câmaras de Fuchs Rosenthal em microscópio óptico comum (BICUDO; MENEZES, 2006; LOURENÇO, 2006). A contagem foi realizada no dia 0 (inóculo) e no dia 25. Com estes valores foi elaborada uma fórmula e por proporção, os dados de absorbância obtidos por espectrofotometria foram convertidos em densidade de Cel.mL.

3.7.2 Peso seco

A cada 5 (cinco) dias foram coletadas alíquotas de 15 mL para a determinação do peso seco dos tratamentos. Este volume foi filtrado, com auxílio de uma bomba a vácuo, um kitassato e funil de Buchner, em filtros de fibra de vidro com diâmetro de 47 mm e poros de 0,7 µm, secos em estufa a 80°C por 24 horas e previamente pesados. Depois de filtrada a amostra, os filtros são levados de volta para estufa e mantidos a mesma temperatura, de 80°C até estabilização do peso (Figura 04).

A determinação do peso seco se dá através da subtração do peso final pelo peso inicial do filtro, dividido pelo volume filtrado. Os valores serão expressos em mg/L (LOURENÇO, 2006).

$$PS = \frac{Pf - Pi}{V}$$

Sendo:

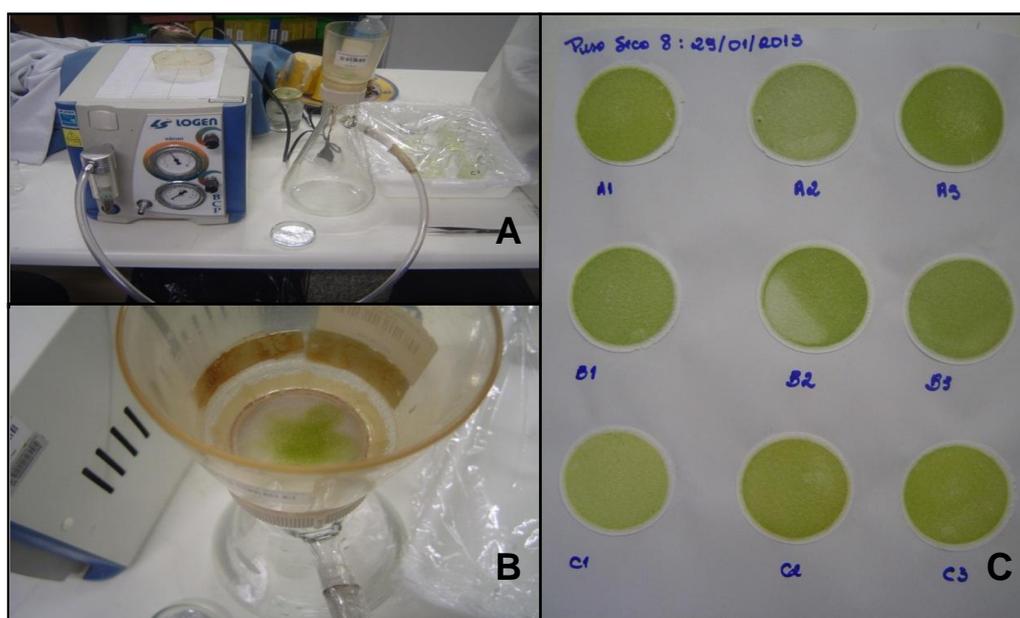
PS: Peso seco;

Pf: Peso final;

Pi: Peso inicial e;

V: Volume filtrado.

Figura 04 – Processo de filtração do peso seco. A e B – Quite filtração, bomba á vácuo e kitassato; C – Filtros após a filtração da amostra.



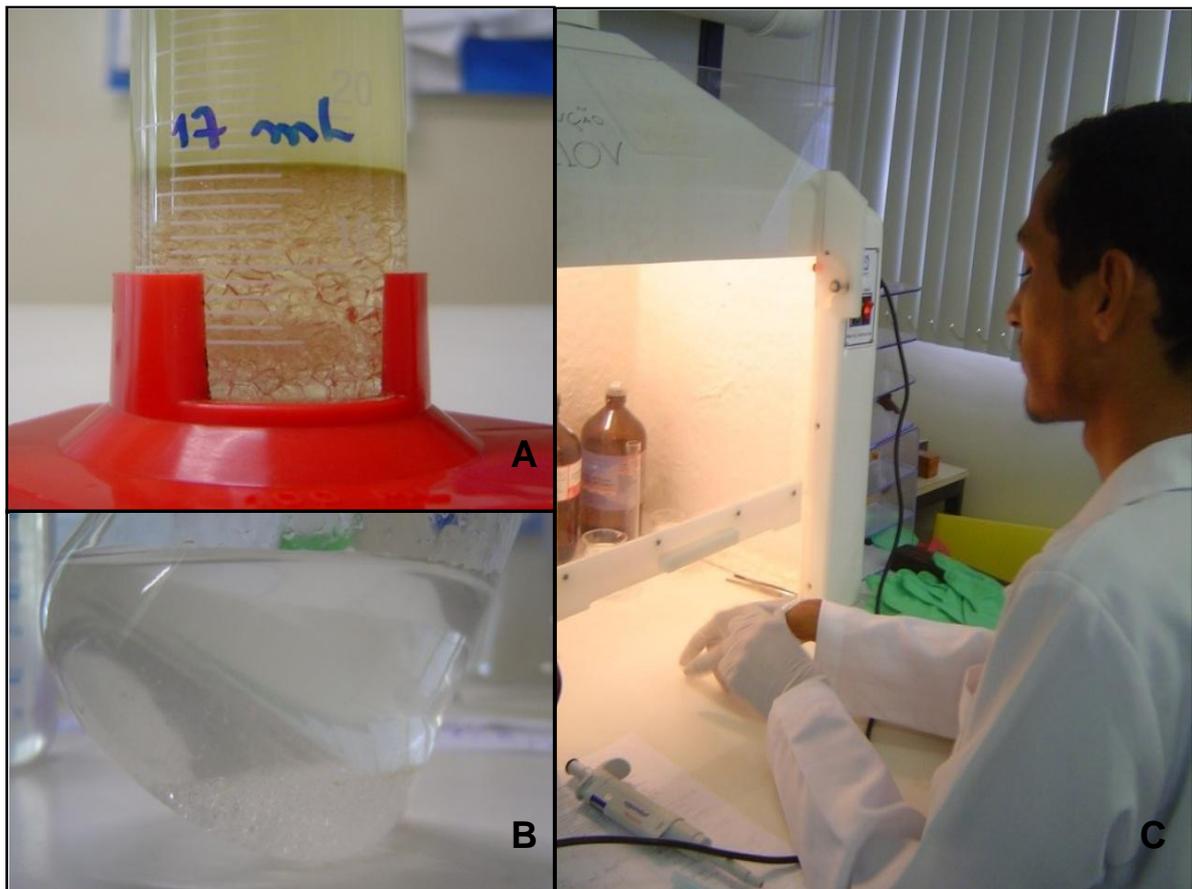
Fonte: Arquivo próprio.

3.8 EXTRAÇÃO DE LIPÍDEOS TOTAIS

A extração de lipídeos totais foi feita com base no protocolo descrito primariamente por Bligh e Dyer (1959). Onde se adiciona 2mL de metanol e 1mL de clorofórmio, numa proporção de 2/1, a uma alíquota de 15 mL da cultura contendo biomassa algal. A mistura é agitada em um vortex por 2 minutos e mantida por 24 horas á uma temperatura de 25 °C. Passadasas 24 horas adiciona-se mais 1mL de clorofórmio e a mistura é agitada em vortex por mais 1 minuto (Figura 05).

Para uma alíquota de 100 mL de cultura, foram adicionados 13,33 mL de metanol e 6,666 mL de clorofórmio, seguindo a mesma proporção sugerida por Bligh e Dyer (1959) de 2/1, adicionando no dia seguinte mais uma alíquota de clorofórmio.

Figura 05 - Extração de lipídeos totais. A – Lipídeo total extraído no final do processo; B – Lipídeo extraído no início do processo; e C – Início do processo, com utilização de uma capela de fluxo.



Fonte: Arquivo próprio.

3.9 CENTRIFUGAÇÃO

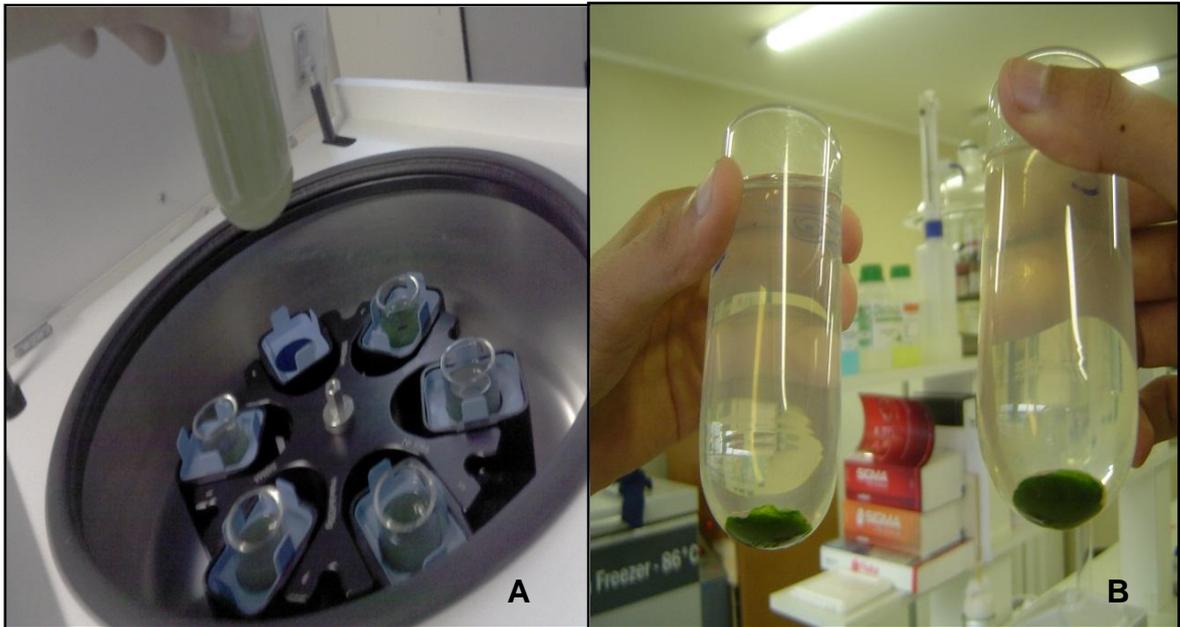
A biomassa obtida através dos cultivos pode ser utilizada para diversos fins, porém para algumas dessas destinações é necessário antes uma preparação, para obter a biomassa nas condições adequadas (LOURENÇO, 2006). A concentração da biomassa e sua separação do meio de cultura é uma etapa quase sempre essencial para certas análises e representa uma etapa trabalhosa, demorada e cara, este último, dependendo dos materiais utilizados, dos volumes e da eficiência que se deseja (LOURENÇO, 2006).

No presente trabalho, a centrifugação foi o método utilizado para coleta, concentração de biomassa algácea e separação da mesma do meio de cultura utilizado. Tendo em vista que dentre os métodos disponíveis (floculação, filtração e centrifugação), a centrifugação é o método mais adequado para a análise posterior pretendida, de perfil dos ácidos graxos da microalga estudada.

De acordo com Lourenço (2006) a centrifugação é um método fácil e bem sucedido quanto em escala laboratorial, como no caso do seguinte estudo, onde se utiliza poucas quantidades de amostra no processo de centrifugação, cerca de alguns litros. Outra vantagem apontada por Lourenço (2006) é que este método pode ser aplicado a qualquer espécie de microalga desejada e a concentração da biomassa final é obtida sem a adição de produtos químicos, como no processo de floculação, o que conserva as características químicas originais da microalga.

A centrífuga utilizada foi da marca SIGMA modelo 6-15, não refrigerada e com capacidade para centrifugação de 6 tubos simultâneos de 150 mL. O processo de centrifugação (Figura 06A) foi realizado em uma rotação por minuto de 4500 rpm, com duração de 10 minutos cada. Duas fases são observadas após o processo de centrifugação (Figura 06B), onde a camada superior, ou sobrenadante, foi descartada e a biomassa algal foi retirada com auxílio de uma pipeta Pasteur descartável e acondicionada em placas de Petri previamente envolvidas com plástico filme.

Figura 06 – Processo de centrifugação da cultura. A) Antes e B) depois da centrifugação.



Fonte: Arquivo próprio.

3.10 CONGELAMENTO E LIOFILIZAÇÃO

Após o término da centrifugação de 10 litros de cultura líquida a biomassa concentrada foi armazenada em placas de Petri previamente envolvidas por plástico filme para evitar contato entre o vidro e a biomassa, facilitando assim a obtenção da biomassa seca ao final do processo de liofilização.

