

FACULDADE CATÓLICA SALESIANA DO ESPÍRITO SANTO

GISLAINE LEITE CUNHA

**EFEITOS DO ESTRESSE NUTRICIONAL E QUALITATIVO DE LUZ EM DUAS  
MICROALGAS VERDES COM ÊNFASE NA PRODUÇÃO DE BIODIESEL**

VITÓRIA  
2014

GISLAINE LEITE CUNHA

**EFEITOS DO ESTRESSE NUTRICIONAL E QUALITATIVO DE LUZ EM DUAS  
MICROALGAS VERDES COM ÊNFASE NA PRODUÇÃO DE BIODIESEL**

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

Orientador: Prof. MSc. Danilo Camargo Santos

VITÓRIA  
2014

GISLAINE LEITE CUNHA

**EFEITOS DO ESTRESSE NUTRICIONAL E QUALITATIVO DE LUZ EM DUAS  
MICROALGAS VERDES COM ÊNFASE NA PRODUÇÃO DE BIODIESEL**

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

Aprovado em \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_, por:

\_\_\_\_\_  
Prof. MSc. Danilo Camargo Santos, FCSES - Orientador

\_\_\_\_\_  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Selma Aparecida Hebling, FCSES

\_\_\_\_\_  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Valéria de Oliveira Fernandes, UFES

Aos cientistas e sua busca pelo conhecimento

## AGRADECIMENTOS

Jamais poderia iniciar sem agradecer ao Deus infinito em misericórdia que abriu portas, me confortou, me concedeu sabedoria e graça em todas as etapas deste trabalho, surpreendendo-me constantemente;

À minha mãe, Miriam, por quem me faltam palavras para agradecer. Foram vários finais de semana me acompanhando no laboratório, na busca incansável por LEDs, incandescentes, fluorescentes e afins, na escrita, nas muitas orações, enfim, minha grande incentivadora e amiga que esteve comigo em tudo, e ao meu pai, Heloísio, pelo auxílio na instalação das lâmpadas, ajuda financeira e interesse por essa “biologia toda”;

Ao meu digníssimo namorado Anderson, por sua grande eficiência em me fazer sorrir, por suas genialidades biológicas mesmo sendo um historiador nato, por ser companheiro, atencioso, compreensivo, paciente, carinhoso e acreditar em minha pesquisa fazendo-a parecer única;

As nossas famílias por compreenderem as minhas faltas nesse último período, pelo interesse na pesquisa e orações;

Aos meus professores que me fizeram chegar até aqui, participando da construção de conhecimento durante esses quatro anos inesquecíveis;

À Kathiani, que me ingressou nesse projeto quando eu simplesmente não tinha nada para o TCC, me concedendo o pacote completo, inclusive orientador;

Ao meu orientador por me confiar a brilhante “ideia das cores” no cultivo, melhorar minha escrita com seu “toque de mestrado” através dos mil rabiscos (sempre organizados e coloridos), conciliar seus inúmeros compromissos, com minha sempre tão esperada meia, uma ou duas horas de orientação, além de, incentivar a todos como coordenador;

À Valéria por me permitir desenvolver o estudo no LATEAC e ser sempre tão gentil e atenciosa;

Ao Kelvin que me auxiliou em toda jornada inicial, inclusive nos fins de semana. Sempre organizado, disposto e amigo;

Ao Fred, creio que serei pobre em palavras para agradecer, pelas experiências de sua monografia, dedicação em me ajudar em todo possível, pela impressionante disposição e acompanhar grande parte do meu experimento;

À linda Bah, sempre disposta mesmo com tantas coisas para resolver, ajudadora em tudo que estava em seu alcance. Sandra pelas muitas noções de clorofila e por seu jeito de ser que tantas vezes me tranquilizava;

À Franciny por suas dicas geniais e Pâmela pelas orientações e conversas. Raíssa pela troca de ideias, por ser tão gentil, interessada, ajudadora e suportar meus erros;

Brenner, Nayara, Lorena, Paula, Gabriel, Fernanda e aos demais já citados pelo companheirismo e risadas, trazendo divertimento a tudo que acontecia;

Ao pessoal dos laboratórios adjacentes pela cordialidade e empréstimo dos equipamentos;

Aos funcionários da botânica, em especial à Beth, por trazer alegria em dias sem graça e me acudir nos momentos de desmaio;

Ao motorista e trocador do meu querido ônibus de bairro, que não me deixaram perder o horário das coletas e pesagens, além de sua alegria sempre viva às 6h da manhã me desejando bons estudos;

Ao Moacyr pelo auxílio de física sobre as lâmpadas a serem utilizadas na pesquisa;

À banca examinadora por aceitar o convite e, através de suas considerações, melhorar a qualidade do trabalho de uma iniciante neste imenso mundo científico;

Enfim, contei com a participação de seres humanos maravilhosos, sem os quais, chegar até aqui seria no mínimo impossível. Todos foram fundamentais para construção do tão temido TCC e suas contribuições são encontradas ao longo das páginas que se seguem.

*He is jealous for me  
Loves like a hurricane  
I am a tree  
Bending beneath  
The weight of his wind and mercy  
When all of a sudden  
I am unaware of these  
Afflictions eclipsed by glory  
And I realize just how beautiful you are  
And how great your affections for me*

How He Loves – John Mark McMillan

## RESUMO

A contínua necessidade do uso de combustíveis para diversas atividades antrópicas traz consigo dificuldades com relação à disponibilidade de suas fontes e consequências de sua utilização. Nesse contexto, o presente trabalho buscou potencializar o aumento de teor lipídico no cultivo de duas microalgas verdes (em experimentos diferentes), para, utilizá-lo na produção de biocombustível, tendo por premissa a viabilidade econômica e ambiental em larga escala. As culturas de *Kirchneriella obesa* foram submetidas à diferença nutricional por nitrogênio, sendo os tratamentos: Controle (1,70g), 50% (0,85g) e 200% (3,70g) da proporção presente no protocolo de preparação do meio e, na análise qualitativa de luz, *Scenedesmus acuminatus* foi cultivada nos comprimentos de onda de luz vermelho e azul, tendo branco como controle. As cepas utilizadas no estudo foram obtidas no Laboratório de Taxonomia e Ecologia de Algas Continentais (LATEAC)/UFES, onde os cultivos foram mantidos em meio de cultura ASM1, intensidade luminosa de 450lux, pH 7, fotoperíodo integral de luz, temperatura de  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$  e aeração manual. Os experimentos foram realizados em erlenmeyers de 1000 ml (sempre com densidade celular inicial de 50.000 cél/ml), e tratamentos em quadruplicata, avaliados durante o período de 45 dias. A análise de crescimento foi feita através de espectrofotometria e contagem direta por microscopia em câmara de Fuchs-Rosenthal, biomassa por peso seco, extração lipídica seguindo protocolo de Bligh e Dyer (1959), pigmentos lidos em espectrofotômetro e biovolume. Em *K. obesa*, o tratamento controle obteve melhor êxito no crescimento, pigmentos e biomassa, porém, o tratamento com privação do nitrogênio mostrou-se mais adequado em biovolume e teor lipídico. Nos tratamentos com *S. acuminatus*, o crescimento e conteúdo lipídico foram superiores nas culturas submetidas à luz azul, enquanto a biomassa foi mais elevada em luz vermelha e os pigmentos variaram durante o período de cultivo. Foi possível concluir que, para as cepas estudadas, os tratamentos com depleção de nitrogênio e iluminação em luz azul são mais adequados quando o objetivo é aumentar a produção lipídica.

**Palavras-chave:** *Kirchneriella*. *Scenedesmus*. Nitrogênio. Qualidade luz. Biodiesel.

## ABSTRACT

The continued need for the use of fuel for various anthropogenic activities brings difficulties with respect to the time of availability of its sources and consequences of its use. In this context, the present study sought to potentiate the increase in lipid content in the cultivation of two green microalgae (in different experiments), in order to use it in the production of biofuel, resulting in economic and environmental viability premise on a large scale. The cultures of *Kirchneriella obesa* were subjected to nutritional difference by nitrogen, being the treatments: control (1, 70 g), 50% (0, 85 g) and 200% (3, 70 g) the proportion in the preparation of the protocol and, on the qualitative analysis of light, *Scenedesmus acuminatus* was cultivated in wavelengths of light red and blue, and white as a control. The strains used in the study were obtained in the Laboratory of Taxonomy and Ecology of Continental Algae (LATEAC)/UFES, where the crops were kept in culture medium ASM1, luminous intensity of 450lux, pH 7, photoperiod, light integral temperature of  $25 \pm 2^\circ \text{C}$  and manual aeration. The experiments were conducted in Erlenmeyer flasks from 1000 ml (always with initial cell density 50,000 cell/ml), and treatments in quadruplicate, evaluated during the period of 45 days. Growth analysis was made through spectrophotometry and direct microscopic count in Board of Fuchs-Rosenthal, biomass for dry weight, lipid extraction following protocol of Bligh and Dyer (1959), measured in pigments and biovolume spectrophotometer. In *K. obesa*, the control treatment had better success in the growth, pigments and biomass, however, treatment with nitrogen deprivation proved to be more suitable in biovolume and lipid content. In the treatments with *S. acuminatus*, growth and lipid content were superior in cultures subjected to blue light, while the biomass was higher in red light and pigments varied during the period of cultivation. It was possible to conclude that, for the studied strains, the treatments with nitrogen depletion and blue lighting are better suited when the goal is to increase lipid production.

**Keywords:** *Kirchneriella*. *Scenedesmus*. Nitrogen. Quality light. Biodiesel.

## SUMÁRIO

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO</b> .....  | <b>17</b> |
| <b>2 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....                                 | <b>21</b> |
| <b>3 METODOLOGIA</b> .....   | <b>37</b> |
| 3.1 LINHAGENS-ALVO.....  | 37        |
| 3.1.1 <i>Kirchneriella obesa</i> (G.S. West) Schmidle, 1893.....   | 37        |
| 3.1.2 <i>Scenedesmus acuminatus</i> (Lagerhein) Chodat, 1902 ..... | 38        |
| 3.2 CLASSIFICAÇÃO DO CULTIVO.....                                  | 38        |
| 3.2.1 Meio de cultura.....   | 39        |
| 3.2.2 Tipo de cultivo.....   | 39        |
| 3.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....                                 | 40        |
| 3.4 MEDIDAS DE CRESCIMENTO.....                                    | 44        |
| 3.4.1 Densidade óptica .....                                       | 44        |
| 3.4.2 Contagem direta por microscopia .....                        | 45        |
| 3.4.3 Taxa e velocidade de crescimento.....                        | 46        |
| 3.4.4 Medidas de biomassa .....                                    | 46        |
| 3.5 MEDIDAS DE BIOVOLUME CELULAR .....                             | 47        |
| 3.6 ANÁLISES DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA .....                           | 48        |
| 3.6.1 Medidas de clorofila por espectrofotometria .....            | 48        |
| 3.6.2 Análise de lipídios totais .....                             | 49        |
| 3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....                                       | 51        |
| <b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....                              | <b>53</b> |
| 4.1 <i>Kirchneriella obesa</i> x CONCENTRAÇÃO DE NITROGÊNIO.....   | 53        |
| 4.1.1 Crescimento .....  | 53        |

|   |    |
|---|----|
| <b>4.1.2 Peso Seco</b> .....                                      | 55 |
| <b>4.1.3 Biovolume x Peso Seco</b> .....                          | 56 |
| <b>4.1.4 Pigmentos e aspecto das culturas</b> .....               | 58 |
| <b>4.1.5 Lipídios totais</b> .....                                | 60 |
| <b>4.2 <i>Scenedesmus acuminatus</i> x QUALIDADE DE LUZ</b> ..... | 61 |
| <b>4.2.1 Crescimento</b> .....                                    | 61 |
| <b>4.2.2 Peso Seco</b> .....                                      | 63 |
| <b>4.2.3 Biovolume x Peso Seco</b> .....                          | 65 |
| <b>4.2.4 Pigmentos e aspecto das culturas</b> .....               | 66 |
| <b>4.2.5 Lipídios totais</b> .....                                | 68 |
| <b>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....                               | 71 |
| <b>REFERÊNCIAS</b> .....  | 73 |

## 1 INTRODUÇÃO

A terminologia “alga” foi apresentada oficialmente em 1753 por Lineu como categoria taxonômica (BICUDO; MENEZES, 2006). Atualmente compreende um agrupamento artificial pelo fato de possuírem poucas características em comum, salvo sua predominância aquática, ausência de tecido recobrimdo os órgãos de reprodução e ausência de sistema diferenciado para condução de água. Este agrupamento pode se apresentar nas comunidades perifítica e fitoplanctônica (BHATTACHARYA; MEDIN, 1998).

A definição de fitoplâncton adotada por Reynolds (2006) em seu livro “Ecology of phytoplankton” consiste em organismos microscópicos, capazes de realizar fotossíntese e adaptados a viver em suspensão na zona eufótica da coluna d’água. Em ambientes dulcícolas, marinhos e salobros são os principais responsáveis pela produção primária.

Um dos principais grupos algais que compõe a comunidade fitoplanctônica é a divisão Chlorophyta (algas verdes), que apresenta clorofilas *a* e *b* e vários carotenoides. Sua morfologia é variada, de formas macro a microscópicas, incluindo cocóides, unicelulares ou coloniais flageladas, multicelulares ou filamentos multinucleados (TOMASELLI, 2004). Há em torno de 17.000 espécies nesse grupo, e apesar da possibilidade de ocupar diversos tipos de habitats (como troncos de árvores e desertos secos), cerca de 90% do total são dulcícolas (LOURENÇO, 2006). Atualmente existem 13 classes na divisão Chlorophyta, com destaque para a classe Chlorophyceae, que tem preferência por habitar lagos eutróficos e mesotróficos. Esse grupo tem caráter cosmopolita devido à sua dispersão pelo vento (ESTEVES, 1998).

Além da importância ecológica (base de cadeia alimentar, produção de oxigênio), as clorofíceas podem ser empregadas em várias atividades economicamente importantes, como geração de biomassa para alimentação (produção de ração) e produção de substâncias de interesse industrial (LOURENÇO, 2006), com destaque para o biohidrogênio, bioetanol, biometano e biodiesel (SCHENK et al., 2008). É importante salientar que, como a maior parte de toda a energia utilizada atualmente provém de fontes limitadas e não renováveis (petróleo, carvão e gás natural), os biocombustíveis são agora vistos como uma boa alternativa energética, por serem

fontes renováveis e sustentáveis, além de livres de enxofre e compostos aromáticos (FERRARI; OLIVEIRA; SCABIO, 2005).

De acordo com Lourenço (2006) esses combustíveis biológicos são menos poluentes que o petróleo e integram uma das melhores alternativas para redução da emissão de dióxido de carbono. Com isso, Chisti (2007) aponta as microalgas como potenciais fontes de biodiesel devido a gordura animal, óleo de cozinha e plantas oleaginosas não serem capazes de satisfazer a demanda real necessária de biocombustível.

Esses organismos tornam-se uma das fontes mais promissoras para obtenção de óleo por dois motivos principais: Seu crescimento independe de terras agrícolas e florestas, minimizando então os danos causados ao ecossistema e produção de alimentos, e o rendimento em relação às oleaginosas tradicionais é muito maior (PEQUENO, 2010).

A extração de óleos de microalgas entre outras fontes compõe a segunda geração de biocombustíveis que, com relação à primeira (cana de açúcar, milho, trigo), é a melhor opção para lidar com a segurança alimentar e energética e as preocupações ambientais. Esses organismos utilizam-se de um processo fotossintético semelhante às plantas superiores podendo completar seu ciclo de crescimento em poucos dias (CHIST, 2007) e ainda sendo viável a utilização de águas residuais para seu cultivo (PEQUENO, 2010).

Nesse contexto, para obtenção de óleos, o cultivo de microalgas fornece informações úteis sobre a fisiologia e autoecologia dos organismos e tem por objetivo atingir biomassa em grande escala. Vale lembrar que diferentes condições de cultivo e linhagens distintas podem levar à produção de lipídios com características diversas (LOURENÇO, 2006; GREENWELL et al., 2010; PEQUENO, 2010).

O desenvolvimento microalgal pode ser afetado por fatores bióticos (parasitismo, alelopatia e herbivoria) e abióticos (pH, temperatura, incidência de luz, velocidade de correnteza e concentrações de nutrientes). Dentre os abióticos, a concentração de nutrientes e a luminosidade são fatores de determinam o desenvolvimento desses organismos devido à sua influência no processo fotossintético e, quando fora da

faixa ótima, podem ser considerados fatores estressores (ESTEVEES, 2011; GUILLARD; MORTON, 2003; LARCHER, 2006).

Dentre os possíveis estressores, o nitrogênio é um dos mais importantes elementos no metabolismo aquático. Isto se deve principalmente ao fato de sua participação na formação de proteínas e ácidos nucleico, dois dos componentes básicos da biomassa (que podem possuir diversas funções metabólicas e/ou estruturais), além da composição de pigmentos fotossintetizantes (clorofilas e ficobilinas), podendo estar presente em várias formas químicas. Caso esteja em baixas concentrações, pode atuar como fator limitante na produção primária (ESTEVEES, 1998; LOURENÇO, 2006). Segundo Becker (1994) citado por Grobbelaar (2004) o teor de nitrogênio na biomassa algal pode variar de 1% a mais de 10% dependendo da disponibilidade no meio. As respostas típicas para limitação do elemento é a descolorização das células e acúmulo de compostos orgânicos de carbono, tais como polissacarídeos e certos lipídios.

