

FACULDADE CATÓLICA SALESIANA DO ESPÍRITO SANTO

PÂMELA FERREIRA MIRANDA

**EFEITO DE DIFERENTES MEIOS DE CULTURA PARA O CRESCIMENTO DE
Tetragastrum heteracanthum (NORDSTEDT) CHODAT 1895 COMO BASE PARA A
PRODUÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEIS**

VITÓRIA - ES

2013

PÂMELA FERREIRA MIRANDA

**EFEITO DE DIFERENTES MEIOS DE CULTURA PARA O CRESCIMENTO DE
Tetrastrum heteracanthum (NORDSTEDT) CHODAT 1895 COMO BASE PARA A
PRODUÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEIS**

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

PÂMELA FERREIRA MIRANDA

**EFEITO DE DIFERENTES MEIOS DE CULTURA PARA O CRESCIMENTO DE
Tetrastrum heteracanthum (NORDSTEDT) CHODAT 1895 COMO BASE PARA A
PRODUÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEIS**

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. Msc. Marcus Andrade Covre FCSES

Prof^a. Msc. Thaís de Almeida Pereira, UFES

Dedico este trabalho ao meu pai, que tanto confiou em mim;
a minha mãe, irmã e namorado Renato pela confiança e pelas palavras de estímulo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me dado força nesta rica jornada durante esses quatro anos de felicidade e desespero e por me guiar na construção da minha carreira profissional, que eu desejo seguir com ética e dedicação.

Ao meu pai José Luiz que mesmo quando eu não sabia o que eu realmente queria para minha vida, já acreditava na minha capacidade e dedicou o seu tempo em vida, me ensinando a ser uma pessoa persistente e me fazendo acreditar sempre, que o conhecimento vale muito mais do que qualquer riqueza que por ventura eu venha conquistar.

A minha mãe Lúcia que tanto me ajudou financeiramente, além das infinitas demonstrações de carinho e conselhos sábios ao longo desses quatro anos.

A minha irmã Mirela que apesar de ser uma pentelha, sempre que possível manifesta seu carinho e confiança na conquista deste sonho.

Ao meu namorado Renato, por ser uma pessoa maravilhosa e paciente, e que me ajudou nos momentos mais imprescindíveis no decorrer do desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço a professora Dra Fabíola Martins por ter me dado à oportunidade de iniciar monitoria e descobrir o qual é majestoso o mundo das nossas amadas alginhas !!!!

Agradeço imensamente a Dra. Valéria Fernandes por ter me aceitado e acolhido com todo carinho em seu laboratório, me dando a oportunidade de apreender e admirar ainda mais a nossa linda área. “As alginhas são o poder !!!”

Agradeço a Msc. Larissa Bassani pela confiança, e por ter me dado à oportunidade de desenvolver uma pesquisa, em um momento que eu estava desacreditada com a minha graduação.

Agradeço a Msc. Thais de Almeida por ter assumido com tanto carinho e dedicação a minha orientação durante o desenvolvimento desta pesquisa.

Agradeço a meu atual orientador! Msc Danilo Camargo por ser um ótimo ouvinte das minhas lamentações e pelos maravilhosos conselhos, toques e ajuda estatísticas durante o desenvolvimento das tão sonhadas “50” paginas.

Agradeço ao meu amigo, parceiro Frederico Pacheco, por me acompanhar a cada sábado de experimento sempre com bom humor, durante as festas de final de ano e por estar sempre ao meu lado a cada etapa vencida durante o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço a ninfa Franciny pelas micro gotas ao calibrar o pH do meu experimento e por ser sempre minha dupla no Karaokê do Lateac e a majestade Raissa pelo incentivo, e pelas tardes alegres fazendo o nosso ambiente de trabalho divertidíssimo.

Aos demais colegas de laboratório, agradeço muitíssimo pelas manifestações de carinho e por tornar dias tristes em tardes maravilhosas.

Agradeço a Betinha, por ter me acolhido com tanto carinho logo quando entrei no lab, e por sempre ficar de olho na minha estufa durante o período de obras da botânica.

Ao professor Dr. Nelson Roberto Antoniosi Filho que contribui com este trabalho a partir das análises de lipídeos das amostras enviadas muito obrigado.

Agradeço a Rayani, Vinicius R e Rudá por terem me abraçado no nosso grupinho e por terem paciência com o meu gênio difícil e algumas vezes mandão rs! durante as confecções dos nossos trabalhos.

Agradeço a Vinicius P pela imensa ajuda na confecção do abstract, neste momento que foi corrido para todos nós.

Agradeço aos professores Marcelo e Fernanda por serem ótimo ouvintes, e por me aconselharem nos momento em que eu me confrontava com a profissão que eu escolhi exercer.

Agradeço aos meus familiares por entender a minha ausência nas festinhas e encontros de família durante a realização deste trabalho.

E a todos que direta ou indiretamente contribui com manifestações de carinho, conselhos, orações e toda ajuda possível na realização deste trabalho, muito obrigado !!!!

RESUMO

Atualmente os combustíveis fósseis vêm sendo substituídos por outros menos poluentes e renováveis, as microalgas tem se destacado como excelentes matérias prima para produção de biocombustíveis, devido crescerem rapidamente, serem fontes de altas concentrações de lipídeos e não exigirem áreas agricultáveis. As microalgas apresentam elevadíssima produtividade em biomassa, sendo influenciadas principalmente pela concentração dos nutrientes essenciais. Sendo assim o presente estudo visa avaliar os efeitos de diferentes meios de cultura no crescimento da *Tetrastrum heteracanthum* (Nordstedt) Chodat com intuito de explorá-las bioquimicamente e metabolicamente como base para a produção de biocombustíveis. A microalga *T. heteracanthum* foi isolada de amostras da lagoa Juara (Serra- ES), por meio da técnica de pipetagem e diluições sucessivas e mantidas em estufa incubadora. A cepa foi exposta a três meios de culturas ASM1, BBM e CHU totalizando nove inoculos, onde os mesmos foram mantidos, a uma temperatura de $22 \pm ^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 12h de claro/escuro e uma intensidade luminosa de aproximadamente (3500 lux) e pH no início no experimento em torno de 7,0 sendo cultivadas durante 45 dias. O método de densidade óptica consiste em avaliar o crescimento da cultura por meio da obstrução física da luz pelas células a partir de um aparelho denominado espectrofotômetro. Foram realizadas coletas diárias de 10 mL em todas as três unidades experimentais e leituras das amostras a fim de obter-se valores de absorvância de cada um dos tratamentos. Paralelo a este método foram feitas coletas de 10 mL em todas as amostras testadas, onde as mesmas foram filtradas em filtros de fibra de vidro a cada 5 dias, com intuito de se obter a massa seca de cada tratamento. A extração de lipídeos totais foi realizada pela técnica de Bligh e Dyer (1959) e o perfil de ácidos graxos e teores de ésteres foram traçados a partir das análises cromatográficas do óleo extraído da soja. A partir dos métodos de densidade óptica e peso seco foi possível obter uma curva de crescimento de cada tratamento (ASM1, BBM e CHU) que a alga *T. heteracanthum* foi submetida, apresentado como resultado um maior crescimento no meio CHU. Quanto aos resultados de ésteres por biomassa seca, *T. heteracanthum* registrou 339,9 mg por grama de biomassa, enquanto que a soja apresenta 196,9 mg por grama de biomassa seca. Os valores de TUFA obtidos a partir das análises desta microalga mostram um teor de 7% valor este em

concordância com que e estabelecido pela EN 12214. Entretanto os valores de PUFA de *T. heteracanthum* mostrou-se alto 2,4%, está mesma norma determina que teores máximos de poli insaturados não deve ultrapassar 1%. Portanto a microalga *T. heteracanthum* mostrou-se promissora para a produção de biodiesel, pois apresenta um bom rendimento em óleo em relação aos resultados registrados pelo óleo de soja. Porém os valores de PUFA precisam ser reduzidos para que o óleo fique em conformidade, de acordo com que e estabelecido pela norma EN 12214.

Palavras chaves: *T. heteracanthum*. meios de cultura. Soja. PUFA.

ABSTRACT

Fossil fuels are being replaced, slowly, by less polluting and renewable energy sources. In this context, microalgae has emerged as an excellent raw material for biofuel production, due to fast growth in laboratory conditions and the capacity to produce high lipids concentrations, without requiring arable land. Microalgae can reach high mass productivity, being mainly influenced by the concentration of essential nutrients or different culture mediums. This study aims to evaluate the effects of different culture medium on the *Tetrastrum heteracanthum* (Nordstedt) Chodat growth and lipid production, giving important informations about the *T. heteracanthum* biochemistry and metabolism, focused in production of biofuels. *T. heteracanthum* were isolated from Juara Lagoon (Serra- ES) samples, by pipetting and successive dilutions technique and maintained in incubation chambers. The strain was cultivated in three culture mediums: ASM1, BBM e CHU. Each treatment were triplicated and maintained at 22 ° C, with 12 h light / dark photoperiod, 3500 lux light intensity and initial pH about 7,0. The experiment was performed in 45 days. 10mL samples were obtained every day from all the cultures and their cell densities were measured by a spectrophotometer. Another 10mL sample were obtained in a 5 days-gap and filtered with a glass fiber filter to measure the dry weight of each treatment. The total lipids extraction was performed by Bligh and Dyer (1959) methodology and the fatty acids profile and esters concentrations were obtained from a comparison with the chromatographic analysis of the soybean oil. The growth curves for each treatment (ASM1, BBM e CHU) were obtained based on cell density data. The better growth of *T. heteracanthum* was registered in CHU treatment. Regarding the results of esters by dry biomass, *T. heteracanthum* recorded 339,9 mg per gram of biomass, while the soybean has 196,9 mg per gram of dry biomass. The values of TUFA obtained from the analysis of this microalgae showed a content of 7% in agreement with this value which is set by EN 12214. However the values of PUFA from *T. heteracanthum* were high (2,4%). This same legislation provides that maximum levels of polyunsaturated must not exceed 1%. Therefore, *T. heteracanthum* showed potenciality for the biodiesel production, with a good oil yield compared to soybean oil. However, PUFA values need to be reduced.

Keywords: *T. heteracanthum*. culture medium. Soybean.PUFA.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 - Reação de transesterificação empregada para produção de biodiesel.....	26
Figura 02 – Lagoa Juara, Serra – ES (22°10'S e 40°13'W).....	37
Figura 03 - Técnica de isolamento por diluições sucessivas.....	38
Figura 04 – Espécies pertencentes ao gênero <i>Tetrastrum</i> : 1. <i>Tetrastrum elegans</i> , 2-4. <i>Tetrastrum heteracanthum</i> , 5. <i>Tetrastrum komarekii</i> , 6. <i>Tetrastrum triangulare</i>	39
Figura 05 - Foto de <i>Tetrastrum heteracanthum</i> em microscópio óptico com aumento de 100X.....	40
Figura 06 - Esquema demonstrando os processos necessários para a inoculação da cepa aos novos meios de cultura.....	43
Figura 07 - Câmara de Fuchs Rosenthal: A - Representação esquemática da área de contagem da câmara com 16 quadrados separados por três linhas paralelas; B - Representação do critério de contagem: contar as células que tocam a linha interna na lateral esquerda e superior (bolas pretas) e não se deve contar as células que tocam a linha interna direita e inferior (bolas brancas).....	44
Figura 08 - Posicionamento dos fracos em arco no interior das câmaras incubadoras	45
Figura 09 - Processo de filtragem do peso seco. (A - Diferença na coloração dos filtros após o processo de secagem e filtragem; Em B - materiais utilizados no processo de filtragem: bomba a vácuo, kitassato e funil de Buchner; C - filtro no interior no kitassato após a filtragem).....	48
Figura 10 - Extração de lipídeos. (Em A - o clorofórmio sendo adicionado; B - mistura sendo agitada; C - formação de um sistema bifásico).....	49
Figura 11 - Processo de centrifugação. (A e B cubetas sendo levadas a centrifuga; C - deposição da cultura no fundo das cubetas após a centrifugação).....	50
Figura 12 – Liofilizador.....	51
Figura 13 – Correlação entre a massa de óleo de soja e a área dos picos de FAME...	53
Figura 14 - Curva de crescimento (Cél/mL) de <i>Tetrastrum heteracanthum</i> em diferentes meios de cultura	57

Figura 15 - Gráfico mostrando a quantidade de lipídeos totais nos diferentes tratamentos	62
Figura 16 – Formato da colônia durante a exposição nos meios de cultura ao longo dos dias.....	63
Figura 17- Relação linear entra peso seco e $\text{cél}/\text{mL}^{-1}$ dos três meios de cultura ASM1 (A); BBM (B) e CHU (C)	65
Figura 18 - Gráfico mostrando a densidade celular em (g/L) de <i>Tetrastrum heteracanthum</i> relacionando os diferentes meios de cultura em função dos dias	66
Figura 19 – Cromatograma dos ácidos graxos do óleo da microalga <i>T. heteracanthum</i> e a soja.....	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição e concentração das soluções-estoque do meio ASM1	41
Tabela 2 - Composição e concentração das soluções-estoque do meio CHU..... ..	42
Tabela 3 - Composição e concentração das soluções-estoque do meio BBM..... ..	42
Tabela 4 - Valores da taxa de crescimento (μ), tempo de duplicação (G) e rendimento máximo (R) para a cultura de <i>Tetrastrum heteracanthum</i> submetido a diferentes meios de cultura.. * Tratamentos com médias não seguidas pela mesma letra diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.....	59
Tabela 5- Rendimento em óleo de <i>Tetrastrum heteracanthum</i>	68
Tabela 6 - Composição de ésteres metílicos a parti da extração do conteúdo lipídico de <i>T. heteracanthum</i> e da soja.....	79
Tabela 7 - Teores totais de ácidos graxos saturados (SFA), monoinsaturados (MUFA), diinsaturados (DUFA), triinsaturados (TUFA) e poliinsaturados (PUFA) de <i>Tetrastrum heteracanthum</i>	72

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	25
3 METODOLOGIA	37
3.1 CAMPO	37
3.2 ISOLAMENTO.....	38
3.3 MICROALGA ISOLADA	39
3.4 CARACTERIZAÇÃO DO MEIO DE CULTURA	40
3.5 TIPOS DE CULTIVO	43
3.6 DELINEAMENTOS EXPERIMENTAIS.....	43
3.7 AVALIAÇÕES DO CRESCIMENTO	46
3.7.1 Densidade óptica.....	46
3.7.1.1 Espectrofotometria	46
3.7.2 Peso Seco	47
3.8 EXTRAÇÃO DE LÍPIDEOS TOTAIS	48
3.9 CENTRIFUGAÇÃO	49
3.10 LIOFILIZAÇÃO	50
3.11 PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS E ANÁLISE DOS TEORES DE ÉSTERES	51
3.12 INTERPRETAÇÕES DOS RESULTADOS.....	54
3.13 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	54
4 RESULTADO E DISCUSSÃO	57
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	75
REFERÊNCIAS.....	77

1 INTRODUÇÃO

Microalgas fitoplanctônicas são seres microscópicos, fotossintéticos que vivem em ambientes aquáticos que apresentam grande quantidade de matéria orgânica, luz solar e dióxido de carbono. Esses locais são propícios para uma alta taxa de crescimento e desenvolvimento de organismos algáceos (PEQUENO; 2010). Esses organismos são os principais responsáveis pela produção primária, sendo assim o fitoplâncton é importante na manutenção e no desenvolvimento da vida aquática (REYNOLDS, 2006).

A Classe Chlorophyceae está entre as mais frequentes Classes de microalgas que constituem o fitoplâncton e estão presentes em ambientes lacustres, principalmente lagos mesotróficos ou eutróficos, com ocorrência em todo o mundo (ESTEVES, 1998). Os organismos dessa Classe, também conhecidos como “algas verdes”, são dotadas de pelo menos um cloroplasto fotossintetizante, o qual apresenta concentrações de carotenoides que não excedem as concentrações de clorofila (RAVEN, 2007) sendo está uma das divisões mais visadas para a extração de óleo algáceo, devido ao seu rápido crescimento e fácil adaptação às variações ambientais (TEIXEIRA; MORALES 2006).

O cultivo de microalgas tem sido utilizado como ferramenta para exemplificar os diversos aspectos da variabilidade morfológica, fisiológica e o ciclo de vida desses organismos, colaborando com o aumento do conhecimento a respeito da ecologia e da taxonomia das algas (LOURENÇO, 2006). Cultivar microalgas passou a ser mais relevante não só sob o ponto de vista biológico e ambiental, mas também devido a capacidade desses organismos produzirem compostos de interesse comercial como proteínas, carboidratos e ácidos graxos (DERNER; OHSE; VILLELA, 2006; LOURENÇO, 2006).

Atualmente o desenvolvimento de biocombustíveis biológicos são umas das melhores alternativas para reduzir a quantidade de CO₂ emitida para a atmosfera vista à preocupação por formas de energia limpa ou menos degradáveis. Sendo assim vê-se a corrida de várias empresas privadas e instituições públicas em busca de uma fonte de energia biológica que cause menos impactos ao ambiente. O governo brasileiro iniciou suas pesquisas ao lançar os programas Proálcool e depois o Programa de Produção e Uso Nacional do Biodiesel (PNPB), atingindo uma marca

de cerca de dois bilhões de litros ao ano de biocombustíveis produzidos no ano de 2010 (CARVALHO, 2010).

O biodiesel é uma fonte de energia limpa no qual o governo brasileiro passou a realizar investimentos, devido está ser uma forma de energia alternativa e que emite menos poluentes como, por exemplo, dióxido de carbono para a atmosfera. Para a sua produção é necessário, quantidades exacerbadas de matrizes ricas em lipídeos que podem ser originadas de plantas oleaginosas, como a mamona, a soja, a cana de açúcar ou pode provir de outras fontes ricas em biomassa como, por exemplo, as microalgas (TAVARES, 2009).

As microalgas são fontes potenciais para a produção do biodiesel e sua produtividade supera a de qualquer vegetal oleaginoso (CAROLINO, 2011). Porém para o cultivo de microalgas ser promissor é necessário a diminuição dos custos de produção de biodiesel em relação às plantas oleaginosas e ao isolamento de espécies promissoras com elevada acúmulo de lipídeos (LOURENÇO, 2006).

O desenvolvimento das microalgas pode ser afetado por fatores bióticos (taxa de crescimento e herbivoria) e abióticos (incidência de luz, concentrações de nutrientes, pH e temperatura). Dentre os fatores abióticos a concentração de nutrientes é um fator determinante no desenvolvimento desses organismos uma vez que afetam o processo fotossintético e o ciclo de vida das mesmas (ESTEVES, 2011).

Estudos referentes à nutrição de microalgas possibilita avaliar a ação de vários elementos químicos no crescimento e produtividade das mesmas. Além disso, é por meio desses trabalhos que é possível definir quais componentes devem ser acrescentados no meio de cultura em maiores ou menores quantidades. Também permite identificar certos componentes desnecessários ou inibitórios para certas espécies podendo assim serem removidos do meio de cultura, permitindo uma economia ao cultivador e não causando prejuízos nutricionais as microalgas (LOURENÇO, 2006) .

Apesar de existirem vários meios de cultura com constituições distintas, na escolha de qualquer um destes deve ter-se em consideração os seguintes fatores: (1) a concentração salina, visto que, este fator depende do habitat original da microalga; (2) fonte de carbono, uma vez que este elemento constitui todas as substâncias sintetizadas pela célula, porém este elemento pode ser fornecido por através da

adição de aeração; (3) fontes de amônia ou nitrato, já que este elemento químico compõe diversas substâncias do metabolismo primário da microalga; (4) pH ótimo; (5) existência de elementos vestigiais e o (6) uso do EDTA para solubilizar alguns desses elementos. Os meios de cultura podem ser completamente sintéticos (meios de cultura definidos), águas naturais enriquecidas com minerais (meios de cultura semi definidos) e águas residuais (LOURENÇO, 2006; RUSSO, 2011).

Existe um número limitado de nutrientes considerados essenciais e foi por meio de estudos como estes que se pode formular meios de cultura definidos, que apresente uma composição química adequada para o crescimento algáceo. A deficiência de um nutriente essencial no meio pode inviabilizar o crescimento e o desenvolvimento da alga (LOURENÇO, 2006).