As placas de Petri com a biomassa concentrada foram acondicionadas em ultrafreezer a -45°C negativos para congelamento e conservação da biomassa, uma vez que o congelamento instantâneo não prejudica ou danifica o conteúdo das células e este congelamento prévio é necessário para se liofilizar as amostras. A liofilização foi realizada com auxílio de um liofilizador marca SOLAB, modelo SL-404 (Figura 07).

Figura 07 – Liofilização da biomassa para análise do perfil dos ácidos graxos da microalga *Tetrastrum heteracanthum*.



Fonte: Arquivo próprio.

A liofilização é considerado um ótimo processo de conservação de biomassa a seco, pois neste processo toda a água é retirada das amostras em temperaturas muito baixas, 48 °C negativos. Junto ao liofilizador é utilizada uma bomba a vácuo, e é com a ação desse vácuo que a água é retirada das amostras congeladas contidas no liofilizador e por sublimação esta água é novamente congelada em outro compartimento do aparelho (LOURENÇO, 2006). Uma vez liofilizadas as amostras se tornam livres de toda a água e sem causar nenhum dano a constituição celular, tornando, dessa forma, a amostra liofilizada pronta para se realizar quaisquer análises químicas desejadas (LOURENÇO, 2006).

3.11 PERFIL DOS ÁCIDOS GRAXOS

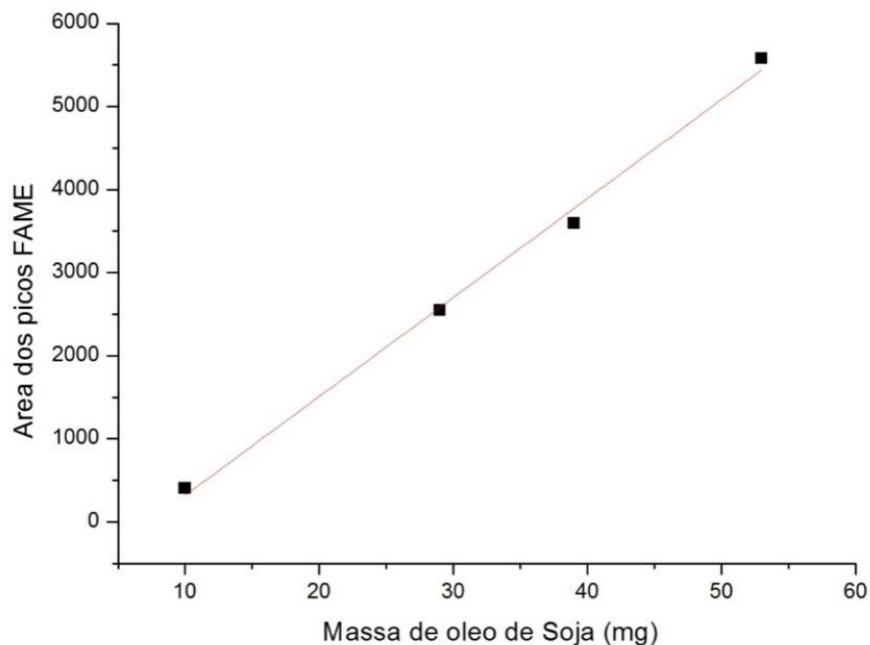
A determinação e a análise de ésteres e do perfil dos ácidos graxo da microalga *Tetrastrum heteracanthum* foi realizado em parceria com a Universidade Federal de Goiás (UFG) pela mestrandia Dayane Cristina Costa do Laboratório de Métodos de Extração e Separação – LAMES sob coordenação do professor Doutor Nelson Roberto Antoniosi Filho, através do projeto maior intitulado “MICROALGAS– Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação em Tecnologia para Produção e uso de Biodieseis Derivados de Óleos de Microalgas” do qual o presente estudo faz parte.

É importante ressaltar que a análise dos ésteres constituintes da microalga deste experimento foi realizada de forma separada, sendo assim não se tem o perfil de ácidos graxos de cada tratamento e sim da microalga cultivada em condições consideradas normais, semelhantes ao tratamento A deste experimento. Dessa forma nenhuma comparação entre os tratamentos, quanto há alterações no perfil lipídico, pode ser realizada.

3.11.1 Curva de quantificação dos ésteres

O cálculo do teor de ésteres das amostras foi baseado na curva de quantificação obtida para a somatória da área dos picos de ésteres metílicos de ácidos graxos do óleo de soja. O óleo de soja refinado foi submetido ao processo de transesterificação direta, com massas correspondentes a 10 mg, 20 mg, 30 mg, 40 mg e 50mg pesadas em 5 tubos de ensaio autoclavável (LABORATÓRIO DE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO E SEPARAÇÃO, 2013a).

Figura 08- Curva de quantificação para ésteres metílicos de ácidos graxos do óleo de soja.



Fonte: Laboratório de Métodos de Extração e Separação (2013b).

Para elaboração da curva, fez-se a somatória das áreas dos picos de ésteres de cada cromatograma. Posteriormente utilizou-se o programa *OriginPro 8* para a construção do gráfico relacionando a massa de óleo de soja com sua respectiva somatória das áreas dos ésteres obtidos por transesterificação direta (Figura 08). Esse gráfico foi utilizado para correlacionar a somatória dos picos de ésteres da microalga com sua correspondente proporcionalidade em massa de óleo de soja. Assim, obteve-se uma função matemática que relaciona a massa de óleo da biomassa de microalgas com a somatória da área dos ésteres fornecidos por esta biomassa via transesterificação direta (LABORATÓRIO DE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO E SEPARAÇÃO, 2013a). A equação gerada pela reta está descrita abaixo:

$$A = -871,2 + 119,1 \cdot X$$

Sendo:

A = \sum Área dos Ésteres;

X = Massa de óleo (mg).

Para calcular a massa de óleo obtida pela transesterificação direta das microalgas, é necessário somar as áreas dos ésteres de cada amostra e substituir na equação acima (LABORATÓRIO DE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO E SEPARAÇÃO, 2013a).

3.12 INTERPRETAÇÕES DOS RESULTADOS

Os resultados de densidade celular obtidos foram utilizados para produzir o modelo de curva de crescimento para cada tratamento. E também para se calcular as taxas de crescimento, tempo de duplicação e rendimento máximo das cepas. Como base para os cálculos das taxas de crescimento foram utilizados os valores compreendidos na fase exponencial do crescimento dos tratamentos.

A taxa de crescimento (μ) e tempo médio de duplicação (**G**) foram calculados segundo as equações descritas primariamente por Fogg e Thake (1987):

$$\mu = (\ln N_2 - \ln N_1) (t_2 - t_1)$$

Sendo:

μ = velocidade específica do crescimento;

N_1 e N_2 = número de células nos tempos t_1 e t_2 ;

A partir do μ é possível calcular o tempo médio de duplicação:

$$G = \ln 2 / \mu$$

O rendimento máximo (R) de cada tratamento foi determinado através da equação:

$$R = R_1 - R_0,$$

Sendo:

R_1 = número máximo de células/mL;

R_0 = número inicial de células/mL;

3.13 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Foram aplicados testes estatísticos de normalidade e variância, ANOVA seguido pelo teste comparativo Tukey a 5% de significância, nos dados da taxa de crescimento, tempo de duplicação e rendimento máximo, assim como nos resultados de densidade celular, peso seco e concentração de lipídeos. Os testes foram realizados utilizando o programa STATISTICA 7.0.

Os dados obtidos diariamente via espectrofotômetro foram organizados em tabelas, das quais foram plotados gráficos de serie lineares correspondentes as curvas de crescimento dos tratamentos A, B e C. Para tal foi utilizado o programa Microsoft Office Excel 2010. Para a curva de crescimento foi calculado o desvio padrão de cada dia do experimento.

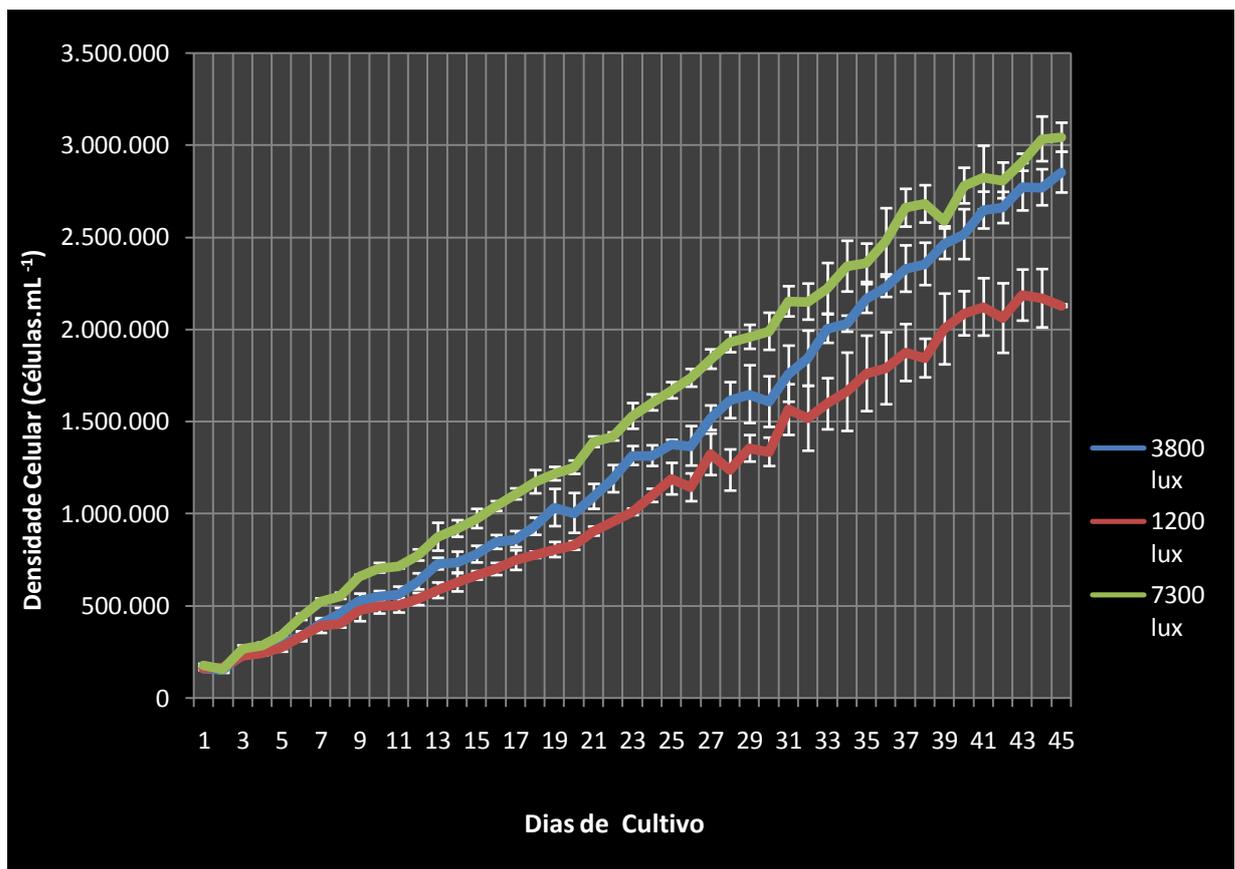
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO DA PESQUISA

Neste capítulo estão dispostos os resultados obtidos ao fim do experimento, seguidos de posterior discussão.

4.1 RESULTADOS

A curva de crescimento da espécie *Tetrastrum heteracanthum* nos diferentes tratamentos está representada na Figura 09.

Figura 09 – Curva de crescimento dos três diferentes tratamentos (7300lux, 3800lux e 1200lux) com o respectivo desvio padrão, baseada na contagem direta por câmera de Fuchs Rosenthal.



Fonte: Elaboração própria.

Os tratamentos apresentaram fase de adaptação longa e nenhum dos três, ao fim dos 45 dias, haviam saído da fase de crescimento exponencial (Log).

O **tratamento C**, na intensidade luminosa de 7300 lux, apresentou fase lag, ou fase de adaptação, até a aproximadamente o 5º dia de cultivo. No qual a variação do

número de células se mostrou significativa entre C e os outros dois tratamentos A e B, os quais permaneceram sem diferença significativa entre si. Os **tratamentos A**, 3800 lux, e **B**, 1200 lux, mantiveram-se na fase lag até aproximadamente o 11º dia.

A fase exponencial de crescimento (log), do **tratamento C** durou do 6º dia até o final do experimento, no 45º dia. Apresentando uma possível entrada na fase estacionária de crescimento. Já o **tratamento A** entrou na fase log no 12º dia de cultivo e nela permaneceu até o fim do experimento, sem indícios de entrada em uma fase estacionária de crescimento. O **tratamento B**, assim como o A, entrou na fase log no 12º dia de cultivo e se manteve em crescimento exponencial até a aproximadamente o 43º dia.