Em relação à luz, a maior parte dos trabalhos com cultivo de microalgas envolve a intensidade luminosa, como os trabalhos de Senger et al. (1993) Krettle (2011) e Militão (2013) (vide referencial). A intensidade luminosa influencia na formação de compostos orgânicos pelo processo fotossintético e, em quantidades excessivas (maior que a capacidade de utilização), a radiação os sobrecarrega acarretando na baixa utilização quântica e fotoinibição (ERIKSEN et al., 1996; JORGE et al., 1999; LARCHER, 2006). Há uma tendência de aumento da clorofila *a* e outros pigmentos, tais como clorofila *b*, *c* e carotenóides primários em baixa intensidade luminosa. De outra forma, em resposta ao aumento da intensidade, a clorofila *a* e outros pigmentos estão diretamente envolvidos na redução da fotossíntese enquanto que os carotenoides secundários são utilizados como agentes fotoprotetores, aumentando sua quantidade relativa no meio (HU, 2004).

Apesar da grande importância em estudar as respostas da microalga quanto à intensidade luminosa, as análises podem ser realizadas visando outra vertente. Por sua característica tanto de partícula como de onda, a luz possui determinadas quantidades de energia e frequência relacionada ao seu comprimento de onda. Comprimentos de onda curtos possuem alto conteúdo energético (alta frequência), enquanto que, os longos contém baixo conteúdo energético (baixa frequência). A

relevância desse fator está em uma determinada cor de espectro visível favorecer ou não a absorção da luz e em quais valores isso acontece (TAIZ; ZEIGER, 2009).

Esses mesmos autores apontam que a energia luminosa é absorvida pelos pigmentos fotossintéticos, sendo que, cada um deles desempenha uma função específica impulsionando o processo de fotossíntese (TAIZ; ZEIGER, 2009).

Tendo em vista as vantagens da utilização de microalgas na produção de biocombustível, o presente trabalho buscou através dos fatores estressantes supracitados, potencializar seu crescimento em biomassa para obter uma cepa em condições de cultivo favoráveis biológica e economicamente, além de contribuir para o conhecimento das duas espécies utilizadas (*Kirchneriella obesa* e *Scenedesmus acuminatus*). Para tal, os objetivos foram: Avaliar o crescimento das culturas sob três comprimentos de onda e três concentrações de nitrogênio diferentes; determinar a concentração de nitrogênio e faixa do espectro luminoso que melhor potencializa a produção de biodiesel; avaliar concentração de pigmentos e comparar a produção de lipídios totais das algas sob a influência de dois fatores estressores.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

A definição de biodiesel, segundo a Lei nº 11.097 de janeiro de 2005, refere-se a um biocombustível proveniente de biomassa renovável utilizado em motores a combustão interna com ignição por compressão (BRASIL, 2006) e de forma geral pode ser considerado como alternativa aos derivados de combustíveis fósseis, emitindo menos poluentes e podendo ser usado em carros ou qualquer outro veículo movido a diesel (BIODIESELBR, 2012a; KNOTHE et al., 2007).

Historicamente, a ideia de biodiesel se inicia no século 20, apesar da origem orgânica ter sido considerada viável posteriormente com o disparar do valor do petróleo da década de 70. Aparentemente, o pioneirismo da utilização de biodiesel provido de fontes vegetais aconteceu em 1900, quando Rudolf Diesel empregou óleo de amendoim no funcionamento de um pequeno motor, obtendo o mesmo resultado do diesel comum. Mais tarde, George Chavanne avançou com a ideia do novo combustível através da descoberta do processo de transesterificação (remoção da glicerina), que permitiu a obtenção do biodiesel moderno ao realizar um novo experimento na movimentação de um ônibus. Somente 30 anos depois, as pesquisas com combustíveis alternativos foram retomadas e aumentaram, devido a crise do petróleo em 1973 (BIODIESELBR, 2012b).

Sendo um produto derivado de biomassa renovável, o biodiesel pode substituir total ou parcialmente os combustíveis derivados de petróleo e gás natural. A maior vantagem em longo prazo pode ser referida ao preço em relação ao combustível fóssil, visto que a cada ano os valores do petróleo são acrescidos devido ao alto consumo e diminuição das reservas, além das crises políticas que elevam ainda mais o seu valor (BIODIESELBR, 2012a).

No contexto mundial, o maior produtor global de biodiesel em sua forma pura ou com mistura é a Alemanha. Esse país utiliza-se de canola ou colza, consumindo 8,8 milhões de litros diários através da política obrigatória de adição de 5% em combustível comum. Na França são difundidas as misturas com diesel mineral e, além dos 5% de obrigatoriedade na maioria dos casos, o transporte urbano deve ter sua mistura em 30%. A Itália, mesmo sendo um dos países pioneiros no investimento em biodiesel, não tem acompanhado o desenvolvimento da Alemanha e França. Nos Estados Unidos, apesar da maior experiência do país com o álcool, a

utilização de biodiesel é mais recente, prevalecendo o óleo de soja como fonte. Na Argentina também se utiliza o óleo de soja por ser a matéria prima mais abundante neste país (BIODIESELBR, 2012c; PLÁ, 2002).

No Brasil, o óleo diesel comercializado tem 5% de biodiesel desde a data 1º de janeiro de 2010, estabelecido pela Resolução nº 6/2009. O aumento de 4 para 5% demonstra que o Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel (PNPB) teve sucesso na produção e uso de biocombustíveis em larga escala. O país está entre os maiores produtores e consumidores de biodiesel do mundo, com a presença de várias espécies vegetais como soja, dendê, babaçu, girassol, pinhão-manso, mamona e amendoim distribuídas em diversas regiões (Figura 1) (AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCMBUSTÍVEIS, 2014).

Figura 1 – Potencialidade brasileira para produção e consumo de combustíveis vegetais



Fonte: Biodieselbr (2012d)

A estimativa da Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis é de que a produção de biodiesel atual brasileira esteja em torno de 176 milhões de litros por ano. A garantia desse valor está na geografia do país, que possui vantagens com relação às energias renováveis como prática socioeconômica promissora, por ser portador de condições climáticas adequadas como fontes hídricas abundantes e temperaturas amenas em grande parte do ano. (BARROS, 2010; BIODIESELBR, 2012e).

Os principais biocombustíveis líquidos utilizados no Brasil são: Etanol, produzido via fermentação de açúcares e utilizado em veículos leves, e o biodiesel, obtido de óleos vegetais e gordura animal, convertido em ésteres metílicos ou etílicos de ácidos graxos e utilizado principalmente em ônibus e caminhões (WESTBROOK, 2013).

No intuito de testar a biomassa renovável para o desempenho de motores, Corrêa e colaboradores (2008), Soranso e colaboradores (2008) e Tabile e colaboradores (2009) realizaram estudos com óleo de girassol, óleo residual de fritura e mamona respectivamente, obtendo resultados satisfatórios relativos ao funcionamento do motor. Porém o consumo do biocombustível foi maior se comparado ao combustível comum.

Dentre as matérias-primas que podem ser utilizadas para produção de biodiesel, foram destacadas algumas de maior uso com suas especificações:

Soja (*Glycine max*) – Extremamente cultivada no Brasil, responsável por 80% da produção de combustível no país devido a sua alta disponibilidade e produção. Porém, o biodiesel produzido possui grande quantidade de iodo, o que não atende as especificações do produto (BIODIESELBR, 2012f).

Algodão (*Gossypium hirsutum*) – Segunda maior cultura de oleaginosa no Brasil. A plantação é definida pelo uso da fibra na indústria têxtil e a semente pode ser usada para o biodiesel, por exemplo. A produção de óleo é mais barata que a soja, mas exige tratamento específico e o teor de lipídio por caroço é baixo (BIODIESELBR, 2012g).

Girassol (*Helianthus annuus*) – Planta originária das Américas utilizada comercialmente para ornamentação e óleo comestível extraído da semente. O

cultivo é simples, sendo uma planta que se adéqua rapidamente ao solo e clima e não necessita de maquinário especializado (BIODIESELBR, 2012h).

Mamona (*Ricinus communis*) – Provavelmente originária da Ásia, o principal constituinte da semente é o óleo que possui alta viscosidade e, por esse motivo, torna-se impuro para produção de biodiesel, sendo necessária a mistura com outros óleos. Mas é justamente essa propriedade que o faz ser importante para outros fins como lubrificação de aviões (BIODIESELBR, 2012i).

Além da produção de biodiesel mais comum, provido de oleaginosas, ainda é possível utilizar gordura animal e óleos residuais. Delatorre e colaboradores (2011) discorrem sobre a importância da utilização de óleos de fritura com relação ao menor impacto para o ambiente (destino final dos resíduos) e matéria-prima de baixo custo, podendo ser recolhido em residências e comércios.

O uso do biodiesel possui vantagens em gerar emprego e renda no setor agrícola, fornecer subprodutos como nutrientes para o solo, utilizar matérias-primas de baixo custo, ser não tóxico, biodegradável e renovável. Suas desvantagens em larga escala podem ser sugeridas, como tornar-se monocultura, degradação do solo com uso de pesticidas, desmatamento de áreas sem fiscalização, aumentar valor agregado aos alimentos providos das plantas utilizadas na produção, alto valor associado aos equipamentos e procedimentos a serem utilizados para extração dos lipídios e ocupar terras aráveis que poderiam ser utilizadas na plantação de outros alimentos (KNOTHE et al., 2007).

Com a descrição das prováveis dificuldades na obtenção de biodiesel, é possível perceber que a maioria delas envolve a utilização do solo (degradação, desmatamento, uso abusivo). Nesse contexto, as microalgas podem emergir como fonte promissora pelo fato de não serem necessárias terras agrícolas e florestais para seu cultivo. Além disso, como destacado na Tabela 1, elas são potencialmente úteis por superar em produtividade qualquer vegetal produzido comercialmente no mundo. (AZEREDO, 2012; LOURENÇO, 2006; TEIXEIRA; MORALES, 2006; PEQUENO, 2010).

Tabela 1 – Rendimento de extração de óleo em diferentes fontes produtoras de biocombustíveis

| Rendimento de óleo t/ha ano |           |
|-----------------------------|-----------|
| Mamoma                      | 0,5 – 1,0 |
| Soja                        | 0,2 – 0,6 |
| Girassol                    | 0,5 – 1,5 |
| Canola                      | 0,5 – 0,9 |
| Pinhão manso                | 2,0 – 3,0 |
| Óleo de palma(dendê)        | 3,0 – 6,0 |
| Microalgas                  | 50 – 150  |

Fonte: Perez (2007) citado por Pequeno (2010)

As microalgas são organismos uni ou multicelulares muito diversos, com hábitos planctônicos ou bentônicos, encontradas em todo mundo e, embora sejam geralmente de vida livre, algumas vivem em associação simbiótica com uma variedade de outros organismos (LOURENÇO, 2006; TOMASELLI, 2004).

Ocorrem comumente em água, seja ela marinha, doce ou salobra. Na maioria dos habitats funcionam como produtores primários da cadeia alimentar utilizando-se do processo de fotossíntese, realizado a partir de dióxido de carbono, água e luz solar. Além de funcionar como base da cadeia alimentar, também fornecem o oxigênio necessário para o metabolismo dos organismos consumidores (LEE, 2008).

O autor ainda organiza os grupos algais em: (1) Algas procariontes (Cyanophyta) constituídas de clorofila *a* e ficobiliproteínas; (2) Algas eucarióticas com cloroplasto envolvido apenas por duas membranas de cloroplastos envelopados (Glaucophyta, Rhodophyta, Chlorophyta); (3) Algas eucarióticas com cloroplasto envolvido por uma membrana de retículo endoplasmático cloroplástico (Euglenophyta, Dinophyta, Apicomplexa); (4) Algas eucarióticas com cloroplasto envolvido por duas membranas de retículo endoplasmático cloroplástico (Cryptophyta, Heterokontophyta, Chrysophyceae, Synurophyceae, Eustigmattophyceae, Pinguiphyceae, Dictyochophyceae, Pelagophyceae, Bolidophyceae, Bacillariophyceae, Raphidophyceae, Xanthophyceae, Phaeothanmiophyceae, Phaeophyceae, Prymnesiophyta) (LEE, 2008).

Como forma de relacionar o óleo vegetal com o produzido por microalgas, o trabalho realizado por Conceição e colaboradores (2012) compara o óleo vegetal de canola e

o óleo da microalga *Isochrysis galbana* (Coccolithophyceae), através da metodologia de transesterificação, para obter detalhes da composição de triglicerídeos presentes. Concluiu-se que o óleo dessa microalga mostra-se boa alternativa de biocombustível, visto que, comparado ao óleo vegetal, as semelhanças foram muitas, atendendo às especificações necessárias do biodiesel, como densidade, viscosidade, poder calorífico, entre outros, além de ressaltar a vantagem da alta produtividade das microalgas.

Sendo uma forma de obtenção de biomassa, o cultivo de microalgas torna-se potencial fonte de substrato para produção de biocombustível. Azeredo (2012), Chisti (2007), Mata e colaboradores (2009), Patil e colaboradores (2008) e Pequeno (2010) são alguns dos autores que apontam a relevância desses organismos como portadores de elevado teor de matéria graxa.

Apesar de não ser amplamente aceito, o cultivo com microalgas teve seu início em 1850 com o pesquisador Cohn, que cultivou a microalga *Haematococcus* em laboratório. O desconsiderar de alguns autores, deve-se ao fato de que não houve isolamento microalgal e preparação de meio de cultura específico. Assim, o pioneirismo é atribuído a Famintzin, em 1871, com o cultivo das microalgas *Chlorococcum infusionum* e *Protococcus viridis* em solução de cultivo hidropônico, quando percebeu que plantas obtinham nutrientes de misturas com componentes minerais. Assim, ele foi o primeiro pesquisador a informar que microalgas, tais como plantas com flores, necessitavam de sais inorgânicos para o seu desenvolvimento (LOURENÇO, 2006).

Após os primeiros feitos, diversos pesquisadores continuaram aprimorando os processos de cultivo de microalgas, com inclusão de soluções estoque, determinação de minerais necessários, tipos de cultivo, formas simples de estresse nutricional, utilização da água e, através disso, elucidadas várias descobertas ecofisiológicas. Com o acúmulo de conhecimento produzido por eles, hoje se busca avançar em cultivos laboratoriais para compreensão de processos de escala global através de novos equipamentos desenvolvidos.

Para que haja sucesso no cultivo, diversas variáveis devem ser consideradas (como foi explanado abaixo), visto que a ideia original é transmitir a maior fração de condições ambientais para o laboratório. Grande parte do conjunto total de

características é passível de controle através de equipamentos específicos e monitoramento.

A temperatura pode ser medida e monitorada por termômetros simples em salas de cultivo ou controlada em estufas, sendo uma das condições mais importantes como influenciadora na composição bioquímica da alga e na velocidade de ocorrência das reações químicas (COLLA, et al., 2007; HU, 2004; LOURENÇO, 2006).

A condição nutricional é oferecida através dos meios de cultivo pré-estabelecidos em solução aquosa, sendo estes responsáveis por estimular o crescimento pela oferta de componentes presentes (nutrientes); seu controle é feito na preparação e podem ou não ser incorporados após a inoculação das células (LOURENÇO, 2006; TREDICI, 2004).

O potencial hidrogeniônico (pH) é estabelecido no meio de cultura antes da inoculação de células por solução ácida ou básica, com seus valores mensurados através de um pHmetro. É importante como forma de absorção efetiva dos nutrientes pelas células e também na distribuição de cargas elétricas por moléculas biológicas (LOURENÇO, 2006).

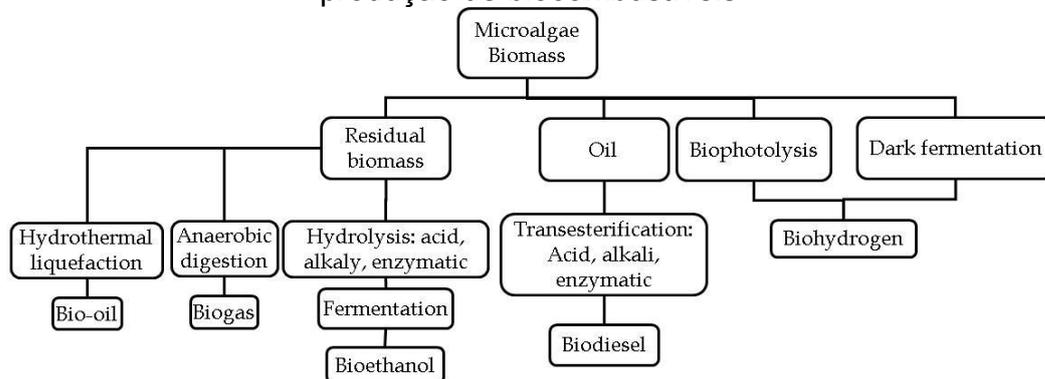
A iluminação adequada também afeta diretamente os cultivos, pois está relacionada ao processo de fotossíntese, que é vital para as microalgas. O controle desse fator é feito por equipamentos que medem a intensidade da luz incidida, como luxímetro (HU, 2004; LOURENÇO, 2006).

Os cultivos podem estar relacionados a diversas aplicações principais, divididas em ambiental, ecológica, e econômica. Entre as ambientais e ecológicas, estudar características, plasticidade, definir limites taxonômicos, conhecer ciclos de vida e testes de toxicidade estão incluídas. Quanto às econômicas, a produção de biomassa para alimentação humana (encapsulados, mistura em biscoitos e bebidas), produção de ração concedida a animais de interesse comercial, concentração de proteínas, ácidos graxos e carboidratos. Além disso, existem outras aplicações e usos potenciais envolvendo, por exemplo, o tratamento de águas residuais (LOURENÇO, 2006).

Além da alta eficiência na produção de óleos (biodiesel), microalgas também são adequadas como matéria-prima de outros biocombustíveis como biohidrogênio

(prótons e elétrons), biometano (biomassa) e bioetanol (açúcares e amido) (SCHENK et al., 2008). Sua utilização está destacada na Figura 2.