Este trabalho foi elaborado com o intuito de identificar o melhor meio de cultura para o crescimento da microalga *Tetrastrum heteracanthum* (Nordstedt) Chodat 1895 pertencente a Classe Chlorophyceae visto que as algas pertencentes a esta Classe são potenciais produtoras de óleo, uma vez que os meios de cultura tem um papel essencial no cultivo, pois proporciona nutrientes essenciais para o desenvolvimento e incremento de biomassa algal.

Por não haver em literaturas específicas o melhor meio de cultura para cada espécie de microalga, esta pesquisa com diferentes meios de cultura visa estabelecer qual dos três meios testados renderá a maior biomassa em menor tempo para *Tetrastrum heteracanthum* que será coletada da lagoa Juara, uma vez que de acordo com os estudos de Oliveira (2011), este ecossistema apresenta uma grande diversidade de táxons.

A Universidade Federal 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 Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) e Ministério da Ciência e Tecnologia (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), coordenado pela Prof. Dra. Valéria de Oliveira Fernandes, convidou a Faculdade Católica Salesiana do Espírito Santo (FCSES) a integrar o projeto intitulado “MICROALGAS”, com a participação do Prof. Msc. Danilo Camargo Santos e alguns alunos do curso de graduação em Ciências Biológicas, permitindo assim uma ampla contribuição para formação dos alunos envolvidos e estabelecendo uma parceria de grande valia para o enriquecimento técnico-científico das instituições. A partir desse projeto o LATEAC iniciou pesquisas relacionadas ao cultivo de clorófitas isoladas de ambientes capixabas, e passou a testa-las em diferentes condições de modo, a otimizar ou induzir a produção de maiores concentrações de ácidos graxos.

A deficiência de algum elemento essencial no meio de cultura pode inviabilizar o crescimento algal bem como o seu ciclo de vida. Na literatura os mesmos são divididos em macronutrientes (Carbono, Hidrogênio, Oxigênio, Nitrogênio, Fósforo, Enxofre, Potássio, Magnésio, Sílica e Ferro) e micronutrientes (Manganês, Cobre, Zinco, Molibdênio, Vanádio, Boro, Cobalto, Cálcio, Sódio, Selênio, Níquel), sendo que dependendo das concentrações que esses elementos estão disponíveis no meio de cultura, esses nutrientes podem se tornar fatores limitantes, o que pode desempenhar algum tipo de estresse durante o desenvolvimento do cultivo (ESTEVES, 2011; PEQUENO, 2010).

As concentrações de lipídeos presentes nas microalgas estão sujeitas às variações de acordo com as condições de estresse que esses organismos enfrentam durante o período de cultivo, já que as células das microalgas que produzem e armazenam os lipídeos, são as mesmas que são responsáveis pela realização da fotossíntese (AZEREDO, 2012; LOURENÇO, 2006).

Desta forma um dos grandes desafios atuais 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 para que se tornar conveniente o consumo de biocombustíveis (CAROLINO, 2011).

Tendo em vista a temática supracitada acima apresentada, o objetivo geral deste trabalho é avaliar os efeitos de diferentes meios nutricionais no crescimento de *Tetrastrum heteracanthum* pertencente à Classe Chlorophyceae, no intuito de melhorar as condições de cultivo. E como objetivos específicos este trabalho visa (1)

Testar o cultivo de *Tetrastrum heteracanthum* em diferentes meios de cultura (ASM1, BBM e CHU) a fim de obter o melhor desenvolvimento algal; (2) Comparar as condições que permitiram o maior crescimento em menor tempo das culturas nos três diferentes meios nutricionais; (3) Estimar a quantidade de lipídeos totais produzidos pelas estirpes após serem expostas aos três tratamentos e (4) Analisar o perfil de ácidos graxos da alga selecionada.

Os dados obtidos com esse trabalho poderão servir de base para o desenvolvimento de tecnologias viáveis para o cultivo de microalgas em larga escala, para a produção de biocombustíveis ou outros fins.

A hipótese deste trabalho é de que a microalga *T. heteracanthum* apresente ótimos resultados no que se refere a um rápido crescimento, em menor tempo, somente nos meios de cultura que, de acordo com a literatura, são próprios para microalgas da Classe Chlorophyceae, isto é, os meios BBM e CHU.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

O século XIX foi marcado pela Revolução Industrial que culminou na queda da produção artesanal e no aumento da produção em massa de produtos industrializados (indústrias têxteis e férlicas), o que foi proporcionado pelas máquinas a vapor que utilizavam como fonte de energia, por exemplo, o carvão mineral. Portanto, a queima desse combustível já era uma das principais responsáveis pela liberação de gases do efeito estufa (GEE) (KOWALSKI, 2010).

Com o aumento do trabalho em série (Fordismo e Taylorismo) e a produção em larga escala, a utilização de combustíveis fósseis como matriz energética se tornou cada vez mais evidente, no abastecimento à indústria, nos setores de transportes e aos países emergentes, devido à necessidade de expansão do mercado econômico. (OLIVEIRA, 2009).

A primeira grande demanda por biocombustíveis ocorreu durante a Segunda Guerra Mundial. Ao término dos combates, o petróleo, que provinha do Oriente Médio, teve seus custos barateados e passou a ser a principal base energética de diversos países (AZEREDO, 2012). Entretanto, na década de 70, devido à emissão de GEE provenientes da exacerbada busca pelo poder econômico, à instabilidade energética de zonas políticas conflituosas e às reservas de combustíveis fósseis limitadas eram razões suficientes para diversos países passarem a investir em fontes alternativas de energia como os bicombustíveis (AZEREDO, 2012; MORAIS, 2011).

Biocombustível é uma biomassa renovável que pode ser derivada de matéria orgânica morta não fossilizada ou ainda de metabolitos de organismos vivos como, por exemplo, óleos vegetais e gordura animal (DERMIBAS, 2009; OSAKI; BATALHA, 2011).

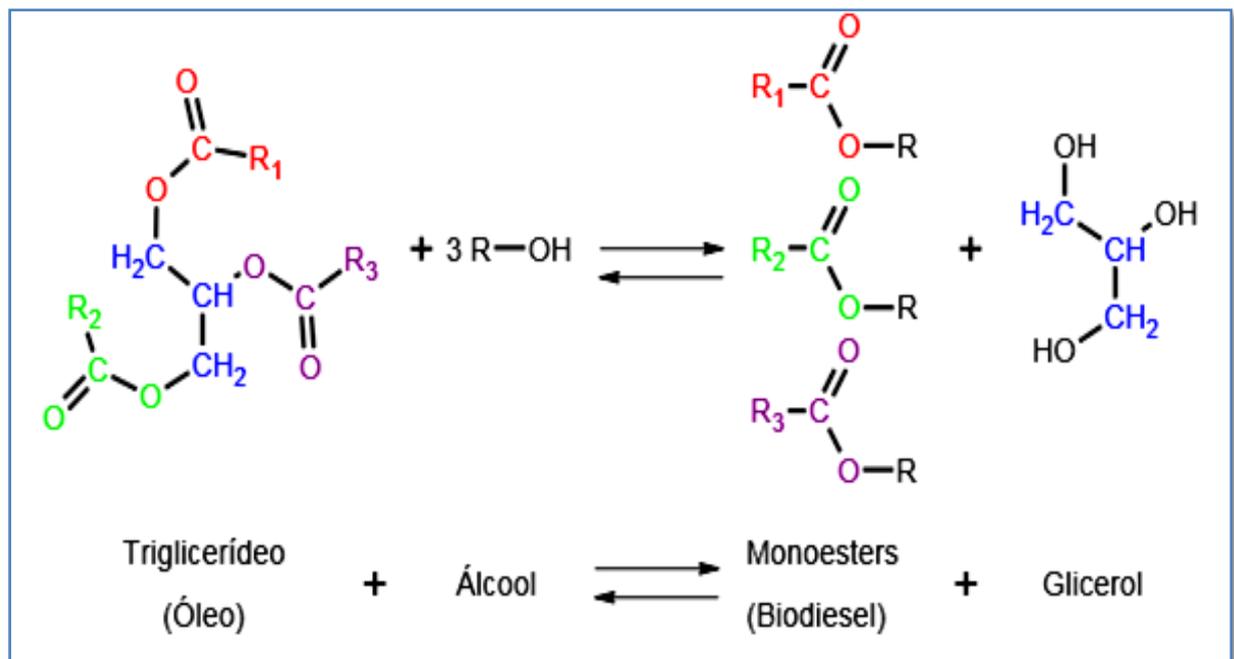
O uso de biocombustíveis como fonte energética data de 1900 quando o inventor alemão Rudolph Diesel expôs um motor com um novo sistema de funcionamento denominado ciclo diesel, movido a óleo de amendoim. Porém com a abundância na oferta do petróleo e seu preço acessível, os óleos vegetais passaram a ser utilizados para outros fins (GONÇALVES; NOGUEIRA, 2007; RAMOS *et al.*, 2003;).

Outro fator que dificultou o uso de combustíveis provenientes de óleos vegetais nesse período foi a combustão. Os óleos de origem vegetal eram muito viscosos e

deixavam depósitos de carbono, o que requereria uma manutenção constante após a utilização desses combustíveis (KNOTHE, 2001).

Os problemas com a viscosidade excessiva dos óleos foram melhorados após a descoberta da transesterificação que envolve a quebra de ácidos graxos proveniente de alguma biomassa por meio de um álcool, na presença de catalisador, formando ésteres e glicerina (Figura 01) (DERMIBAS, 2009; OSAKI; BATALHA, 2011; KOWASLQUI, 2010).

Figura 01- Reação de transesterificação empregada para produção de biodiesel



Fonte: Torres, Vargas, Mariano, ([20--]).

Durante a década de 30 os franceses também passaram a testar o óleo de amendoim como fonte energética, assim como vários outros países, como a China e a Bélgica, que passaram a realizar experimentos provenientes de outras fontes vegetais, como a palma e o óleo de dendê com esta finalidade (KOWALSKI, 2010). Uma das maiores dificuldades encontradas pelos pesquisadores neste período foi o alto custo de produção do biodiesel, o que fez com que as pesquisas com essas matrizes energéticas alternativas fossem interrompidas (KOWALSKI, 2010; KNOTHE, 2001).

Com o desenvolvimento tecnológico e econômico, somado ao aumento populacional e à necessidade de energia para sustentar a indústria, aliados a insegurança instalada após o desabastecimento do petróleo com o fim da segunda guerra

mundial, ficava cada vez mais evidente a necessidade de programar alternativas economicamente viáveis de energia renovável para continuar o ciclo do desenvolvimento (KOWALSKI, 2010).

A partir deste momento vários países retomaram suas pesquisas a fim de investir em combustíveis alternativos ao petróleo (AZEREDO, 2012). Em meados da década de 70 o governo brasileiro investiu em projetos para obtenção de novas matrizes energéticas devido a crise do petróleo. Assim, programas como o Pro – álcool e outros voltados para a obtenção de formas distintas de bicomcombustível, com o intuito de executar a substituição parcial aos derivados de petróleo, foram estimulados e financiados pelo governo (CARVALHO, 2010).

Durante a implantação desses projetos foi elaborada uma Comissão Nacional de Energia, através da Resolução n^o 007, datada de 22 de outubro de 1980, que previa uma mistura de 30% de óleos vegetais ao diesel para uma posterior substituição em longo prazo (AZEREDO, 2012).

Porém, apesar dos bicomcombustíveis serem uma fonte de energia promissora, programas de incentivo a este tipo de pesquisa foram abandonados devido à queda de preços do petróleo e o elevado custo de produção em relação ao diesel (AZEREDO, 2012; OSAKI; BATALHA, 2011). Entretanto, em 1990, as pesquisas foram retomadas baseadas em dois contextos: descarbonificação da atmosfera da Terra (devido às mudanças climáticas) e segurança energética (AZEREDO, 2012; OSAKI; BATALHA, 2011).

Desde então os investimentos em bicomcombustíveis crescem a cada ano principalmente devido ao apoio governamental. No Brasil, a Lei 11.097 de 13 de Janeiro de 2005 propõe que cerca de 5% do biodiesel seja adicionada ao diesel como forma de aproximar o consumidor a essa nova fonte de energia e minimizar os custos com a exportação do petróleo e seus derivados (AGÊNCIA NACIONAL DE ENERGIA ELÉTRICA, 2005;MORAIS, 2011).

Além disso, esta lei prevê que: (1) os biocomcombustíveis devem apresentar características relevantes para uma melhor produção, com um alto teor de óleo; (2) seu custo benefício deve ser menor ou igual ao diesel para os casos de produção de biodiesel; (3) o seu uso não deve danificar o motor e (4) o subproduto da extração

deve ser sempre que possível reaproveitado (AGÊNCIA NACIONAL DE ENERGIA ELÉTRICA, 2005; TEIXEIRA; MORALES 2006).

Parâmetros como viscosidade, ponto de fulgor, nível de cetano, quantidade máxima de fósforo e enxofre entre outras, são requisitos que medem a qualidade do biodiesel e devem ser seguidos de acordo com as resoluções ANP 07/2008 e EN 14214(LOBO; PEREIRA; CRUZ, 2009).

De acordo com a resolução ANP 07/2008 o conteúdo de fósforo máximo permitindo no óleo biodiesel é de 10 mg/kg. Os fosfolipídios, presentes nos óleos vegetais, necessitam passar por um processo denominado degomagem, onde os fosfolipídios e outras ascorosidades como ceras, substâncias coloidais e íons metálicos, são removidos através da limpeza do óleo aquecido com água. Esse processo é importante, pois permite um alto rendimento de ésteres (LOBO; PEREIRA; CRUZ, 2009).

Assim como o fósforo, o enxofre também é um típico veneno de catalisadores. A presença deste composto no diesel mineral permite a emissão desse material, na atmosfera ocasionando problemas a saúde e promovendo a chuva ácida. Além disso, a oxidação do combustível promove a corrosão de partes do motor devido à presença dos ácidos sulfúrico e sulfônico(LOBO; PEREIRA; CRUZ, 2009).

Mediante a esses impactos o teor de enxofre passou a ser reduzido no combustível diesel. Entretanto essa redução causa uma perda de lubricidade no combustível. O biodiesel, por outro lado, apresenta baixas quantidades de enxofre e boa lubricidade, podendo ser utilizado sem causar nenhum tipo de dano entre o atrito das peças (LOBO; PEREIRA; CRUZ, 2009).

Parâmetros como viscosidade, estabilidade oxidativa e nível de cetano estão diretamente relacionados quanto ao comprimento da cadeia carbônica. A viscosidade do biodiesel aumenta de acordo com o tamanho do ésteres metílicos e devido ao grau de saturação. Esta propriedade ocasiona um acúmulo de resíduos levando ao entupimento de partes internas do motor. A estabilidade oxidativa está relacionada com a presença de ácidos graxos insaturados e tamanho das cadeias carbônicas, bem como a posição de duplas ligações. Sendo assim, quanto maior for o número de insaturações, mais exposta está a molécula à degradação e oxidação e, a partir deste processo, a formação de produtos insolúveis fica

iminente, ocasionando depósitos de produto no motor (LOBO; PEREIRA; CRUZ, 2009; MENEZES et al., 2013).

O número de cetano está relacionado com a velocidade de ignição do combustível, sendo que o alto índice de cetano indica um bom funcionamento do motor. Menezes e outros (2013) em um experimento com a microalga *Kirchneriella lunaris* e *Choricystis* sp. ambas microalgas pertencente a Classe Chlorophyceae obteve ótimo resultado com relação ao nível de cetano. Essa propriedade é influenciada pelo grau de saturação e comprimento da cadeia carbônica, ou seja, um biodiesel que apresenta ácidos graxos com uma cadeia carbônica longa e saturações tende a apresentar um alto índice de cetano, sendo considerado um biocombustível de boa qualidade (MENEZES et al., 2013).

Os bicombustíveis atualmente produzidos em larga escala são derivados de plantas oleaginosas como a soja, girassol, colza, canola, mamona e palma (DERMIDAS, 2009; GONÇALVES; NOGUEIRA, 2007; OSAKI; BATALHA, 2011). Entretanto, devido ao aumento no consumo desses combustíveis de origem vegetal, aliados ao aumento de monoculturas para suprir essa demanda, surgiram certos questionamentos em relação à competição por áreas que atendam à produção de alimentos e biocombustíveis. As plantas oleaginosas vêm sendo alvo de críticas devido a sustentarem o mercado energético ao invés de eliminarem a escassez alimentar (AZEREDO, 2012; DERMIDAS, 2009).

Por isso, fontes alternativas para a extração de óleos para a produção de biodiesel vêm sendo estudadas e dentre elas destacam – se o cultivo de microalgas (AZEREDO, 2012; MONTEIRO, 2009; PAULILLO; JATOBÁ; CECHINEL, 2009).

O uso de microalgas para a produção de biodiesel tem sido uma boa alternativa, tendo em vista que algumas espécies apresentam uma taxa rápida de crescimento, produzem grande quantidade de óleo, crescem em regiões com extremas condições climáticas, fazendo com que o uso de terras aráveis seja destinado apenas para culturas voltadas para a alimentação, além de ocuparem espaços menores em relação às grandes plantações (PAULILLO; JATOBÁ; CECHINEL, 2009). O cultivo de linhagens de microalgas permite uma homogeneidade da cultura, já que esses organismos irão apresentar a mesma composição genética e bioquímica (LOURENÇO, 2006). Sendo assim, quando são estressadas, as células de uma mesma linhagem se comportam igualmente e, se forem corretamente induzidas,

podem aumentar a produção de alguns compostos metabólicos de alto valor comercial como, por exemplo, proteínas, lipídeos e carboidratos (OHSE, 2007; BERTOLDI, 2008).

As algas estão inseridas entre os seres vivos mais antigos da terra, os registros fósseis indicam que organismos semelhantes às algas atuais datam há mais de três bilhões e meio de anos (BOLD; WYNNE, 1985). Lineu, 1753 propôs alga como caráter taxonômico uma variedade de organismos de difícil descrição, devido apresentarem grande variabilidade morfológica, diversas formas de reprodução, ecologia e processos fisiológicos. Atualmente este termo não exibe valor taxonômico (BICUDO; MENEZES 2006; LOURENÇO 2006).

Algas fitoplanctônicas são seres microscópicos fotossintetizantes que vivem em ambientes aquáticos que apresentam grande quantidade de matéria orgânica, disponibilidade de luz solar e dióxido de carbono, sendo de origem marinha, salobra ou dulcícola que vivem ao sabor das correntes (ESTEVES, 1998; PEQUENO 2010). Por serem autotróficos, são a base da cadeia alimentar, sendo as principais responsáveis pela produção primária desses ambiente aquáticos. Além disso, apresentam um ciclo de vida curto são bioindicadoras da qualidade da água, normalmente apresentando uma rápida resposta às variações ambientais (ESTEVES, 1998; REYNOLDS, 2006; VIDOTTI, 2004).

A Divisão Chlorophyta é uma das mais ocorrentes na comunidade fitoplânctonica e são conhecidas como “algas verdes”, devido sua coloração esverdeada e por apresentar como pigmento principal a clorofila a e b, além de pigmentos acessórios como a xantofila e carotenoides. São consideradas cosmopolitas e apresentam cerca de 17000 espécies. Estas algas exibem uma enorme variabilidade morfológica que compreende indivíduos unicelulares, coloniais ou filamentosos, além de formas macroscópicas (LOURENÇO, 2006; RAVEN, 2007).

A Classe Chlorophyceae, juntamente com as representantes das Classes Zygnemaphyceae, Oedogoniophyceae pertencem á Divisão Chlorophyta, sendo a Classe Chlorophyceae uma das mais abundantes em numero de espécies. Suas representantes estão presentes em ambientes lacustres, principalmente lagos mesotróficos ou eutróficos, com ocorrência em todo o mundo (ESTEVES, 1998; RAVEN, 2007). É uma das Classes mais visadas devido aos seus produtos metabólicos que servem para serem aplicados na indústria alimentícia, farmacêutica

e na extração de óleo algáceo, devido ao seu rápido crescimento e alta tolerância das condições de cultivo (LOURENÇO, 2006; TEIXEIRA; MORALES 2006).