Os dados foram considerados paramétricos, ou normais, pelo teste de normalidade e na determinação da variância pelo teste ANOVA seguido do teste Tukey a 5% de significância, mostrou que houve diferença significativa entre os três tratamentos, sendo que o Tratamento C variou em relação ao B a partir do 5º dia e se manteve diferente deste, sempre em maior concentração de células por mL, até o final do experimento. Em relação ao tratamento A e o tratamento C a variação teve início a partir do 6º dia, sendo que do dia 32 ao dia 36 os dois tratamentos não apresentaram diferença significativa. Nos dias 37 e 38 os tratamentos A e C voltaram a mostrar diferença significativa, e do dia 39 ao dia 45 essa diferença deixou de existir.

Entre os tratamentos A e B a variação só se tornou significativa a partir do 13º dia de cultivo. Sendo que nos dias 27, 31, e 34 de cultivo essa variação não se mostrou significativa, fato esse que pode ser explicado pelo desvio padrão das duas curvas, que se mostrou grande o suficiente para que não ocorresse variação. Do dia 35 até o 45º dia do experimento houve variação significativa entre esses dois tratamentos.

Durante a fase exponencial de crescimento foram calculados, para os três tratamentos A, B e C, os valores das taxas de crescimento, tempo de duplicação e rendimento máximo (Tabela 02).

Tabela 2 - Valores de Taxa de crescimento (μ), tempo de duplicação em dias (G) e rendimento máximo (R) para a cultura de *Tetrastrum heteracanthum* submetidos a diferentes intensidades luminosas. Tratamentos com médias não seguidas pela mesma letra diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de significância.

Luminosidade (lux)	(μ)	(G)	(R)
3800	0.061391 a	11.292895 a	274,5 x 10 ⁴ a
1200	0.058063 b	11.942539 b	207,8 x 10 ⁴ b
7300	0.061863315 a	11.20670078 a	293,5 x 10 ⁴ a

Fonte: Elaboração própria.

Os tratamentos de 3800 lux e 7300 lux não apresentaram diferença significativa nos parâmetros calculados ($p < 0,05$). Já o tratamento de menor intensidade luminosa (1200 lux) apresentou diferença significativa quando comparado com os tratamentos A e C.

A taxa de crescimento da estirpe C, com luminosidade de 7300 lux, correspondente a $\mu = 0,061863315$, foi maior que a dos demais tratamentos sendo de $\mu = 0.061391$ e $\mu = 0.058063$ nos tratamentos de 3800 e 1200 lux respectivamente. Ao modo que o tempo de duplicação no tratamento C foi menor, $G = 11.20670078$, do que os valores obtidos nos demais tratamentos, $G = 11.292895$ para o tratamento A e $G = 11.942539$ para o tratamento B. Com isso pode-se afirmar que a taxa de crescimento aumenta com o aumento da luminosidade enquanto que o tempo de duplicação diminui, ou seja, são inversamente proporcionais. O crescimento de C foi maior e mais rápido que os de A e B, mesmo não apresentando diferença significativa com A. Todos os tratamentos apresentaram crescimento contínuo, embora este tenha sido lento.

Os tratamentos com os maiores valores de rendimento máximo foram C e A, equivalentes a $293,5 \times 10^4 \text{ Cel.mL}^{-1}$ e $274,5 \times 10^4 \text{ Cel.mL}^{-1}$ no 45º dia de cultivo, respectivamente. Sem diferença significativa entre si. Enquanto que no tratamento B o rendimento máximo foi de $207,8 \times 10^4 \text{ Cel.mL}^{-1}$ no 43º dia do cultivo, com uma diferença de quase 100 mil células para os tratamentos A e C.

Ao fim dos 45 dias de experimento nenhum dos três tratamentos apresentou fase estacionária de crescimento e nem fase de senescência, continuando na fase

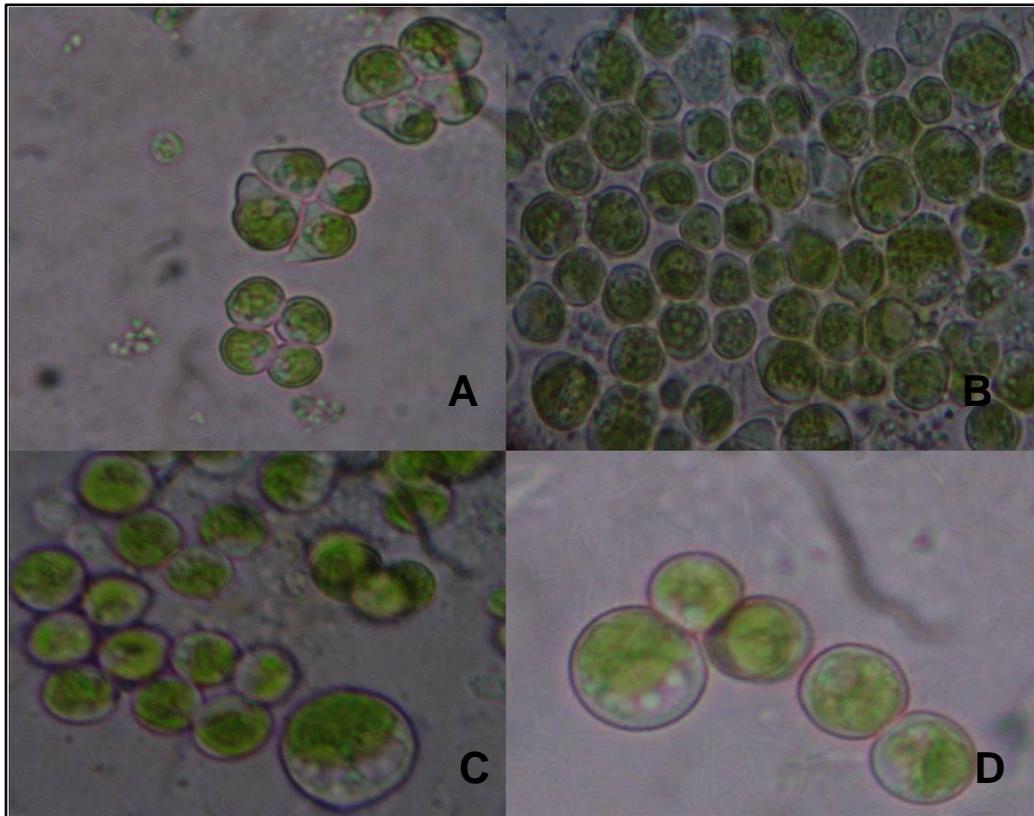
exponencial de crescimento. Embora quedas nos números de Cel.mL^{-1} no tratamento B indiquem o possível final da fase log e início da fase estacionária.

4.1.1 Aspecto das culturas

De maneira geral as culturas apresentaram-se saudáveis durante todo o experimento. A coloração observada no início dos cultivos dos três tratamentos foi um verde claro. Entre os dias 13 e 15 já se observou uma mudança na coloração para um verde mais escuro no tratamento B e um verde com um aspecto amarelado nos tratamentos A e C. Possivelmente, além do próprio crescimento celular influenciar na coloração das cepas cultivadas, essas colorações se devem ao aumento e a diminuição da produção de clorofila- α e outros pigmentos para aperfeiçoar a captação de energia vinda da luz para realização dos processos metabólicos como a fotossíntese. Uma vez que reduzindo a luminosidade os pigmentos relacionados com a fotossíntese aumentam enquanto que aumentando a intensidade luminosa os pigmentos chamados fotoprotetores aumentam sua concentração, por exemplo, zeaxantina e o β -Caroteno (HU, 2004).

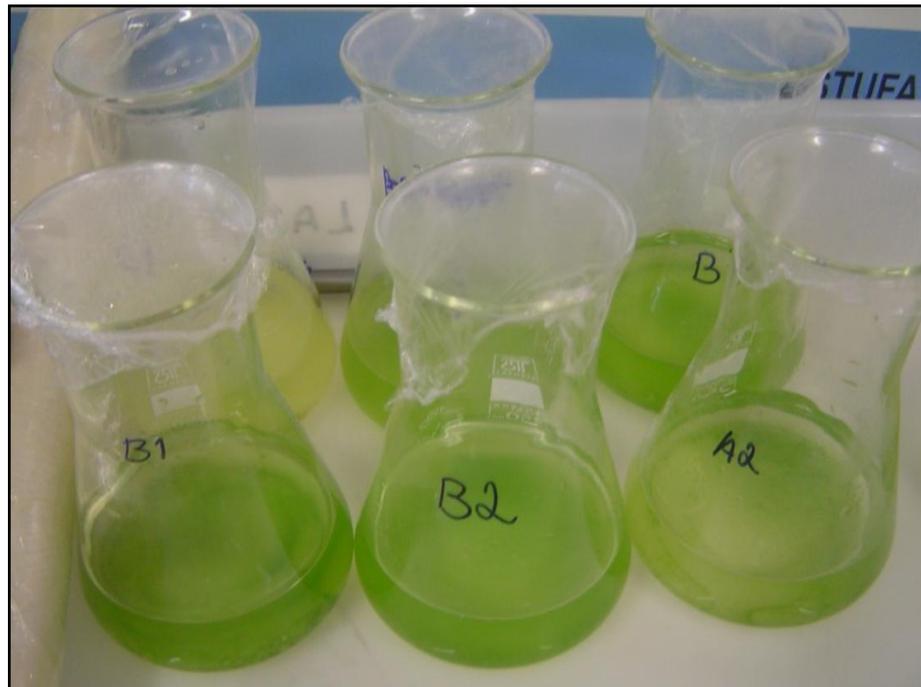
Em relação às colônias de *Tetrastrum heteracanthum* nos dias finais do experimento foi observado a perda dos espinhos, estrutura característica da espécie, e a presença de pirenóidena maioria das células. A ausência dos espinhos pode ser explicada pelo fato de que quando em cultivo, as células não tem a necessidade de vencer as propriedades físicas, como densidade e viscosidade, do meio para se manterem em suspensão na coluna d'água para a obtenção de luz como evidenciado por Esteves (2011), uma vez que em cultivo a luminosidade chega a todo o erlenmeyer. Também se notou células mais arredondadas que o normal, assim como colônias com tamanhos muito diferentes entre si. A colônia de *Tetrastrum heteracanthum* normalmente com 4 células, se apresentou na forma de grandes aglomerados e colônias com até 5 células. Algumas células apresentaram projeções na parede celular, indicando um possível estágio reprodutivo. Também foram encontradas células flageladas, indicando a possível reprodução por zoósporo, fato inédito na biologia da microalga estudada, uma vez que não existe qualquer registro a respeito (Figuras 10 e 11).

Figura 10 – Aspecto microscópico culturas, microfotografia em microscópio óptico com aumento de 1000x. A – Células em processo de divisão; b – Colônia formando aglomerados de células; c e d – células com tamanhos anormais.



Fonte: Arquivo próprio.

Figura 11 – Aspecto macroscópico da cultura, dia 45 de cultivo.

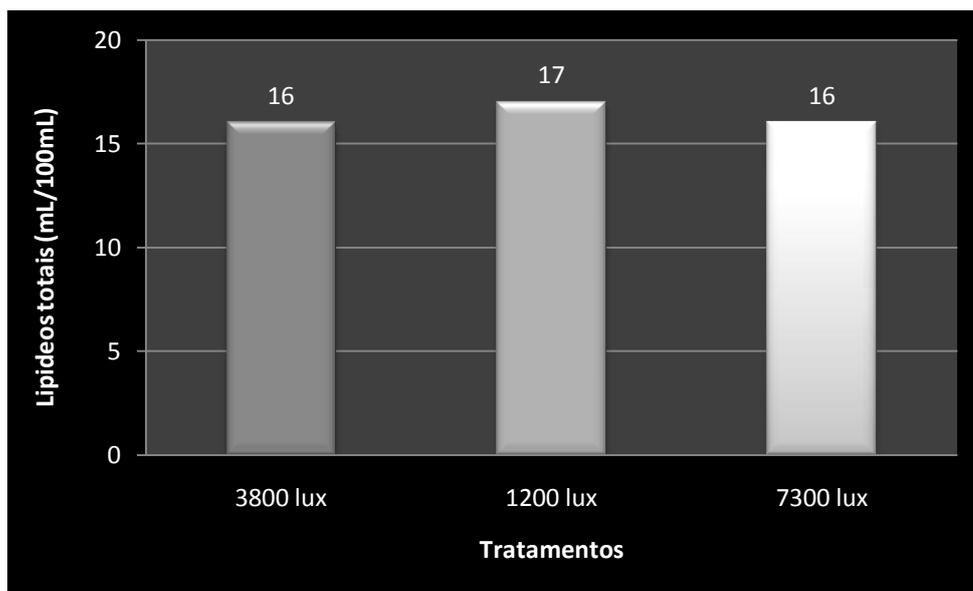


Fonte: Arquivo próprio.

4.1.2 Lipídeos totais

O Tratamento B, que recebeu iluminação a uma intensidade luminosa de 1200 lux, produziu mais lipídeos em mL/100mL que os outros que receberam iluminação mais elevada. Sendo este o equivalente a 17 mL/100mL de cultura (Figura 12).