Figura 2 – Principais processos de transformação de biomassa de microalgas para produção de biocombustíveis



Fonte: Schneider e colaboradores (2012)

Lourenço (2006) dispõe de uma série de recomendações para o avanço desses cultivos microalgais no Brasil. Sendo elas: (1) Acentuar discussões entre sociedades científicas com integração de pesquisadores dedicados ao cultivo e fisiologia de microalgas; (2) Elaborar formas de facilitar o contato entre redes de pesquisadores com diferentes especialidades em cultivo; (3) Criação de novos laboratórios e investimento na manutenção dos pré-existentes nas regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste; (4) Estimular coletas em áreas pouco estudadas; (5) Aplicar investimento para formação de novos pesquisadores direcionados ao cultivo e fisiologia de microalgas; (6) Fomentar novas técnicas ao banco de cepas e empregar estudos genéticos a elas; (7) Incentivar estágios de intercâmbio entre locais de maior experiência em cultivo de microalgas; (8) Disseminar os avanços do cultivo aos novos pesquisadores por meio de treinamentos; (9) Estabelecer pelo menos uma coleção de microalgas dulciaqüícolas e outra de microalgas marinhas; (10) Acompanhar tendências *online* para, disponibilizar as coleções existentes;

Com o objetivo de potencializar o processo de obtenção da biomassa algácea, muitos autores buscaram diferentes linhagens de microalgas com formas de cultivo distintas (nutrição, temperatura, meio de cultura, intensidade luminosa, fotoperíodo), e, a partir do resultado encontrado, alguns deles analisaram a possibilidade de sua utilização como biocombustível (biodiesel) através de metodologias para extração lipídica e análise dos mesmos.

Tepe, Naz e Türkmen (2006) realizaram o cultivo de *Scenedesmus acuminatus* em intensidade de 4300lux com fotoperíodo de 18h luz e 6h escuro à 24°C durante seis dias, avaliando o estresse nutricional por nitrogênio. A fonte de nitrogênio foi retirada da matéria orgânica de plantas aquáticas (*Myriophyllum*, *Typha* e *Nymphaea*) em proporções de 50 e 100mg. Os autores apontaram como resultado o crescimento elevado da microalga quando *Nymphaea* foi fornecida como fonte de nitrogênio na concentração de 100mg por litro, seguida de *Myriophyllum* e *Typha* na mesma concentração.

Santos e colaboradores (2009) estudaram a influência do fotoperíodo na microalga *Chlorella vulgaris*, utilizando densidade inicial  $100 \times 10^4$  cél/mL, garrafas de vidro 250mL, temperatura  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , lâmpadas fluorescentes de 40W durante dez dias. Os tratamentos foram 24 horas de luz (24L:00E) e divisão entre luz e escuro (12L:12E). Como resultado, foi possível perceber um lento desenvolvimento de ambos os tratamentos até o 5º dia de cultivo (fase de adaptação), após, houve um aumento significativo, sendo o maior em fotoperíodo integral. O estudo concluiu que a região Nordeste é potencial para produção de biodiesel, visto que durante todo ano a luminosidade é favorável.

Vasconcelos e colaboradores (2009) realizaram a avaliação de crescimento nas microalgas *Isochysis galbana* (Haptophyta), *Chaetoceros calcitrans* (Ochlorophyta) e *Chlorella vulgaris* (Chlorophyta) com concentração inicial de 100.000 cél/mL cada, uso de água salina (30 ppm), meio de cultura Conway modificado para *Chlorella vulgaris* e Conway para as demais, temperatura mantida em  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , iluminação artificial via lâmpadas fluorescentes de 40W, aeração presente e fotoperíodo de 24h luz. Obtiveram como resultado, a maior densidade e velocidade de crescimento em *I. galbana* e menor em *C. vulgaris*.

Chinnasamy e colaboradores (2009) estudaram a potencial produção de biomassa através de águas residuais com a espécie *Chlorella vulgaris*, sob elevados níveis de  $\text{CO}_2$  e temperatura. A intensidade da luz empregada foi  $47 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e os tratamentos foram 30, 40 e  $50^\circ\text{C}$  para temperatura e elevação em 6% de  $\text{CO}_2$ , com controle em 0.036% (ambiente). O melhor resultado para produção em biomassa foi de 6% de concentração de  $\text{CO}_2$  e  $30^\circ\text{C}$  de temperatura, apesar de diminuir o crescimento da alga.

Marinho e colaboradores (2009) avaliaram o crescimento de *Chlorella vulgaris*, em diferentes valores de pH, através de três tratamentos em tréplica, sendo eles de pH 5, 7 e 9, realizados em garrafas de vidro de 500 ml em meio Conway modificado, aeração presente, temperatura  $24 \pm 1^\circ\text{C}$ , fotoperíodo 24h de luz, densidade inicial  $100 \times 10^4$  cél/mL e iluminação através de lâmpadas fluorescentes de 40W, totalizando 500lux de intensidade luminosa. A contagem para densidade foi realizada em câmara de Neubauer, sendo possível verificar maior densidade em pH 5,0 até o nono dia de cultivo e densidade superior até o sexto dia em pH 7,0. Conclui-se então que essa microalga se desenvolve melhor em pH ácido.

O estudo de Chagas (2010) com a microalga *Isochrysis galbana* avaliou a influência do estresse nutricional pelo composto químico nitrogênio em uma taxa normal (N:P 15) e duas menores (N:P 5, N:P 2,5). Fez uso da água salina em erlenmeyers de 3,0L e meio f/2 modificado, mantidas a  $25^\circ\text{C}$ , fotoperíodo 12h e densidade de inoculo  $7 \times 10^4$  cél/mL. As coletas foram feitas através de alíquotas de 3,0mL fixadas em 25 $\mu$ l de lugol acético. A contagem de células foi em câmaras de Fuchs-Rosenthal, tendo como resultado o aumento das reservas de carboidrato e lipídios nos cultivos estressados pela depleção de nitrogênio, porém, o crescimento foi limitado.

O estudo de Krettle (2011) com a microalga *Scenedesmus acuminatus* utilizou as intensidades de 3500, 1920 e 1300lux com fotoperíodo de 12/12h em erlenmeyers de 500mL, meio de cultura ASM1, pH 6,8 e temperatura mantida em  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  com aeração por 30 dias. A metodologia utilizada foi de coletas diárias de 1ml fixadas em lugol acético para posterior contagem que foi feita por câmara de Neubauer para análise da densidade celular. Como resultado, o tratamento controle (3500 lux) obteve quase o dobro do rendimento e entre os demais, não houve diferença significativa.

Ortega-Salas e Reyes-Bustamante, em 2012, cultivaram as microalgas *Kirchneriella obesa*, *Scenedesmus quadricauda* e *Chlorococcum infusorium* em três diferentes meios de cultivo (F/2, Fert I e Fert II). A temperatura variou entre 24 e  $25^\circ\text{C}$ , em sistema de volume crescente, a partir de 62,5mL e duplicando a cada 24h até 32L em nove dias, com aeração e coletas diárias de 1-10mL fixadas em solução de lugol para posterior contagem em câmara de Neubauer. Esses autores obtiveram os seguintes resultados: *K. obesa* teve aumento diário nos meios F/2 e Fert I, em *S.*

*quadricauda*, o valor mais elevado das taxas médias de crescimento foi no meio F/2 e *C. infusorium* taxas mais altas em F/2 e mais baixas em Fert II.

Baumgartner e outros (2013) trabalhando com a microalga *Scenedesmus acuminatus* cultivada através de diferentes meios de cultura (DM, NPK, MC), fotoperíodo de 24h, temperatura 25°C, intensidade luminosa de 5000lux, erlenmeyers de 1L com aeração e duração de 14 dias, utilizou a metodologia de contagem via espectrofotômetro. A melhor produtividade obtida foi do meio MC seguido de DM e NPK. Após isso, o meio MC foi utilizado em diferentes concentrações mostrando que até o 18º dia de cultivo a diluição de 1:10 não altera a produtividade de biomassa, passando este período, as diluições 1:2 e 1:1 mantém o cultivo por mais tempo.

O trabalho feito por Miranda (2013) utilizou três meios de cultura (ASM1, BBM e CHU) para avaliar o crescimento da microalga *Tetrastrum heteracanthum* como base para produção lipídica. Para isto, o experimento teve duração de 45 dias em erlenmeyers de 1L, temperatura 22°C, fotoperíodo de 12h claro/escuro, intensidade luminosa de 3500 lux e pH entre 7,0 e 7,5. Os resultados tiveram base na avaliação de crescimento por espectrofotometria com retirada diária de alíquotas de 10mL.

Observou-se um melhor crescimento no meio CHU, seguido de ASM1 e BBM. Em relação à produção de lipídios, ASM1 e CHU alcançaram 16mL e BBM 12mL. A conclusão do trabalho foi de que a microalga em questão é promissora para produção de biodiesel devido ao seu bom rendimento em óleo, sendo que o melhor meio para esta produção é o CHU por proporcionar um crescimento mais rápido em menor tempo (MIRANDA, 2013).

Visando avaliar a interferência da intensidade luminosa, Militão (2013) realizou seu estudo com a microalga *Tetrastrum heteracanthum*, avaliando as taxas de crescimento e produção de lipídios em 1200, 3800 e 7300lux. O meio de cultura utilizado foi ASM1 em erlenmeyers de 1L, pH ajustado entre 7,0 e 7,5, temperatura  $27 \pm 2^\circ\text{C}$ , fotoperíodo 24h sem aeração e duração de 45 dias. Utilizou as metodologias de contagem direta em microscópio óptico com câmara de Fuchs-Rosenthal e densidade óptica por espectrofotometria, obtendo como resultado a maior quantidade de lipídios no tratamento de menor intensidade (1200lux), apesar do crescimento em número de células ter sido maior nos demais tratamentos

(3800lux e 7300lux). A conclusão foi que a microalga estudada possui perfil de ácidos graxos adequado e por isso constitui uma potencial fonte de biodiesel.

Repossi (2013) estudou o crescimento e produção de lipídios em intensidades luminosas e concentrações de nitrogênio diferentes para *Stichococcus fragilis*. A avaliação foi dividida em dois experimentos. Foram utilizadas as intensidades luminosas de 4000, 2800 e 2000lux (três tratamentos em tréplica) com fotoperíodo integral de luz, temperatura  $28 \pm 2^\circ\text{C}$ , meio de cultura BBM, lâmpadas fluorescentes de 40W e duração de 30 dias. Para avaliação de densidade foram recolhidas alíquotas de 1ml diariamente com contagem em câmaras de Fuchs-Rosenthal. Os maiores valores de biomassa foram identificados no tratamento de menor luminosidade (2000lux), assim como os maiores valores de lipídios.

O experimento com diferentes concentrações de nitrogênio foi realizado em um período de 45 dias, utilizando-se coleta de alíquotas de 5ml a cada três dias analisadas em espectrofotômetro. Foram feitos quatro tratamentos e um controle, sendo dois com concentrações superiores (75% e 50% maior que o protocolo) e dois com concentrações inferiores (75% e 50% menor que o protocolo). O resultado de lipídios totais foi indiferente estatisticamente entre os tratamentos, e maiores valores em biomassa foram obtidos no controle e sem diferença estatística com relação ao tratamento de depleção em 75% de nitrogênio. Não houve diferença significativa entre os demais tratamentos. O estudo conclui que os custos em relação ao nitrogênio podem ser reduzidos com a menor utilização em quantidade desse elemento, visto que a biomassa entre controle e menor valor, e ainda o conteúdo lipídico não foi diferente (REPOSSI, 2013).

Martins (2014), valendo-se também do estresse nutricional, avaliou as microalgas *Ankistrodesmus fusiformes*, *Chlorella vulgaris* e *Desmodesmus spinosus* sob o efeito da escassez de nitrogênio na biomassa e produção lipídica. A temperatura utilizada foi de  $26^\circ\text{C}$ , pH 7, erlenmeyers de 1L com aeração, meio de cultura BBM, intensidade luminosa 3500lux e fotoperíodo 12h por 16 dias. A avaliação foi feita com coletas de 7ml a cada dois dias com cálculo em duplicata obtido através de densidade óptica por espectrofotometria. Foi constatado maior conteúdo lipídico em *D. spinosus*, apesar da diminuição em biomassa. Nas demais espécies estudadas não houve diferença significativa.

Olofsson e colaboradores (2014) combinaram a sazonalidade com diferentes concentrações de nitrogênio na produção de lipídios em *Nannochloropsis oculata* através de fotobiorreator com controle N:P 20 e depleção de N:P 5 e N:P 2,5, meio de cultivo nutribloom, temperatura variando de 10°C à 30°C entre dia e noite e pH 7,5 – 9,5 (dia) e 6,0 (noite). As estações escolhidas foram outono e primavera. Como resultado, a densidade óptica e peso seco tiveram padrão semelhante no outono e primavera do tratamento N:P 20, baixos nas duas estações para N:P 5 e sem diferença significativa em N:P 2,5. Lipídios totais altos em N:P 5 e N:P 2,5 sendo os maiores valores no outono (10-15%), porém, em biomassa, o controle obteve maior sucesso.

Por não serem encontrados trabalhos utilizando a qualidade de luz avaliando crescimento em microalgas, foram reunidos alguns estudos abordando esta vertente em vegetais superiores. Inclusive, a ideia de trabalhar a qualidade de luz foi retirada desses trabalhos.

Lin e colaboradores (2012) estudaram os efeitos da emissão de luz azul, vermelha e branca no crescimento e desenvolvimento de alface hidropônica (*Lactuca sativa*) utilizando-se de pH 6, temperatura em 24°C, fotoperíodo 16h/8h luz e escuro, intensidade luminosa  $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , umidade relativa do ar 75% e aeração constante em solução nutritiva substituída a cada semana. Os tratamentos foram: LEDs vermelhos e azuis (1), LEDs vermelhos, azuis e brancos (2) e lâmpada fluorescente (3) como controle. O mesmo experimento foi realizado duas vezes em momentos diferentes, porém, com as mesmas condições para obtenção de uma média. Cada experimento foi composto de oito plantas em réplica para cada um dos três tratamentos durante 15 dias. Como resultado, foi verificado um maior tamanho da parte aérea e raiz em (2) e menores em (1), não houve diferença significativa entre os pigmentos, a morfologia das plantas cultivadas no tratamento (2) foi normal e em (1) menores.

Fraszczak (2013) estudou os efeitos da luz vermelha e azul em curto prazo para plantas de endro (*Ambrosia*) em condições de 65-70% de umidade, 23/18°C (dia e noite) de temperatura, fotoperíodo de 16h, regadas a cada dois dias. No controle, foram consideradas apenas as plantas iluminadas com LEDs brancos e sem suplementação de cores, nos tratamentos, dois períodos foram considerados: Final do período escuro (fim da noite) e após o período de luz (fim do dia), e nesses

períodos, durante 30 minutos as plantas eram submetidas à luz vermelha ou azul. Os resultados obtidos mostraram que durante o período inicial não houve diferença significativa, porém até o fim do experimento a suplementação em luz vermelha (fim da noite) houve um aumento da massa seca e comprimento das plantas, porém, inibiu significativamente o crescimento do hipocótilo, enquanto na azul (fim da noite) o crescimento do hipocótilo foi bem maior que nas outras combinações, sendo o desenvolvimento da planta menor no fim do dia.

Samuoliené e colaboradores (2010) realizaram estudo com os efeitos da luz vermelha e azul no crescimento e desenvolvimento de morango. O experimento foi composto de dois tratamentos, LEDs vermelhos e LEDs vermelhos e azuis, pH do substrato em 6, armazenados em temperatura  $-2 \pm 1^{\circ}\text{C}$  e fotoperíodo 21/16 (dia e noite). A relação entre parte aérea e raiz foi maior nos morangos tratados com LEDs vermelhos e a combinação de LEDs vermelhos e azuis influenciou positivamente a raiz e folhas inferiores, a biomassa foi 13% maior quando a luz azul era inclusa no experimento e em vermelho houve síntese mais intensa das clorofilas. A adição de 10% de luz azul não influenciou notavelmente os morangos, mas afetou de forma positiva a razão de área foliar; ponderam os autores que esta área pode afetar a planta no sentido de adquirir maior ganho total de carbono e assim aumentar de forma mais rápida seu crescimento.

Round (1983) decorre a respeito de alguns pesquisadores que explanaram inicialmente a ideia da adaptação cromática em algas com argumentos que visaram a determinação de sua zonação. Engelmann (1880) dizia que a cor (comprimento de onda de luz) era o fator importante; no início do século XX, Oltmann afirmava que a intensidade era responsável, e Harder sugeriu que ambos os fatores atuavam. Mais tarde, em 1945, Rabinovich mostrou que a adaptação cromática individual nas algas ocorre em função das diferentes intensidades e comprimentos de onda.

Gaidukow anteriormente realizou um estudo mostrando Cyanophyta alterando sua coloração por meio de iluminação com diferentes cores. O experimento utilizou-se da microalga *Oscillatoria sancta* que alterou sua coloração para verde em luz azul, azul em luz verde, amarela em verde-azul e azul em amarela. O autor imaginou essa mudança por conta de mudança na natureza dos pigmentos, porém, Boresh mostrou serem devidas à concentração relativa dos mesmos. Mothes e Sangromsky ainda realizaram o teste de qualidade de luz em *Chaetoceros* (diatomácea) e observaram

que ocorria uma mudança para marrom-escuro em luz verde e amarelo em luz vermelha, deduziram então que esta mudança acontecia pela diferença na proporção de carotenoides (ROUND, 1983).

Além destes experimentos, Engelmann (1880) novamente realizou um novo experimento iluminando algas *Spirogyra* em microespectro na presença de bactérias e observou que se aglomeravam nas regiões azul e vermelha onde há maior produção de oxigênio (ROUND, 1983).