O cultivo de microalgas tem sido uma ferramenta facilitadora de estudo, pois permite explicar diversos aspectos da biologia das espécies como variabilidade morfológica, ciclo de vida e características bioquímicas (LOURENÇO, 2006). Além disso, o cultivo de organismos algáceos proporciona a realização de testes como, por exemplo, bioensaios que visa avaliar o crescimento populacional após a exposição em condições de estresse. Por exemplo, estes testes permitem avaliar quais os impactos ambientais bioacumulativos podem ser gerados a partir de derrames de algumas substâncias nos ambientes aquáticos (VIDOTTI; ROLLEMBERG 2003).

O primeiro registro de cultivo de microalgas data do século XIX com os trabalhos de Robert Koch, que realizava experimentos adotando materiais semelhantes aos que eram aplicados nos trabalhos com bacteriologia como, por exemplo, o uso de meio sólido e a utilização de vidrarias (erlenmeyer, balões e pipetas). Posteriormente, o pesquisador Georg Pringshein, em 1912, demonstrou a necessidade de substituir algumas metodologias relacionadas ao cultivo de microalgas. Ele adotou a adição de água destilada e quelantes durante o preparo dos meios de culturas (LOURENÇO, 2006).

O cultivo de microalgas deslanchou no cenário científico a partir da década de 1930, quando houve uma intensificação de diversos trabalhos relacionados ao cultivo de microalgas aliados a ecologia, fisiologia e bioquímica em diversos países, sendo difícil determinar a partir desta fase a ordem cronológica dos trabalhos realizados (LOURENÇO, 2006).

Em alguns países esta técnica não era mais uma novidade, então as microalgas deixaram de ter um enfoque unicamente biológico e passaram a ser produzidas em escala comercial para abastecer a indústria alimentícia já que a biomassa gerada tem um alto valor nutritivo (AZEREDO, 2012). O cultivo de microalgas foi empregado em outras áreas da indústria, como a de fármacos, química, tratamentos residuais e produção de biodiesel (TEIXEIRA; MORALES 2006).

Países como França, EUA e China cultivam algas dos gêneros *Spirulina* sp. E *Chorella* sp. com fins nutricionais (MORAIS, 2011; RICHMOND 2004). Estudos recentes com a cianobactéria *Spirulina* sp. sugerem que a biomassa, além de ter

alto teor de proteína, essas microalgas apresentam grande potencial farmacêutico. A utilização deste gênero como fonte nutricional pode trazer vários benefícios à saúde com, por exemplo, melhoramento do sistema imunológico, prevenção contra o desenvolvimento de alguns tumores e diminuição do colesterol (RICHMOND, 2004). Outras algas como, por exemplo, *Dunaliella salina* são utilizadas na indústria de cosméticos para a obtenção de betacaroteno uma vez que este pigmento antioxidante previne radicais livres e o envelhecimento (MORAIS, 2011).

Silva (2006), em seu trabalho com *Chlorella vulgaris*, Tavares (2009) ao testar *Botryococcus braunii* e Menezes e outros (2012) ao testar as microalgas *Monoraphidium komarkovae*, *Tetranephris brasiliensis* e *Kirchneriella irregularis* apresentou resultados satisfatório em relação ao conteúdo lipídico que atualmente vem sendo visado com uma alternativa para a produção de biodiesel. Segundo Teixeira e Morales (2006) a composição de ácidos graxos que são encontrados nas microalgas possui substâncias similares aos que são encontrados em plantas oleaginosas. Microalgas podem ser consideradas potenciais matérias-primas para a produção do biodiesel, apresentando vantagens como: (1) custo baixo para transporte; (2) podem ser cultivadas em terras não aráveis, não havendo, portanto competição por áreas cultiváveis; (3) apresentam uma boa capacidade de fixação de CO₂ e (4) também uma alta taxa de crescimento (PAULILLO; JATOBÁ; CECHINEL, 2009).

Culturas de microalgas em escala comercial para a produção de biodiesel atualmente apresenta um custo/benefício baixo comparado à produção atual de petróleo. Desta forma o desafio atual para o cultivo de microalgas associa-se em determinar o potencial máximo da taxa de crescimento, ao isolamento e triagem de espécies promissoras de elevada acumulação de lipídeos e também avaliar quais são os fatores que influenciam no aumento ou diminuição durante a produção de moléculas orgânicas com ênfase em lipídeos (AZEREDO, 2012; CAROLINO, 2011).

Segundo Azeredo (2012) os lipídeos são substâncias químicas de composição variada, além de desempenharem diversas funções, tais como o armazenamento de energia na forma de gordura e ácidos graxos, fazem parte da composição das membranas celulares através dos fosfolipídios, e quando estão presentes em pequenas concentrações, exercem funções como substâncias auxiliares de absorção de energia, cofatores enzimáticos e mensageiros intracelulares.

As concentrações de lipídeos presentes nas microalgas estão sujeitas as variações de acordo com as condições de crescimento e estresse nos quais esses organismos se encontram durante o período de cultivo.

Além disso, as células das microalgas que produzem e armazenam os lipídeos, são as mesmas que são responsáveis pela realização da fotossíntese. Entretanto geralmente a produção de lipídeos é inversamente proporcional à atividade fotossintética que pode ser reduzida devido a diversos fatores (AZEREDO, 2012; LOURENÇO, 2006). Sendo assim segundo Pequeno (2010) o cultivo de microalgas pode obter uma elevada produção de triacilgliceróis, por meio de duas fases: (1) associada ao crescimento exponencial da cultura sob condições ótimas ou (2) a imposição de algum tipo de estresse na cultura algácea.

Ainda que a produção, composição e armazenamento de lipídeos sejam espécie - específica, existem mecanismos intrínsecos à maioria das espécies de microalgas, produtoras de lipídios que, quando são submetidas a estímulos ambientais, sejam eles bióticos ou abióticos, atuam de forma sinérgica para o aumento da produção de lipídeos (AZEREDO, 2012). Com relação aos fatores bióticos que influenciam na produção lipídica estão a taxa de crescimento e herbívora. Quanto aos fatores abióticos que estão relacionados a produção de ácidos graxos estão a temperatura, o pH, a intensidade luminosa e a disponibilidade de nutrientes (ESTEVEES, 2011; LOURENÇO, 2006).

A concentração dos diferentes nutrientes tem papel fundamental na produção primária (ESTEVEES, 1998). Sendo assim o cultivo em sua maioria utilizam a indução artificial das condições tróficas para viabilizar o rápido crescimento das culturas algáceas, já que as quantidades requeridas de nutrientes no meio variam entre as espécies.

A composição química dos meios de cultura podem ser divididos em 3 classes fundamentais: (1) meios de cultura definidos são aqueles que utilizam água destilada, deionizada ou ultrapura onde são adicionados os nutrientes que tem o dever de enriquecer esta água, aumentando o seu valor nutricional e viabilizando um elevado crescimento desses organismos. Geralmente este tipo de meio de cultura é aplicado quando se tem um interesse em extrair substâncias específicas de valor agregado; (2) meios de cultura semi definidos, são aqueles que utilizam como matriz a água do mar, onde é enriquecida com nutrientes inorgânicos e orgânicos. Os

custos de preparação deste tipo de meio de cultura são baixos, favorecendo sua aplicação para a realização de pesquisas, os meios mais conhecidos que utilizam esse processo são o Guillard e o Conway; (3) meios de cultura indefinidos são aqueles meios que utilizam a água do mar e são adicionados a esta água substâncias orgânicas e inorgânicas, onde não se tem uma precisão de quanto foi adicionado desses elementos químicos e nem suas proporções e (4) meios de cultura sólidos, que são preparados a partir de qualquer meio de cultura líquido onde se acrescenta ágar (LOURENÇO, 2006).

Estudos referentes à nutrição de microalgas permitem avaliar a ação de vários elementos no crescimento e produtividade das mesmas. Em cultivo, estudos como estes definem quais e em que quantidade cada nutriente deve ser adicionada ao meio de cultura. A deficiência de um nutriente essencial no meio pode inviabilizar o crescimento e o desenvolvimento da alga (LOURENÇO, 2006).

Há um número limitado de nutrientes que são considerados essenciais para as microalgas. O cultivo de microalgas em diferentes meios de cultura foi uma ferramenta importantíssima na busca de certas composições químicas que permitiram estabelecer quais eram as concentrações ideais de certos elementos. Entretanto ainda não se sabe quais são as quantidades ideais de elementos essenciais (nutrientes) indispensáveis para cada espécie, isso porque as quantidades de nutrientes variam de uma espécie para outra de acordo com as suas exigências metabólicas. Sendo assim os nutrientes foram divididos em duas categorias micronutrientes e macronutrientes (LOURENÇO, 2006).

O principal papel dos micronutrientes é participar da estrutura e da atividade de diversas enzimas, assim como na estruturação de organelas e diferentes vias metabólicas. Os micronutrientes estão dispostos em menor quantidade em torno de ppb (partes por bilhão) e ppm (partes por milhão) (LOURENÇO, 2006).

Os elementos que compõem esta categoria são: (1) Manganês (Mn) o qual é um componente estrutural dos tilacóides dos cloroplastos, além de funcionar como co-fator de enzimas que participam da síntese de ácidos graxos; (2) Molibdênio (Mo) que é constituinte de uma das principais enzimas das algas, a nitrato redutase, que atua na redução de nitrato para nitrito; (3) Cobalto (Co). Este elemento participa nos processos de fixação de nitrogênio pela célula; (4) Boro (B). Este elemento faz parte da composição de algumas enzimas utilizadas durante os processos

metabólicos das algas; (5) Vanádio (V) que, funciona como estimulante ao crescimento de organismos algáceos dulcícolas; (6) Zinco (Zn) o qual, é utilizado pelas algas como componente estrutural de enzimas e co – fator; (7) Cobre (Cu), que participa no processo de transporte de elétrons na fotossíntese; e (8) Selênio (Se), o qual é um elemento essencial para o crescimento microalgal (LOURENÇO, 2006).

Os macronutrientes são nutrientes que desempenham funções essenciais ao longo dos processos metabólicos das algas como, por exemplo, serem constituintes estruturais abundantes de biomoléculas e de membranas, por participarem de processos de trocas gasosas e por regularem atividades metabólicas dentre outras funções relevantes e por isso devem está dispostos em maior quantidade no meio de cultura (LOURENÇO, 2006).

Os elementos que compreendem esta categoria são: (1) Carbono (C), que é um componente que está relacionado a todas substancia orgânicas sintetizadas pelas células, pode ser considerado um fator limitante em cultivos quando estes se encontram densos, inviabilizando o crescimento satisfatório da cultura. A aeração com CO₂ é um método que e empregado como forma de proporcionar fontes de carbono ao cultivo; (2) Hidrogênio (H), o qual é um elemento que é adquirido por meio da molécula de água nas reações primarias da fotossíntese. Sendo assim não é considerado um fator limitante; (3) Oxigênio (O), que é um elemento essencial para as atividades respiratórias e processos que demandam energia; (4) Nitrogênio (N), o qual é um constituinte estrutural de proteínas, ácidos nucleicos e pigmentos fotossintetizantes. Sendo assim o nitrogênio é um componente essencial do metabolismo primário desses organismos; (5) Fósforo (P), que é um elemento que está associado a processos que envolvem trocas energéticas das células; (6) Enxofre (S) o qual, é um importante componente estrutural de diversas enzimas e também funciona como co – fator; (7) Potássio (K), este elemento tem a função de regulação osmótica, e controle de pH interno; (8) Magnésio (Mg), elemento constituinte da molécula de clorofila e está associado à ativação de varias enzimas; (9) Silício (Si), que é utilizado em altas concentrações por diatomáceas já que este elemento é o componente principal de suas frústulas; e (10) Ferro (Fe), um elemento importante, por participar de vias biossintéticas da clorofila e dos citocromos (ESTEVES, 1998; LOURENÇO, 2006).

No cultivo de microalgas alguns elementos estão sempre em circulação no meio de cultura como, por exemplo, o carbono e o hidrogênio. Porém, elementos como o fósforo e o nitrogênio podem ser tornar fatores limitantes ao crescimento das algas, uma vez que a velocidade de crescimento da cultura diminui na ausência destes elementos (LOURENÇO, 2006).

Vários estudos estão sendo realizados associando os nutrientes limitantes e o estresse que eles podem provocar no metabolismo das microalgas. Além disso, esses trabalhos mostram quais são as possíveis respostas que esses organismos demonstram ao passar por certas perturbações e que tipos de componentes específicos podem ser produzidos como, por exemplo, os lipídeos, após a sua exposição em um meio de cultura que apresente a deficiência de algum nutriente essencial (GREENE; GEIDER; FALKOWSKI, 1991; LOURENÇO, 2006).

Estudos realizados por Santos, Macedo e Alegre (2003), Grant (2001), Alonso e outros (2000) mostram que a diminuição de nitrogênio pode acarretar um aumento no conteúdo lipídico da microalga. Assim como trabalhos realizados por Lombardi, Wangerski (1991) revelam que a deficiência de fósforo afeta a quantidade de lipídeos produzidos, uma vez que a limitação deste nutriente direciona o metabolismo da microalga para a produção de triglicerídeos saturados.

3 METODOLOGIA

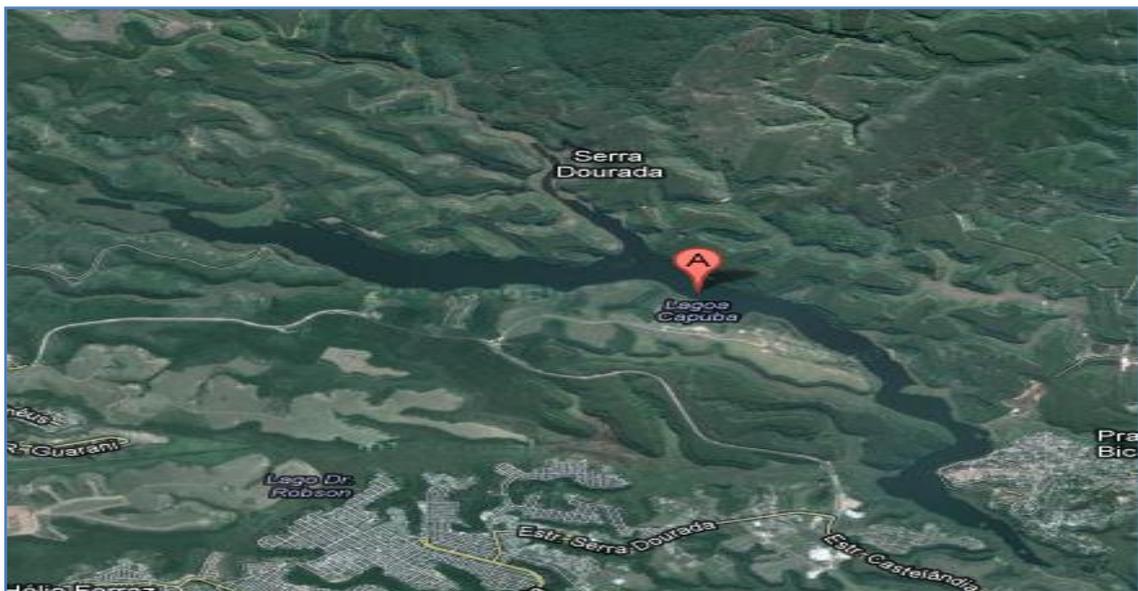
3.1 ECOSSISTEMA DE ORIGEM

A Lagoa Juara faz parte da bacia hidrográfica do rio Jacaraípe, localizada no município da Serra (22°10'S e 40°13'W). Esta região apresenta clima tropical quente e úmido com temperatura em torno de 24°C. Este ecossistema costeiro apresenta grande importância socioeconômica regional e, por estar localizada em uma área urbana, vem sendo submetida a diferentes formas de impactos antrópicos, como por exemplo, lançamentos de efluentes domésticos “*in natura*” nos córregos afluentes(OLIVEIRA, 2011).

Um estudo anteriormente realizado na lagoa Juara com a comunidade fitoplanctônica (OLIVEIRA, 2011), evidencia que a lagoa apresenta uma grande biodiversidade, havendo um destaque para a presença constante de representantes da Classe Chlorophyceae nas amostras, organismos potencialmente produtores de lipídeos.

Sendo assim, a partir do exposto acima, em setembro de 2012 foram coletadas amostras de água da lagoa Juara (Figura 02) para o isolamento de diversos organismos algáceos para a realização de testes, com o intuito de explorá – las bioquimicamente e metabolicamente, em prol de maior produção de lipídeos.

Figura 02 – Lagoa Juara, Serra – ES.



Fonte: Google Maps, (2013).

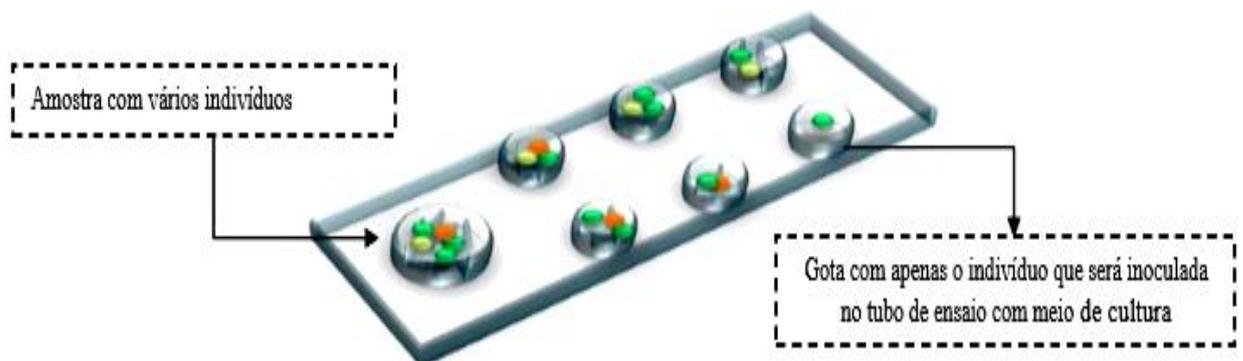
3.2 ISOLAMENTO

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 com o objetivo de se obter uma amostra concentrada (BICUDO; MENEZES, 2006). As amostras coletadas foram 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. Esta técnica é imprescindível para separar a alga do seu meio natural (LOURENÇO, 2006). E consiste na análise de uma pequena alíquota da amostra coletada na lagoa Juara em microscópio óptico (Olympus CX-41). Com o auxílio de uma pipeta Pasteur de vidro, previamente reduzida a um capilar, uma pequena quantidade da amostra contendo a alga de interesse é transferida para outra gota contendo somente meio de cultura (LOURENÇO, 2006).

Esse processo deve ser realizado de forma sucessiva até que se tenha na gota apenas um único indivíduo da espécie de interesse (Figura 03). Por fim, o indivíduo é inoculado em um microtubo de plástico (ependorf), com capacidade de 2 mL, contendo 1mL de meio nutritivo previamente esterilizado (LOURENÇO, 2006).

Figura 03 - Técnica de isolamento por diluições sucessivas.



Fonte: Vicius et al., [20--].