Figura 12 - Quantidade de lipídeos totais nos diferentes tratamentos.



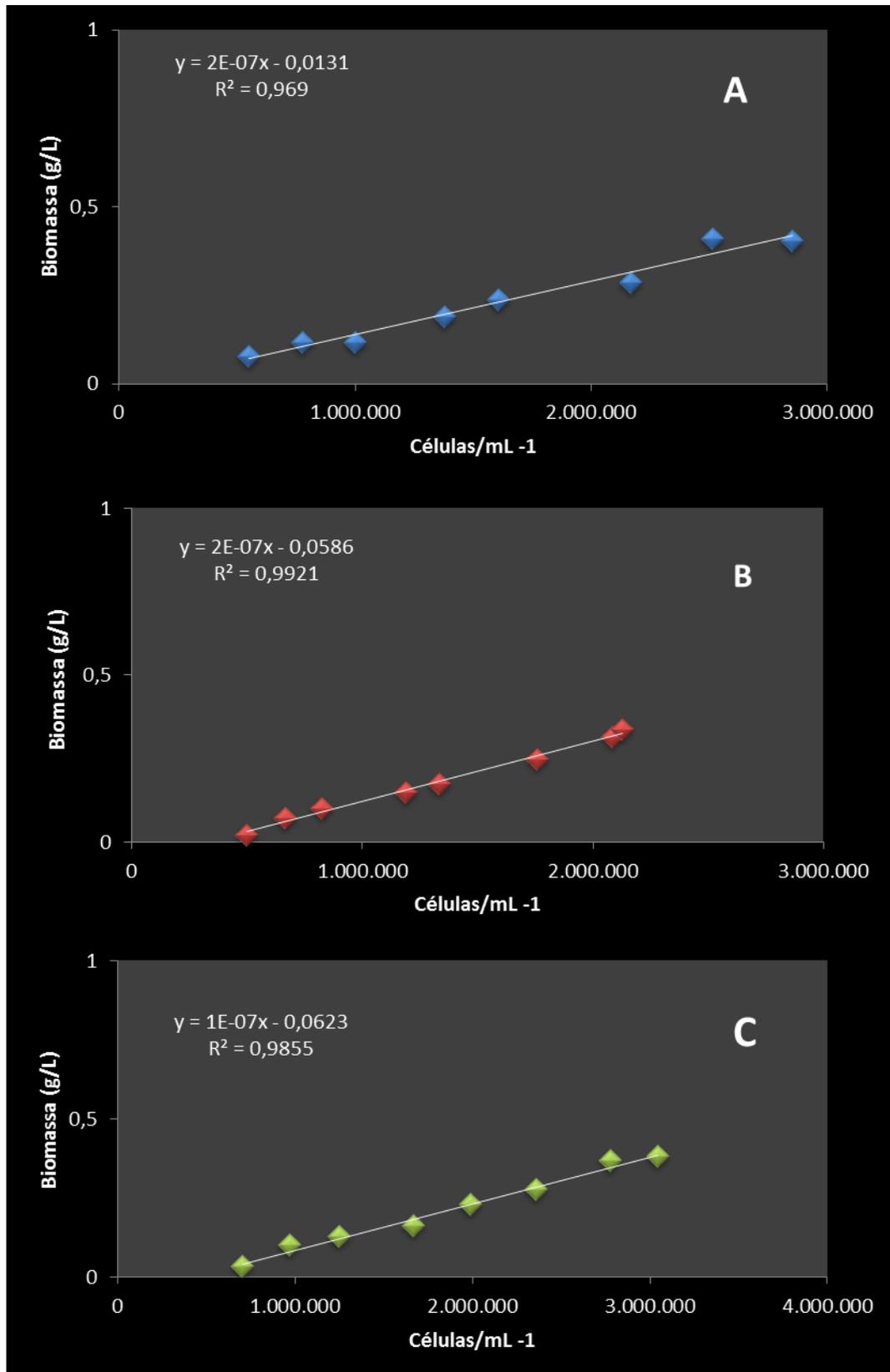
Fonte: Elaboração própria.

A maior produção de lipídeos totais ocorreu no tratamento B, que recebeu menor incidência luminosa. Porém, quando comparados estatisticamente pelo teste ANOVA os resultados não apresentaram diferença significativa.

4.1.3 Peso seco

A Figura 13 mostra a relação linear estabelecida entre o peso seco e os valores de células por mL, obtidos através do método de contagem direta, correspondentes aos dias 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 do cultivo, dias estes em que se determinou o peso seco das estirpes de *Tetrastrum heteracanthum* nos diferentes tratamentos.

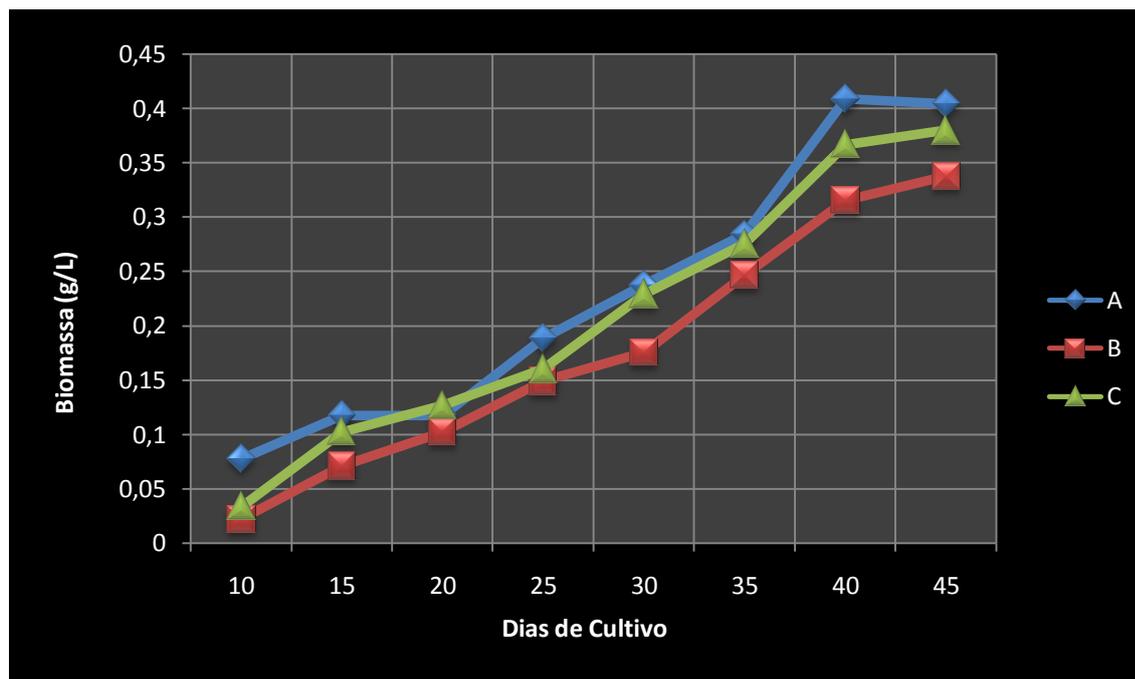
Figura 13 – Relação linear entre peso seco e Cel. mL^{-1} dos três tratamentos, A (3800 lux), B (1200 lux) e C (7300 lux).



Fonte: Elaboração própria.

Os valores de R^2 foram de 0.969, 0.9921 e 0.9855 para os tratamentos A, B e C respectivamente. Os dados obtidos mostram a linearidade entre os valores de peso seco e os valores de células/mL, uma vez que os valores de R^2 foram todos acima de 0.95, mostrando a relação de que quanto maior a quantidade de células/mL maior será o peso seco (Figura 14).

Figura 14 – Curva de crescimento baseada no peso seco por dias de cultivo.

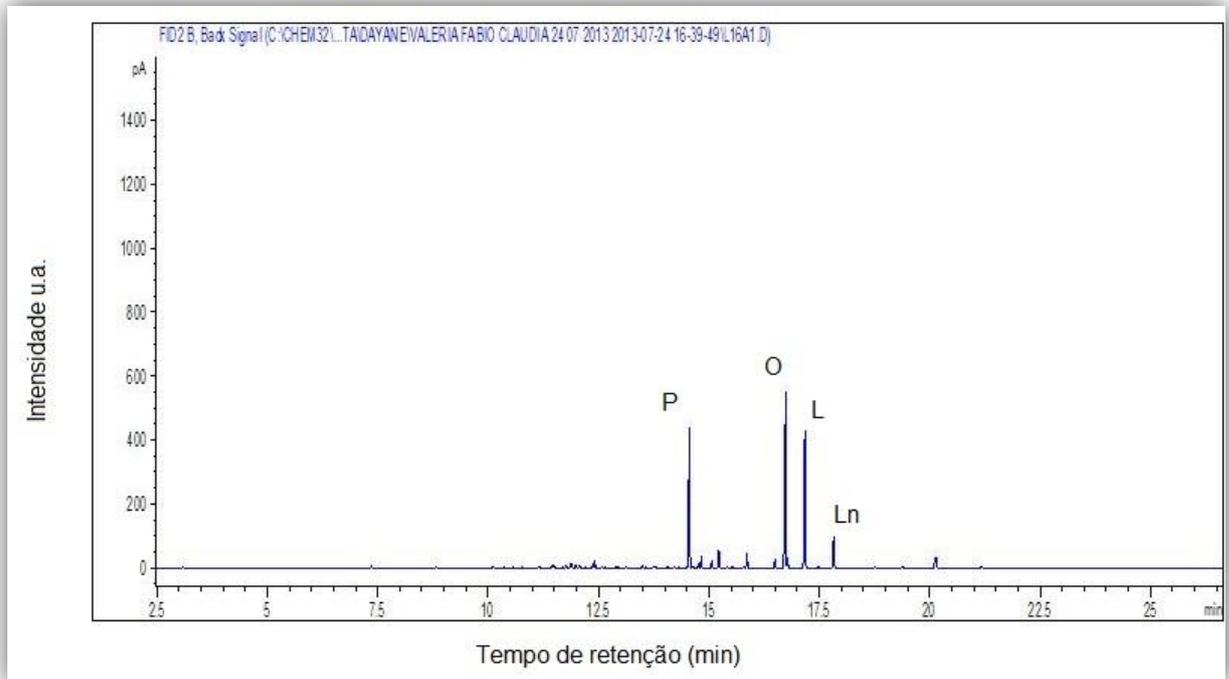


Fonte: Elaboração própria.

4.1.4 Análise do perfil de ácidos graxos

Os ésteres com maior representatividade na constituição lipídica da microalga *Tetrastrum heteracanthum* (Figura 15) são os ácidos oleico (C18:1 c9), representado pela letra O, com um teor de 33%, seguido pelo ácido linoleico (C18:2 c9,12), representado pela letra L, com seu teor chegando a 25.9%, o ácido palmítico (C16:0), o qual é representado pela letra P, também teve seu teor significativo na composição da microalga estudada, sendo de 24,6% e por fim o ácido linolênico (C18:3 c9,12,15) com teor de 6,4%, representado pelas letras Ln.

Figura 15 – Cromatograma apresentando os principais ácidos graxos constituintes da microalga *Tetrastrum heteracanthum*. Onde P, O, L e Ln representam os ácidos graxos palmítico, oleico, linoleico e linolênico, respectivamente.



Fonte: Laboratório de Métodos de Extração e Separação (2013c).

Todos os ácidos graxos que constituem a microalga estudada estão relacionados na Tabela 03.

Tabela 03 – Perfil de ácidos graxos da microalga *T. heteracanthum*.

Tempo de Retenção (min)	Símbolo	Éster Metílico do Ácido Graxo	Notação Taquigráfica	Teor (%)
12,6	M	Mirístico	C14:0	0,6
12,9	Mo	Miristoléico	C14:1	0,3
14,5	P	Palmítico	C16:0	24,6
14,7	Po	Palmitoléico	C16:1 c9	0,3
14,9		7,10-Hexadecadienóico	C16:2 c7,10	2,4
15,5		Monoinsaturado		0,4
15,8		Poliinsaturado		2,4
16,2		7,10,13-Hexadecatrienóico	C16:3 c7,10,13	0,2
16,6	S	Esteárico	C18:0	1,6
16,7	O	Oléico	C18:1 c9	33,0
16,8	V	Vacênico	C18:1 c11	1,5
17,2	L	Linoléico	C18:2 c9,12	25,9
17,4	γ-Ln	Gama-Linolênico	C18:3 c6,9,12	0,4
17,8	Ln	Linolênico	C18:3 c9,12,15	6,4

Fonte: Laboratório de Métodos de Extração e Separação (2013d).

A partir da Tabela 03, apresentada acima, pode-se conhecer a composição lipídica da microalga e o teor em porcentagem dos mesmos na constituição da microalga. Com isso foi calculado o teor total dos ácidos graxos saturados (SFA), monoinsaturados (MUFA), di-insaturados (DUFA), tri-insaturados (TUFA) e poli-insaturados (PUFA) que constituem a microalga estudada, e esses valores são apresentados na Tabela 04.