Senger e outros (1993) estudaram a influência da intensidade luminosa e comprimento de onda no conteúdo de  $\alpha$  e  $\beta$ -caroteno e suas xantofilas em algas verdes. Foram utilizadas lâmpadas de 20W, fotoperíodo de 24h de luz e temperatura em 30°C. As cepas escolhidas foram três *Scenedesmus* mutacionadas, sendo elas: WT-LHC<sub>1</sub>, WT-LHC<sub>3</sub> e C-2A', *Scenedesmus obliquus* (WT) foi o controle. Os resultados mostraram que o  $\alpha$ -caroteno é o pigmento mais afetado pela intensidade e qualidade da luz, a relação entre linoxantina e luteína é claramente evidente tanto nas intensidades como em comprimentos de luz diferentes (vermelho e azul), e diminuem acentuadamente em baixa intensidade luminosa. A composição de carotenoides em porcentagem foi dividida por fotoperíodo em claro (C) e escuro (E), neoxantina foi mais alta em WT (C), linoxantina em WT-LHC<sub>3</sub> (C/E) e C-2A' (C), violaxantina em WT-LHC<sub>4</sub> (C), WT-LHC<sub>3</sub> (E) e C-2A', zeaxantina obteve seu pico em C-2A' (C),  $\alpha$ -caroteno em WT-LHC<sub>3</sub> (C) e  $\beta$ -caroteno em WT-LH<sub>3</sub> (C/E).

É válido lembrar que cada experimento obteve seus resultados decorrentes do tratamento e microalga utilizada podendo variar como abordam as discussões destes mesmos trabalhos.

Devido à grande variedade de respostas nas diferentes condições de cultivo e linhagens de microalgas, é possível perceber que ainda não há uma cepa ideal para potencializar a produção de biodiesel. Isto pode ser explicado pelo fato dos grupos algais serem muito diversos em tipos de pigmentos fotossintetizantes, substância de reserva, coloração, adaptações como mucilagem, vacúolos, formação de gotículas de óleo, capacidade de "blooms" e, assim, com comportamentos distintos frente às condições impostas as células.

Portanto, apesar dos vários estudos abordando o biodiesel de microalgas, ainda não há um consenso da seleção de espécies e sistema de cultivo em massa ideal. Desta

forma, é necessário que mais trabalhos sejam feitos sobre o tema, principalmente visando formas de cultivo e utilização de equipamentos com menor valor agregado, visto que este é um ponto que inviabiliza o processo em relação à competição com os combustíveis fósseis.

### 3 METODOLOGIA

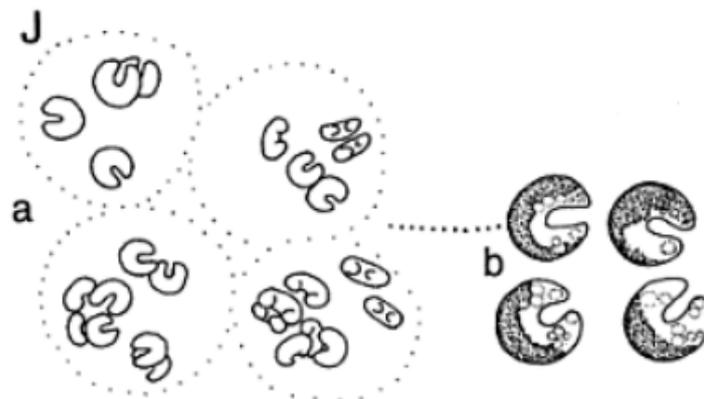
#### 3.1 LINHAGENS-ALVO

As espécies utilizadas nos experimentos fazem parte dos gêneros *Kirchneriella* e *Scenedesmus*, que estão inclusos na divisão Chlorophyta, na qual há enorme variabilidade morfológica, compreendendo formas unicelulares cocóides, monadais, colônias pequenas, de tamanho intermediário, grandes e filamentos. São dotadas de plastos fotossintetizantes com número e formas variados, porém regulares entre as espécies tendo uma grande importância taxonômica além de armazenar clorofila *a*, *b*,  $\beta$ -caroteno e várias xantofilas (LOURENÇO, 2006).

##### 3.1.1 *Kirchneriella obesa* (G.S. West) Schmidle, 1893

O gênero *Kirchneriella* é cosmopolita e inclui 18 espécies (BICUDO; MENEZES, 2006) dentre elas a microalga verde *Kirchneriella obesa* (G.S. West) Schmidle, 1893 (Figura 3), a qual é caracterizada por indivíduos em colônias de 4-8-16 células ou isolados. Em linhas gerais, as células são circulares em forma crescente (lunadas), geralmente com lados quase paralelos, ápices arredondados, cloroplasto único e parietal preenchendo quase todo o interior da célula e pirenóide presente, aproximadamente central. O diâmetro varia entre 5-13 $\mu$ m (BICUDO ; MENEZES, 2006; HENTSCHKE ; PRADO, 2012; JOHN et al., 2002).

Figura 3 – Microalga verde *Kirchneriella obesa* (J), cenóbio envolto por mucilagem (a) esquema detalhando a morfologia celular e do cloroplasto (b)

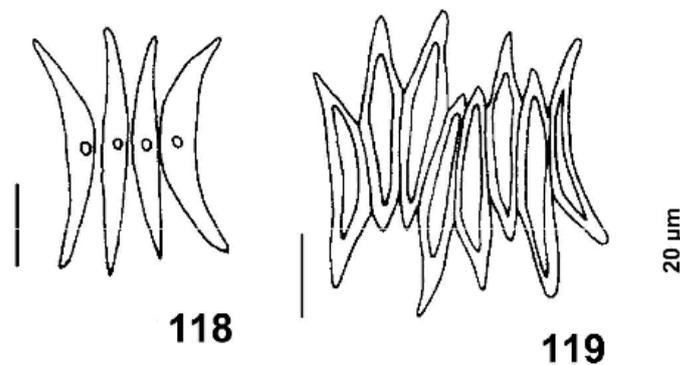


Fonte: John et al. (2002)

### 3.1.2 *Scenedesmus acuminatus* (Lagerhein) Chodat, 1902

As algas pertencentes ao gênero *Scenedesmus* possuem grande plasticidade morfológica, rápido crescimento e fácil adaptação às variações ambientais (HEGEWALD; WOLF, 2003), dentre elas, *Scenedesmus acuminatus* (Lagerhein) Chodat, 1902 (Figura 4) a qual é formada por cenóbios planos de 4-8 células dispostas alternada ou linearmente, lunadas, fusiformes, com células internas quase retas e externas arqueadas, comprimento 20, 4-34, 1µm, largura 3,0-5, 42µm, um pirenóide e plasto parietal (GODINHO, 2009).

Figura 4 – Microalga *Scenedesmus acuminatus* em um cenóbio de 4 células (118) e outro de 8 células evidenciando o plasto parietal (119)



Fonte: Godinho (2009)

### 3.2 CLASSIFICAÇÃO DO CULTIVO

As diferentes formas de cultivar microalgas são dependentes do fim desejado para a biomassa formada, sendo então aplicadas metodologias que visam alcançar esta finalidade. Os cultivos podem ser classificados de diversas maneiras quanto as espécies cultivadas, meio utilizado, teor de nutrientes, presença de contaminantes microbianos, entre outros, sendo que um mesmo cultivo pode receber mais de uma classificação. Aqui, para proporcionar maior controle sobre as culturas e entender seu desenvolvimento, optou-se pelo cultivo monoalgáceo em que apenas a população de uma mesma espécie é cultivada, embora outros microrganismos não-algais possam estar associados (LOURENÇO, 2006).

### 3.2.1 Meio de cultura

Para as duas cepas, foi utilizado o meio de cultura ASM1 (GORHAM; MCLACHLAN; HAMMER, 1964), constituído de quatro soluções estoque denominadas A, B, C e D (Tabela 2) que inclui nutrientes e elementos essenciais para o crescimento microalgal (LOURENÇO, 2006).

O preparo da solução A se inicia com 200 ml de água deionizada e os sais (com suas respectivas massas) relacionados na Tabela 2. Para as soluções B, C e D, utiliza-se 100 ml água deionizada e os respectivos sais apresentados na Tabela 2. A proporção das soluções A, B, C e D é de 20 ml, 2 ml, 0,1 ml e 0,4 ml, respectivamente, em 1L de água deionizada.

Tabela 2 – Soluções estoque do meio ASM1 com as respectivas massas e composições

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

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

### 3.2.2 Tipo de cultivo

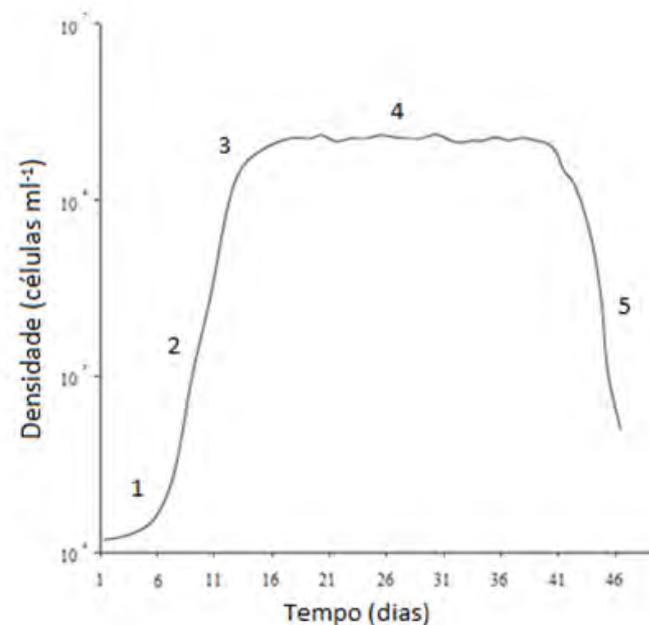
O cultivo realizado classifica-se em batelada ou estanque (LOURENÇO, 2006), caracterizado por nenhum componente ser adicionado ao longo do experimento após a inoculação das células. O volume pode ser removido total ou parcialmente em determinado momento, porém este não é substituído por novo meio de cultura.

Este tipo de cultivo é marcado por cinco fases: Adaptação, crescimento exponencial, redução do crescimento, estacionária e senescência (Figura 5).

A fase de adaptação (1) é marcada por defasagem inicial no crescimento por conta da transferência do inóculo para o novo meio de cultura; na fase de crescimento

exponencial (2) a taxa de crescimento se torna aproximadamente constante e alta por um período curto de tempo devido ao alto teor de nutrientes e baixo número de células; já na fase de redução (3) ocorre decréscimo na taxa de crescimento por conta da queda de nutrientes dissolvidos e autosombreamento; a fase estacionária (4) mostra o rendimento final máximo da cultura quando o maior número possível de células se desenvolveu e se mantém estável; finalmente, a fase de senescência (5) ocorre quando ainda pode haver crescimento, mas o valor de indivíduos senescentes é maior reduzindo o número de indivíduos (LOURENÇO, 2006).

Figura 5 – Representação esquemática do desenvolvimento de microalgas em cultivo tipo estanque em suas cinco fases



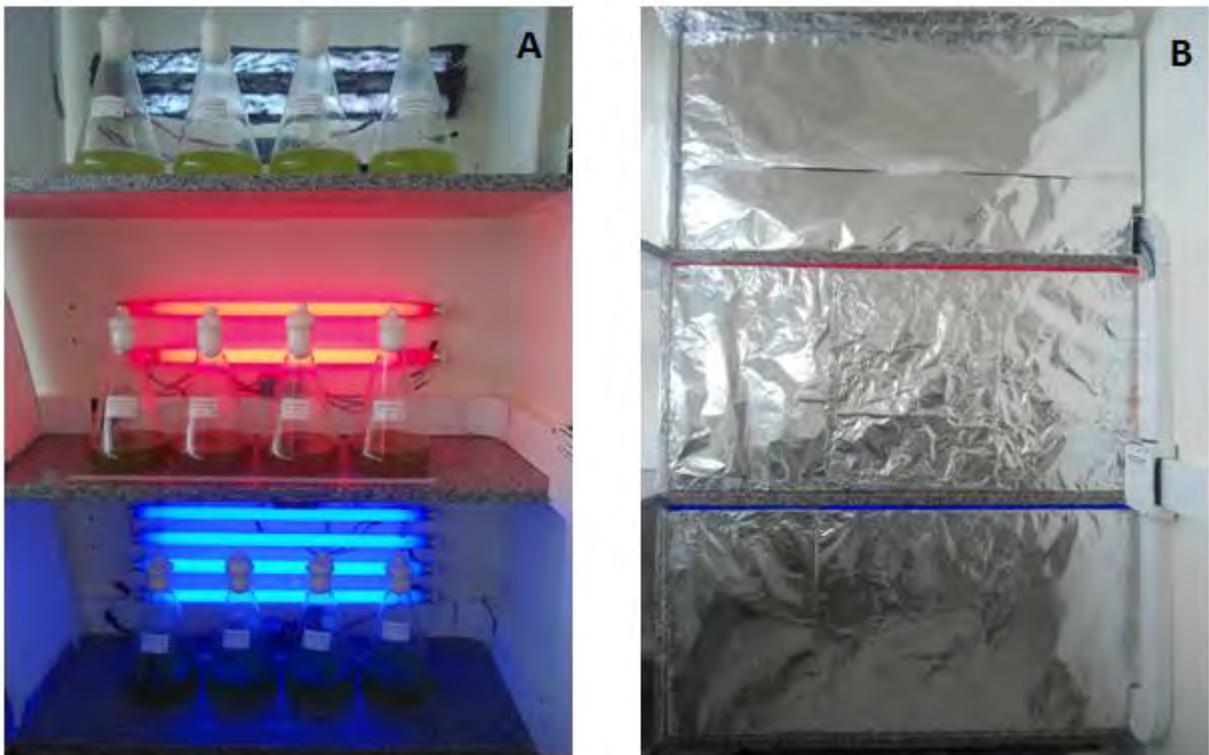
Fonte: Lourenço (2006)

### 3.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

As culturas foram submetidas a dois experimentos: Variação na concentração de nitrogênio e na qualidade da luz, cada um deles com três tratamentos. Os experimentos foram desenvolvidos na sala de cultivo do Laboratório de Taxonomia e Ecologia de Algas Continentais/UFES (LATEAC), a qual possui três bancadas (com alturas diferentes) instaladas de forma adjacente às paredes da sala. Nos dois experimentos as lâmpadas (independente da cor) foram instaladas na parede da sala de cultivo, posicionadas lateralmente aos erlenmeyers.

No experimento com diferentes comprimentos de onda de luz, para que não houvesse interferência das demais lâmpadas brancas da sala de cultivo, as bancadas foram fechadas com isopor envolvido por papel alumínio na parte externa, apresentado na Figura 6. Além disso, foi demarcado nas bancadas o espaçamento dos erlenmeyers às lâmpadas, isso foi necessário para que as intensidades dos três tratamentos fossem igualadas.

Figura 6 – Disposição dos erlenmeyers nas bancadas (A), recobrimento das folhas de isopor com papel alumínio impedindo a entrada da luz branca (B)



Fonte: Arquivo próprio

O valor de intensidade luminosa adotado nos dois experimentos foi de aproximadamente 450lux aferido através de um luxímetro ICEL Manaus, LD-550, externamente aos erlenmeyers. Para alcançar este valor, as lâmpadas brancas foram envolvidas por um sombrite, já que naturalmente a intensidade luminosa dessa lâmpada possui um valor maior. É importante enfatizar que, através do uso de sombrites e da disposição dos erlenmeyers nas bancadas, todos os tratamentos receberam a mesma intensidade luminosa, independente da potência e quantidade de lâmpadas.

Para o experimento com diferentes concentrações de nitrogênio foi adotado como controle o peso de 1,70g presente na solução A na forma de nitrato ( $\text{NO}_3$ ), sendo os tratamentos, o dobro (3,40g) e metade (0,85g) desse valor. Esses tratamentos foram chamados de N, N+ e N- respectivamente. As quatro lâmpadas utilizadas nesse experimento são fluorescentes da marca EMPALUX com 40W de potência cada.

O experimento envolvendo diferentes comprimentos de onda de luz foi composto pelas faixas do espectro visível: branco, azul e vermelho, sendo branco o controle. Foram utilizadas duas lâmpadas brancas da marca EMPALUX, duas lâmpadas vermelhas da marca SCT e quatro lâmpadas azuis da marca LUXOR. Independente da cor, todas as lâmpadas eram fluorescentes e possuíam 20W de potência. A escolha das cores foi feita com base em seu comprimento de onda destacados na Tabela 3, pois é nas faixas do vermelho e azul que se encontram as maiores taxas de absorção das clorofilas *a*, *b* e carotenoides (ESTEVES, 1998; LARCHER, 2006).

Tabela 3 – Principais radiações de interesse biológico, sendo azul e vermelho as principais radiações envolvidas na fotossíntese

| Cor               | Faixa de Comprimento de Onda (nm) | Energia Média ( $\text{kJ mol}^{-1}$ fótons) |
|-------------------|-----------------------------------|--|
| Ultravioleta      | 100 – 400                         |  |
| UV – C            | 100 – 280                         | 471  |
| UV – B            | 280 – 320                         | 399  |
| UV – A            | 320 – 400                         | 332  |
| Visível           | 400 – 740                         |  |
| Violeta           | 400 – 425                         | 290  |
| Azul              | 425 – 490                         | 274  |
| Verde             | 490 – 550                         | 230  |
| Amarelo           | 550 – 585                         | 212  |
| Laranja           | 585 – 640                         | 196  |
| Vermelho          | 640 – 700                         | 181  |
| Vermelho distante | 700 – 740                         | 166  |
| Infra-Vermelho    | > 740                             | 85   |

Fonte: Hopkins (2000)

Dentre os pigmentos mais relevantes, a clorofila *a* apresenta picos de absorção em 664nm e 430nm e é o principal pigmento que participa do processo fotossintético. Já a clorofila *b*, tem picos de absorção em 647nm e, aproximadamente, 468nm.