Após a inoculação da espécie isolada, realiza-se um período de incubação de alguns dias ou semanas, em eppendorfs mantidos em estufas sob condições controladas (temperatura de $\pm 22^{\circ}\text{C}$ e intensidade luminosa de ± 3500 lux),

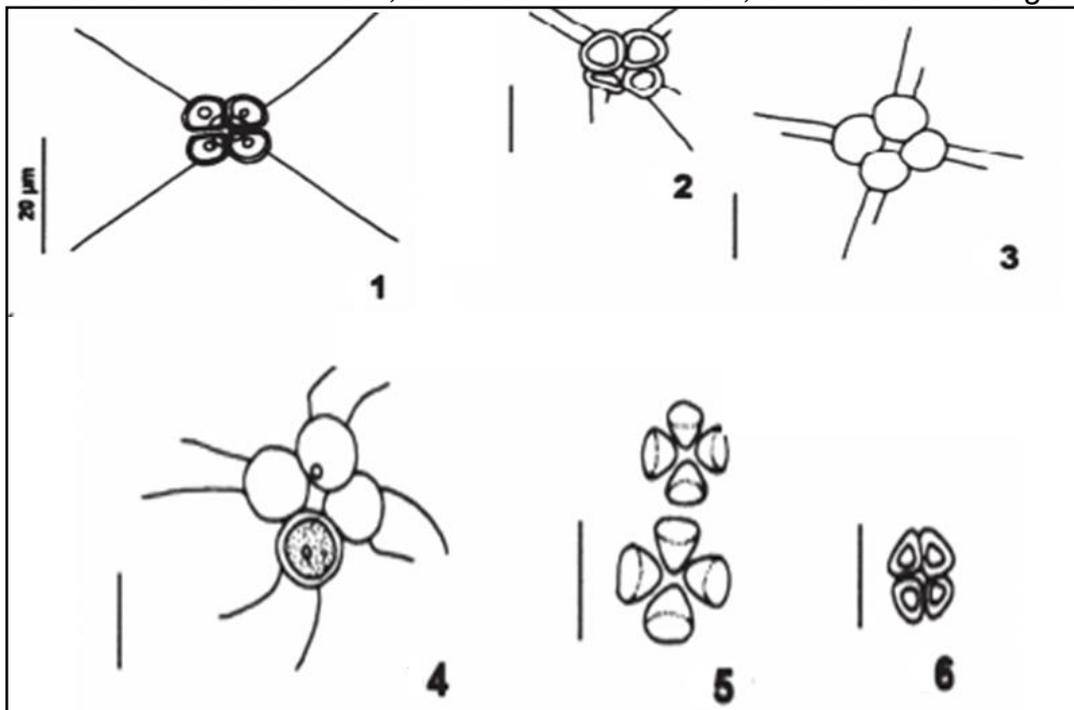
tornando a multiplicação do indivíduo viável e permitindo assim a confirmação do isolamento (LOURENÇO, 2006).

Esse método garante a formação de uma cultura unialgal, ou seja, todos os indivíduos são geneticamente semelhantes entre si. Esse tipo de cultura é ideal, pois todos os indivíduos devem se comportar de maneira semelhante a diferentes condições gerando resultados mais homogêneos (LOURENÇO, 2006).

3.3 MICROALGA ISOLADA

O táxon que foi isolado para a realização deste experimento pertence ao gênero *Tetrastrum* Chodat (1985) (Figura 04) que apresenta as seguintes características: Indivíduos coloniais, composta por quatro células dispostas de modo a formar um quadrado ou um losango. As células podem ser elipsoidais, mais ou menos triangulares ou cordiformes e possuem de um a quatro espinhos na parte livre. O cloroplasto varia de um a vários e pode ou não ter presença de pirenóides mais ou menos centrais (BICUDO; MENEZES, 2006).

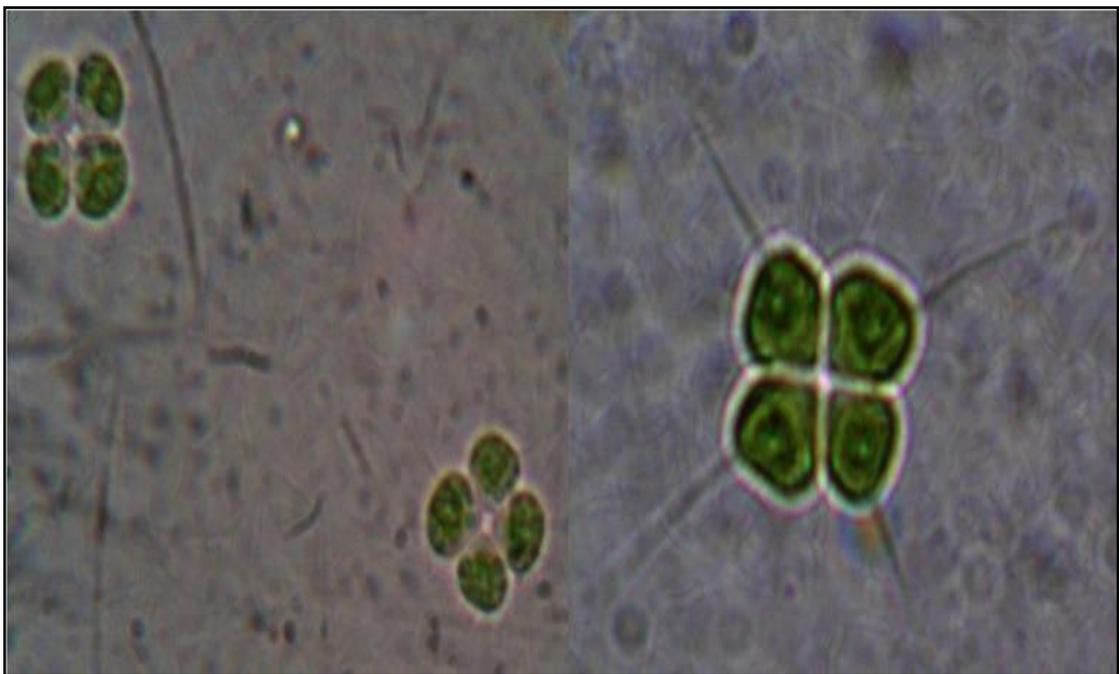
Figura 04 – Espécies pertencentes ao gênero *Tetrastrum*: 1. *Tetrastrum elegans*, 2-4. *Tetrastrum heteracanthum*, 5. *Tetrastrum komarekii*, 6. *Tetrastrum triangulare*.



Fonte: Godinho, González e Bicudo, (2010).

A microalga isolada *Tetrastrum heteracanthum* (Nordstedt) Chodat 1895 (figura 5) é uma espécie que se difere das demais espécies do gênero devido apresentar dois espinhos de tamanhos diferentes dispostos na margem livre de cada uma das 4 células que formam o cenóbio. Apresenta também um cloroplasto por célula e um pirenoide central por cloroplasto, estrutura utilizada para armazenar amido (GODINHO; GONZALES; BICUDO, 2010).

Figura 05 - Foto de *Tetrastrum heteracanthum* em microscópio óptico com aumento de 1000X.



Fonte: Arquivo próprio.

3.4 CARACTERIZAÇÃO DO MEIO DE CULTURA

Neste experimento todos os meios de cultura utilizados são considerados definidos, pois foram preparados a partir de água destilada e foram adicionados constituintes nutricionais (elementos químicos) como modo de enriquecer a água destilada, para estimular o crescimento das microalgas (LOURENÇO, 2006).

Para a realização deste experimento foram utilizados três meios de cultura ASM1 (tratamento A), CHU (tratamento C) e BBM (tratamento B) (Tabela 1, 2 e 3), sendo que os meios BBM e CHU são considerados meios próprios para algas que pertençam a Classe Chlorophyceae como é o caso de *T. heteracanthum*, uma vez que os mesmos apresentam concentrações de diferentes componentes químicos

necessários para um ótimo crescimento microalgal. Já o meio de cultura ASM1, de acordo com a literatura, é um meio próprio para cianobactérias, Entretanto testes que expõem microalgas a este meio nutricional estão obtendo resultados satisfatórios.

Tabela 1– Composição e concentração das soluções-estoque do meio ASM1.

Solução Estoque A	Peso (g)		Para cada litro de ASM -1
NaNO ₃ /NH ₄ Cl ₂	1,70		
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,41	Completar para 200 mL	20 mL
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,49		
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,29		
Solução Estoque B			
K ₂ HPO ₄	0,87	Completar para 100 mL	4 mL
Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O	1,33		
Solução C			
H ₃ BO ₃	2,48		
MnCl ₂ .4H ₂ O	1,39		
FeCl ₃ .6H ₂ O	1,08	Completar para 100 mL	0,2 mL
ZnCl ₂	0,335		
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,019		
CuCl ₂ .2H ₂ O	0,0014		
Solução D			
EDTA. Na ₂	1,86	Completar para 100 mL	0,8 mL

Fonte: Modificado de Gorhan, Mclachlan e Hammer (1964)

Tabela 2 - Composição e concentração das soluções-estoque do meio CHU.

Composição	mg/ Litro
Água destilada	1 litro
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	20.0
KH ₂ PO ₄	6.0
MgSO ₄ · 7H ₂ O	25.0
Na ₂ CO ₃	20.0
Na ₂ SiO ₃	25.0
HCl (1mol/L 1)	0.25 ml
H ₃ BO ₃	2.5
MnCl ₂ · 4H ₂ O	1.5
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4H ₂ O	1.0
Na ₂ EDTA	2.0
FeCl ₃ · 6H ₂ O	1.0

Fonte: Chu (1942).

Tabela 3 – Composição e concentração das soluções-estoque do meio BBM

	Estoque	Solução estoque	mL/ Litro
Solução 1	KH_2PO_4	8.75 g/500 ml	10ml
Solução 2	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1.25 g/500 ml	10 ml
Solução 3	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3.75 g/500 ml	10 ml
Solução 4	NaNO_3	12.5 g/500 ml	10 ml
Solução 5	K_2HPO_4	3.75 g/500 ml	10 ml
Solução 6	NaCl	1.25 g/500 ml	10 ml
Solução 7	Na_2EDTA	10 g/L	1 ml
Solução 8	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	4.98g/L	1 ml
Solução 9	H_2SO_4		1ml
	Elementos traços		
	H_3BO_3	2.86 g	
Solução 10	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1.81 g	1 ml
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.222 g	
	$\text{Na MoO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.390 g	
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.079 g	
	$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.0494 g	
Solução 11	H_3BO_3	5.75 g/500 ml	0.7 ml

Fonte:Stein (1973).

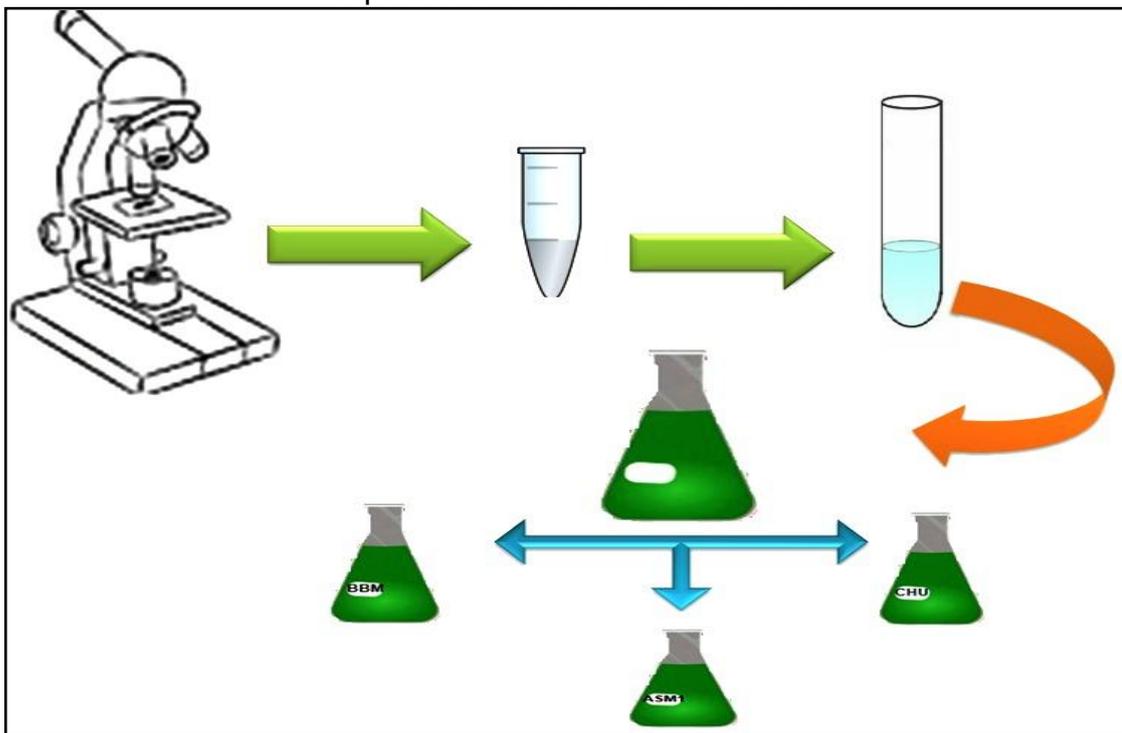
3.5 TIPOS DE CULTIVO

O cultivo realizado neste experimento é conhecido como cultivo em batelada ou estanques. Neste tipo de cultivo as microalgas são inoculadas ao meio de cultura e após a esse processo o mesmo não recebe nenhum outro tipo de nutriente adicional ao logo do crescimento da cultura. A partir do esgotamento dos nutrientes do meio de cultura o cultivo para de crescer. Sendo assim a utilização deste tipo de cultivo permite observar as diferentes fases do crescimento como: a fase de adaptação(indução do crescimento, está fase é marcada pela adaptação das células a um cultivo preexistente), crescimento exponencial (maior taxa de crescimento em curto período), redução do crescimento (durante esta fase ocorre um decréscimo relativo da taxa de crescimento), estacionária (nesta fase o cultivo atinge o rendimento final máximo) e fase de declínio ou senescência (durante esta fase ocorre à lise celular) (LOURENÇO, 2006).

3.6 DELINEAMENTOS EXPERIMENTAIS

Para a realização dos tratamentos foi necessário submeter à cepa aos três meios de cultura (ASM1, BBM e CHU) que compõem este experimento. Esse processo foi necessário, pois permitiu a exposição da cepa aos novos parâmetros da cultura fazendo com que a mesma habitue – se a sua nova condição (Figura 06).

Figura 06 - Esquema demonstrando os processos necessários para a inoculação da cepa aos novos meios de cultura.

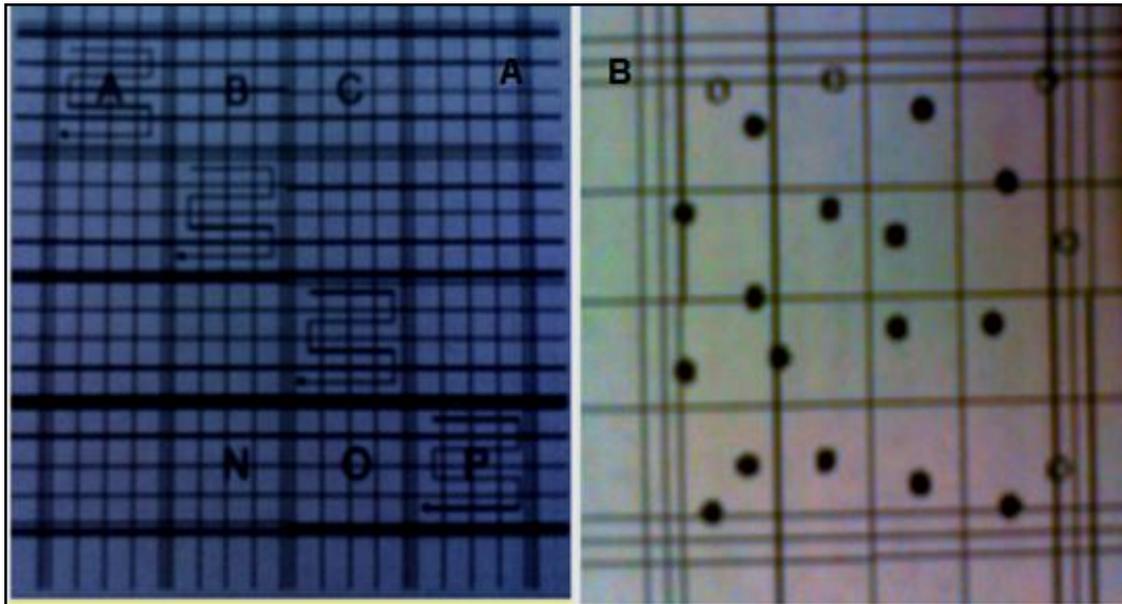


Fonte: Elaboração própria.

Após esse processo foi possível dar início a realização do experimento, já que as cepas recém-inoculadas já estavam habituadas à sua nova condição. Sendo assim, foi realizada a contagem direta das cepas em cada meio de cultura com o auxílio da câmara de Fuchs Rosenthal (Figura 07) por meio do microscópio óptico, sendo necessário contar no mínimo 400 células a partir de um dos 16 quadrados que compõe a câmara. Ao iniciar a contagem recomenda-se um curso contínuo e regular dentro de cada quadrado (Figura 07 – A), por exemplo, a contagem do primeiro quadrado iniciou-se da esquerda para a direita, o segundo quadrado a ser contabilizado também deve seguir deste mesmo modo. E necessário verificar se ao final de cada contagem de um dos 16 quadrados o número de 400 indivíduos foi

atingido, pois e a partir destes valores que aplica - se um fator de multiplicação onde se estima a densidade celular das culturas.

Figura 07 - Câmara de Fuchs Rosenthal: A - Representação esquemática da área de contagem da câmara com 16 quadrados separados por três linhas paralelas; B - Representação do critério de contagem: contar as células que tocam a linha interna na lateral esquerda e superior (bolas pretas) e não se deve contar as células que tocam a linha interna direita e inferior (bolas brancas).



Fonte: Adaptado de Lourenço(2006).

Após determinação da densidade celular das culturas foi inoculado cerca de cem mil células a cada um dos meios nutritivos ASM1, BBM e CHU em erlenmeyers de 1L, previamente esterilizados,todos em triplicata, totalizando nove cultivos que correspondem às unidades experimentais deste estudo. O experimento durou 45 dias como forma de estabelecer as melhores respostas em relação ao aumento de biomassa.

Para a realização deste estudo foi necessário à utilização de câmara incubadora que se encontram no (LATEAC- UFES). Os inóculos foram mantidos a uma temperatura de $22 \pm ^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 12h de claro/escuro e uma intensidade luminosidade de aproximadamente (3500 lux) e pH no início no experimento em torno de 7,0 e 7,05 (Figura 08).

Figura 08 – Inóculos mantidos em condições controladas na câmara incubadora.



Fonte: Arquivo próprio.

3.7 AVALIAÇÕES DO CRESCIMENTO

Avaliação do crescimento das cepas nas diferentes unidades experimentais foi realizada através da densidade óptica, peso seco.

3.7.1 Densidade óptica

A utilização deste método baseia-se em avaliar o crescimento da biomassa por meio da obstrução física da luz pelas células. Sendo assim quanto maior for a quantidade de células presentes na minha amostra maior será a absorção de luz (absorbância). Para se mensurar a densidade celular por meio deste método utiliza-se um equipamento denominado espectrofotômetro (LOURENÇO, 2006).

3.7.1.1 Espectrofotometria

Devido às microalgas apresentarem pigmentos fotossintetizantes, para a utilização deste método, com a finalidade de determinar a densidade celular nas unidades experimentais, foi necessário utilizar o comprimento de onda de 570 nm, pois este comprimento situa-se numa faixa distante de absorção máxima de luz por clorofilas e carotenoides (LOURENÇO, 2006).

A partir do dia zero foram realizadas coletas diárias de alíquotas de 10 mL em todas as três unidades experimentais. A leitura da amostra foi realizada em duplicata para a obtenção de uma média por meio do espectrofotômetro que consiste na técnica de avaliar o crescimento da microalga de acordo com a absorção de luz (LOURENÇO, 2006).

Apesar de ser uma metodologia prática para o cultivo, as informações são limitadas, pois células mortas ou fragmentadas exercem obstrução da luz da mesma forma que as células vivas, por isso é necessário somar à essa metodologia a contagem direta por meio do microscópio óptico utilizando a câmara de Fuchs Rosenthal, que permite quantificar o número de células algáceas presente em certa unidade de volume (LOURENÇO, 2006).

3.7.2 Peso Seco

A análise da massa seca é mais um método que determina o crescimento do cultivo microalgal ao longo dos dias. Para se estimar o peso seco das culturas foi utilizado o processo de filtração, que consiste na retenção de células, por meio de uma membrana porosa. Este processo permite determinar o volume equivalente do cultivo a partir da biomassa concentrada no filtro (LOURENÇO, 2006).

A cada cinco dias a partir do dia zero ao longo do estudo foram retirados uma alíquota de 15 mL para posterior filtragem com a finalidade de determinar o peso seco dos tratamentos testados durante os 45 dias.