Tabela 04 - Teores totais de ácidos graxos saturados.

Microalga	Ácido Graxo	Sigla	Teor Total (%)
<i>Tetrastrum heteracanthum</i>	Saturados	SFA	26,8
	Monoinsaturados	MUFA	35,5
	Di-insaturados	DUFA	28,3
	Tri-insaturados	TUFA	7,0
	Poli-insaturados	PUFA	2,4

Fonte: Elaboração própria.

Para calcular a massa de óleo obtida pela transesterificação direta da microalga, foi necessário somar as áreas dos ésteres de cada amostra e substituir na equação apresentada no item 3.11.1 (Curva de quantificação dos ésteres) da metodologia. Esses valores foram comparados com a massa de óleo de soja obtidos pela transesterificação direta da microalga (Tabela 05).

Tabela 05 – Massa de óleo da microalga *Tetrastrum heteracanthum* em comparação com a soja.

Organismo	Somatória da Área dos Picos de Ésteres (A)	Massa correspondente a óleo de soja (X - em mg)
<i>Tetrastrum heteracanthum</i>	3180,6	34,0

Fonte: Laboratório de Métodos de Extração e Separação (2013e).

O rendimento em óleo pode ser calculado relacionando a massa de óleo obtido com a massa de biomassa pesada. Assim, têm-se na Tabela 06 os valores do percentual de óleo por grama de biomassa microalgal obtidos pela microalga *Tetrastrum heteracanthum*.

Tabela 06 - Rendimento em óleo na microalga.

Microalga	Massa biomassa pesada (mg)	Rendimento (mg de óleo/ g de biomassa)	Rendimento (%)
<i>Tetrastrum heteracanthum</i>	100,1	339,9	3,4

Fonte: Laboratório de Métodos de Extração e Separação (2013f).

A análise do perfil de ácidos graxos do óleo de soja (*Glicime max*) também foram determinados por meio da transesterificação direta e cromatografia gasosa (GC-FID), em parceria com a Universidade Federal de Goiás (UFG) pela mestrande Dayane Cristina Costa do Laboratório de Métodos de Extração e Separação – LAMES sob coordenação do professor Doutor Nelson Roberto Antoniosi Filho. Os resultados podem ser observados na Tabela 07 a seguir.

Tabela 07 - Perfil de ácidos graxos do óleo de soja.

Tempo de Retenção (min)	Símbolo	Éster Metílico do Ácido Graxo	Notação Taquigráfica	Teor (%)
9,8	P	Palmítico	C16:0	10,3
11,8	S	Estearico	C18:0	2,2
11,9	O	Oleico	C18:1 c9	17,1
12,2	L	Linoleico	C18:2 c9,12	59,7
12,8	Ln	Linolênico	C18:3 c9,12,15	10,7

Fonte: Laboratório de Métodos de Extração e Separação (2013g).

4.2 DISCUSSÃO

Os tratamentos cultivados sob intensidades luminosas mais altas, 7300 lux e 3800 lux, tratamentos C e A respectivamente, obtiveram um maior rendimento em biomassa quando comparado com o tratamento B cultivado em intensidade luminosa menor de 1200 lux.

Estudos comparando diferentes intensidades luminosas não estão disponíveis em literatura para a microalga aqui estudada (*Tetrastrum heteracanthum*). Portanto,

para discutir seus dados, os mesmos serão comparados com estudos similares realizados com outras Chlorophyceae e algas das demais Classes.

A fase de indução ao crescimento ao cultivo para os três tratamentos realizados pode ser considerada longa, cinco dias para o tratamento C e onze dias para os tratamentos A e B, quando comparada a outros trabalhos como o de Sebastien e Granja (2006), que cultivando a microalga *Scenedesmus acuminatus*, uma Chlorophyceae da família Scenedesmaceae, observaram uma fase lag de apenas 3 dias de duração. Por outro lado Arcas e Andrade (2008) cultivando *Dunaliella salina*, uma Chlorophyceae da família Dunaliellaceae, não observou fase de indução ao crescimento.

Essa fase é caracterizada por um período de adaptação das células ao novo ambiente, ao meio recém-preparado e inoculado. O aumento de biomassa é imperceptível ou acontece com poucas variações na densidade celular (LOURENÇO, 2006). Sua duração depende da idade do inóculo, das condições do novo meio, uma vez que quanto mais próximas forem as condições entre o cultivo inóculo e o novo cultivo mais adaptada estará a microalga e mais rápida será a fase de indução (LOURENÇO, 2006). Diferenças na concentração e disponibilidade dos nutrientes nos diferentes meios de cultura podem influenciar na duração da fase de indução, no presente experimento foi utilizado o meio líquido ASM1 enquanto que Sebastien e Granja (2006) utilizaram o meio CHU₁₀ em sua pesquisa.

A fase de crescimento exponencial de todos os tratamentos se manteve até o final desta pesquisa, evidenciando o crescimento lento da microalga estudada, sendo que no tratamento C ela teve início no 6º dia e nos tratamentos A e B a partir do 12º dia. Contrastando com o estudo de Sebastien e Granja (2006) onde a fase exponencial durou apenas seis dias no cultivo de *Scenedesmus acuminatus*, assim como no trabalho de Krettle (2011) para a mesma microalga. Já Arcas e Andrade (2008), no cultivo de *Dunaliella salina*, observou fase log com duração de cinco dias.

Essa fase é caracterizada por um crescimento contínuo e aumento exponencial da densidade celular. Diversos fatores podem influenciar na duração desta fase como: idade do inóculo, temperatura, luminosidade, pH do cultivo e concentração de nutrientes (LOURENÇO, 2006). Acredita-se que a idade e a densidade celular inicial do inóculo sejam os fatores determinantes que favoreceram a longa duração de

ambas as fases de crescimento registradas, uma vez que o inóculo inicial continha apenas 107.727,00 Cel.mL⁻¹.

Diversos trabalhos demonstram que o cultivo em fotoperíodo integral apresenta melhores resultados quanto ao crescimento das algas. Santose outros (2009) demonstraram que *Chlorella vulgaris* alcançou no 8º dia densidade máxima de 2500 x 10⁴ Cel.mL⁻¹ com fotoperíodo 12/12h de luz/escuro, e em 24h de luz, sem fotoperíodo, atingiu quase o quádruplo do valor (9432 x 10⁴ Cel.mL⁻¹) no nono dia. Sendo ambos cultivados a 25 °C em meio Conway modificado, diferente do presente estudo onde foi utilizado o meio ASM1. Nas mesmas condições de cultivo Vasconcelos e outros (2009) utilizando fotoperíodo integral em cultivo de *Chlorella vulgaris*, registraram densidade celular igual a 533,86 x 10⁴ Cel.mL⁻¹.

Apesar de ter sido realizado em fotoperíodo integral com 24 horas de luz, os valores de rendimento máximo obtidos no presente trabalho foram baixos quando comparados com os de outras espécies de microalgas e os trabalhos supracitados. A maior densidade celular se deu no tratamento C (7300 lux), 293,5 x 10⁴ Cel.mL⁻¹. Em comparação, Loera-Quezada, Angeles e Olgúin (2011) registraram densidade celular máxima igual a 410 x 10⁴ Cel.mL⁻¹, cultivando a Chlorophyceae *Neochloris oleoabundans* em intensidade luminosa de 136 µmol m²s⁻¹ (7344 lux) em fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro a 33 °C no meio BBM. Arcos e Andrade (2008) registraram um valor de 814 x 10⁴ Cel.mL⁻¹ para o cultivo de *Dunaliella salina* a uma intensidade luminosa de 10000 lux, temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 12 horas de luz e escuro.

Os valores obtidos para as taxas de crescimento dos tratamentos A (0.0613), B (0.0580) e C (0.0618) mostram que a microalga *T. heteracanthum* apresenta um crescimento lento que aumenta com a elevação da intensidade luminosa, porém sem muita variação a partir de 3800 lux, fator este que pode ser influenciado pelo tamanho das colônias. Bouterfas, Belkoura e Dauta (2006) trabalhando com as microalgas verdes *Selenastrum minutum*, *Coelastrum microporum*, todas da Classe Chlorophyceae, e *Cosmarium subprotumidum* pertencente a Classe Conjugatophyceae, em intensidades luminosas entre 30 e 456 µmol m² s⁻¹ (ou 1620 e 24624 lux) e fotoperíodo de 15 horas de luz e 9 horas de noite, obteve valores máximos da taxa de crescimento em 1,36 para *S. minutum*, 1,16 para *C. microporum* e 0,74 para *C. subprotumidum*. O autor atribuiu o baixo crescimento de *C.*

subprotumidum ao seu tamanho, mostrando uma relação alométrica entre a taxa de crescimento e o tamanho da célula, na qual microalgas menores, *S. minutum*, crescem mais rápido que microalgas maiores, *C. subprotumidum*. Esta relação também foi observada por Foy e Smith (1980). Isso porque as células menores assimilam mais rápido os nutrientes e incorporam o carbono de forma mais eficiente (REYNOLDS, 1984). Estudos realizados por Santos e outros (2009) com a microalga verde *Chlorella vulgaris*, com temperatura de 25 °C e intensidade luminosa de aproximadamente 3500 lux registraram taxa de crescimento de 0,81 para fotoperíodo integral e 0,55 para fotoperíodo com 12 horas de luz e escuro.

O tempo de duplicação registrado neste experimento para *Tetrastrum heteracanthum* foi igual a 11.20670078 para o tratamento C, 11.292895 no tratamento A e 11.942539 no tratamento B. O que indica que o C demora menos tempo para duplicar o número de células no cultivo, seguido por A e B, respectivamente. Os valores aqui registrados são considerados altos quando comparados aos de outras Chlorophyceae. Arcos e Andrade (2008) registraram para *Dunaliella salina* tempo de duplicação de 3,03 enquanto que Krettle (2011) observou para *Scenedesmus acuminatus* um valor de tempo de duplicação igual a 2,15.

Quevedo, Morales e Acosta (2008) cultivando *Scenedesmus* sp. em meio Estandar1, fotoperíodo de 12 horas de luz e escuro, intensidade luminosa igual a $12 \mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$ (648 lux) a 25 °C obteve valores máximos de massa seca equivalente a 0,408 g/L de cultivo. Um valor próximo foi observado no presente experimento onde ao final do 45º dia foi registrado para o tratamento C (7300 lux) um valor de massa seca de 0,404 g/L. Fatores como tamanho e peso das colônias, além da densidade celular do cultivo, influenciaram no peso final.

A temperatura a qual o experimento foi conduzido foi de 27 °C \pm 2, temperatura essa que se encontra dentro da faixa considerada ótima, 25 a 30 °C, para o crescimento de Chlorophyceae em geral (BOUTERFAS; BELKOURA; DAUTA, 2006).

A importância de se relacionar a temperatura com a intensidade luminosa está evidenciada nos trabalhos de Sorokin e Krauss (1958), que ao aumentar a temperatura do cultivo da microalga verde *Chlorella pyrenoidosa* de 25°C para 39°C observou aumento na luminosidade de saturação de 500 para 1400 footcandles

(5380 e 15064 lux, aproximadamente), o que significa que a cultura em maior temperatura se desenvolveu muito melhor em maior luminosidade.

Molejón e outros (1996) em seu experimento com a clorofícea *Tetraselmis tetraathele*, testando quatro luminosidades (2000, 3000, 4000 e 12000 lux) em quatro diferentes temperaturas (25°C, 30°C, 35°C e 40°C), demonstrou que a 40°C não houve crescimento em nenhuma luminosidade, a 35°C houve melhor crescimento nas menores intensidades luminosas 2000 e 3000 lux, e a 25°C e 30°C houve melhor crescimento em 12000 lux, atingindo, nessas condições, a maior densidade de todos os tratamentos do seu experimento, $250 \times 10^4 \text{ Cel.mL}^{-1}$.

A extração de lipídeos totais dos diferentes tratamentos mostrou que houve, apesar de não ser significativa, uma redução na quantidade de lipídeos extraídos nos tratamentos de maior intensidade luminosa, 16 mL/100mL de cultura em ambos os tratamentos 7300 lux e 3800 lux, quando comparados com o tratamento cultivado em 1200 lux com 17 mL/100mL de cultura. Este mesmo resultado, redução da concentração de lipídeos em intensidades mais altas, foi observado por Tahiri e outros (2000), que cultivando a microalga verde *Scenedesmus abundans* em três diferentes intensidades luminosas 75, 150 e 300 $\mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$ (ou 4050, 8100 e 16200 lux) a 35 °C e fotoperíodo de 15L/9E, constatou redução de 23% na concentração de lipídeos na cultura de 300 $\mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$ para a cultivada em 75 $\mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$.