Cada experimento durou 45 dias, durante os quais foi utilizado fotoperíodo de 24 horas de luz sendo, cada tratamento em quadruplicata, totalizando 24 unidades experimentais. Dessas, 12 são equivalentes ao tratamento por nitrogênio e 12 por

comprimento de onda de luz, sendo que cada valor de nitrogênio (1,70g, 3,40g e 0,85g) compõe quatro unidades, assim como cada comprimento de onda de luz (branco, azul e vermelho). Os experimentos foram feitos simultaneamente e sem aeração mecânica.

Para o experimento com variação de nitrogênio a microalga *K. obesa* foi escolhida e nos diferentes comprimentos de onda de luz, *S. acuminatus*, as duas presentes no banco de cepas do LATEAC com as numerações L009A e L027A, respectivamente.

O cultivo foi realizado em erlenmeyers de 1000 ml, sendo utilizados apenas 500 ml do meio de cultura (volume final) para que houvesse espaço de trocas gasosas. Em seguida, o pH, visto como essencial para que componentes do meio possam ser efetivamente absorvidos, foi previamente ajustado em 7,0 através do gotejamento de ácido clorídrico (HCl) e hidróxido de sódio (NaOH) quando necessário. Posteriormente, os frascos foram vedados com algodão envolvido por gaze (permitindo aeração e redução da entrada de contaminantes) e autoclavados como método de esterilização. Em seguida, os frascos foram levados para o fluxo laminar, onde, junto ao meio de cultura, foram inoculados 24 ml de *K. obesa* (nitrogênio) e 23 ml de *S. acuminatus* (qualidade da luz). Sendo assim, a densidade inicial foi de 50.000 cel/mL para cada um dos dois experimentos.

O volume do inóculo e a concentração inicial de células, para os dois experimentos, foram calculados através da equação,

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

Sendo:

**C<sub>1</sub>** = Concentração inicial

**V<sub>1</sub>** = Volume inicial

**C<sub>2</sub>** = Concentração final

**V<sub>2</sub>** = Volume final

Durante o experimento, a temperatura foi aferida e mantida de acordo com as possibilidades do laboratório, por ser um dos fatores que podem afetar a taxa metabólica dos organismos (LOURENÇO, 2006), em  $24 \pm 2^\circ\text{C}$  para *K. obesa* e  $25 \pm$

4°C para *S. acuminatus* (essa diferença ocorreu devido ao experimento da qualidade da luz ter sido realizado em ambiente fechado por isopor).

As culturas foram agitadas todos os dias (cerca de duas vezes) para evitar o chamado auto-sombreamento em que a intensidade da luz diminui por indivíduo devido ao aumento da densidade de células por tempo de cultivo. Com a agitação, todas as células tendem a receber a mesma radiação. Além disso, os erlenmeyers tiveram suas posições trocadas aleatoriamente para que todas as culturas recebessem as mesmas condições luminosas (LOURENÇO, 2006).

A avaliação de polimorfismo nas células foi feita por conta do avanço de crescimento das culturas, quando é possível ocorrer perda progressiva de fatores estimulantes e diminuição de recursos, levando a modificação do estado fisiológico das células como deformação, tamanho e movimento (LOURENÇO, 2006).

### 3.4 MEDIDAS DE CRESCIMENTO

O crescimento foi avaliado através da espectrofotometria e contagem direta por microscopia em câmara de Fuchs-Rosenthal para determinação da densidade celular. A biomassa, por peso seco, também foi utilizada como medida de crescimento.

As coletas foram feitas em câmara de fluxo laminar vertical PACHANE PCR T3 para evitar contaminação por microrganismos que são retidos em um filtro especial, além disso, a abertura dos frascos foi feita ao redor da chama produzida pelo bico de Bunsen, sendo este um procedimento antimicrobiano (LOURENÇO, 2006).

#### 3.4.1 Densidade óptica

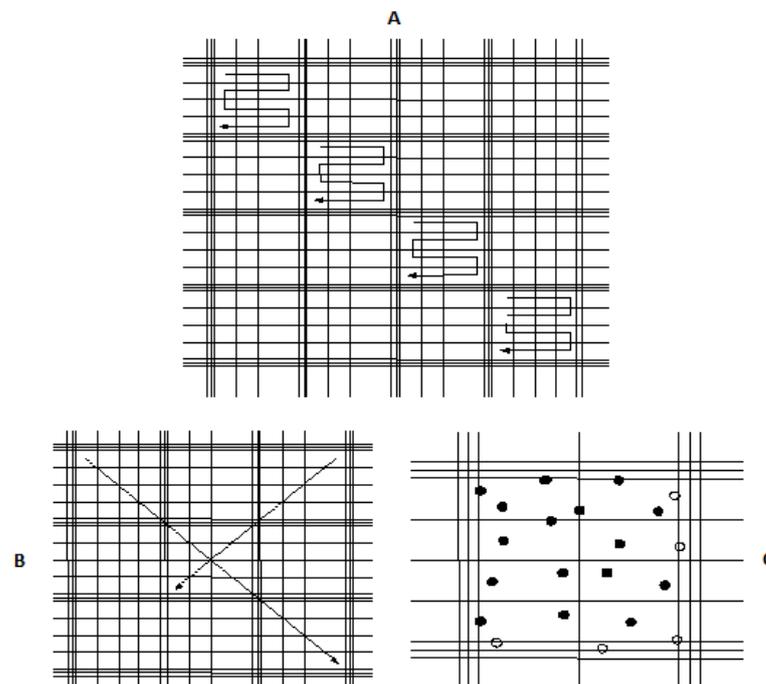
De acordo com Lourenço (2006) a densidade óptica baseia-se na obstrução física da luz pelas células através do espectrofotômetro em intervalos de tempo controlados. Essa medição é feita em um comprimento de onda de 570nm, que está distante das faixas de absorção máxima feita pelas clorofilas e carotenoides. Desta forma, a absorvância (absorção da luz) é pouco influenciada por esses pigmentos fotossintéticos.

Com isso, a luz passa por células em suspensão presentes na amostra. Quanto maior a densidade, maior a absorbância e menor a passagem de luz pela amostra (transmitância) (LOURENÇO, 2006). As coletas para determinação dessa densidade foram feitas em duplicata para obtenção de uma média a cada três dias, contados a partir do dia três, com alíquotas de 5 ml. O espectrofotômetro utilizado foi TERMO Scientific Aquamate Plus UV-VIS.

### 3.4.2 Contagem direta por microscopia

Em microscópio óptico comum OLYMPUS CX41RF as células de cada tratamento foram contadas visualmente em câmara de Fuchs-Rosenthal (Figura 7) como forma de determinar uma constante, para, transformar os dados de absorbância informados pelo espectrofotômetro em cél/ml.

Figura 7 – Imagens da câmara de contagem Fuchs-Rosenthal. (A) Representação esquemática completa constituída de 16 quadrados maiores de  $1,0 \text{ mm}^2$  formados por 16 menores de  $0,0625 \text{ mm}^2$  indicando padrão de contagem interno em “zig zag”, (B) Padrão de contagem diagonal, (C) Critério de contagem das células nos quadrantes, sendo demonstradas em preto as que devem ser contadas e branco as desconsideradas.



Fonte: Lourenço (2006)

### 3.4.3 Taxa e velocidade de crescimento

Para converter absorbância em densidade celular (células ml<sup>-1</sup>), foram utilizadas amostras do 15º dia de cada tratamento (nos dois experimentos) para contagem manual em câmaras de Fuchs-Rosenthal. Esta data foi escolhida com base no dia em que a curva de crescimento se apresentou mais estável. Com os dados de densidade celular foi possível obter a taxa de crescimento e tempo médio de duplicação através das equações de Fogg e Thake (1987) citado por Nascimento (1996):

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

Sendo,

$\mu$  = Velocidade específica de crescimento

$N_1$  e  $N_2$  = Número de células nos tempos  $t_1$  e  $t_2$

Com o valor de  $\mu$  é possível calcular o tempo médio de duplicação ( $G$ ):

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

Sendo,

$\mu$  = Velocidade específica de crescimento

### 3.4.4 Medidas de biomassa

Foram coletados a cada cinco dias 10 ml de cada unidade experimental e filtradas através de um kitasato e funil de Buchner ligados a uma bomba de vácuo. O volume passa por filtros com diâmetro de 47mm e poros 0,7 $\mu$ m. Estes filtros são deixados na estufa com temperatura 40°C por 24h antes da filtração e pesados previamente para posterior cálculo. Após, as amostras foram filtradas e colocadas na estufa onde a leitura é feita 24, 48 e 72h depois (para se obter um peso estável) em uma balança de precisão SHIMADZU AY220. A unidade final utilizada foi mg/L (LOURENÇO, 2006).

Foi utilizada a equação de Peso Seco (**PS**), sendo:

$$\text{PS} = \text{Pf} - \text{Pi} / \text{V}$$

**Pf** = Peso final

**Pi** = Peso inicial

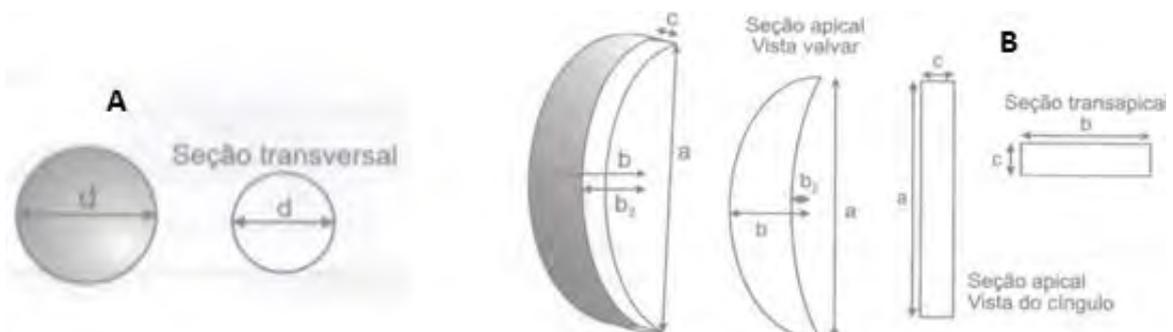
**V** = Volume filtrado

### 3.5 MEDIDAS DE BIOVOLUME CELULAR

No decorrer de um cultivo podem ocorrer diversas variações celulares além do seu crescimento quantitativo. Essas alterações podem ser químicas (maior ou menor produção de metabólitos primários ou secundários) ou morfológicas (mudanças no formato ou volume celular – biovolume). A análise do biovolume de uma cultura oferece uma melhor compreensão sobre as condições de desenvolvimento das microalgas em cultivo que, eventualmente, podem aumentar ou diminuir o biovolume em relação aos nutrientes dissolvidos, por exemplo (LOURENÇO, 2006).

Para determinar o biovolume é necessário obter medidas celulares específicas (o que varia de acordo com a forma da célula estudada). Para tanto, as microalgas foram primeiramente fotografadas em microscópio de fotografia NIKON DS-Ri1 e mensuradas através do programa TS View. As medidas realizadas seguiram o formato das células de acordo com as dimensões destacadas na Figura 8 e feitas em todas as coletas realizadas.

Figura 8 – Esquema das medidas necessárias para determinar biovolume de acordo com o formato da microalga. Utilizada (A) para *K. obesa* e (B) para *S. acuminatus*



Fonte: Lourenço (2006)

Posteriormente, a medida de volume celular foi multiplicada pela densidade celular do cultivo, o que resulta no biovolume final, cujos resultados são expressos em  $\text{mm}^3/\text{L}$ .

### 3.6 ANÁLISES DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA

As análises de composição química são medidas de lipídios e nitrogênio total, clorofila e proteínas, por exemplo, e são úteis como indicadores de crescimento por se referirem ao acúmulo de substâncias em determinado período de tempo. Na avaliação de seus resultados pode-se obter resposta quanto às condições de cultivo empregadas (LOURENÇO, 2006).

#### 3.6.1 Medidas de clorofila por espectrofotometria

A extração dos pigmentos fotossintetizantes foi feita segundo Lourenço (2006) por meio de acetona 90% devido à clorofila ser uma molécula de polaridade leve, assim, a adição da acetona leva a maior eficiência da extração. Os pigmentos medidos foram: clorofilas *a*, *b* e *c*, carotenoides e feopigmentos designados como derivados inativos da clorofila *a*.

O procedimento foi realizado duas vezes, na metade e fim dos experimentos, por meio de filtração a vácuo, utilizando-se filtros de fibra de vidro com porosidade de  $0,7\mu\text{m}$ , em seguida foram macerados e refrigerados por 24h para completar a extração dos pigmentos. As amostras foram centrifugadas em centrífuga não refrigerada HERMILE Labortechnik GmbH 206A para redução de materiais em suspensão e lidas pelo espectrofotômetro calculando-se as concentrações de cada pigmento através das equações abaixo:

Clorofila *a* e feofitina propostas por Lorenzen (1967):

$$[\text{Clorofila } a \text{ } (\mu\text{g L}^{-1})] = 26,73 \times [(A_{664\text{nm}} - A_{750\text{nm}}) - (A_{664\text{nm}} - A_{750\text{nm}})] \times v / (V \times c)$$

$$[\text{Feofitina } a \text{ } (\mu\text{g L}^{-1})] = 26,73 \times [1,8 \times (A_{664\text{nm}} - A_{750\text{nm}}) - (A_{664\text{nm}} - A_{750\text{nm}})] \times v / (V \times c)$$

Clorofila *b* e *c* pela equação de Jeffrey e Humphrey (1975) citado por Lourenço (2006):

$$[\text{Clorofila } b \text{ } (\mu\text{g L}^{-1})] = [21,03 \times A_{647\text{nm}} - 5,43 \times A_{664\text{nm}} - 2,66 \times A_{630\text{nm}}] \times v / (V \times c)$$

$$[\text{Clorofila } c \text{ } (\mu\text{g L}^{-1})] = [24,52 \times A_{630\text{nm}} - 1,67 \times A_{664\text{nm}} - 7,60 \times A_{647\text{nm}}] \times v / (V \times c)$$

Carotenóides totais, por Strickland e Parson (1968) citado por Lourenço (2006):

$$[\text{Carotenóides totais } (\mu\text{g L}^{-1})] = [7,6 \times A_{480\text{nm}} - (3,0 \times A_{750\text{nm}}) - 1,49 \times A_{510\text{nm}} - 6,9 (2,0 \times A_{750\text{nm}})] \times v / (V \times c)$$

Em que:

**v** = Volume de acetona utilizado (L)

**V** = Volume filtrado (L)

**c** = Caminho óptico da cubeta (cm)

**A** = Absorbância

### 3.6.2 Análise de lipídios totais

Em uma centrífuga não refrigerada SIGMA 6-15 foram centrifugados, a 4500 rpm durante 10min, cerca de 300 ml de amostra de cada unidade experimental, descartando o sobrenadante e conservando o *pellet*. Após isso, as microalgas concentradas foram congeladas em ultrafreezer de 45°C negativos (necessário para que o processo de liofilização ocorra, garantindo a conservação do material sem dano do conteúdo) e liofilizadas em seguida. A quantidade de vezes em que as amostras foram centrifugadas variou em *K. obesa* provavelmente por conta da alta concentração de mucilagem. Porém, para *S. acuminatus* foi necessária apenas uma centrifugação.

O processo de liofilização acoplado à bomba de vácuo é adequado por extrair toda a água, preservando as características químicas da amostra, sendo mais interessante em pequenas quantidades e dispensando a utilização de agentes químicos como no

caso da floculação. O liofilizador utilizado foi SOLAB SL-404, com temperatura 49,1°C negativos.

Figura 9 – Biomassa em processo de liofilização



Fonte: Arquivo próprio

Para extração dos lipídios totais o presente trabalho seguiu o protocolo de Bligh e Dyer (1959) proposto como “Método rápido para extração e purificação dos lipídios totais”. Essa metodologia é considerada uma das mais versáteis e efetivas, superando dificuldades encontradas em outros métodos. É importante salientar que este método é uma versão simplificada do procedimento clássico proposto por Folch e colaboradores em 1956 (BRUM et al., 2009). A extração foi feita apenas uma vez no final dos experimentos, já que o volume de cultivo em laboratório é baixo em relação aos realizados em larga escala (como o cultivo em fotobiorreatores), sendo necessária uma quantidade significativa de volume de cultivo para o sucesso do procedimento.

Determinado o peso da biomassa liofilizada, calculou-se 2 ml de água destilada para cada 0,5g de biomassa seca seguindo o procedimento realizado por Santos (2013). Nessa mistura foi adicionada solução de clorofórmio:metanol 1:2 (7,5mL) sendo 5 ml de metanol imediato e clorofórmio 2,5 ml anterior à agitação feita por 2min e 2,5 ml após. Adicionando mais 2,5 ml de água destilada, novamente a agitação é feita e a amostra centrifugada à 3500 rpm por 10min em tubos falcon.

A fase orgânica foi transferida para Beckers previamente pesados em balança analítica SHIMADZU AY220, submetidos à alta temperatura para evaporação do remanescente líquido, e colocados em estufa a 40°C por 24h, pesados e calculados posteriormente através da equação, sendo:

$$\%LT = (Mf - Mi) \times 100 / Mb$$

**%LT** = Porcentagem de lipídios totais

**Mf** = Massa final

**Mi** = Massa inicial

**Mb** = Biomassa utilizada (liofilizada)

### 3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Com os valores obtidos de peso seco, pigmentos e lipídios totais foram feitas tabelas e posteriormente gráficos de colunas ou linhas através do programa Microsoft Excel 2007, com apresentação das médias e desvios padrão de cada tratamento. Para o biovolume, pelo mesmo programa, foi feito gráfico de dispersão para evidenciar possíveis correlações entre peso seco e biovolume.

Os dados de densidade celular (dentro de cada dia, isoladamente), peso seco, pigmentos, biovolume e lipídios totais foram submetidos ao teste de ANOVA para determinar ocorrência de diferenças significativas no experimento. Em caso positivo, foi realizado o teste de Tukey para determinar qual(is) tratamento(s) foram significativamente distintos entre si. Esses testes foram realizados no programa PAST, com 5% de significância.