Os 15mL retirados das três unidades experimentais são filtrados a vácuo através de filtros de microfibras de vidro com diâmetro de 47 mm e poros de 0,7 μm (Figura 09). Os filtros foram previamente secos em estufa a 60°C por 24 horas e

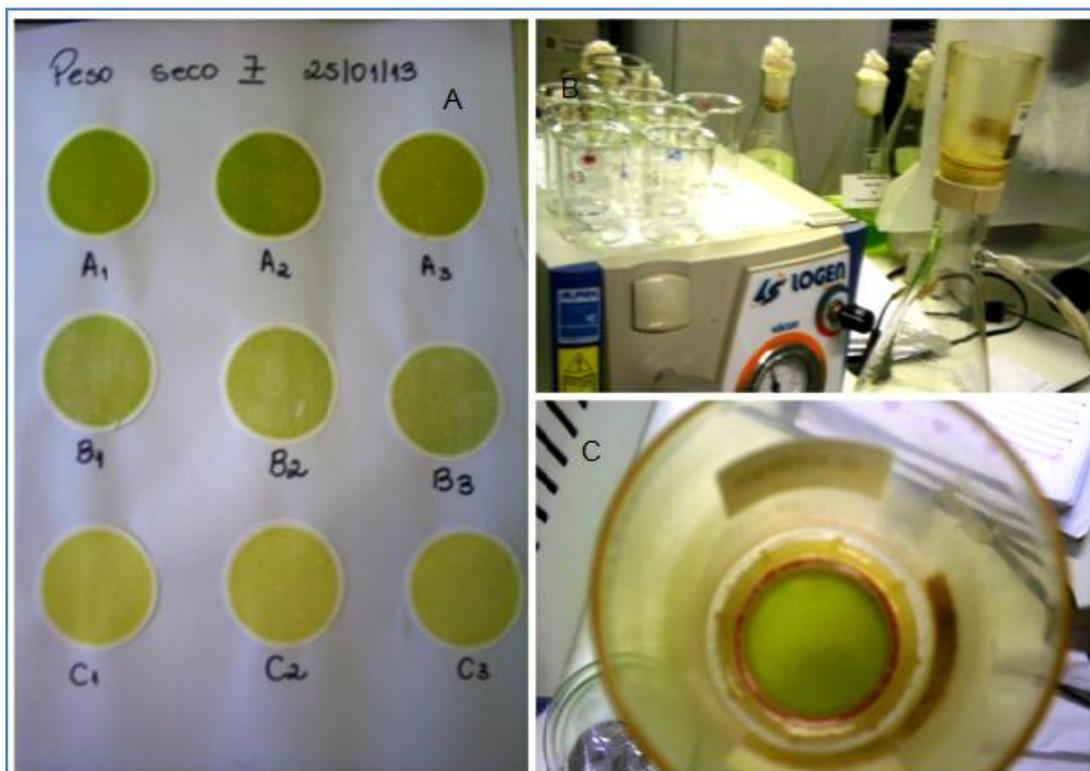
antecipadamente pesados. Após a filtração esses filtros foram secos novamente e mantidos a mesma temperatura, de 60°C até estabilização do peso. A massa seca foi obtida por meio da subtração do peso final com o peso inicial do filtro sendo que seus valores foram expressos em mg/L conforme descritos por Lourenço (2006).

$$PS = Pf - Pi / V$$

Onde:

PS: Peso seco; **Pf:** Peso final, **Pi:** Peso inicial e **V:** Volume filtrado.

Figura 09 - Processo de filtração do peso seco. (A - Diferença na coloração dos filtros após o processo de secagem e filtração; Em B - materiais utilizados no processo de filtração: bomba a vácuo, kitassato e funil de Buchner; C - filtro no interior no kitassato após a filtração).

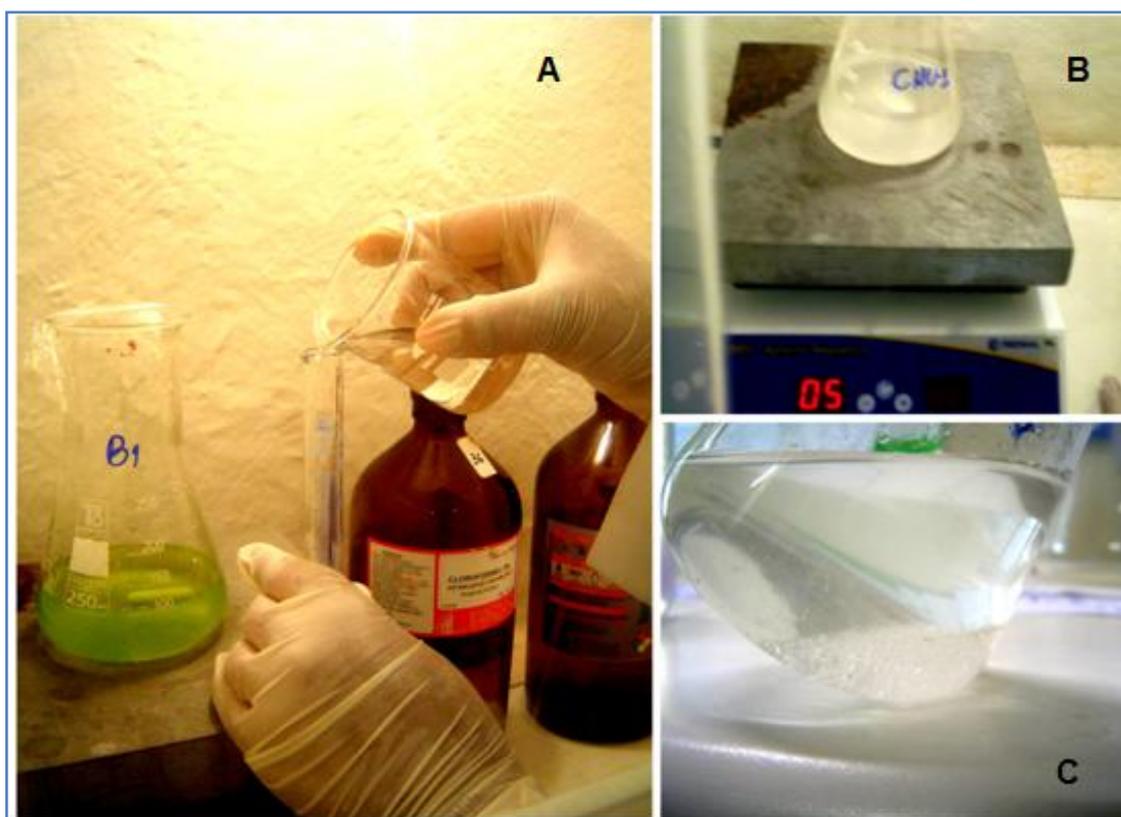


Fonte: Arquivo próprio.

3.8 EXTRAÇÃO DE LÍPIDEOS TOTAIS

A extração de lipídios totais foi realizada com base no protocolo descrito primariamente por Bligh e Dyer (1959). Onde foi retirada uma alíquota de 15 mL nas três unidades experimentais e posteriormente foi adicionado 2 mL de metanol e 1 mL de clorofórmio, numa proporção de 2 : 1. A mistura foi agitada em um vortex por 2 minutos e mantida por 24 horas a uma temperatura de 22 °C. Passada às 24 horas adicionou-se mais 6,666 mL de clorofórmio à mistura, sendo a mesma foi agitada em vortex por mais 1 minuto. A utilização do clorofórmio associado ao metanol permite a formação de duas fases, onde o conteúdo lipídico fica separado do resto da mistura (Figura 10).

Figura 10 - Extração de lipídeos. (Em A - o clorofórmio sendo adicionado; B - mistura sendo agitada; C - formação de um sistema bifásico).



Fonte: Arquivo próprio.

3.9 CENTRIFUGAÇÃO

No final da fase exponencial do crescimento, o cultivo passou por um processo denominado centrifugação onde ocorre a separação das partículas em suspensão (células) do meio de cultura. O impacto gerado nas células por meio da força centrífuga faz com que as partículas se deslocam para o fundo do frasco e sedimentam ao fim deste processo (Figura 11). O produto deste procedimento é um agregado de microalgas que foram depositadas em placas de petri mantidas congeladas no ultra freezer com a finalidade de conservar a biomassa (LOURENÇO, 2006).

Figura 11 - Processo de centrifugação. (A e B cubetas sendo levadas a centrifuga; C - deposição da cultura no fundo das cubetas após a centrifugação).



Fonte: Arquivo próprio.

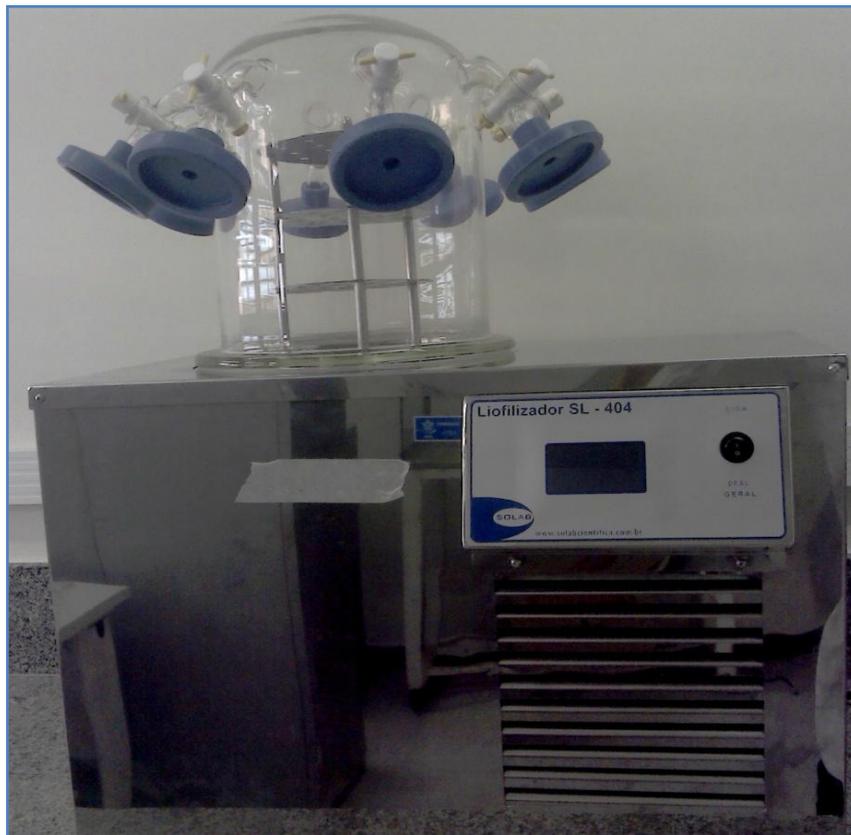
3.10 LIOFILIZAÇÃO

A liofilização é um processo de conservação da biomassa para posterior análise química lipídica da amostra. Após a centrifugação a biomassa passou por um

processo de congelamento e posteriormente foi levado ao liofilizador (Solab, modelo SL – 404 Figura 12). Por meio de um forte vácuo a água é retirada das amostras congeladas, pelo processo de sublimação tornando – as, secas sem qualquer dano às substâncias contidas nas células (LOURENÇO, 2006).

Ao término deste processo as microalgas assumem um formato de pó permitindo assim análises químicas do seu conteúdo lipídico (LOURENÇO, 2006).

Figura 12 - Liofilizador.



Fonte: Arquivo próprio.

3.11 PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS E ANÁLISE DOS TEORES DE ÉSTERES

Durante a realização deste experimento o Laboratório de Taxonomia e Ecologia de Algas Continentais (LATEAC) e o prédio do setor Botânica, onde o laboratório está localizado, atravessou um processo de reforma estrutural. Sendo assim, para a realização deste experimento, foi necessário adotar o uso de incubadora para controlar o fotoperíodo e a temperatura, uma vez que esses fatores são fundamentais para o crescimento das microalgas e o laboratório não teria como

disponibilizar um local com esses parâmetros controlados por conta das obras. Devido ao pouco espaço da incubadora para a realização deste experimento adotou-se a utilização de erlenmeyer de 1 litro para cada meio de cultura. Ao término do experimento o volume que constava em cada erlenmeyer não era suficiente para enviar, para o laboratório de Métodos e Extração e Separação (LAMES) localizado na Universidade Federal de Goiás (UFG) uma vez que, para a análise de lipídeos é necessário enviar no mínimo cerca de 2,0 gramas de amostra liofilizada. Por isso, a partir das informações expressas acima, as análises em relação ao conteúdo lipídico de *Tetrastrum heteracanthum* (discutidas adiante) ao longo deste trabalho foram obtidas através de uma amostra que foi cultivada somente em meio ASM1 onde o volume de 5 litros, foi submetido ao processo de centrifugação e liofilização, resultando ao final deste processo 2,5 gramas, quantidade mínima exigida para a realização das análises.

Após a liofilização da amostra, a mesma foi enviada para o laboratório, de métodos de extração e separação também participantes do projeto “Microalgas”, vinculado ao MCT, sob a coordenação do professor Dr. Nelson Roberto Antoniosi Filho onde a aluna mestranda Dayane Cristina Costa realizou as análises do perfil de ácidos graxos.

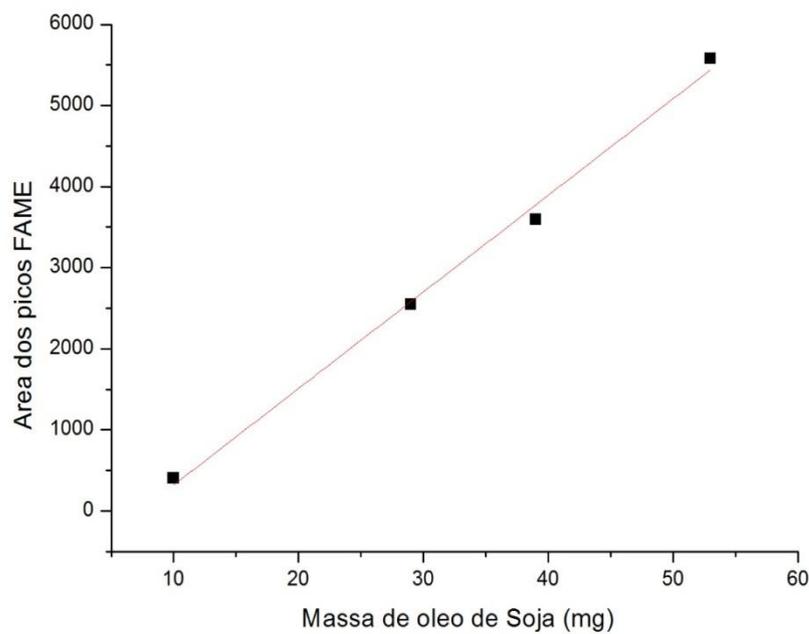
O cálculo dos teores de ésteres das amostras baseou-se na curva de quantificação obtida a partir da somatória da área dos picos de ésteres metílicos de ácidos graxos do óleo de soja.

O óleo de soja refinado foi submetido ao processo de transesterificação direta adaptado para microescala, com massas correspondentes a 10 mg, 20 mg, 30 mg, 40 mg e 50mg pesadas em 5 tubos de ensaio autoclavável. A transesterificação direta é um método que é empregado para aumentar o rendimento de FAME (ésteres metílicos de ácidos gordos), este método tem a vantagem de eliminar etapas de extração e purificação do óleo. Além disso, todos os lipídios de extremidade polar são convertidos a ésteres de ácidos graxos (LABORATÓRIO DE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO E SEPARAÇÃO [20 -- a]).

Após a realização da cromatografia gasosa foi possível determinar os ácidos graxos presentes na amostra. Posteriormente fez-se a somatória das áreas dos picos de ésteres de cada cromatograma para a elaboração da curva. Por fim 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 13)

Figura 13 – Correlação entre a massa de óleo de soja e a área dos picos de FAME.



Fonte: Laboratório de métodos de extração e separação [20 -- b].

Assim, obteve-se uma função matemática que relaciona a massa de óleo da biomassa das microalgas com a somatória da área dos ésteres fornecidos por esta biomassa via transesterificação direta. A equação gerada pela reta está descrita abaixo:

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

Onde:

$$A = \sum \text{Área dos Ésteres}$$

$$X = \text{Massa de óleo (mg)}$$

O valor de massa de óleo obtido pela transesterificação direta (TD) das microalgas e obtida a partir da fórmula acima, onde, foi necessário somar as áreas dos ésteres

de cada amostra e substituir na equação. A partir do valor de massa de óleo foi possível calcular o rendimento (mg de óleo/ g de biomassa).

3.12 INTERPRETAÇÕES DOS RESULTADOS

Por meio dos resultados obtidos através da densidade celular foi possível produzir uma curva de crescimento para cada tratamento. Além de, viabilizar as taxas de crescimento, tempo de duplicação e rendimento máximo das cepas.

A taxa de crescimento (μ) e tempo médio de duplicação (G) foram calculadas segundo as equações descritas por Fogg e Thake (1987). Os cálculos das taxas de crescimento utilizaram como base os valores compreendidos na fase exponencial do crescimento dos tratamentos.

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

Onde:

$$\begin{aligned} \mu &= \text{velocidade específica do crescimento} \\ N_1 \text{ e } N_2 &= \text{número de células nos tempos } t_1 \text{ e } t_2 \end{aligned}$$

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:

$$R = R_1 - R_0$$

Onde:

$$\begin{aligned} R_1 &= \text{número máximo de células/mL} \\ R_0 &= \text{número inicial de células/mL} \end{aligned}$$

4.13 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para as análises estáticas foram aplicados os testes de normalidade e variância, ANOVA e em seguida o teste de Tukey com 5% de significância. Sendo que o teste de Tukey foi utilizado a partir dos resultados positivos obtidos no teste ANOVA. Todas as análises foram feitas comparando os dias isoladamente de cultivo, e o programa utilizado foi Statistica 7.0.

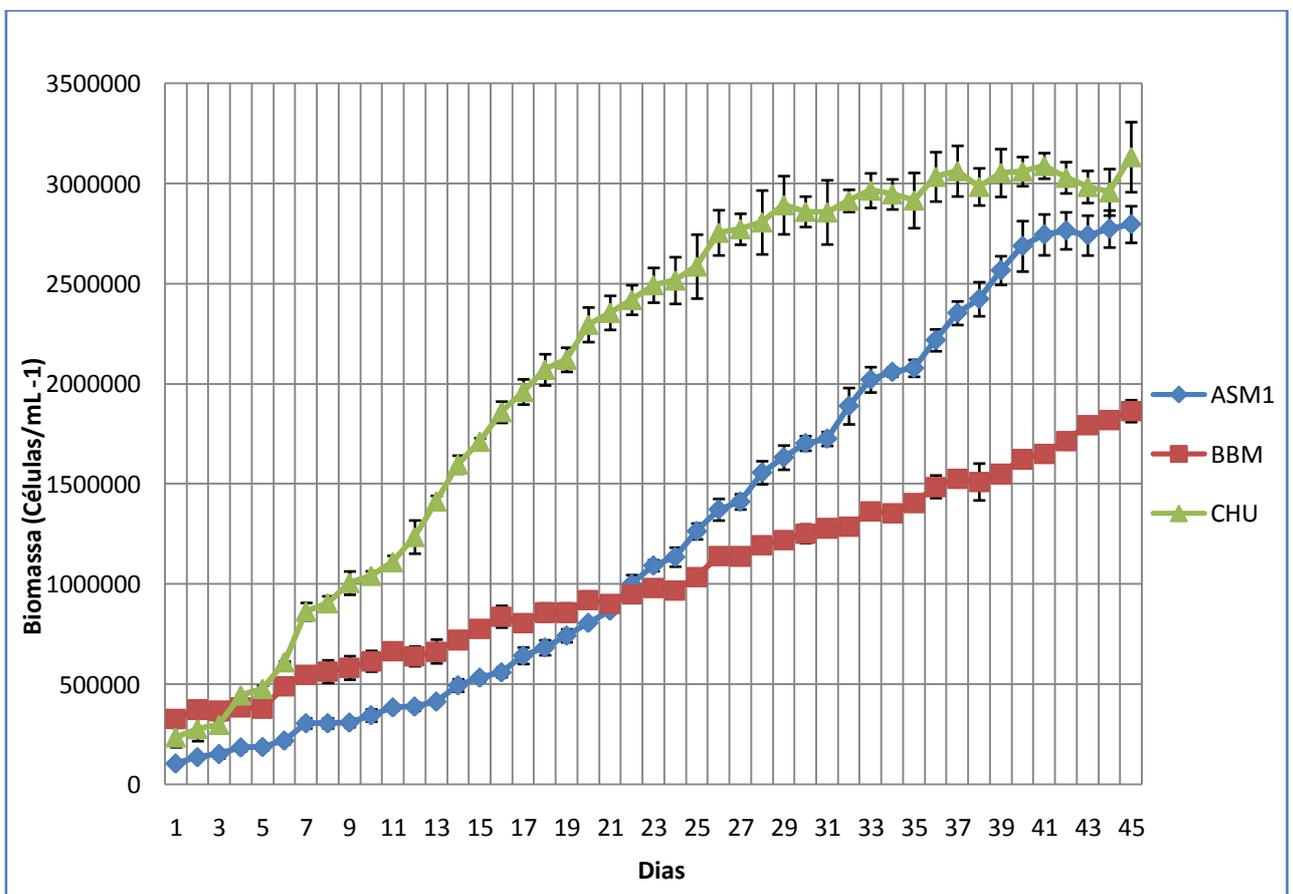
4 RESULTADO E DISCUSSÃO

O crescimento de uma população microalgal pode ser estimado através da curva de crescimento. Sendo assim a curva de crescimento por meio do tempo de cultivo permite observar o período em que se inicia o crescimento da cultura assim como, sua biomassa máxima. Os três meios nutritivos testados (ASM1, BBM e CHU) neste experimento para a microalga *T. heteracanthum* apresentaram diferença significativas em suas curvas de crescimento.