Uma possível explicação pode ser dada pelo fato da luz ser um dos fatores que age diretamente na obtenção de compostos orgânicos pela microalga via processo fotossintético (ERIKSEN; GEEST; IVERSEN, 1996; JORGE et al., 1999). Com a redução da luminosidade, este fator se torna um estresse para a alga e a mesma produz uma maior quantidade de substância de reserva, no caso os lipídeos (ESTEVEZ, 2011).

O fato de não ter ocorrido fotoinibição na intensidade luminosa mais alta (7300 lux) e um baixo crescimento na menor intensidade luminosa (1200 lux), indica que a espécie é sensível a baixas luminosidades e tem seu crescimento favorecido quando em luminosidades mais elevadas, corroborando com os valores de Cel.mL^{-1} estão os dados de peso seco, onde se é possível observar uma maior biomassa nos tratamentos A e C, quando comparados com o tratamento B.

Porém não foram testados valores superiores a 7300 lux, não podendo afirmar a preferência da microalga estudada por luminosidades muito altas, por outro lado é possível afirmar que a mesma se desenvolve melhor em intensidades luminosas acima de 1200 lux. A intensidade luminosa desse experimento foi medida externamente aos erlenmeyers. A iluminação lateral acarreta maior reflexão da luz, pois o erlenmeyer gera ângulos predominantemente oblíquos de incidência em sua superfície, portanto, a luminosidade que chega à cultura é provavelmente menor do que a aferida (LOURENÇO, 2006). Outro fator importante é conhecido como auto sombreamento, ocasionado pelo aumento na densidade celular e na concentração de pigmentos fotossintetizantes tornando a luz um fator limitante ao cultivo (LOURENÇO, 2006). Este problema foi resolvido com aeração manual duas vezes ao dia.

Sorokin e Krauss (1958) demonstraram ocorrer fotoinibição em *Scenedesmus obliquus*, o ponto de saturação da luz para essa alga foi de 500 footcandles, que corresponde a aproximadamente 5382 lux, nesse ponto *S. obliquus* atingiu uma taxa de crescimento de 2,2. O crescimento caiu pela metade quando a intensidade luminosa passou para 4500 footcandles ou 48437 lux aproximadamente, quando ocorreu a fotoinibição.

No experimento de Bouterfas, Belkoura e Dauta (2006), que trabalharam com as microalgas verdes *Selenastrum minutum*, *Coelastrum microporum* e *Cosmarium subprotumidum*, uma Desmidiaceae, em intensidades luminosas entre 30 e 456 $\mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$ (ou 1620 e 24624 lux) em duas temperaturas diferentes, 25°C e 35°C e observaram fotoinibição do crescimento após uma intensidade luminosa ótima, sendo 365, 390 e 360 $\mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$ para *Selenastrum minutum*, *Coelastrum microporum* e *Cosmarium subprotumidum*, respectivamente, através do decréscimo dos valores da taxa de crescimento mais ou menos rapidamente, dependendo da temperatura.

A microalga *Tetrastrum heteracanthum* apresentou um rendimento total de ésteres metílicos de ácidos graxos de 339,9 mg de óleo por grama de biomassa (Tabela 06), obtidos por meio da transesterificação direta, o que é 73% maior do que o rendimento obtido pela transesterificação indireta do óleo de soja, com 196,9 mg de óleo por grama de biomassa. Comparando com o trabalho de Menezes e outros (2013), onde através da transesterificação direta da microalga identificada por

Choricystis sp. (A), apontada pelo autor como uma potencial fonte de extração de triglicerídeos para a produção de biodiesel, obteve-se um rendimento total em ésteres metílicos de ácidos graxos de 422,9 mg de óleo por grama de biomassa, 115% maior que o obtido pela soja e apenas 24% maior que o rendimento obtido pela microalga *Tetrastrum heteracanthum*. Entretanto, o rendimento obtido pela *Tetrastrum heteracanthum* foi maior que o apresentado pelas outras cinco microalgas estudadas por Menezes e outros (2013): *Choricystis* sp. (B) (252,2), *Monoraphidium komarkovae* (239,9), *Tetranephris brasiliensis* (230,8), *Kirchneriella lunares* (202,2) e *Kirchneriella irregulares* (198,1).

Como pode ser observada em uma comparação entre as Tabelas 03 e 07, a composição lipídica da microalga *Tetrastrum heteracanthum* é bem mais complexa e diversificada em relação à soja se levada em consideração a quantidade de ácidos graxos que a compõe, os quais variam em seu teor, o que permite uma gama de possíveis usos e aplicações comerciais. O óleo de soja é composto em sua maioria de ácidos graxos di-insaturados (59,7%), representado pelo éster metílico de ácido graxo linoleico, e monoinsaturados com 17,1% de ácido graxo oleico. Os outros ésteres metílicos que constituem o perfil lipídico da soja são o esteárico, palmítico e linolênico. Esses ácidos graxos também estão presentes na microalga *Tetrastrum heteracanthum*.

A predominância dos ácidos graxos oleico, linoleico, palmítico e linolênico na composição da Chlorophyceae *T. heteracanthum* também foi observada em outras microalgas que tiveram sua composição de ácidos graxos estudadas. Mandal e Mallick (2009) cultivaram a microalga verde *Scenedesmus obliquus* e através da cromatografia gasosa desta microalga revelou que ela é composta principalmente pelo ácido palmítico (38,8%) e pelo ácido oleico (35,4%) que juntos correspondem a quase 75% do total de FAMES, seguidos pelos ácidos linoleico e ácido linolênico com 10,8% e 15%, respectivamente. Já Menezes e outros (2013) demonstraram que a microalga *Choricystis* sp. (A), é constituída principalmente por ácidos graxos palmítico (28,1%), palmitoleico (10,2%), o qual teve baixa representatividade na microalga estudada nesta pesquisa (0,3%), e oleico (12,7%); a microalga *Choricystis* sp. (B) constituída em sua maioria pelos ácidos graxos palmítico (37,1%), oleico (5,2%), palmitoleico (4,3%) e apresentou ainda alta concentração do ácido graxo eicosapentaenoico (9,6%) EPA (C20:5 *cis5, cis8, cis11, cis14, cis17*), importante

para o sistema cardiovascular e muito utilizado pela indústria farmacêutica (MENEZES et al., 2013), o ácido graxo EPA não ocorre em *Tetrastrum heteracanthum*.

O biodiesel extraído e produzido a partir do óleo de microalgas é, provavelmente, a única fonte capaz de substituir o diesel derivado do petróleo e suprir sua demanda no ramo do transporte (CHISTI, 2007). Porém para se tornar viável o uso de biodiesel derivado de microalgas no lugar do biodiesel derivado do petróleo, o mesmo precisa cumprir algumas exigências, apesar de no Brasil não existir nenhuma legislação que determine qual deva ser a composição do biodiesel. Nos Estados Unidos da América (EUA) a norma vigente é a ASTM Biodiesel Standard D 6751e na União Europeia as normas são estabelecidas para o biodiesel destinado ao uso nos transportes (Norma EN 14214), em vigor desde 2003, e como óleo de aquecimento (Norma EN 14213) (KNOTHE, 2006a). Os ácidos graxos são avaliados principalmente com relação aos teores de ácidos insaturados. A norma EN 14214 estipula que o limite máximo aceitável para o teor de ácido linolênico (Ln), correspondente ao teor de ácidos graxos tri-insaturados (TUFA), é de 12% (mol); e é de 1% o teor máximo admitido para ácidos graxos com mais de três duplas ligações, poli-insaturados (PUFA), para as duas normativas européias. Além desses fatores, as normas EN 14214 e EN 14213 exigem que o valor de iodo do biodiesel não pode exceder 120 e 130 gramas de iodine por 100 gramas de biodiesel, respectivamente (KNOTHE, 2006a).

A composição lipídica da microalga *Tetrastrum heteracanthum*, a qual é composta majoritariamente pelos ácidos graxos palmítico (24,6%), oleico (33,0%), linoleico (25,9%) e linolênico (6,4%), se mostrou bastante promissora para utilização como possível fonte de extração de triglicerídeos para a produção de biodiesel. De acordo com os dados obtidos, e relacionados na Tabela 04, a microalga estudada é constituída em sua maioria por ácidos graxos monoinsaturados (35,5%) seguidos dos ácidos graxos di-insaturados (28,3%), ácidos graxos saturados (26,8%), ácidos graxos tri-insaturados (7,0%) e os ácidos graxos poli-insaturados com apenas 2,4%.

Desta forma, com base nestes limites estabelecidos, a microalga *Tetrastrum heteracanthum* atende as normativas da união europeia supracitadas, que

determinam um teor total de no máximo 12% para o ácido graxo com mais de três duplas ligações, representado em sua maioria pelo ácido graxo Linolênico.

Porém, a quantidade encontrada de *fatty acid methyl esters* (FAME) com quatro ou mais duplas ligações (PUFA) foi de 2,4%, acima do que é exigido por ambas as normativas vigentes na união européia, que estipulam um teor de, no máximo, 1% destes FAMEs na composição lipídica do biodiesel. Ácidos graxos com mais de quatro duplas ligações são sensíveis à auto-oxidação e, portanto não podem ser armazenados por um longo período de tempo, o que reduz sua aceitabilidade como constituinte de um biodiesel (KNOTHE, 2006c; CHISTI, 2007). A auto-oxidação dos FAMEs acontece em taxas diferentes, dependendo da quantidade de duplas ligações presentes (KNOTHE, 2006c), quanto maior sua quantidade, mais sensível à auto-oxidação se torna o éster e conseqüentemente o biodiesel. Outros fatores como alta temperatura, presença de ar, iluminação e de metais aumentam a estabilidade oxidativa do biodiesel quando armazenado por longo período de tempo (KNOTHE, 2006c; LIRA et al., 2012). Porém, a presença de ácidos graxos poli-insaturados aumenta a resistência ao congelamento do biodiesel, uma vez que estes ácidos graxos possuem um menor ponto de congelamento quando comparados aos ácidos graxos monoinsaturados e saturados, melhorando e garantindo o funcionamento do biodiesel em regiões de baixa temperatura (DUNN, 2006; VIEIRA et al., 2010; LIRA et al., 2012), propriedade essa conhecida como ponto de fluidez.

A redução do teor total de PUFA para menos de 1% e o aumento do teor total de ácidos graxos pode ser realizada, por exemplo, por meio de pesquisas que estudem o perfil lipídico da microalga em diferentes concentrações de nitrogênio, ou outros constituintes importantes dos meios de cultura como a fonte de carbono inorgânico. No trabalho de Moraes e Costa (2008) no qual foi estudado o conteúdo lipídico e o perfil dos ácidos graxos das Chlorophyceae: *Scenedesmus obliquus*, *Chlorella kesslerie* *Chlorella vulgaris* e da Cyanophyceae *Spirulina* sp., quando cultivadas em diferentes concentrações de dióxido de carbono e de bicarbonato de sódio em intensidade luminosa de 3200 lux, temperatura de 30°C e fotoperíodo de 12 horas de luz e escuro durante 20 dias. Foi possível observar que com a redução das concentrações de dióxido de carbono e a adição de bicarbonato de sódio as concentrações de PUFA diminuía. A cianobactéria filamentosa *Spirulina* sp., quando cultivada em 0,038% de CO₂ sem adição de bicarbonato de sódio tinha seu

teor de PUFA em 8,9% e já quando cultivada em 0,038% de CO₂ e 16,8% de NaHCO₃ seus teores de PUFA reduziram para 0%. A microalga verde *Scenedesmus obliquus* também apresentou menores teores de PUFA quando cultivada em menores concentrações de dióxido de carbono, enquanto que as demais microalgas estudadas tiveram seu menor teor de PUFA registrado quando cultivadas em concentrações de dióxido de carbono iguais a 12%.

A viscosidade, medida de resistência de um líquido ao fluxo, é outra propriedade física importante dos combustíveis a base de petróleo, assim como para o diesel a base de biomassa, pois está diretamente relacionado com a formação de depósitos no motor, e o aumento da viscosidade potencializa tais formações diminuindo a vida útil destes equipamentos (KNOTHE, 2006d). A viscosidade cresce com o aumento do comprimento da cadeia carbônica e reduz com a presença de duplas ligações (KNOTHE, 2006d; VIEIRA et al., 2010).

A presença dos ácidos graxos palmítico e oleico em grandes concentrações na constituição lipídica da microalga *Tetrastrum heteracanthum* contribuem para o aumento da viscosidade (MENEZES et al., 2013), pois estes são ácidos graxos saturado e monoinsaturado de cadeias consideradas de média a longa com 16 e 18 carbonos, respectivamente, um fator negativo visto que o aumento da viscosidade do diesel prejudica o funcionamento do motor de injeção por compressão (PARENTE, 2003), através de complicações como entupimento e deposição de partículas no motor, diminuindo, dessa forma, o desempenho e vida útil do mesmo (PONTES et al., 2010). A microalga estudada apresenta ainda em sua composição os ácidos graxos monoinsaturados Esteárico e Mirístico, e os monoinsaturados Miristoleico, Palmitleico e Vacênico em baixas concentrações.