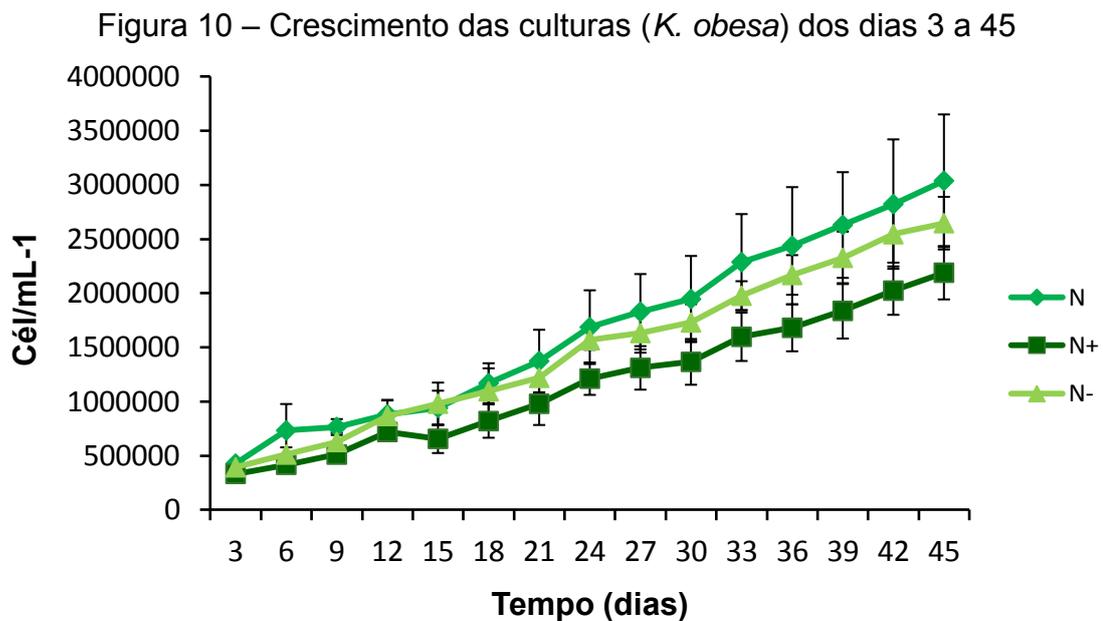


## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 *Kirchneriella obesa* x CONCENTRAÇÃO DE NITROGÊNIO

#### 4.1.1 Crescimento

A Figura 10 mostra que as culturas de todos os tratamentos, desde o terceiro dia do experimento (quando a primeira coleta foi realizada), estiveram na fase exponencial de crescimento, não apresentando as demais fases.



Fonte: Elaboração própria

A maior parte dos estudos realizados com nitrogênio, visando a potencialidade de microalgas como fonte de biodiesel, utiliza a depleção deste elemento, já que a base literária afirma que menores concentrações de nitrogênio produzem maiores valores lipídicos. Assim, os trabalhos de Martins (2014), Olofsson e colaboradores (2014) e Chagas (2010) trabalharam apenas com concentrações menores que o protocolo. É possível discutir os resultados com o estudo feito por Repossi (2013) utilizando duas concentrações maiores e duas menores que o controle. O resultado foi um crescimento maior no controle e em menor concentração de nitrogênio (-75%), corroborando com os resultados do presente trabalho, em que maiores taxas de crescimento foram também no controle e depleção de nitrogênio.

As taxas de crescimentos (Tabelas 4 e 5) apresentaram os maiores valores no 6º dia do controle (0,18018) e 12º dia do dobro e metade da concentração de nitrogênio, com 0,11421 e 0,10797 respectivamente. Já no tempo de duplicação (Tabelas 6 e 7), as menores taxas (crescimento mais rápido) oscilaram até o 24º dia de cultivo e a partir deste momento se tornaram elevadas (crescimento mais lento).

Tabela 4 – Taxas de crescimento (*K. obesa*) dos dias 6 a 24

| TAXA DE CRESCIMENTO ( $\mu$ ) |         |         |         |          |         |         |         |
|-------------------------------|---------|---------|---------|----------|---------|---------|---------|
|                               | 6       | 9       | 12      | 15       | 18      | 21      | 24      |
| N                             | 0,18018 | 0,01391 | 0,04770 | 0,02170  | 0,07219 | 0,05363 | 0,06829 |
| N+                            | 0,07472 | 0,06773 | 0,11421 | -0,03075 | 0,07430 | 0,05920 | 0,07082 |
| N-                            | 0,08748 | 0,06784 | 0,10797 | 0,04104  | 0,03683 | 0,03575 | 0,08351 |

Fonte: Elaboração própria

Tabela 5 – Taxas de crescimento (*K. obesa*) dos dias 27 a 45

| TAXA DE CRESCIMENTO ( $\mu$ ) |         |         |         |         |         |         |         |
|-------------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
|                               | 27      | 30      | 33      | 36      | 39      | 42      | 45      |
| N                             | 0,02702 | 0,02067 | 0,05379 | 0,02130 | 0,02515 | 0,02362 | 0,02449 |
| N+                            | 0,02630 | 0,01384 | 0,05205 | 0,01693 | 0,02961 | 0,03228 | 0,02616 |
| N-                            | 0,01374 | 0,01935 | 0,04441 | 0,03088 | 0,02345 | 0,02982 | 0,01310 |

Fonte: Elaboração própria

Tabela 6 – Tempo de duplicação (*K. obesa*) dos dias 6 a 24

| TEMPO DE DUPLICAÇÃO (G) |         |          |          |           |          |          |          |
|-------------------------|---------|----------|----------|-----------|----------|----------|----------|
|                         | 6       | 9        | 12       | 15        | 18       | 21       | 24       |
| N                       | 3,84687 | 49,81612 | 14,53004 | 31,93536  | 9,60189  | 12,92523 | 10,15024 |
| N+                      | 9,27671 | 10,23397 | 6,06886  | -22,54491 | 9,32962  | 11,70889 | 9,78711  |
| N-                      | 7,92319 | 10,21689 | 6,41956  | 16,88981  | 18,81832 | 19,39080 | 8,30033  |

Fonte: Elaboração própria

Tabela 7 – Tempo de duplicação (*K. obesa*) dos dias 27 a 45

| TEMPO DE DUPLICAÇÃO (G) |          |          |          |          |          |          |          |
|-------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
|                         | 27       | 30       | 33       | 36       | 39       | 42       | 45       |
| N                       | 25,65353 | 33,54188 | 12,88598 | 32,54379 | 27,55681 | 29,34665 | 28,30363 |
| N+                      | 26,35537 | 50,08903 | 13,31701 | 40,94953 | 23,41257 | 21,47483 | 26,49962 |
| N-                      | 50,44839 | 35,81652 | 15,60717 | 22,44990 | 29,55417 | 23,24522 | 52,91719 |

Fonte: Elaboração própria

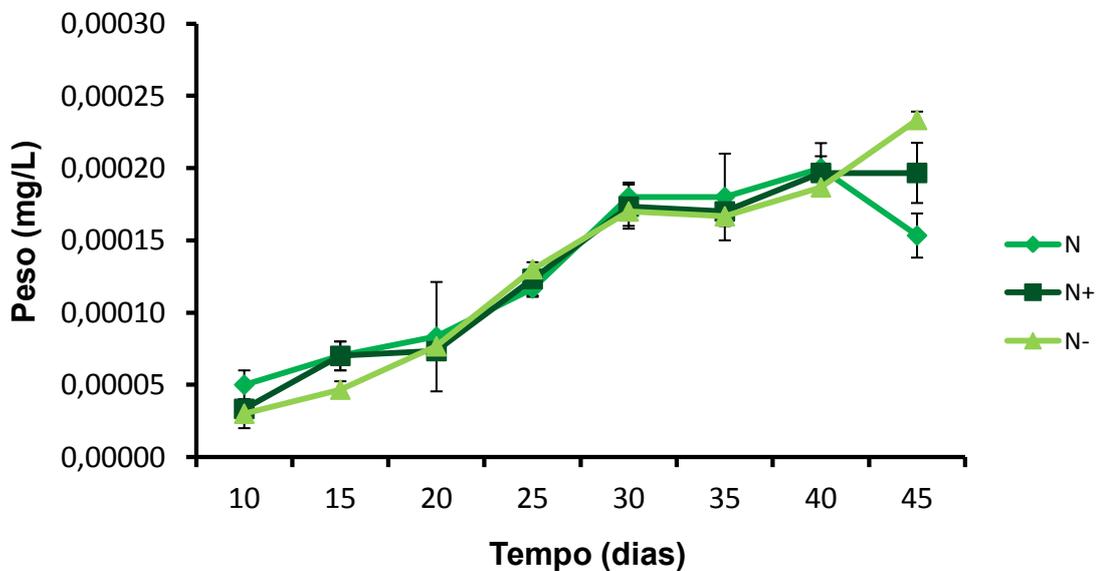
Conforme apresentado, as taxas de crescimento foram maiores no início do cultivo. Esse fato ocorreu porque o número de células nos primeiros dias do experimento é baixo e há abundância de nutrientes no meio de cultura. Uma vez que os nutrientes não estão limitando o crescimento da cultura, as microalgas investem na

reprodução, o que fica comprovado pelo menor tempo de duplicação nos primeiros dias. Também é possível perceber que o tempo de duplicação foi baixo até o 21º dia, aproximadamente (o que não ocorreu com a taxa de crescimento), em todos os tratamentos, provavelmente pelo acúmulo de nutrientes no interior das células. A ausência de fase de adaptação pode ser explicada pela microalga ter sido cultivada desde o início em meio ASM1, o mesmo meio de cultura que foi utilizado no experimento. Assim, como a única diferença do inóculo para o experimento é a concentração de nitrogênio, o crescimento exponencial foi possível desde o início do cultivo.

#### 4.1.2 Peso seco

A biomassa seca dos dias 10 a 20 sofreu pouca alteração, entre o 20º e 30º dia houve um aumento contínuo, nos dias 30, 35 e 40 novamente as alterações permaneceram quase indiferentes. No 45º dia de experimento o peso seco do controle diminuiu, enquanto o peso seco do tratamento com metade da concentração de nitrogênio aumentou. O valor de peso seco do tratamento com o dobro da concentração de nitrogênio foi mantido (Figura 11).

Figura 11 – Peso seco das culturas (*K. obesa*) dos dias 10 a 45



Fonte: Elaboração própria

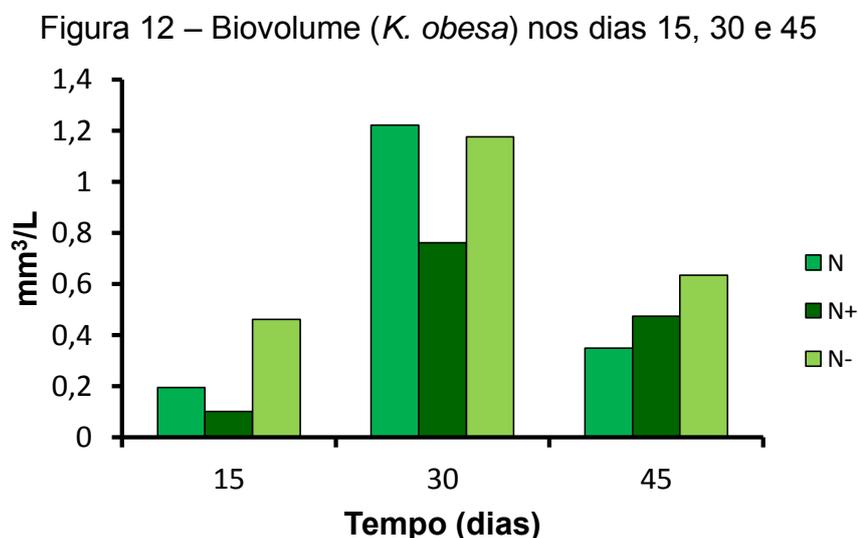
A análise do gráfico pode ser dividida em quatro pontos. Do 10º ao 20º dia houve crescimento, porém não acentuado, que em conjunto com a taxa de crescimento e tempo de duplicação pode ser explicado pela abundância de nutrientes, fazendo com que a reprodução fosse o maior investimento dos organismos. Entre o 20º e 30º dia, apesar do avanço no crescimento, os organismos passaram a investir em crescimento celular (biovolume) pela menor quantidade de nutrientes dissolvidos, a partir do 30º até o 40º dia os nutrientes passaram a ser limitados fazendo com que o crescimento continuasse, porém lentamente. No 45º dia o valor em biomassa pode ser explicado pelo conteúdo interno das células discutido no próximo tópico.

Os estudos de Olofsson e colaboradores (2014) com a microalga *N. oculata* e Martins (2014) com *D. spinosus* divergiram neste resultado, por apresentarem biomassa elevada no controle em detrimento dos tratamentos. Porém, no mesmo trabalho de Martins, com as microalgas *C. vulgaris* e *A. fusiformes* os valores mais elevados foram encontrados na depleção de nitrogênio.

Para subsidiar a discussão sobre o peso seco, o biovolume da cultura foi determinado no 15º, 30º e 45º dia de experimento (Figura 12).

#### 4.1.3 Biovolume x Peso Seco

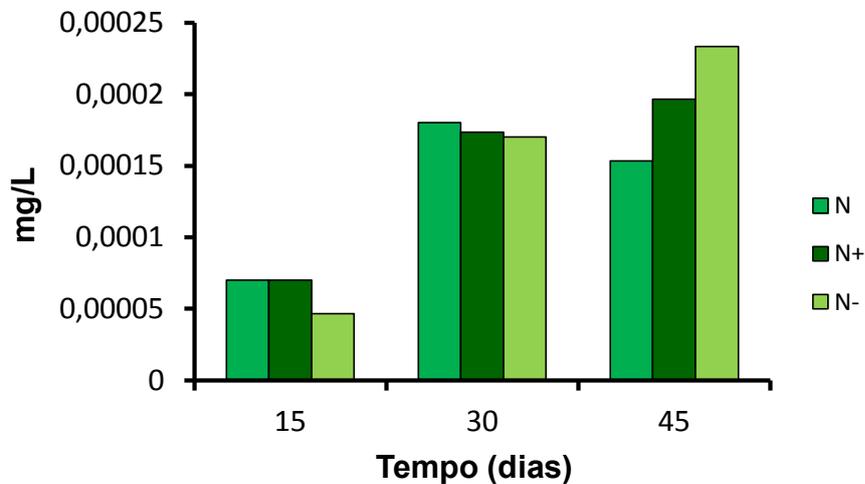
De modo geral, os menores valores de biovolume foram obtidos no 15º dia, enquanto os maiores valores foram obtidos no 30º dia do experimento (Figura 12).



Fonte: Elaboração própria

No 45º dia, o biovolume das culturas sofreu redução, sendo que o tratamento N- apresentou o maior valor de biovolume final. Como é possível observar na Figura 13, o resultado para o peso seco obtido no 45º dia é semelhante ao resultado de biovolume para o mesmo dia.

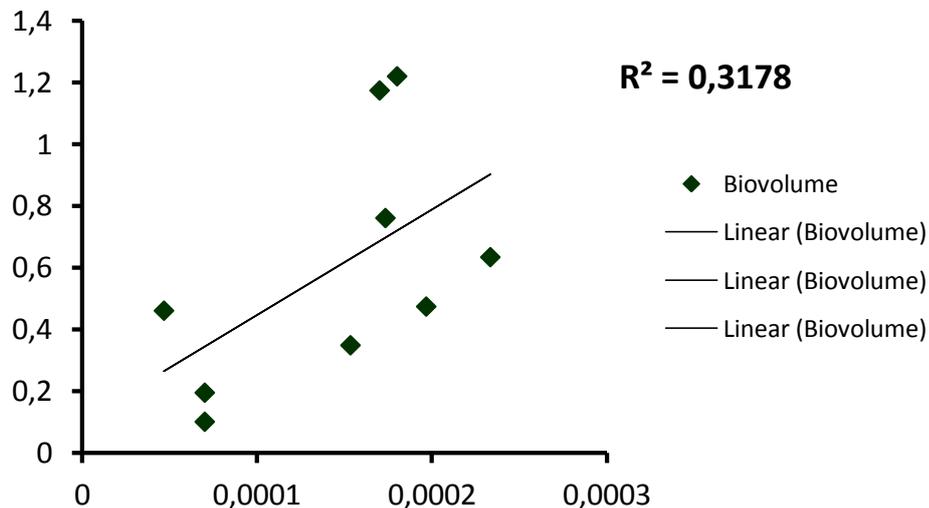
Figura 13 – Peso seco (*K. obesa*) nos dias 15, 30 e 45



Fonte: Elaboração própria

A correlação entre o biovolume e o peso seco está apresentada na Figura 14. Embora o valor de  $R^2$  tenha sido baixo ( $R^2 = 0,3178$ ), é possível notar uma relação direta entre as duas grandezas, ou seja, quanto maior o biovolume, maior é o peso seco. Assim, é provável que o biovolume seja um dos responsáveis pelo maior valor de peso seco obtido no tratamento N- no 45º dia de experimento.

Figura 14 – Correlação entre biomassa e biovolume das células nos três tratamentos



Fonte: Elaboração própria

#### 4.1.4 Pigmentos e aspecto das culturas

A concentração de pigmentos (Figuras 15 e 16) mostraram que no 22º dia os valores de clorofila *b* foram altos em todos os tratamentos, seguidos dos valores de feofitina. A clorofila *a*, *c* e carotenoides apresentaram valores muito próximos entre si. Já no 45º dia, os valores de clorofila *b* baixaram consideravelmente, e as demais clorofilas aumentaram, assim como a feofitina e carotenoides.