O meio CHU (tratamento C) foi o que obteve o melhor resultado em relação ao crescimento visto que as algas presentes neste meio cresceram mais rápido em menor tempo, seguidos dos meios ASM1 (tratamento A) e BBM tratamento (B).

Os tratamentos C e B apresentaram fase lag (fase de adaptação) até aproximadamente o 6º dia enquanto o meio ASM1 permaneceu nesta fase até o 8º dia de experimento (Figura 14).

Figura 14 - Curva de crescimento (Cél/mL) de *Tetrastrum heteracanthum* em diferentes meios de cultura.



Fonte: Elaboração própria.

Na fase lag pode ocorrer algum tipo de defasagem ao iniciar o crescimento, uma vez que é nesta fase que a cultura recém - inoculada se adapta ao novo ambiente.

Apesar das células do cultivo preexistente terem sido retiradas quando o seu crescimento era considerado exponencial, para a realização de um novo inóculo a fase de indução neste experimento foi considerada longa quando comparadas aos estudos de Vargas (2012) que obteve uma fase de indução quase imperceptível durando apenas 1 ° dia de experimento ao testar o crescimento de *Monoraphidium contortum* no meio ASM 1. Entretanto, no presente trabalho, o tratamento A obteve uma fase de indução de 8 dias e os tratamentos B e C apresentaram uma fase de indução de aproximadamente 6 dias. Este mesmo resultado foi obtido por Tavares (2009) ao realizar testes com *Botryococcus braunii* nos meios CHU e BBM.

A fase exponencial de crescimento (log) é iniciada ao término da fase lag. Esta fase é caracterizada por sucessivas duplicações da biomassa. Dessa maneira, a taxa de crescimento torna-se maior e constante por um curto período. Porém neste trabalho, os tratamentos apresentam fase exponencial longa, uma vez que os tratamentos B e C iniciaram a fase log a partir do 7 ° dia de experimento e esta fase durou até os dias 45 e 40 respectivamente. Este resultado é diferente do registrado por Carolino (2011); Tavares, Ibarra e Fioresi (2009) onde, ao testarem *Scenedesmus* sp. e *Ankistrodesmus fusiforme* no meio BBM e *Ankistrodesmus gracilis* no meio CHU, obtiveram um crescimento exponencial curto que durou do dia 6° ao 8 para as microalgas que foram testadas no meio BBM, enquanto que no meio CHU *A. gracilis* permaneceu nesta fase do dia 5 ao 11 ° dia de experimento. Já o experimento realizado com *Botryococcus braunii* no meio BBM a fase exponencial durou em torno de 40 dias, período equivalente ao experimento com *T. heteracanthum* ao ser testada neste mesmo meio de cultura (TAVARES, 2009).

Vargas (2011), ao testar *Monoraphidium contortum* no meio ASM 1, conseguiu uma fase log curta durando aproximadamente 10 dias. Entretanto, no presente experimento *Tetrasthium heteracanthum*, ao ser testada no meio artificial ASM1, apresentou fase exponencial longa, uma vez que o cultivo entrou nesta fase a partir do 9° dia e se manteve em crescimento exponencial até o fim do experimento.

Os dados deste experimento foram considerados paramétricos, pelo teste de normalidade e através do teste ANOVA seguido pelo teste de Tukey, foi possível determinar diferenças significativas entre os três tratamentos, sendo que o

Tratamento C variou de B a partir a partir do 6º dia e se manteve diferente deste, sempre em maior concentração de células por mL, até o final do experimento.

Ente os tratamentos A e B a variação só se tornou significativa a partir do 7 ° dia, pois foi neste período que o tratamento B iniciou sua fase log. Porém entre os dia 19 ao dia 24 os tratamentos A e B não obtiveram diferença significativa, isso deve - se ao fato de que durante este período ambos os meios estavam desenvolvendo valores equivalente de crescimento algal.

A partir do dia 25 até o termino do experimento os tratamentos A e B voltaram a apresentar diferença significativa em relação ao crescimento de *Tetrastrum heteracanthum*. Em relação aos tratamentos A e C a diferença significativa iniciou a partir do 5º dia e permaneceu até o fim deste trabalho.

Os cálculos de taxa de crescimento, tempo de duplicação e rendimento máximo, foram obtidos durante a fase exponencial de crescimento dos tratamentos A, B e C (Tabela 4), onde a densidade celular máxima resulta do maior número de células/mL, assim como a velocidade de crescimento representa o número de divisões celulares da população por unidade de tempo (divisões por dia).

Tabela 4 - Valores da taxa de crescimento (μ), tempo de duplicação (G) e rendimento máximo (R) para a cultura de *Tetrastrum heteracanthum* submetido a diferentes meios de cultura.. * Tratamentos com médias não seguidas pela mesma letra diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

	(μ)	(G)	(R)
A	0,056408 a	12,31984132 a	271,7 x 10 ⁴ a
B	0,039519 b	17,563686 b	167,7 x 10 ⁴ b
C	0,071541 c	9,698291 c	292,0 x 10 ⁴ c

Fonte: Elaboração própria.

O tratamento C apresentou a maior taxa de crescimento ($\mu = 0,071541$), em relação aos demais tratamentos, que apresentaram a taxa de crescimento de $\mu = 0,056408$ e $\mu = 0,039519$ para os tratamentos A e B respectivamente. Porém, Tavares (2009) utilizando o meio CHU no cultivo de *Botryococcus braunii*, inicialmente obteve uma

alta taxa de crescimento em relação ao meio BBM, mas a partir do 20º dia a taxa de crescimento da estirpe que estava presente no tratamento CHU atenuou - se e relação ao meio BBM.

As taxas de crescimento registradas durante este experimento mostram que a microalga *Tetrasthurm heteracanthum* apresenta um crescimento lento em relação aos resultados obtidos por Tavares, Ibarra e Fioresi (2009) e Santos (2011) onde ao testarem *A. gracilis* e *Ankistrodesmus* sp. nos meios ASM1 e CHU apresentaram taxas de crescimento de 0,40 e 0,26 respectivamente.

Quanto ao tempo de duplicação, o tratamento C apresentou o menor valor ($G = 9,698291$) do que os tratamentos A e C ($G = 12,31984132$ e $17,563686$), ou seja, a taxa de crescimento aumenta devido à interação da linhagem da microalga em questão, com o meio de cultura, resultando então em mudanças expressivas na densidade celular à medida que o tempo de duplicação diminui.

Porém, os valores obtidos em relação ao tempo de duplicação para *T. heteracanthum* são considerados altos, quando são comparados com os estudos de Tavares, Ibarra e Fioresi (2009) que registraram um tempo de duplicação de 0,40 para *A. gracilis*, e Quevedo (2008) que apresentou um tempo de 0,492 para *Scenedesmus* sp..

O tratamento C registrou os maiores valores de rendimento máximo, onde $R = 292,0 \times 10^4$ cel/mL (valor obtido no ultimo dia de experimento), enquanto os tratamentos A e B apresentaram $R = 271,7 \times 10^4$ e $167,7 \times 10^4$ respectivamente ao final do experimento.

Silva (2006) ao realizar ensaios com *Chlorella vulgaris* no meio BBM, obteve um rendimento máximo de $10,6 \times 10^6$ cels. mL⁻¹ em 7 dias de experimento. Bertoldi, Anna e Oliveira (2008) que ao realizar experimentos com a mesma alga no meio BBM registraram resultados similares ($10,6 \times 10^6$ cél/mL⁻¹). A similaridade dos resultados obtidos em ambos os experimentos deve-se provavelmente ao fato, dos mesmos terem utilizados a mesma intensidade luminosa 11.100 lux com fotoperíodo de 24 hs. Da mesma maneira, Carolino (2011) que em seu experimento com *A. fusiformes* e *Scenedesmus* sp. ambas cultivadas no meio BBM, sob uma intensidade luminosa de 7.400 lux, e fotoperíodo contínuo, a uma temperatura de 25 ± 2 °C, obteve um rendimento máximo de $1,01 \times 10^7$ cél mL⁻¹ e $3,57 \times 10^7$ cél mL⁻¹ respectivamente.

T. heteracanthum apresentou valores de rendimento máximo relativamente baixo ($167,7 \times 10^4$ cél mL⁻¹) quando comparados com esses trabalhos, uma vez que, está estirpe presente no meio BBM estava em condições de cultivo com 3.500 lux e fotoperíodo de 12/12 hs. Sendo assim, o rendimento baixo de *T. heteracanthum* provavelmente pode estar envolvido com a intensidade luminosa e ao tempo de exposição da cepa ao fotoperíodo, uma vez que, os resultados registrados, pelos outros trabalhos, obtiveram rendimentos superiores devido suas condições de cultivo apresentarem uma intensidade luminosa alta e fotoperíodo contínuo .

Tavares, Ibarra e Fioresi (2009) em seu experimento com *A. gracilis* no meio CHU e Santos (2011) com *Ankistrodesmus* sp. no meio ASM1 registraram um rendimento máximo de $447,93 \times 10^5$ cél mL⁻¹ e $14,3 \times 10^6$ cél mL⁻¹ respectivamente. *Chlorella vulgaris* no experimento realizado por Ferreira (2012) com meio ASM1, obteve um rendimento máximo de $6,0 \times 10^7$ cél mL⁻¹ em quatro dias de experimento. Todos esses trabalhos apresentaram rendimentos superiores aos testes realizados com *T. heteracanthum* nos meios ASM1 e CHU, uma vez que ambos registram $271,7 \times 10^4$ cél mL⁻¹ e $292,0 \times 10^4$ cél/mL respectivamente no último dia de experimento.

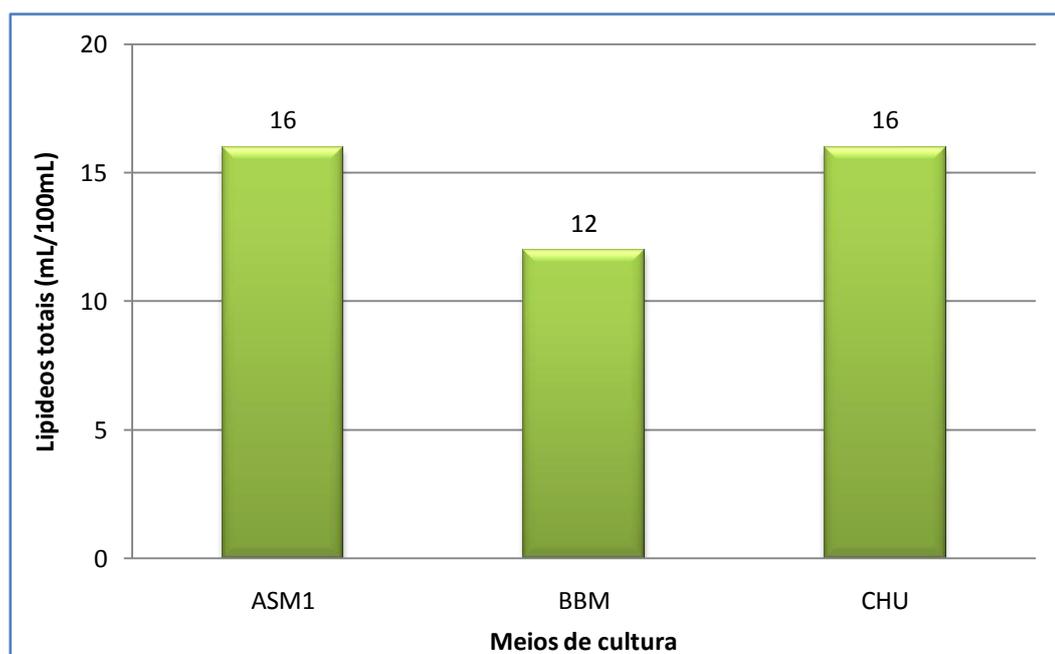
Esses resultados alcançados por *T. heteracanthum*, provavelmente se deve ao fato, desta ter sido cultivada a uma intensidade luminosa de 3500 lux enquanto que nesses outros trabalhos citados, as estipes ficaram expostas a uma intensidade luminosa de 14800 lux, sendo assim a intensidade luminosa que os tratamentos A, B e C estavam expostos em relação aos experimentos acima citados e cerca de 11800 lux de diferença.

Santos (2011) em outro experimento, onde o mesmo testava as concentrações de fosfato (10 e 50 %) no meio ASM1 utilizando novamente *Ankistrodesmus* sp. registrou os seguintes resultados $6,85 \times 10^6$ cél mL⁻¹ e $3,54 \times 10^6$ cél mL⁻¹ respectivamente.

Apesar das baixas concentrações de fosfato adicionadas ao meio, o que implica em mudanças fisiológicas nas células do cultivo e, conseqüentemente na sua biomassa, os resultados de rendimento máximo obtidos por Santos (2011) foram maiores dos que obtidos neste trabalho com *T. heteracanthum* este fato pode ser explicado por diferenças no ciclo de vida e morfologia da alga citada. Li xin *et al*, (2010) ao testar *Scenedesmus* sp. obteve o mesmo resultado que Santos, (2011) ao diminuir as concentrações de fósforo no meio de cultura.

Quanto aos resultados obtidos por meio da extração de lipídeos totais o tratamento C apresentou 16 mL e os tratamentos A e B obtiveram 16 mL e 12 mL respectivamente (Figura 15), não havendo diferenças significativas nos resultados dos três tratamentos testados.

Figura 15 - Gráfico mostrando a quantidade de lipídeos totais nos diferentes tratamentos.

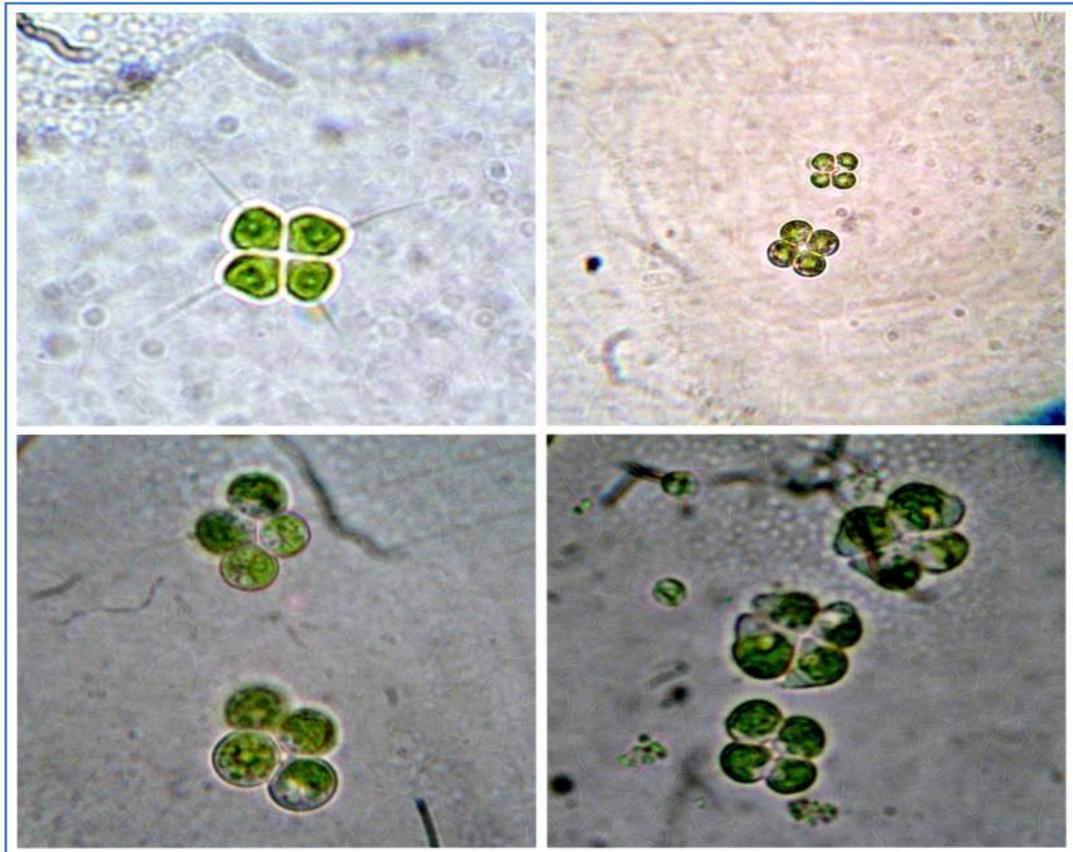


Fonte: Elaboração própria.

Tavares (2009) no experimento com *Botryococcus braunii* obteve um rendimento de lipídeos totais de 36% no meio CHU e 18% no meio BBM. Entretanto neste experimento todos os tratamentos não obtiveram diferenças significativas em relação ao seu teor de lipídeos totais.

O que se pode inferir é que, apesar dos diferentes tratamentos terem apresentado quantidades distintas de células, não houve variação na quantidade de lipídeos totais extraído nas três unidades experimentais ao término deste experimento. É provável que este resultado seria diferenciado se as células presentes nos meios BBM e ASM – 1 chegassem à fase estacionária, uma vez que esta fase é caracterizada pelo aumento nas concentrações de lipídeos no interior das células.

Figura 16 – Formato da colônia durante a exposição nos meios de cultura ao longo dos dias.



Fonte: Arquivo próprio.

Ao fim do experimento (DIA 45), nenhum tratamento chegou à fase de senescência, somente as estirpes presentes no meio CHU próximo aos 40 dias de experimento, demonstraram uma coloração mais amarelada em relação aos outros tratamentos.

O meio CHU é considerado um meio mais pobre em relação à disposição de nitrogênio e, mas este meio apresenta em sua composição amônio elemento este que é absorvido facilmente pelos organismos algáceos devido não haver a necessidade de ser reduzido para as demais formas químicas do nitrogênio. Sendo assim, o crescimento por parte das células que se encontram neste meio é favorável já que o nitrogênio é um constituinte de diversas substâncias do metabolismo primário como, por exemplo, pigmentos fotossintetizantes que estão relacionados diretamente ao crescimento desses organismos (LOURENÇO, 2006).

O meio BBM em relação ao meio CHU apresenta concentrações de nitrogênio maiores, sendo que este fica disposto na forma de sais de nitrato como forma de fornecer nitrogênio a cultura. O nitrato diferentemente do amônio, necessita ser

assimilado isto é sofrer redução para as demais formas químicas do nitrogênio, sendo assim o resultado obtido por *T. heteracanthum* exposto a este meio de cultura em relação a estirpe exposta ao tratamento C pode ter sido mais lento devido as células presentes no tratamento B ter que assimilar este composto primeiro.