Por outro lado, diferente do estudo realizado por Menezes e outros (2013), no qual os autores determinaram o perfil de ácidos graxos de seis microalgas dulcícolas, dentre elas a microalga *Choricystis* sp. (A) que apresentou grandes concentrações dos ácidos graxos monoinsaturados oleico e palmitleico e baixa concentração de di, tri e poli-insaturados favorecendo o aumento da viscosidade, no presente estudo a microalga *Tetrastrum heteracanthum* também apresentou boas concentrações de ácidos graxos di, tri e poli-insaturados, constituindo juntos 37,7% do teor lipídico da microalga, possivelmente diminuindo a viscosidade do biodiesel obtido através desta

espécie. Fatores externos como a diminuição da temperatura também contribui para o aumento da viscosidade (KNOTHE, 2006d).

Outra propriedade relevante para se determinar a qualidade do biodiesel produzido é o índice de cetano. Este índice determina a qualidade da queima do biodiesel associado com a velocidade de ignição, quanto maior o índice melhor é a combustão do biodiesel, o funcionamento do motor e menor é seu grau de poluição (PARENTE, 2003; KNOTHE, 2006b; MENEZES et al., 2013). O fato da espécie estudada na presente pesquisa ter em sua composição 26,8% de ácidos graxos saturados aumentou o índice de cetano do biodiesel produzido. Uma vez que este índice é diretamente influenciado pela presença de ácidos graxos saturados de cadeia longa (KNOTHE, 2006b).

Tabela 08 – Comparação entre Teores totais de ácidos graxos entre a Chlorophyceae *Tetrastrum heteracanthum* e outras sete espécies.

Microalgas	SFA (%)	MUFA (%)	DUFA (%)	TUFA (%)	PUFA (%)	REFERÊNCIA
<i>Tetrastrum heteracanthum</i>	26,8	35,5	28,3	7,0	2,4	Presente estudo
<i>Scenedesmus obliquus</i>	38,8	35,4	10,8	15,0	--	Mandal e Mallick (2007)
<i>Choricystis sp. (A)</i>	44,7	39,0	8,1	3,9	4,3	Menezes e outros (2013)
<i>Choricystis sp. (B)</i>	62,1	22,7	2,4	3,2	9,6	Menezes e outros (2013)
<i>Kirchneriella irregulares</i>	53,9	41,3	2,9	0,6	1,3	Menezes e outros (2013)
<i>Chlorella minutíssima</i>	38,0	26,3	7,5	24,1	1,9	Campos, Barbarino e Lourenço (2010)
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	41,8	22,0	17,1	16,7	9,7	Campos, Barbarino e Lourenço (2010)
<i>Tetraselmis gracilis</i>	37,3	15,6	4,4	14,7	22,95	Campos, Barbarino e Lourenço (2010)

Fonte: Elaboração própria.

Quando comparada com demais microalgas testadas como potenciais fontes de biodiesel, a microalga *Tetrastrum heteracanthum* foi a que apresentou menor teor de ácidos graxos monoinsaturados, tais dados - utilizando como base os trabalhos de

Menezes e outros (2013) nos quais foram analisadas a composição lipídica de seis microalgas dulciaquícolas, o trabalho de Mandal e Mallick (2007), que determinaram o perfil lipídico da microalga *Scenedesmus obliquus*, e o trabalho de Campos, Barbarino e Lourenço (2010) que identificaram o perfil dos ácidos graxos de dez espécies potenciais microalgas marinhas - foram compilados e podem ser visualizados na Tabela 08.

Conforme evidenciado todas as microalgas, relacionadas na Tabela 08, estão com seus valores de PUFA acima do valor determinado pela norma da união europeia de 1%. A microalga *Tetrastrum heteracanthum* apresenta menor teor total de ácidos graxos com mais de quatro duplas ligações (2,4%) em relação à microalga *Choricystis* sp. (A) que, apesar de ser considerada potencial para a produção de biodiesel, tem seu teor de PUFA de 4,3%, ambos acima do teor considerado ideal. Tal composição não se torna uma limitação significativa, uma vez que o teor lipídico da microalga pode ser moldado alterando-se as condições do cultivo através de testes preliminares (CHISTI, 2007). Outra forma de se resolver esta questão é através da hidrogenação catalítica parcial do óleo, processo que reduz facilmente o teor de insaturações e de ácidos gordos com mais de quatro duplas ligações do biodiesel (JANG; JUNG; MIN, 2005).

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com este experimento provou-se que *Tetrastrum heteracanthum* cresce melhor em intensidades luminosas mais altas. Em relação ao aumento de biomassa da microalga estudada em maiores intensidades luminosas a hipótese foi aceita.

Com isso conclui-se que a melhor intensidade luminosa para incremento de biomassa em menor período de tempo para *Tetrastrum heteracanthum* é a de 3800 lux visando à economia de energia, uma vez que as taxas calculadas não apresentaram variação significativa com o tratamento de maior luminosidade, 7300 lux.

A microalga *Tetrastrum heteracanthum* se mostrou uma boa produtora de lipídeos, chegando a um máximo de 17 mL/100mL de cultivo na intensidade luminosa de 1200 lux (tratamento B).

Conclui-se também, com a caracterização do perfil dos ácidos graxos da microalga *Tetrastrum heteracanthum*, que esta microalga é uma potencial fonte de extração de triglicerídeos para a produção de biocombustíveis, pois possui um perfil de ácidos graxos adequado. Porém de acordo com a norma EN14214, os valores de ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) devem ser reduzidos abaixo de 1%, tais reduções podem ser feitas modificando as condições nas quais a microalga foi cultivada, como por exemplo, a redução de CO₂.

Com relação ao aumento na produção de lipídeos, a hipótese foi rejeitada, pois quando comparados os valores obtidos entre os diferentes tratamentos os mesmos não tiveram diferença significativa. Logo, a utilização do aumento da intensidade luminosa para amplificar a produtividade lipídica desta microalga não é efetiva, porém, como pode ser notado, a diminuição da radiação causou um aumento, mesmo que não significativo, do teor de lipídeos totais.

Dessa maneira, o estudo de microalgas em cultivo é uma importante ferramenta para se conhecer a biologia das espécies e no estado do Espírito Santo mais estudos precisam ser realizados, testando outras variáveis, a relação entre diferentes variáveis e com novas espécies. Assim como novos testes devem ser realizados a fim de aperfeiçoar a produção e o perfil de ácidos graxos da microalga *Tetrastrum heteracanthum*.

REFERÊNCIAS

- AHLSTROM, E. H.; TIFFANY, L. H. The algal genus *Tetrastrum*. **American Journal of Botany** 21: 499-507, 1934.
- ARCAS, A. P.; ANDRADE, C. G. Influencia de La intensidad luminosa sobre El crecimiento de dos cepas de *Dunaliella salina* isoladas de salinas venezolanas. **Tecnociência**, Cumaná, v.10, n. 1, p.73-84, 2008.
- AZEREDO, V. B. S. **Produção de biodiesel a partir do cultivo de microalgas: estimativa de custos e perspectivas para o brasil**. 2012. 171 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.
- BECKER, W. Microalgae in human and animal nutrition. In: Richmond, A. (Ed). **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycolgy**. London: Blackwell Science, 566p. 2004.
- BERTOLDI, F. C.; SANT'ANNA, E.; OLIVEIRA, J. L. B. Teor de clorofila e perfil de sais minerais de *Chlorella vulgaris* cultivada em solução hidropônica residual. **Ciência Rural**, v.38, n.1, 2008.
- BICUDO, C.E.M.; MENEZES, M. **Gêneros de algas de águas continentais do brasil**: Chave para identificação e descrições. 2. ed. São Carlos: Rima, 2006.
- BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Can. J. Biochem. Physiol.**, 37:911-917, 1959.
- BOLD, H. C.; WYNNE, M. J. **Introduction to the algae: Structure and reproduction**, Ed. Prentice-Hall, 720p., 1985.
- BOUTERFAS, R.; BELKOURA, M.; DAUTA, A. The effects of irradiance and photoperiod on the growth rate of three freshwater green algae isolated from a eutrophic lake. **Limnetica**, Espanha, v. 25, n. 3, p. 647-656, 2006.
- BRASIL, MINISTÈRIO DA CIENCIA E TECNOLOGIA. **Plano Nacional de Agroenergia**. 4. ed. Brasilia, 114p. 2006.
- BRASIL, MINISTÈRIO DE MINAS E ENERGIA. **Programa Nacional de Produção e uso do Biodiesel**. Disponível em: <<http://www.mme.gov.br/programas/biodiesel/-menu/biodiesel/pnpb.html>>. Acesso em: 30 de maio 2013.
- CAMACHO, R. F.; GARCÍA, C. F.; FERNÁNDEZ S. J. M.; CHISTI, Y.; MOLINA, G. E. A mechanistic model of photosynthesis in microalgae. **Biotechnol. Bioeng.**, 81:459–73. 2003.
- CAMPOS, V. B.; BARBARINO, E.; LOURENÇO, S. de O. Crescimento e composição química de dez espécies de microalgas marinhas em cultivos estanques. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 2, p.339-347, 01 fev. 2010.

- CAROLINO, L. R. V. **Cultivo de microalgas unicelulares para determinação da produção lipídica e sequestro de carbono**. 2011. 91 f. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Biologia Vegetal, Universidade de Lisboa, Lisboa, 2011.
- CHIARANDA, M.; ANDRADE J.; MARTINS, A.; OLIVEIRA, G. T. **A produção do biodiesel e aspectos do PNPB**. São Paulo: USP; ESALQ, 2005.
- CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, Palmerston North, v. 25, p.294-307, fev. 2007.
- DEMIRBAS, A. **Progress and recent trends in biodiesel fuels**. Elsevier, Trabzon, p.14-34, jan. 2009.
- DERNER, R. B.; OHSE, S.; VILLELA, M. Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 6, p.1959-1967, 2006.
- DUNN, R. O. Cold Weather Properties and Performance of Biodiesel. In: KNOTHE, Gerhard; GERPEN, Jon Van; KRAHL, Jürgen. **The Biodiesel Handbook**. Champaign, Illinois: Aocs Press, 2006. p. 91-129.
- ERIKSEN, N.T.; GEEST, T.; IVERSEN, J. J. L., Phototrophic growth in the Lumostat: a photo-bioreactor with on-line optimization of light intensity. **ApplPhycol**, v. 8, p. 345-352, 1996.
- ESTEVES, F.A., **Fundamentos em Limnologia**. Rio de Janeiro: Interciência, 545p. 1998.
- ESTEVES, F. de A. **Fundamento de limnologia**. 2ª Edição. Rio de Janeiro: Interciência, 791 p. 2011.
- FERRARI, R.A.; OLIVEIRA, V.S.; SCABIO, A. Biodiesel de soja – taxa de conversão em ésteres etílicos, caracterização físicoquímica e consumo em gerador de energia. **Química Nova**, Ponta Grossa, v. 28, n. 1, p.19-23, 23 nov. 2005.
- FOGG, G.E.; THAKE, B. **Algae Cultures and Phytoplankton Ecology**. 3.ed. London: University of Wisconsin Press, p. 269, 1987.
- FOTT, B. **Algenkunde**. 2 ed. Hufthgar: Gustav Fischer Verlag. 581p. 1971.
- FOY, R. H.; SMITH, R. Y. The role of carbohydrate accumulation in the growth of planktonic *Oscillatoria* species. **British Phycological Journal**, London, p.139-150, 2 jun. 1980.
- GODINHO, L.R.; GONZÁLEZ, A.A.C.; BICUDO, C.E.M. Criptógamos do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, SP. Algas, 30: Chlorophyceae (Família Scenedesmaceae). **Hoehnea**, São Paulo, p.513-533, 05 ago. 2010.
- GONÇALVES, M. A. B.; NOGUEIRA, R. G. O efeito estufa pode ser reduzido com a produção e a utilização do biodiesel? **Processos Químicos**, Goiânia, v.1, n. 2, p.51-59, jul./dez. 2007.