A proporção entre os pigmentos celulares de cores diferentes normalmente modifica o aspecto visual das culturas. Como no experimento com *K. obesa* houve mudança de concentração das clorofilas *a* e *b*, o aspecto visual das culturas mostrou pouca diferença entre os tratamentos. Ainda assim, o tratamento controle apresentou um verde levemente mais escuro no fim do experimento por conta de sua maior densidade celular final e maior teor de feofitina.

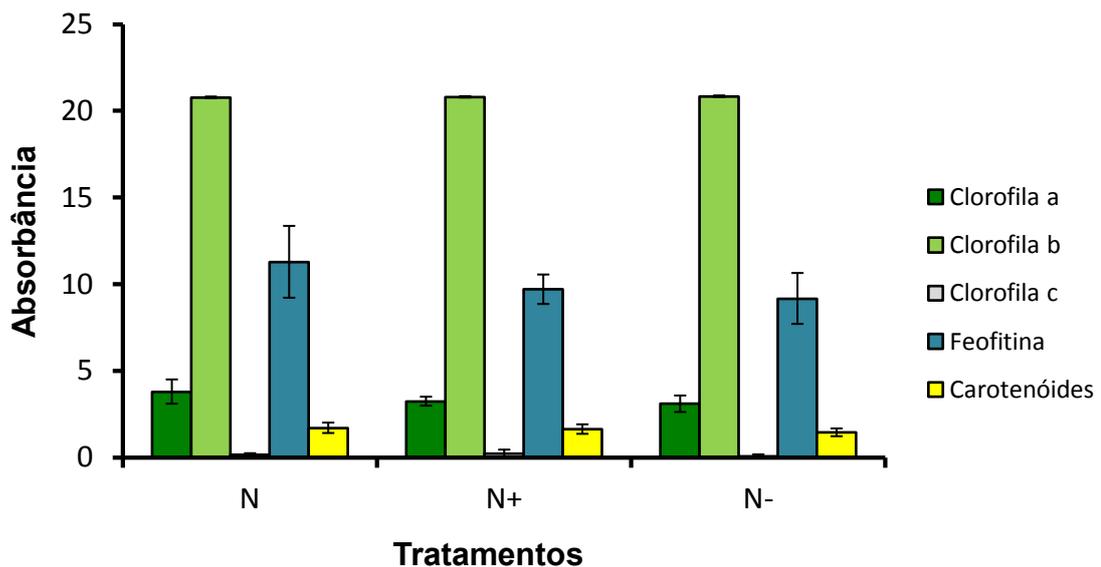
O alto valor de clorofila *b* (Figura 15) em todos os tratamentos pode ser explicado devido à baixa intensidade luminosa (450lux) comparado aos demais experimentos feitos com microalgas independente da espécie (vide referencial). Desta forma, essa condição inicial (pigmentos determinados no 22º dia de experimento) pode demonstrar uma condição de adaptação das células à baixa luminosidade. Esta explicação teve por base trabalhos acadêmicos realizados com vegetais superiores.

Scalon e colaboradores (2003) estudaram o crescimento inicial de mudas de *Bombacopsis glabra* (castanha do Maranhão) em condição de sombreamento e notaram que o teor de clorofila *b* aumentava de forma crescente ao sombreamento imposto às mudas. Da mesma maneira, Rêgo e Possamai (2006) avaliaram os teores de clorofila no crescimento de mudas de Jequitibá-rosa (*Cariniana legalis*) e também obtiveram resultados de maiores valores de clorofila *b* em intensidades luminosas baixas.

Os altos valores de feofitina no fim do experimento (45º dia) não podem ser totalmente vinculados à morte das células, visto que, no 22º dia suas taxas já demonstravam um alto valor. Uma explicação provável é de que a repicagem foi feita de um inoculo antigo, assim, já havia um determinado número de células em fase de senescência nos dias intermediários do experimento.

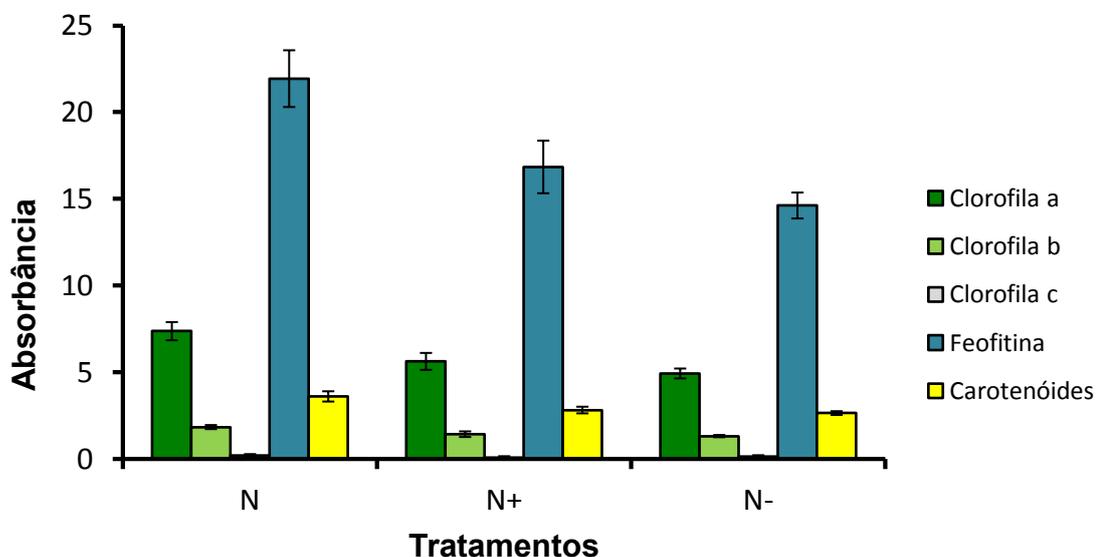
Quanto à clorofila *a*, Terashima e Hikosaka (1995) citados por Costa e Marengo (2007) falam sobre a estreita relação entre o teor de nitrogênio e a capacidade fotossintética do organismo estudado. Porém, como é possível observar nas Figuras 15 e 16, o controle apresentou maior quantidade de clorofila *a*, seguido do tratamento N+ e N-, respectivamente. Provavelmente a quantidade de nitrogênio no tratamento N+ seja muito alta, ao ponto de limitar a produção de clorofila *a* pelas células da cultura.

Figura 15 – Valores de pigmentos (*K. obesa*) no 22º dia



Fonte: Elaboração própria

Figura 16 – Valores de pigmentos (*K. obesa*) no 45º dia

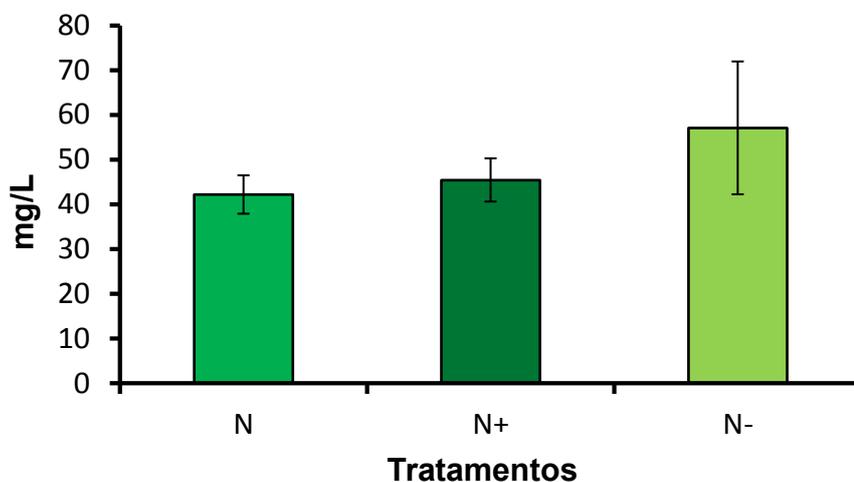


Fonte: Elaboração própria

#### 4.1.5 Lipídios totais

Os valores de conteúdo lipídico foram de 42,18 mg/L (14,06%), 45,43 mg/L (15,14%) e 57,07 mg/L (19,02%) para os tratamentos N, N+ e N-, respectivamente.

Figura 17 – Valores de lipídios totais (LT) da microalga *K. obesa*



Fonte: Elaboração própria

Os tratamentos com menor concentração de nitrogênio (Figura 17) obtiveram um melhor êxito (em valores) na concentração de lipídios totais, apesar de não haver diferença significativa ( $p = 0,2027$ ) em relação aos outros tratamentos. Esse resultado é corroborado com a afirmação de Becker (2004), referente a muitas microalgas terem melhora no valor lipídico em baixas concentrações de nitrogênio. Além do autor, outros trabalhos atuais confirmaram a afirmação, mesmo empregando diferentes cepas e metodologias.

Dentre os estudos que determinaram teor de lipídios, Martins (2014) encontrou nos tratamentos com deficiência de nitrogênio, valores lipídicos superiores em *Desmodesmus spinosus* (Chlorophyta); Chagas (2010) utilizando água salina, obteve resultado de aumento das reservas lipídicas e de carboidratos na microalga *Isochrysis galbana* (Haptophyta) e Olofsson e outros (2014) também encontraram maiores taxas lipídicas em privação de nitrogênio utilizando a microalga *Nannochloropsis oculata* (Ochrophyta) e equipamento de produção em larga escala (fotobiorreator). Apesar do maior valor lipídico em menor concentração de nitrogênio, todos os estudos apresentados apontaram menor crescimento das culturas em relação aos tratamentos controle.

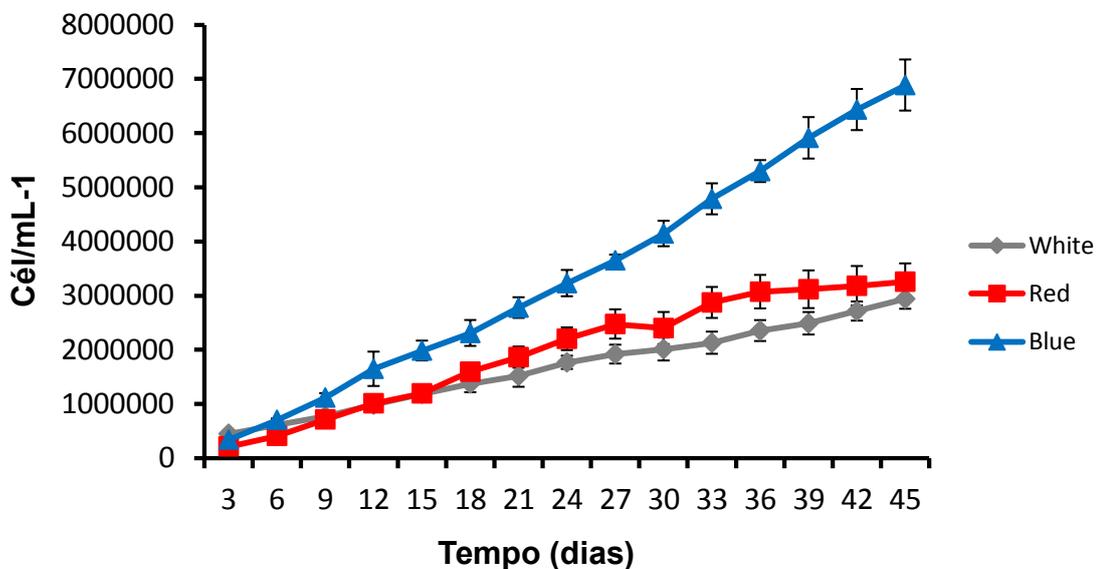
Contrastando os trabalhos citados, Repposi (2013), encontrou valores muito parecidos entre controle, abundância e privação de nitrogênio, utilizando a microalga *Stichococcus fragilis* (Chlorophyta), o que pode ser considerado como uma variação presente nas Chlorophyta que, de forma geral, apresentam grande variedade de respostas à depleção de nitrogênio (RODOLFI et al., 2009; BOROWITZKA, 1988 apud MARTINS, 2014).

#### 4.2 *Scenedesmus acuminatus* x QUALIDADE DE LUZ

##### 4.2.1 Crescimento

A partir do terceiro dia de experimento (início das coletas), o maior crescimento foi observado nos tratamentos iluminados com luz branca (447023,8352 cél/mL) seguido da luz azul (340661,9742 cél/mL) e vermelha (214897,1324 cél/mL). A partir do 6º dia, por uma pequena diferença, as unidades experimentais tratadas em luz azul passaram a ser superiores em quantidade de cél/mL e assim seguiu-se até o final do experimento.

Figura 18 – Crescimento das culturas (*S. acuminatus*) dos dias 3 a 45



Fonte: Elaboração própria

Com a avaliação das curvas de crescimento (Figura 18), foi possível perceber que as fases de cultivo foram diferentes em cada tratamento. Em azul, do 3º ao 45º dia

de experimento a microalga permaneceu em fase exponencial de crescimento. No tratamento “luz vermelha”, as culturas apresentaram a fase exponencial do 3º ao 27º dia, mas no 30º houve redução do crescimento e, em torno do 33º até o 45º dia, esteve em fase estacionária. Por fim, as culturas submetidas ao controle, com luz branca, permaneceram em fase exponencial de crescimento, porém com taxas de crescimento menores em relação ao tratamento com luz azul (Tabelas 8 e 9). Por isso, os valores de densidade celular do tratamento “luz branca” são menores que os do tratamento “luz azul”.

As maiores taxas de crescimento (Tabelas 8 e 9) foram observadas no início do experimento para as cores vermelha (0,21313, no 6º dia) e azul (0,24359, no 6º dia) assim como os menores (mais rápidos) tempos de duplicação (Tabelas 10 e 11), sendo 3,25216 no 6º dia (vermelho) e 2,84555 no 6º dia (azul).

Tabela 8 – Taxa de crescimento (*S. acuminatus*) dos dias 6 a 24

|       | TAXA DE CRESCIMENTO ( $\mu$ ) |         |         |         |         |         |         |
|-------|-------------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
|       | 6                             | 9       | 12      | 15      | 18      | 21      | 24      |
| White | 0,10359                       | 0,07892 | 0,08257 | 0,05913 | 0,04970 | 0,03237 | 0,05112 |
| Red   | 0,21313                       | 0,18507 | 0,11649 | 0,05482 | 0,09649 | 0,05161 | 0,05591 |
| Blue  | 0,24359                       | 0,15215 | 0,12682 | 0,06405 | 0,05104 | 0,06169 | 0,05002 |

Fonte: Elaboração própria

Tabela 9 – Taxa de crescimento (*S. acuminatus*) dos dias 27 a 45

|       | TAXA DE CRESCIMENTO ( $\mu$ ) |          |         |         |         |         |         |
|-------|-------------------------------|----------|---------|---------|---------|---------|---------|
|       | 27                            | 30       | 33      | 36      | 39      | 42      | 45      |
| White | 0,02729                       | 0,01599  | 0,01888 | 0,03335 | 0,01818 | 0,02928 | 0,02716 |
| Red   | 0,03870                       | -0,01047 | 0,06031 | 0,02235 | 0,00461 | 0,00682 | 0,00803 |
| Blue  | 0,04180                       | 0,04233  | 0,04808 | 0,03405 | 0,03614 | 0,02813 | 0,02211 |

Fonte: Elaboração própria

Tabela 10 – Tempo de duplicação (*S. acuminatus*) dos dias 6 a 24

|       | TEMPO DE DUPLICAÇÃO (G) |         |         |          |          |          |          |
|-------|-------------------------|---------|---------|----------|----------|----------|----------|
|       | 6                       | 9       | 12      | 15       | 18       | 21       | 24       |
| White | 6,69109                 | 8,78331 | 8,39485 | 11,72264 | 13,94756 | 21,41384 | 13,55912 |
| Red   | 3,25216                 | 3,74523 | 5,95034 | 12,64456 | 7,18360  | 13,43081 | 12,39838 |
| Blue  | 2,84555                 | 4,55568 | 5,46554 | 10,82167 | 13,57965 | 11,23601 | 13,85793 |

Fonte: Elaboração própria

Tabela 11 – Tempo de duplicação (*S. acuminatus*) dos dias 27 a 45

|       | TEMPO DE DUPLICAÇÃO (G) |          |          |          |           |           |          |
|-------|-------------------------|----------|----------|----------|-----------|-----------|----------|
|       | 27                      | 30       | 33       | 36       | 39        | 42        | 45       |
| White | 25,40121                | 43,35960 | 36,71461 | 20,78680 | 38,13015  | 23,66943  | 25,52521 |
| Red   | 17,90976                | -66,2220 | 11,49361 | 31,01197 | 150,41462 | 101,61291 | 86,36017 |
| Blue  | 16,58230                | 16,37360 | 14,41519 | 20,35556 | 19,17792  | 24,64130  | 31,34402 |

Fonte: Elaboração própria

As taxas de crescimento mostraram que o investimento dos organismos em todos os tratamentos, no início do experimento, foi em reprodução. Isto porque o teor de nutrientes é abundante nos cultivos e o número de células ainda é baixo pelo pouco tempo de transferência do inóculo. Após este período inicial, que durou cerca de 12 dias, os tratamentos passaram a ter respostas diferentes entre si.

Em luz branca, os organismos investiram em reprodução por um curto período de tempo (próximo do 5º dia), logo depois passaram por uma leve redução de crescimento e com isso houve constância de crescimento.

Em comprimento de onda de luz vermelha, as microalgas investiram em reprodução até próximo ao 27º dia de cultivo, após isso o tempo de duplicação se tornou muito elevado sendo possível inferir que o investimento passou a ser em biomassa (verificar tópico 4.2.2). Já os tratamentos submetidos ao espectro azul tiveram seu maior investimento, do início ao fim do experimento, em reprodução visto que as taxas de crescimento foram constantes e o tempo de duplicação só aumentou realmente nos últimos dias de cultivo.