O tratamento C foi o único que ao final do experimento apresentou uma cor verde amarelada, essa coloração pode está associada a disposição do nutriente em relação ao crescimento da cultura, uma vez que ao se torna um fator limitante as células do cultivo passam a produzir mais teores de carotenoides enquanto as concentrações de clorofila tende a diminuir provocando uma mudança de cor na cultura que passa a ter um aspecto verde amarelado(LOURENÇO, 2006).

De forma geral as culturas apresentaram-se saudáveis durante todo o experimento, sendo observada uma coloração verde claro nos três tratamentos no início do ensaio, e com o passar dos dias houve uma mudança gradual na tonalidade de verde claro para escuro em todas as unidades experimentais. Possivelmente essa alternância na coloração de verde claro para escuro pode estar ligada ao suprimento abundante de nitrogênio ou também ao maior numero de células no meio e ao aumento nas concentrações de clorofila da célula, uma vez que com a diminuição deste componente na cultura, aumenta a quantidade de carotenoides e conseqüentemente a cultura adquire uma cor amarelada (LOURENÇO, 2006).

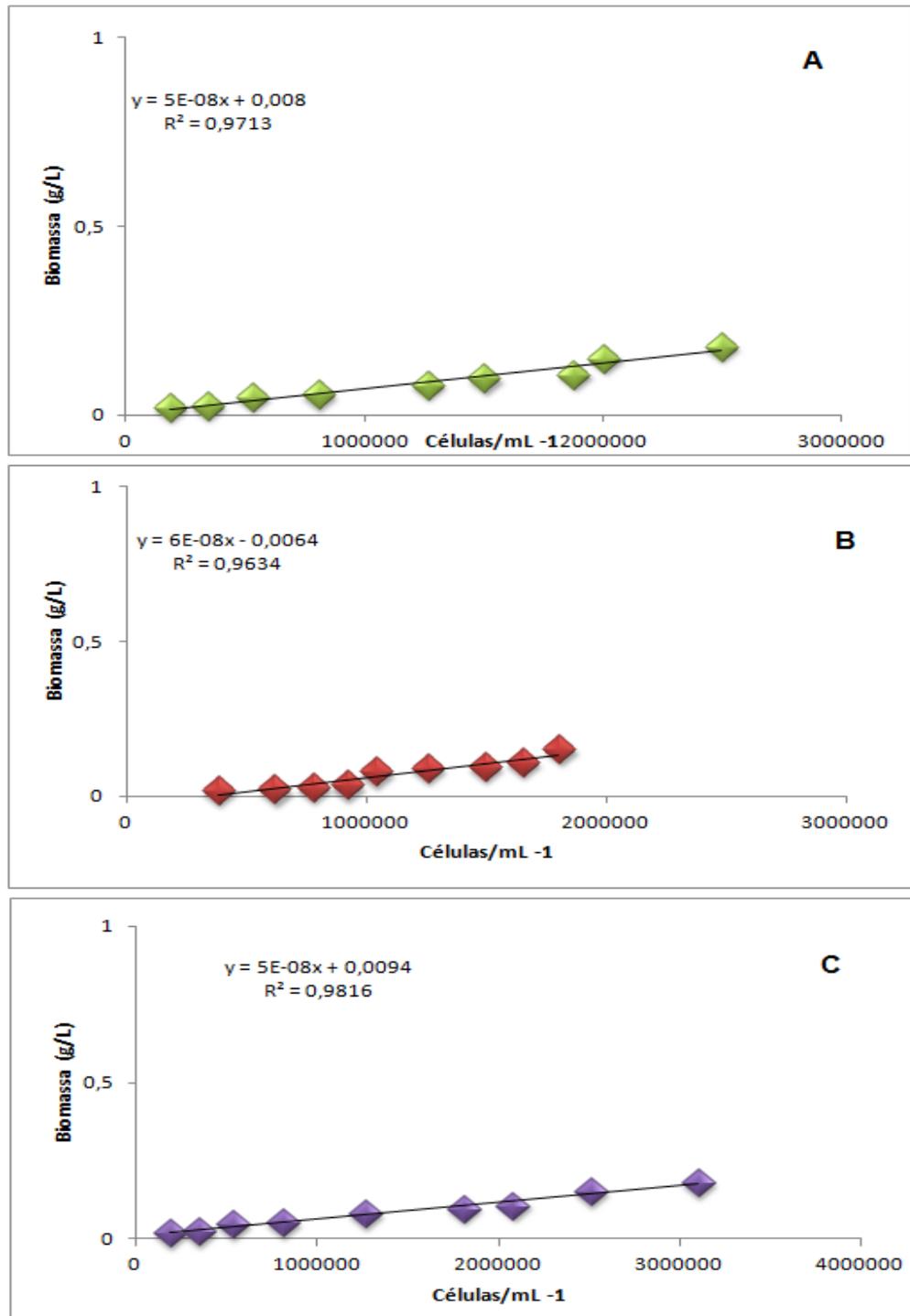
As colônias de *T. heteracanthum* apresentaram no início do experimento colônia com 4 células, um pirenoide na maioria das células mais ou menos central e a presença de espinhos de tamanhos diferentes dispostos na margem livre de cada uma das 4 células(GODINHO; GONZALES; BICUDO, 2010).Nos dias finais do experimento foi observado que as células de *T. heteracanthum* apresentavam formatos mais globulares em sua parede celular, perca dos espinhos e formavam grandes aglomerados (Figura 16).

Em relação ao peso seco a Figura 17 representa similaridade entre os valores obtidos de peso seco aos de valores de células / mL em todas as unidades experimentais.

Os valores de R^2 foram 0,9713, 0,9634 e 0,9816 para os tratamentos A, B e C respectivamente, deste modo os dados de peso seco em relação aos valores de células / mL são lineares tal qual, o valor R^2 menor que 0,95 evidenciando uma falta

de linearidade uma a partir dos dados relacionados. Portanto a partir dos valores obtidos de R^2 pode - se inferir que quanto maior for a quantidade de células/mL maior será o peso seco (Figura 17).

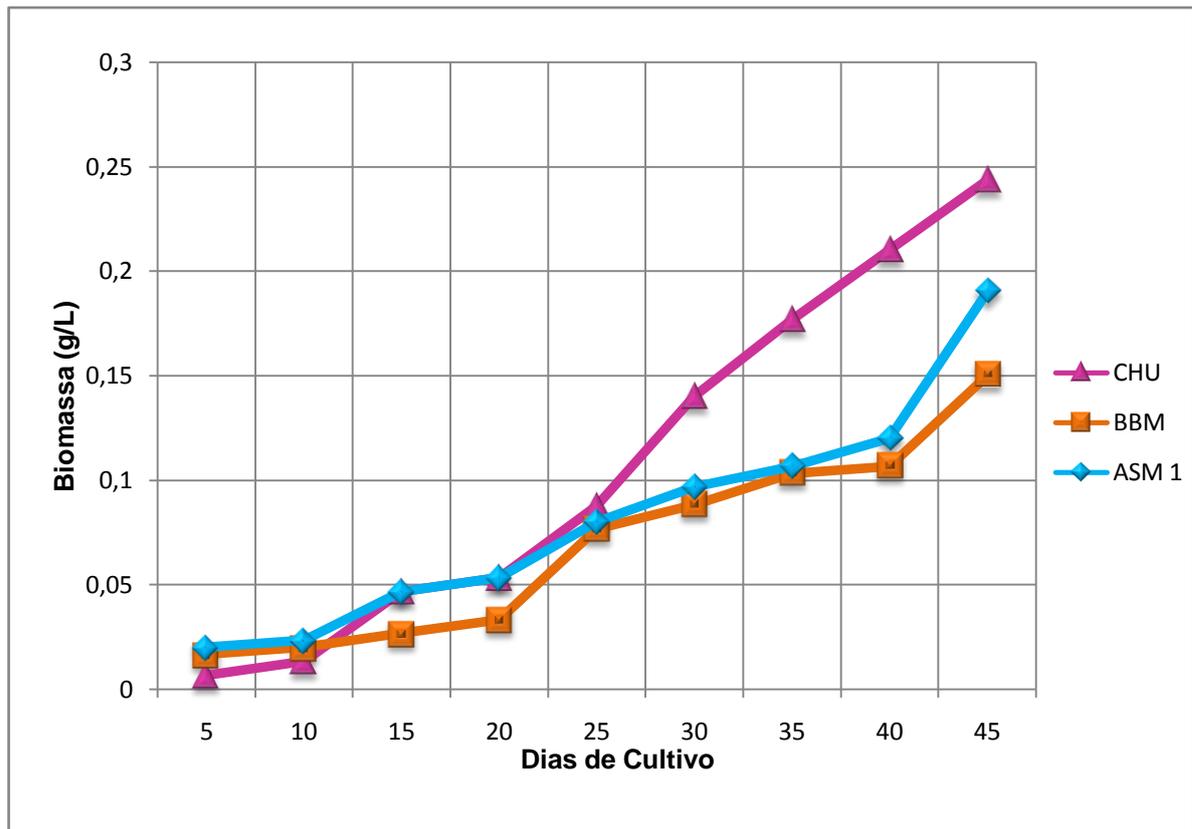
Figura 17- Relação linear entra peso seco e cél/mL^{-1} dos três meios de cultura ASM1 (A); BBM (B) e CHU (C).



Fonte: Elaboração própria.

O resultando obtido de peso seco é equivalente ao que foi encontrado na curva de crescimento, sendo que o meio CHU obteve o maior resultado, seguido dos meios ASM1 e BBM, como mostra a Figura 18.

Figura 18 - Gráfico mostrando a densidade celular em (g/L) de *Tetrastrum heteracanthum* relacionando os diferentes meios de cultura em função dos dias.



Fonte: Elaboração própria.

Tetrastrum heteracanthum cultivada no meio ASM1 obteve 0,19 g / L de massa seca em 45 dias de experimento, em compensação *Ankistrodesmus* sp. cultivada no meio ASM1 apresentou uma massa seca de 0,78 g / L em 19 dias de experimento (SANTOS, 2011). Carolino (2011) registrou peso seco máximo de 1 g / L para *A. fusiformis*, alga está pertencente ao mesmo gênero que Santos (2011) testou de no meio BBM em 18 dias de experimento. Já *T. heteracanthum* em nossos experimentos neste mesmo meio obteve um peso seco final de 0,15 g / L.

Tavares (2009), ao testar *Botryococcus braunii* nos meios CHU e BBM, obteve 0,88 e 1,86 g / L respectivamente. Diferentemente do trabalho de Tavares (2009) a estirpe presente no meio CHU foi a que obteve os melhores resultados em relação ao peso seco, onde está apresentou ao final do experimento 0,24 g / L de massa seca. Além

disso, Tavares (2009) observou em seu experimento que as estirpes presentes no meio CHU passaram a apresentar uma cor mais amarelada ao iniciarem a fase estacionária. O mesmo aconteceu neste experimento, onde o tratamento C apresentou uma coloração mais amarelada ao iniciar esta fase.

As coincidências de coloração em ambos os meios ao iniciar esta fase, provavelmente podem estar envolvidas, devido o meio CHU ser um meio mais pobre em nitrogênio, e apresentar em uma parte da sua composição íons de amônio. Esta forma iônica é mais facilmente absorvida pelas células, pois não necessita ser reduzida sendo, portanto, energeticamente mais econômica (LOURENÇO, 2006).

Illman e outros (2000) no seu estudo com *Chlorella vulgaris* em meios de macrófita + NPK e CHU 12 com teores de nitrato e nitrito reduzidos obteve ao fim do ensaio um rendimento de lipídico de 50%.

O déficit de nitrogênio implica em uma menor divisão celular, visto que a quantidade de clorofila diminui, acarretando em uma menor biomassa. Entretanto vários autores acreditam que uma grande demanda metabólica para um elevado conteúdo lipídico requer crescimento lento.

Várias condições são importantes para avaliar se determinada matéria – prima pode ser utilizada para a produção de biodiesel. No caso das microalgas avalia-se o rendimento obtido a partir da transesterificação direta (teor de ésteres e os tipos de ácidos graxos) que compõem as amostras.

Para se obter o rendimento em óleo por grama de biomassa microalgal é necessário relacionar a massa de óleo obtido pela massa de biomassa pesada. A partir deste cálculo obteve - se o rendimento ésteres metílicos de ácidos graxos de *T. heteracanthum*, que registrou 339,9 mg por grama de biomassa (Tabela 5). Enquanto que a soja, a partir deste mesmo processo, apresenta 196,9 mg de ésteres por grama de biomassa seca.

Menezes e outros (2012) ao testar *Choricystis* sp. no meio WC sob intensidade luminosa de 22,200 lux, em fotoperíodo de 12/12h e com temperatura em torno de 23° C obteve um rendimento de ésteres metílico de 422,9 mg por grama de biomassa. Apesar do resultado registrado por Menezes e outros (2012) ter sido maior do que o obtido por *Tetrastrum heteracanthum*, ambas as microalgas

apresentaram um rendimento superior ao da soja a qual é a oleaginosa mais utilizada para produção de biodiesel no Brasil.

Tabela 5- Rendimento em óleo de *Tetrastrum heteracanthum*.

Microalga	Massa biomassa pesada (mg)	Rendimento (mg de óleo/ g de biomassa)	Rendimento (%)
<i>T. heteracanthum</i> – ASM1	100,1	339,9	3,4

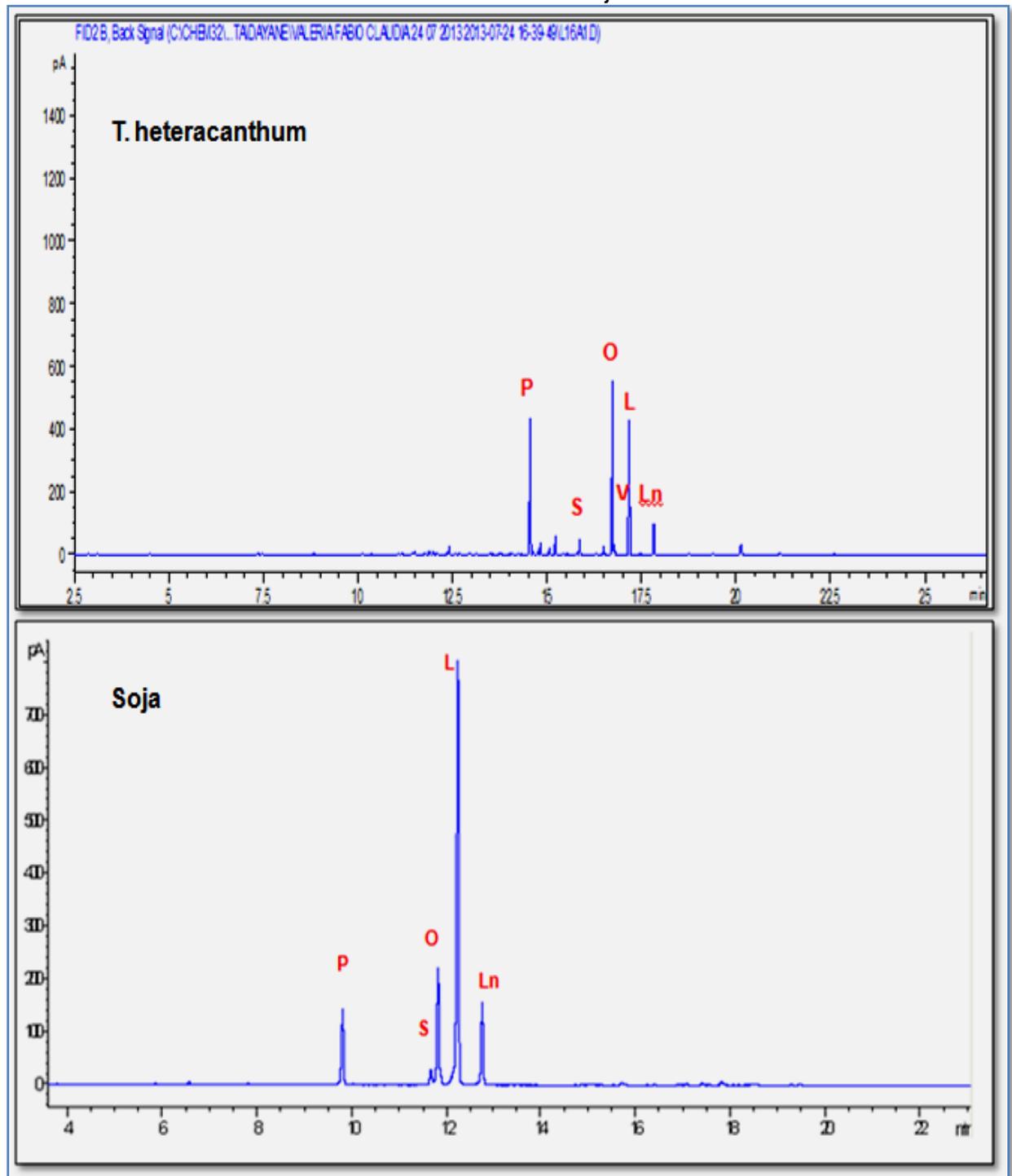
Fonte: Laboratório de Síntese e Análise ([20—c]).

Com relação aos teores de ésteres e composição de ácidos graxos é necessário que este óleo atenda os parâmetros exigidos nas normas internacionais, bem como aos teores de ácidos insaturados, especialmente tri e poli insaturados. Além disso, devem-se levar em consideração algumas propriedades físicas do biodiesel a partir do óleo de microalgas como, por exemplo, a combustão, densidade, viscosidade, a corrosividade, o ponto de fulgor e o nível de cetano (MENEZES et al., 2012).

O perfil de ácidos graxos, tanto da microalga *T. heteracanthum* quanto da soja podem ser observados a partir da Figura 19.

O óleo de soja apresenta varias similaridades em relação à composição do óleo extraído de *T. heteracanthum* (Figura 19). Porém as diferenças de ambos os óleos estão associados ao tempo de retenção, no teor percentual dos ácidos graxos e na presença de alguns ésteres metílicos na composição do óleo algaceo.

Figura 19 – Cromatograma dos ácidos graxos do óleo da microalga *T. heteracanthum* a soja.



Fonte: Laboratório de métodos de extração e separação ([20—d]).

Mediante as análises foi possível gerar a Tabela 6 com a composição de ésteres e o tempo de retenção do óleo extraído de *T. heteracanthum* e da soja respectivamente.

Tabela 6 – Composição de ésteres metílicos a parti da extração do conteúdo lipídico de *T. heteracanthum* e da soja.

<i>T. heteracanthum</i>				
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

Soja				
Tempo de Retenção (min)	Símbolo	Éster Metílico do Ácido Graxo	Notação Taquigráfica	Teor (%)
9,8	P	Palmitico	C16:0	10,3
11,8	S	Esteárico	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 ([20—e]).

O óleo de *Tetrastrum heteracanthum* é constituído basicamente pelo ácido Palmítico (teor de 24,6 %) e Esteárico (1,6%) que são os ácidos graxos saturados (SFA), enquanto que a soja os teores desses mesmos ácidos correspondem a 10,3% para o Palmítico e 2,2% Esteárico (Tabela 6). A soja apresenta cerca de 17,1% de teor de ácido oléico, enquanto *T. heteracanthum* exibiu um percentual 33,0% para este mesmo ácido. Ou seja, o teor lipídico deste ácido é quase 16 % maior em relação à soja. Quanto aos ácidos graxos diinsaturados (DUFA) e triinsaturados (TUFA) *T.*

heteracanthum apresenta cerca 25,9% que corresponde ao teor de ácido Linoléico (DUFA) e 6,4% para o ácido linolênico (TUFA) enquanto que a soja apresenta para os respectivos ácidos 59,7% e 10,7%. Por fim, os poliinsaturados (PUFA) apresentam o teor de 2,4% na composição deste óleo.