- GORHAM, P. R.; MCLACHLAN, R. W.; HAMMER, U. T. **Isolation** and culture of toxic strains of *Anabaena flos-aquae* Breb. **Int. Ver. Theor. Angew. Limnol. Verh.**, v. 19, p. 796–804, 1964.
- GUILLARD, R.R.L.; MORTON, S.L. **Culture Methods**. In: Manual on Harmful Marine Microalgae. UNESCO, Paris, p. 77-97, 2003.
- HINO, K. **Análise qualitativa e quantitativa do microfitoplâncton da Represa do Lobo (Broa), São Carlos/SP**. Tese de mestrado apresentado ao DCB/UFSCar, São Carlos, SP. 119p. 1979.
- HIRAYAMA, S.; UEDA, R.; SUGATA, K. Evaluation of active oxygen effect on photosynthesis of *Chlorella vulgaris*. **Free Radical Research**, v.25, n.3, p.247-257, 1996.
- HU, Q. Industrial production of microalgal cell-mass and secondary products major industrial species: *Arthrospira (Spirulina) platensis*. In: RICHMOND, A. (Ed). **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. Oxford: Blackwell Science, p.264-272, 2004.
- HUTCHINSON, G. E. **A Treatise on Limnology: Introduction to lake biology and their limnoplankton**. New York: John Wiley & Sons, 1967. 2 v.
- JANG, E. S.; JUNG, M.Y.; MIN, D. B. Hydrogenation for Low Trans and High Conjugated Fatty Acids. **Comprehensive Reviews In Food Science And Food Safety**, Ohio, v. 1, p.22-30, 2005.
- JORGE, R.R; MORIOKA, L.R.; RIBEIRO, M. L. L.; PINOTTI, M. H. P. Cultivo de *Nostoc* sp em diferentes luminosidades para produção de biomassa e ficobiliproteínas. **Semina: Ci Biol. Saúde**, Londrina, v. 20/21, n. 2, p. 67-71, 1999.
- KNOTHE, G. Analytical Methods for Biodiesel. In: KNOTHE, Gerhard; GERPEN, Jon Van; KRAHL, Jürgen. **The Biodiesel Handbook**. Champaign, Illinois: Aocs Press, 2006a. p. 70-83.
- KNOTHE, G. Fuel Properties: Cetane Numbers–Heat of Combustion–Why Vegetable Oils and Their Derivatives Are Suitable as a Diesel Fuel. In: KNOTHE, Gerhard; GERPEN, Jon Van; KRAHL, Jürgen. **The Biodiesel Handbook**. Champaign, Illinois: Aocs Press, 2006b. p. 84-88.
- KNOTHE, G. Fuel Properties: Oxidative Stability of Biodiesel. In: KNOTHE, Gerhard; GERPEN, Jon Van; KRAHL, Jürgen. **The Biodiesel Handbook**. Champaign, Illinois: Aocs Press, 2006c. p. 130-134.
- KNOTHE, G. Fuel Properties: Viscosity of Biodiesel. In: KNOTHE, Gerhard; GERPEN, Jon Van; KRAHL, Jürgen. **The Biodiesel Handbook**. Champaign, Illinois: Aocs Press, 2006d. p. 89-90.

KOWALSKI, S. C. **Análise da viabilidade técnica econômica do cultivo de microalgas para produção de biodiesel estudo de caso paranaguá – estado do paraná.** 2010. 93 f. Dissertação (Mestrado em desenvolvimento de tecnologias) - Instituto De Engenharia Do Paraná, Curitiba, 2010.

KRETTLE, R. **Avaliação dos efeitos de diferentes intensidades luminosas no crescimento de *Scenedesmus acuminatus* (Lagerheim) Chodat var. *acuminatus*.** 2011. 41 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas) – Departamento de Ciências Biológicas do Centro de Ciências Humanas e Naturais, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2011.

LABORATÓRIO DE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO E SEPARAÇÃO. **Análise dos teores de ésteres e do perfil de ácidos graxos em microalgas da UFES.** Goiânia: UFG, 2013a.

LABORATÓRIO DE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO E SEPARAÇÃO. **Curva de quantificação para ésteres metílicos de ácidos graxos do óleo de soja.** Goiania: UFG, 2013b.

LABORATÓRIO DE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO E SEPARAÇÃO. **Cromatograma apresentando os principais ácidos graxos constituintes da microalga *Tetrastrum heteracanthum*. Onde P, O, L e Ln representam os ácidos graxos palmítico, oleico, linoleico e linolênico, respectivamente.** Goiânia: UFG, 2013c.

LABORATÓRIO DE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO E SEPARAÇÃO. **Perfil de ácidos graxos da microalga *T. heteracanthum*.** Goiânia: UFG, 2013d.

LABORATÓRIO DE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO E SEPARAÇÃO. **Massa de óleo da microalga *Tetrastrum heteracanthum* em comparação com a soja.** Goiânia: UFG, 2013e.

LABORATÓRIO DE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO E SEPARAÇÃO. **Rendimento em óleo na microalga.** Goiânia: UFG, 2013f.

LABORATÓRIO DE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO E SEPARAÇÃO. **Perfil de ácidos graxos do óleo de soja.** Goiânia: UFG, 2013g.

LIRA, R. de A.; MARTINS, M. A.; MACHADO, M. F.; CORRÊDO, L. de P.; MATOS, A. T. As microalgas como alternativa à produção de biocombustíveis. **Reveng**, Viçosa, v. 20, n. 5, p.389-403, 27 ago. 2012.

LOERA-QUEZADA, M. M.; ANGELES, G.; OLGUÍN, E. J. Effect of irradiance on the cell density, size and lipid accumulation of *Neochloris oleoabundans*. **Rer. Latinoam. Biotecnol. Amb. Algal**, Veracruz, p.81-92, 2011.

LOURENÇO, S. O. **Cultivo de Microalgas Marinhas: Princípios e aplicações.** São Carlos: RiMa, 2006.

MA, F.; HANNA, M. A. Biodiesel production: a review. **Bioresource Technology**, v.70, n.1, p.1-15, 1999.

MANDAL, S.; MALLICK, N. Microalga *Scenedesmus obliquus* as a potential source for biodiesel production. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, West Bengal, p.281-291, 2009.

MENEZES, R. S.; LELES, M. I. G.; SOARES, A. T.; FRANCO, P. I. B. M.; ANTONIOSSI-FILHO, N. R.; SANT'ANNA, C. L.; VIEIRA, A. A. H. Avaliação da potencialidade de microalgas dulcícolas como fonte de matéria-prima graxa para a produção de biodiesel. **Química Nova**, Goiania, v. 36, n. 1, p.10-15, 2013.

MOLEJÓN, O. G. H.; ÁLVAREZ-LAJONCHÈRE, L.; GONZÁLES, A. C.; ALMEIDA, V. M. Efectos de la temperatura y la iluminación sobre el crecimiento de dos microalgas: *Nannochloropsis gaditana* Lubiam 1982 y *Tetraselmia tetraathele* (West) Butchu, 1959. **Hidrobiológica**, Cienfuegos, v. 2, n. 1, p.43-47, jun. 1996.

MONTEIRO, R. T. T. **Análise de Ciclo de Vida do Biodiesel – Aplicação à Realidade Nacional**. 2009. 157 f. Dissertação (Mestrado em engenharia mecânica) - Departamento de Engenharia Mecânica, Universidade de Aveiro, Aveiro, 2009.

MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. Perfil de ácidos graxos de microalgas cultivadas com dióxido de carbono. **Ciênc. Agrotec.**, Lavras, v. 32, n. 4, p. 1245-1251, jul./ago., 2008.

OHSE, S.; DERNER, R. B.; OZÓRIO, R. A.; BRAGA, M. V. C.; CUNHA, P.; LAMARCA, C. P.; SANTOS, M. E. Crescimento de microalgas em sistema autotrófico estacionário. **Biotemas**, v. 21, n. 2, p. 7-18, 2007.

OLAIZOLA, M.; DUERR, E. O. Effects of light intensity and quality on the growth rate and photosynthetic pigment content of *Spirulina platensis*. **Journal of Applied Phycology**, v.2, n.2, p.97-104, 1990.

OLIVEIRA, L. B.; FERNANDES, V. O. Diagnóstico limnológico em uma lagoa costeira tropical (lagoa Juara, Serra/ES, Brasil). **Acta Limnológica Brasiliensia**. (em prep.). 2011.

OLIVEIRA, O. S. B. C. **Optimização da produtividade lipídica da microalga *Arthrospira platensis* como matéria-prima para biocombustíveis**. 2009. 96 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Nova De Lisboa, Lisboa, 2009.

OSAKI, M.; BATALHA, M. O. Produção de biodiesel e óleo vegetal no Brasil: realidade e desafio. **Organizações Rurais & Agroindustriais**, Lavras, v. 13, n. 2, p.227-242, 2011.

PARENTE, E. J. de S. **Biodiesel: uma aventura tecnológica num país engraçado**. Fortaleza: Tecbio, 2003. 68 p.

PAULILLO, L. C. M. S.; JATOBÁ, F. H. P.; CECHINEL, C. A. Biodiesel: Eficiência energética e impacto ambiental. **Diálogos & Ciência –Revista da Rede de Ensino FTC**. Ano III. n. 11. 2009.

PONTES, A. S. G. C.; SANTOS, I. M. G.; FILHO, J. R. C.; SOUSA, A. G. Influência da temperatura nas propriedades das blends diesel/biodiesel de óleo de peixe. In: IV Congresso brasileiro de mamona e I simpósio internacional de oleaginosas energéticas, 4, 2010, João Pessoa, Paraíba. **Inclusão Social e Energia: Anais**. João Pessoa, Paraíba: Embrapa Algodão, 2010. p. 122-127.

QUEVEDO, C.; MORALES, S.P.; ACOSTA, A. Crecimiento de *Scenedesmus* sp en diferentes medios de cultivo para la producción de proteína microalgal. **Revista De La Facultad De Química Farmacéutica**, Medellín, v. 1, n. 15, p.25-31, 04 mar. 2008.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia vegetal**. 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 830 p. 2007.

REYNOLDS, C.S. **The ecology of freshwater phytoplankton**. Cambridge University Press, London: 384 p., 1984.

REYNOLDS, C.S. **The ecology of phytoplankton**. Cambridge: Cambridge University Press.535p. 2006

RICHMOND, A. **Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology**. Oxford: Blackwell Science, 2004.

RICHMOND, A. Microalga biotechnology at the turn of the millennium: a personal view. **Applied Phycology**., 12: p.441-451, 2000.

SANTOS, L. B. G.; CALAZANS, N. K. F.; MARINHO, Y. F. M.; SANTOS, A. P. F.; NASCIMENTO, R. D. M.; VASCONCELOS, R. F. L.; DANTAS, D. M. M.; GÁLVEZ, A. O. Influência do fotoperíodo no crescimento da *Chlorella vulgaris* (Chlorophyceae) visando produção de biodiesel. In: IX JORNADA DE ENSINO PESQUISA E EXTENSÃO, 2009, Recife. **Anais da IX Jornada de Ensino Pesquisa e Extensão**. Recife: UFRPE, 2009.

SEBASTIEN, N. Y.; GRANJA, R. P. Cultivo de *Scenedesmus*: alimento vivo para a manutenção de organismos planctônicos e implementação na dieta humana. **Revista Varia Scientia**, v. 05, n. 10, p. 113-121, 2006.

SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS. **Cartilha Biodiesel**. Disponível em:

<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/NT00035116_000gihb7tn102wx5ok05vadr1szzvy3n.pdf>. Acesso em: 20 de abril de 2013.

SILVA, L. L. F. **Iluminação pública no Brasil: aspectos energéticos e institucionais**. 2006. 161 f. Dissertação (Mestrado em planejamento energético) - Universidade Federal Do Rio De Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

SOROKIN, C.; KRAUSS, R. W. The effects of light intensity on the growth rates of green algae. **Plantphysiology**, v. 33, p.109-113, 1958.

TAHIRI, M.; BENIDER, A.; BELKOURA, M.; DAUTA, A. Caractérisation biochimique de l'algue verte *Scenedesmus abundans*: influence des conditions de culture. **Annales de Limnologie - International Journal Of Limnology**, França, p. 3-12, jan. 2000.

TEIXEIRA, C.M.; MORALES, M. E. Microalga como matéria-prima para a produção de biodiesel. In: I Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel, 2006, Brasília. **Anais do I Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel**, Brasília, DF: MCT/ABIPTI, p.91-96, 2006.

VASCONCELOS, R. F. L.; SANTOS, A. P. F.; MARINHO, Y. F. M.; SANTOS, L. B. G.; CALAZANS, N. K. F.; NASCIMENTO, R. D. M.; DANTAS, D. M. M.; COSTA, W. M.; GÁLVEZ, A. O. Avaliação do crescimento de três microalgas: *Isochrysis galbana*, *Chaetoceros calcitrans* e *Chlorella vulgaris*, visando à utilização como biocombustíveis. In: IX Jornada de Ensino Pesquisa e Extensão, 2009, RECIFE. **Anais da IX Jornada de Ensino Pesquisa e Extensão**. Recife: UFRPE, 2009.

VIDOTTI, E. C.; ROLLEMBERG, M. C. E. Algas: da economia nos ambientes aquáticos à bioremediação e à química analítica. **Química Nova**, Maringá, v. 27, n. 1, p.139-145, 01 jan. 2004.

VIEIRA, A. C.; VASCONCELOS, V. M.; SILVA, P. C. G. da; OLIVEIRA, R. da P. S.; SILVA, G. F. da. Winterização do óleo de soja associado à degomagem para produção de biodiesel. In: Congresso brasileiro de mamona e I simpósio internacional de oleaginosas energéticas, 4, 2010, João Pessoa, Paraíba. **Inclusão Social e Energia: Anais**. João Pessoa, Paraíba: Embrapa Algodão, 2010. p. 1933 - 1938.