Menezes e outros (2012), ao analisar a composição de ácidos graxos das microalgas verdes *Monoraphidium komarkovae*, *Tetranephris brasiliensis* e *Kirchneriella irregular*, observaram que essas microalgas apresentavam teores elevados de ácidos como, por exemplo, o palmítico, oleico e linolênico, enquanto que os ácidos esteárico e linoleico demonstraram menores proporções. Já *Tetrastrum heteracanthum* apresentou algumas similaridades em relação aos resultados obtidos por Menezes e outros (2012). Entretanto, as menores proporções de teores de ácidos encontrados foram esteárico e linolênico (Tabela 6), sendo que este foi encontrado em maiores proporções na composição das algas citadas acima. As diferenças na composição dos óleos podem estar associadas tanto nas condições de cultivo onde as microalgas foram cultivadas, quanto à diferentes linhagens que levam a produção de óleos com características muito diversas (PEREIRA et al., 2012).

Pequeno (2010), ao avaliar o teor de ácidos graxos da cianobactéria *Arthrospira platensis* e microalga verde *Chlorella* sp. obteve elevados teores de ácidos saturados como por exemplo o palmítico e palmitoléico. Tang e outros (2011), ao testar a microalga verde *Dunaliella tertiolecta* e Menezes e outros (2012) ao testar as microalgas *Monoraphidium komarkovae*, *Tetranephris brasiliensis* e *Kirchneriella irregulari* obtiveram resultados semelhantes quanto ao teor de ácidos saturados em torno de 28,8 e 28,7% respectivamente. *Tetrastrum heteracanthum*, em relação ao teor de saturação dos ácidos esteáricos, apresentou cerca de 26,8% (Tabela 6). Todos os resultados obtidos em relação à saturação são relativamente altos, ou seja, altos teores de (SFA) favorecem a estabilidade oxidativa do biocombustível.

Em relação ao teor de ácidos insaturados no experimento, Tang e outros (2011) em seu trabalho com *Dunaliella tertiolecta*, obteve um total de insaturações de 37,4% já *T. heteracanthum* apresentou um total de 73,2% (Tabela 7). As insaturações reduzem a viscosidade do biodiesel e estão relacionadas ao desempenho do biocombustível a frio, uma vez que as insaturações dos ésteres provenientes do óleo

melhoram as propriedades de entupimento do filtro (LOPES et al., 2008 ; Menezes et al., 2012).

Tabela 7 -Teores totais de ácidos graxos saturados (SFA), monoinsaturados (MUFA), diinsaturados (DUFA), triinsaturados (TUFA) e poliinsaturados (PUFA) de *Tetrastrum heteracanthum*.

Microalga	SFA (%)	MUFA (%)	DUFA (%)	TUFA (%)	PUFA (%)
	26,8	35,5	28,3	7,0	2,4

Fonte: Laboratório de métodos de extração e separação ([20—f]).

Os valores obtidos dos teores de ésteres monoinsaturados por Menezes e outros (2012) registraram em testes com *Choricystis* sp. 39,0%, *Tetrastrum heteracanthum* apresentou valores próximos em relação a *Choricystis* sp, sendo que o percentual encontrado de ésteres monoinsaturados para *Tetrastrum heteracanthum* foi de 35,5 % (Tabela 7).

No experimento de Gouveia e Oliveira (2008) a microalga verde *Scenedesmus obliquus* obteve um bom valor de TUFA apresentando um percentual de 3,76%. Já *T. heteracanthum* apresentou um percentual de 7,0% quanto aos teores de TUFA (Tabela 7), enquanto que no experimento de Menezes e outros (2012) as microalgas *M. komarkovae* e *T. brasiliensis* registraram um teor de 14,7 e 15,6% respectivamente. O resultado obtido por *T. heteracanthum* em relação ao teor de TUFA está em concordância com o teor máximo estabelecido pela EN 14214, que diz que os ácidos triinsaturados devem apresentar teor máximo de 12%.

Em relação aos teores de (PUFA) *K. lunaris* no experimento de Menezes e outros (2012) apresentou teor de 1,3%, enquanto *T. heteracanthum* obteve um teor de 2,4% (Tabela 7), sendo assim é necessário que *T. heteracanthum* tenha seus valores de (PUFA) reduzidos, uma vez que os parâmetros estabelecidos pela norma EN 14214 determina que o limite máximo de ácidos graxos com mais de três duplas ligações (PUFA) seja de 1%, visto que os baixos teores de di, tri e poli-insaturados favorecem algumas das propriedades físicas do biodiesel, tais como o ponto de entupimento e a viscosidade.

Os valores de PUFA encontrado nos óleos das microalgas podem ser modificados a parti de mudança nas condições de cultivo, uma vez que fatores como, nutrientes,

temperatura e luminosidade levam a produção de óleos com características muito diversas. Hu e Gao (2006), ao cultivar *Nannochloropsis oculata*, sob diferentes condições de cultivo obteve uma composição lipídica diferenciada em detrimento aos diversos parâmetros em que a alga foi testada.

É importante destacar que a maioria dos trabalhos com Chlorophyceae apresentados nesta discussão, incluindo este experimento, foram realizados, com temperaturas entre 22° a 25°C, que é considerada ótima para o crescimento dessas microalgas. Meinerz e outros (2009) ao realizar um experimento com a microalga *T. weissflogii* sob diferentes condições de temperatura observou que a absorção de nutrientes está diretamente relacionada com a temperatura que o cultivo fica exposto. Esses fatores implicam na redução da taxa de crescimento e divisão celular das cepas.

Portanto, a disponibilidade de nutrientes é apenas um entre vários fatores que influenciam no conteúdo lipídico, ou seja, por mais que os nutrientes dispostos no meio seja um fator limitante, para um ótimo crescimento das microalgas é interessante que esses fatores sejam comparados com outras variáveis como temperatura e pH.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O meio CHU mostrou contemplar de forma abrangente as necessidades nutricionais de *Tetrastrum heteracanthum* minimizando os custos para seu cultivo.

Com este experimento provou-se que o melhor meio de cultura para o crescimento de *Tetrastrum heteracanthum* foi o meio CHU, pois este meio possibilitou um crescimento mais rápido em menor tempo da alga em questão. Entretanto a hipótese de que somente nos meios próprios para clorófitas elas teriam um melhor crescimento foi contraposta tendo em vista que, as microalgas expostas no meio ASM 1 obteve melhor crescimento do que as estirpes expostas ao meio BBM que na literatura e referenciado como um meio próprio para Chlorophyceae.

Com relação às análises lipídicas *Tetrastrum heteracanthum* mostrou ser uma microalga promissora para a produção de biodiesel uma vez que, obteve um bom rendimento em óleo, se comparado aos resultados registrados a partir do óleo de soja atual planta utilizada como matéria prima para a produção de biodiesel. Entretanto é necessário que os valores de (PUFA) seja reduzido para que seu uso esteja de acordo com as normas EN14214.

Sendo assim este estudo propõe que *Tetrastrum heteracanthum* seja testada com certas modificações no meio de cultura para que os valores de PUFA reduzam, e seu perfil de ácidos graxos se torne adequado para produção de biodiesel.

REFERENCIAS

- AGÊNCIA NACIONAL DE ENERGIA ELÉTRICA. **Lei Nº 11.097, de 13 de Janeiro de 2005.** Brasília: ANEEL, 2005. Disponível em: <www.aneel.gov.br/cedoc/blei200511097.pdf>. Acesso em: 20 ago. 2013.
- AGENCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS. Resolução ANP nº 7 de 19 de março de 2008. DOU 20 de março de 2008. Disponível em: <http://www.ellopuma.com.br/pdf/resolucao_anp_n7_de_19.3.2008_dou20.3.2008.pdf>. Acessado em: 20 ago. 2013.
- ALONSO, D. L. et al. Acyl lipid composition variation related to culture age and nitrogen concentration in continuous culture of the microalga *Phaeodactylum tricorutum*. **Photochemistry**, [SI], n. 54, p. 461 – 471, 2000.
- 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 (Programa de pós-graduação de Pesquisa e Engenharia)- Instituto Alberto Luiz Coimbra da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.
- 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**, [SI], v. 38, n. 1, 2008.
- BERTOLDI, F. C.; ANNA, E. S.; OLIVEIRA, J. L. B. Teor de clorofila e perfil de sais minerais de *Chlorella vulgaris* cultivada em solução hidropônica residual. **Ciência Rural**, [S.I.], v. 38, n 1, p.54 - 58, 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.; *Can. J. Biochem. Physiol*, [S.I.:s.n.], p. 911, 1959.
- BOLD, H. C.; WYNNE, M. J. Introduction to the algae: Structure and reproduction. **Prentice-Hall**, [SI], p. 720, 1985.
- CAROLINO, L. R. V. **Cultivo de microalgas unicelulares para determinação da produção lipídica e sequestro de carbono.** 2011. 79 f. Dissertação de mestrado (Programa de pós-graduação de Biologia Celular e Biotecnologia) - Departamento de Biologia vegetal da Universidade de Lisboa, Lisboa, 2011.
- CARVALHO, J. R. M. **Desenvolvimento e Análise Energética do Processo de Obtenção do Biodiesel de Microalga por Metanólise in situ.** 2009. 99 f. Dissertação de mestrado (Programa de pós-graduação do Cento de Engenharia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.
- CHU, S. P. The influence of the mineral composition of the medium on the growth of planktonic algae.Part I. Methods and culture media.**J. Ecol**, [S.I.], p. 284-325, 1942.
- DEMIRBAS, A. Progress and recent trends in biodiesel fuels. **Elsevier**, Trabzon, p.14 - 34, 01 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.

ESTEVEZ, Francisco de Assis. **Fundamentos em Limnologia**. 1. ed. Rio de Janeiro: Interciência, 545 p. 1998.

ESTEVEZ, Francisco de Assis. **Fundamento de limnologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Interciência, 791 p. 2011.

FOGG, G. E.; THAKE, B. **Algae Cultures and Phytoplankton Ecology**. 3 ed. London: University of Wisconsin Press, p. 269, 1987.

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 Scenedesmeceae). **Hoehnea**, São Paulo, p.513-533, 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, 2007.

GORHAM, P. R.; MCLACHLAN, R. W.; HAMMER, U. T. **Isolation and culture of toxic strains of Anabaena**. *Int. Ver. Theor. Angew. Limnol. Verh.* v. 19, p. 796–804, 1964.

GOUVEIA, L.; OLIVEIRA, A. C. Microalgae as raw material for biofuels production. **J Ind Microbiol Biotechnol**, [S.l.], p. 269 – 274, 2008.

GRANT, Coral. **Characteristics of nitrogen- and iron-limited growth in the diatom *Phaeodactylum tricorutum*, and in natural phytoplankton population**. 2001. Thesis Doctor in Philosophy - University of Auckland, 2001.

GREENE, R. M.; GEIDER, R. J.; FALKOWSKI, P. G. Effect of iron limitation on photosynthesis in a marine diatom. **Limnol Oceanogr**, [S.l.], v. 8, n. 36, p. 1772 – 1782, 1991.

HU, H., GAO, K.; Response of growth and fatty acid compositions of *Nannochloropsis* sp. to environmental factors under elevated CO₂ concentration. **Biotechnology Letters**, v. 28, p. 987-992, 2006.

ILLMAN, A.M.; SAAGG, A.H.; SHALES, S.W. Increase in *Chlorella strains* calorific values when grown in low nitrogen medium. **Enzyme Microb**, [S.l.], p. 631- 635, 2000.

KNOTHE, G. Perspectivas históricas de los combustibles diesel basados em aceites vegetales. **Revista A&G**, [S.l.], v. 47, n. 2, 2001.

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 de mestrado (Programa de pós-graduação em Tecnologia e Meio Ambiente)- Instituto de Engenharia Do Paraná - IEP, Curitiba, 2010.

LABORATÓRIO DE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO E SEPARAÇÃO. **Análise dos teores de ésteres e do perfil de ácidos graxos em microalgas da UFES.** Goiânia: UFG, [20 -- a].

LABORATÓRIO DE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO E SEPARAÇÃO. **Correlação entre a massa de óleo de soja e a área dos picos de FAME.** Goiânia: UFG, [20 -- b].

LABORATÓRIO DE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO E SEPARAÇÃO. **Rendimento em óleo de *Tetrastrum heteracanthum*.** Goiânia: UFG, [20 -- c].

LABORATÓRIO DE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO E SEPARAÇÃO. **Cromatograma dos ácidos graxos do óleo da microalga *T. heteracanthum* e a soja.** Goiânia: UFG, [20 -- d].

LABORATÓRIO DE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO E SEPARAÇÃO. **Composição de ésteres metílicos a parti da extração do conteúdo lipídico de *T. heteracanthum* e da soja.** Goiânia: UFG, [20 -- e].

LABORATÓRIO DE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO E SEPARAÇÃO. **Teores totais de ácidos graxos saturados (SFA), monoinsaturados (MUFA), diinsaturados (DUFA), triinsaturados (TUFA) e poliinsaturados (PUFA) de *Tetrastrum heteracanthum*.** Goiânia: UFG, [20 -- f].

LI XIN. et al. Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp.. **Bioresource Technology**, p. 101, 2010.

LOBO, I. P.; FERREIRA, S. L. C; CRUZ, R. S. Biodiesel: parâmetros de qualidade e métodos analíticos. **Química Nova**, [SI], v. 32, n. 6, p. 1596-1608, 2009. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-40422009000600044&script=sci_arttext. Acessado em 10 out. 2013.

LOMBARDI, A. T.; WANGERSKY, P. J. Influence of phosphorus and silicon on lipid class production by the marine diatom *Chaetoceros gracilis* grown in turbidostat cage cultures. **Marine Ecology Progress Series**, [SI], v. 77, p. 39 – 47, 1991.

LOPES, J.C.A., BOROS, L., KRÄHENBÜHL, M.A., MEIRELLES, A.J.A., DARIDON, J.L., PAULY, J., MARRUCHO, I.M., COUTINHO, J.A.P.; Prediction of cloud points of biodiesel, **Energy & Fuels**, v. 22, p. 747-752, 2008.

LOURENÇO, S. O. **Cultivo de Microalgas Marinhas: Princípios e aplicações.** 1. ed. São Carlos: RiMa, 587 p. 2006.

MEINERZ, L.I. et al. Efeitos da temperatura sobre a absorção de nutrientes e crescimento celular da microalga *Thalassiosira weissflogii*. **Atlântica**, Rio Grande, v. 31, n. 2, p. 209 -212, 2009.

MENEZES, R. et al. Avaliação da potencialidade de microalgas dulcícolas como fonte de matéria-prima graxa para a produção de biodiesel. **Química nova**, [SI], v. 36, n.1, p. 10-15, 2013. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422013000100003>. Acessado em 15 ago. 2013.

MONTEIRO, R. T. T. **Análise de Ciclo de Vida do Biodiesel – Aplicação à Realidade Nacional**. 2009. 157 f. Dissertação de mestrado (Programa de pós-graduação de Engenharia Mecânica) - Departamento de Engenharia Mecânica, Universidade de Aveiro, Aveiro, 2009.

MORAIS, K. C. C. **Análise e desenvolvimento de aquicultura da microalga *Phaeodactylum tricomutum* em crescimento autotrófico e mixotrófico em fotobiorreatores compactos**. 2011. 97 f. Dissertação de mestrado (Programa de pós-graduação em Engenharia e Ciências Materiais) – Setor de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

OHSE, S. et al. Revisão: Sequestro de carbono realizado por microalgas e florestas e a capacidade de produção de lipídios pelas microalgas. **Insula**, Florianópolis, n. 36, p. 39-74, 2007.

OLIVEIRA, L.B.; FERNANDES, V.O. Diagnóstico limnológico em uma lagoa costeira tropical (lagoa Juara, Serra/ES, Brasil). **Acta Limnologica 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 de mestrado (Programa de pós-graduação em Bioenergia) - 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.

PAULILLO, L. C. M. S; JATOBÁ, F. H. P; CECHINEL, C. A. Biodiesel: eficiência energética e impacto ambiental. **Diálogos e Ciência**: Revista da rede de ensino FTC, Feira de Santana, v. 3, n. 11, p.126-135, 01 dez. 2009. Disponível em: <www.ftc.br/dialogos>. Acesso em: 15 ago. 2013.

PEQUENO, M. A. G. **Avaliação do potencial produtivo de óleos obtidos a partir de microalgas por cromatografia gasosa**. 2010. 44f. Dissertação de mestrado (Mestrado do Programa de pós-graduação em química) – Departamento de química do Centro de Ciências Exatas da Natureza da Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2010.

PEREIRA, C. M. P. et al. Biodiesel renovável derivado de microalgas: avanços e perspectivas tecnológicas. **Química Nova**, [S.I.], v. 35, n. 10, p. 2013-2018, 2012. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422012001000022> Acessado em: 19 out. 2013.

QUEVEDO, C.O ; MORALES, S. F.; ACOSTA, A. C. Crescimento de *Scenedesmus* sp. em diferentes meios de cultivo para laproduccion de protein microalgal. **VITAE Revista de lafacultad de química farmaceutica**, Comlombia, v. 15, n. 1,p. 25 – 31, 2008.

RAMOS, L. P. et al. Biodiesel: Um projeto de sustentabilidade econômica e sócio-ambiental para o Brasil. **Revista Biotecnologia Ciência e desenvolvimento** , v. 31, p. 28-37, 2003.

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 phytoplankton.**Cambridge University Press**, Cambridge, p. 535, 2006.

RUSSO, D. A. M. T. **Estudo do crescimento da microalga *Chlorella vulgaris* numa água residual tratada, sob diferentes condições de fotoperíodo e temperatura**. 2011. 91 f. Dissertação de mestrado (Programa de pós-graduação do departamento de Ciência e Tecnologia de Biomassa) - Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2011.

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

SANTOS, G. M. dos; MACEDO, R. V. T. de; ALEGRE, R. M. Influência do teor de nitrogênio no cultivo de *Spirulina* sp. máxima em duas temperaturas – Parte I: Alteração da Composição da Biomassa. **Ciência e Tecnologia em Alimentos**, Campinas, v. 23, p. 17 – 21, 2003.

SANTOS, L. B. **Efeitos da variação da concentração de fósforo no crescimento e síntese lipídica por *Ankistrodesmus* sp..** 2011. 70 f. Dissertação de mestrado (Programa de pós-graduação em Ciências Biológicas Biofísica) – Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

SILVA, F. **Biorremocão de nitrogênio, fósforo e metais pesados (Fe, Mn, Cu, Zn) do efluente hidropônico através do uso de *Chlorella vulgaris***. 2006. 73 f. Dissertação de mestrado (Programa de pós-graduação em agroecossistemas) – Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

STEIN. J. **Handbook of Phycological methods**. Culture methods and growth measurements. Cambridge University Press, p. 448, 1973.

TANG, N; GARCIA, M ; CHEN, M; SIMON, N; SALLEY, S. O. Potential of Microalgae Oil from *Dunaliella tertiolecta* as a Feedstock for Biodiesel. Appl Energy **Applied Energy**, v. 88 p. 3324, 2011.

TAVARES, J. E. B. **Cultivo de microalgas do gênero *Botryococcus* visando a produção de biodiesel**. 2009. 58 f. Dissertação de mestrado (Programa de pós-

graduação em Biologia celular e Biotecnologia) – Departamento de Biologia Vegetal da Universidade de Lisboa, Lisboa, 2009.

TAVARES, L. H. S; FIORESI, T. B; IBARRA, L. C. C. Cultivo de *Ankistrodesmus gracilis* (REISCH) KORSIKOV (Chlorophyta) em laboratório utilizando meio chu 12 e de macrófita com npk. **B. Inst. Pesca**, São Paulo, v. 35, n. 1, p. 111 – 118, maio. 2009.

TEIXEIRA, C. M. L. L.; MORALES, 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.

TORRES, J. C. L; VARGAS, J. V. C; MARIANO, A. B. **Biodiesel de microalgas: Composição e propriedades**. 10f. Paraná: [20--].

VARGAS, S. R. **Influencia da concentração de nutrientes na interação entre duas espécies fitoplanctônicas isoladas do Reservatório de Itupararanga – SP**. 2012. 137 f. Dissertação de mestrado (Mestrado Programa de pós-graduação em hidráulica e saneamento) – Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

VICIUS, F. R. J. et al. **Manual para cultivo de cianobactérias**. 27 f. [S.l.]. [20--].

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.