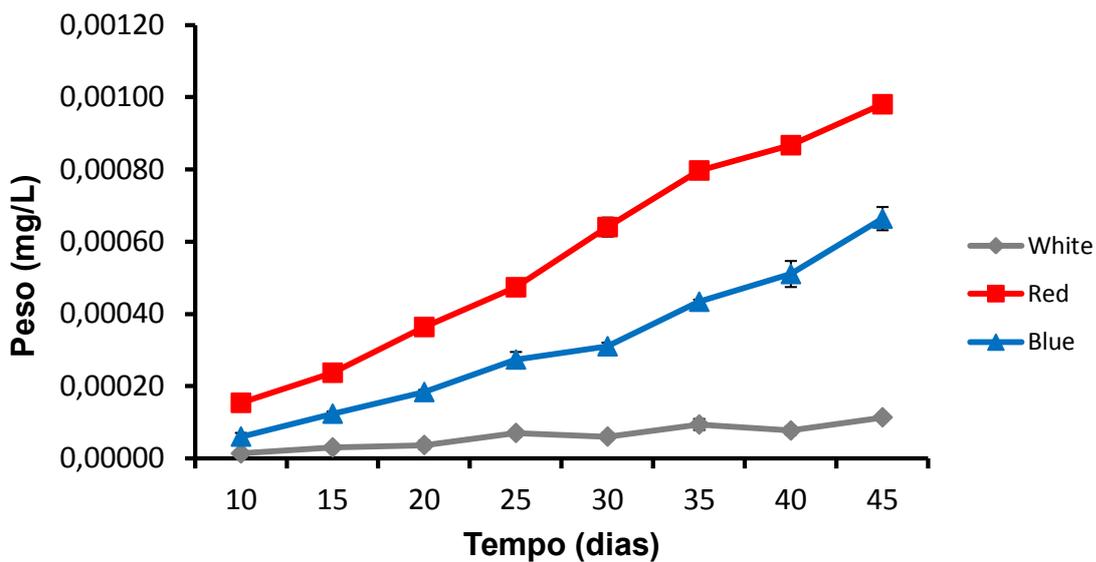
#### 4.2.2 Peso seco

Os valores de biomassa mais elevados (Figura 19) foram observados nos tratamentos com comprimento de onda de luz vermelho, seguido do azul e branco (controle).

Em comprimento de onda de luz vermelha desde o 10º dia os valores de biomassa seca foram mais elevados, aumentando continuamente até o fim do experimento. A biomassa em azul apresentou tendência em elevar mais suas taxas nos últimos dias de cultivo, dado que foi corroborado pelo alto valor em tempo de duplicação neste mesmo período. Já em luz branca, a biomassa sofreu poucas e baixas oscilações do início ao fim do experimento, mostrando que seu maior investimento ao longo dos 45

dias foi em reprodução. Este fato pode indicar que não houve escassez de nutrientes para as células, mas que seu crescimento foi limitado por outro fator, provavelmente a baixa incidência luminosa. Comparando as taxas de crescimento das culturas submetidas aos comprimentos de onda de luz vermelho e azul essa hipótese foi comprovada, visto que com a mesma intensidade alcançaram índices mais elevados já que nessas faixas os maiores pontos de absorção das clorofilas e carotenoides são encontrados.

Figura 19 - Peso seco das culturas (*S. acuminatus*) dos dias 10 a 45



Fonte: Elaboração própria

O termo “baixa incidência luminosa” foi usado com base nos estudos citados em referencial teórico que sempre utilizam intensidades de luz de valor mais alto.

O resultado de biomassa obtido neste experimento pode ser comparado ao estudo feito por Fraszczak (2013) utilizando *Ambrosia* suplementada com os espectros vermelho e azul, o autor verificou que a suplementação em luz vermelha aumentava a massa seca das plantas, porém o crescimento do hipocótilo foi inibido significativamente, enquanto que em azul, o crescimento do hipocótilo foi maior e o desenvolvimento da planta menor. Já no trabalho de Samuoliné e outros (2010), com a implementação da luz azul nas plantas tratadas com luz vermelha a biomassa aumentou em 13%.

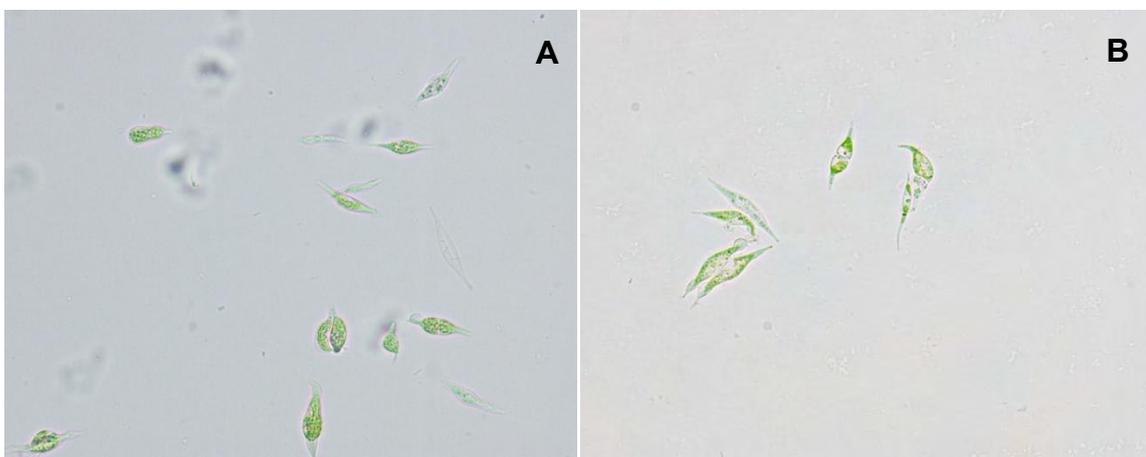
#### 4.2.3 Biovolume x Peso seco

Não foi possível realizar testes estatísticos para o biovolume de *S. acuminatus* devido a necessidade de medidas muito específicas que devem ser feitas para esta microalga (vide metodologia), com isso a alta plasticidade do gênero não permitiu mensurá-las como pode ser observado na Figura 20 (aumento 40x), sendo que, as maiores diferenças na morfologia celular foram observadas nos tratamentos submetidos ao comprimento de onda de luz vermelho.

Além da elevada plasticidade do gênero *Scenedesmus* (HEGEWALD; WOLF, 2003) que ocorre normalmente em circunstâncias adversas, o resultado acima descrito foi comparado com o trabalho de Victório e Lage (2009) que realizaram experimento com a germinação de sementes de *Phyllanthus tenellus* (quebra-pedra) em diferentes comprimentos de onda de luz. Os autores encontraram variação na morfologia e fisiologia do vegetal quando a coloração vermelha foi imposta, sendo a principal diferença, o aumento na porcentagem de enraizamento, comparada com a diminuição em luz azul.

Apesar de não ser possível comparar os resultados obtidos com microalgas pela ausência de estudos nesta vertente, é provável que as respostas sejam semelhantes àquelas encontradas em vegetais superiores no que tange a alteração morfológica quando submetidas ao espectro de luz vermelho.

Figura 20 – Unidade experimental 7B (vermelho) na 12<sup>o</sup> coleta (A) e 9<sup>o</sup> coleta (B)

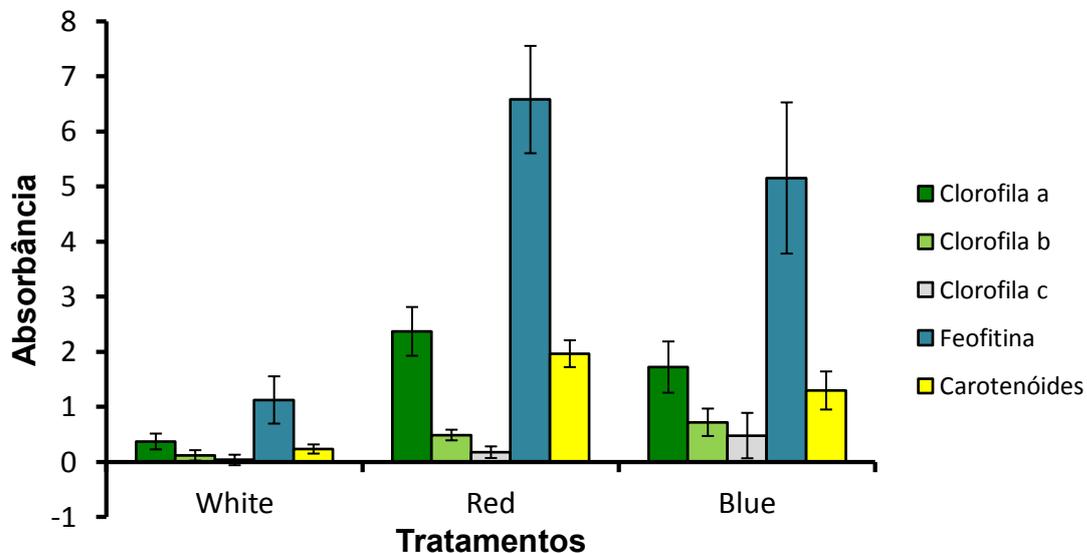


Fonte: Arquivo próprio

#### 4.2.4 Pigmentos e aspecto das culturas

De acordo com as Figuras 21 e 22, os menores teores pigmentares foram registrados no comprimento de luz branca, independente dos dias de cultivo. No 22º dia, as maiores taxas se revelaram nos tratamentos submetidos à coloração de luz vermelha, entretanto, no 45º dia estas taxas diminuíram consideravelmente. Já em espectro azul os valores iniciais foram intermediários, porém maiores em relação aos pigmentos acessórios *b* e *c*. Se comparado ao 45º dia, clorofila *a*, carotenóides e feofitina elevaram suas taxas.

Figura 21 – Valores de pigmentos (*S. acuminatus*) no 22º dia

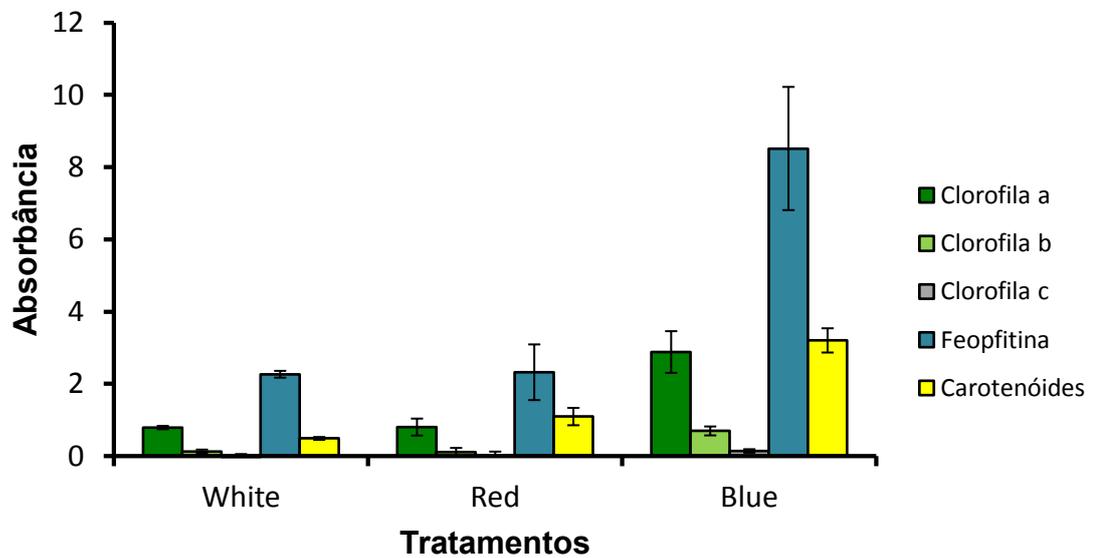


Fonte: Elaboração própria

O aspecto das culturas variou bastante no decorrer do experimento. Em comprimento de onda de luz branco, as culturas permaneceram em tom verde claro do início ao fim do experimento. Os cultivos submetidos ao espectro azul, desde os primeiros dias, apresentaram coloração amarelada, o que durou até o 26º dia aproximadamente. Após essa data as culturas mudaram bruscamente para verde escuro, o que permaneceu até o fim do experimento. Já em espectro vermelho, as culturas apresentaram coloração verde médio (era mais escuro que o tratamento de luz branca), que se tornou mais escura ao passar dos dias. Porém, aproximadamente na mesma data em que os tratamentos em azul mudaram de

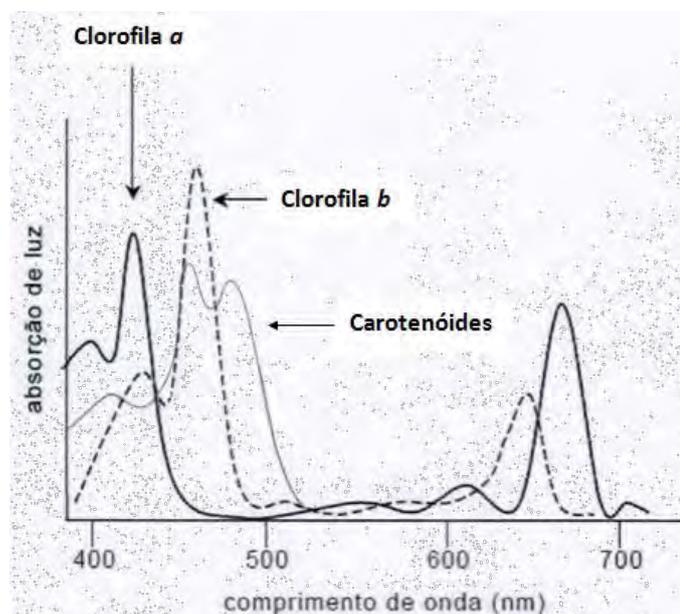
coloração, os tratamentos em luz vermelha passaram a ser amarelados e essa condição se acentuou até o fim do experimento onde as culturas encontravam-se em tom amarelo mostarda.

Figura 22 – Valores de pigmentos (*S. acuminatus*) no 45º dia



Fonte: Elaboração própria

Figura 23 – Espectros de absorção de luz (clorofilas *a*, *b* e carotenoides), indicando os principais pontos de absorção luminosa



Fonte: Adaptado de Lourenço (2006)

A explicação para as mudanças de coloração das culturas provavelmente deveu-se aos pigmentos presentes em cada comprimento de onda de luz. Para o tratamento com luz azul, a coloração no 22º dia estava mais amarelada, enquanto no 45º a cor era mais próxima do verde escuro. Conforme é possível visualizar nas Figuras 21 e 22, a proporção de pigmentos se manteve praticamente a mesma durante o experimento. Ou seja, a mudança de coloração ocorreu devido ao aumento de células no interior dos cultivos. Porém, é importante notar que a quantidade de carotenoides aumentou no 45º dia. Isso deve ter ocorrido porque os carotenoides absorvem luz à cerca de 400-510nm, comprimento este que está na mesma faixa do azul (425-490nm).

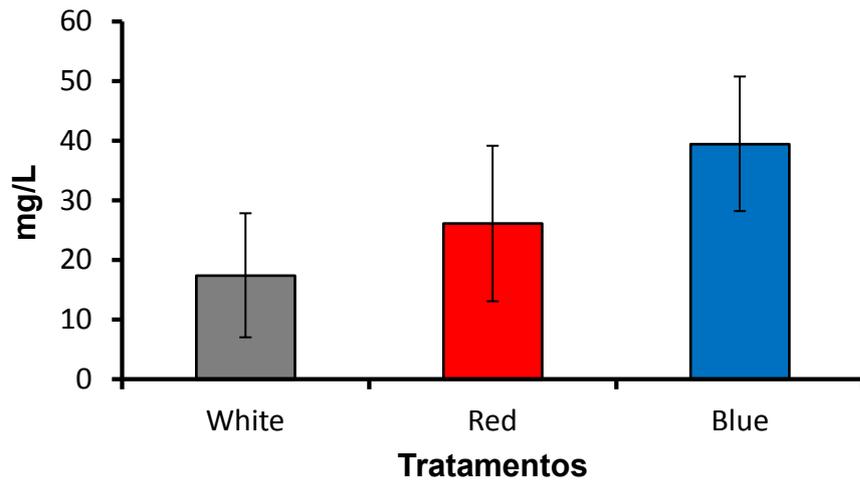
Já para os cultivos submetidos à luz vermelha, a mudança de coloração ocorreu por conta da morte de várias células após as culturas terem entrado em fase estacionária. Por conta disso, as células sofreram redução da quantidade de pigmentos (Figura 22), principalmente de clorofilas, o que tornou as culturas amareladas. Por fim, é importante salientar que a faixa do vermelho (600-700nm) estimula menos a produção de carotenoides (Figura 23), o que explica o seu menor teor no 45º dia.

#### **4.2.5 Lipídios totais**

Assim como as demais análises, a quantidade e aspecto visual dos lipídios de cada tratamento variou bastante. Os valores lipídicos (Figura 24) foram 17,41mg/L (5,80%), 26,09mg/L (8,70%) e 39,45mg/L (13,15%) para o controle (branco) e comprimentos de onda de luz vermelho e azul respectivamente.

As unidades experimentais tratadas em luz branca obtiveram lipídios em menor quantidade e com coloração bem clara, os tratados com lâmpadas vermelhas alcançaram uma quantidade lipídica intermediária e coloração amarelada enquanto que, os lipídios extraídos dos tratamentos em luz azul foram os de maior quantidade e coloração mais escura (Figura 25), todos acompanhando a coloração dos cultivos. O teor lipídico foi maior, apesar de não significativo ( $p = 0,1429$ ), nos tratamentos submetidos ao comprimento de onda de luz azul, e azul pode ser explicado pela correlação entre carotenoides e lipídios, apesar de sua baixa resultante ( $R^2 = 0,1023$ ).

Figura 24 – Valores de lipídios totais (LT) da microalga *S. acuminatus*



Fonte: Elaboração própria

Figura 25 – Aspecto visual da extração lipídica nos tratamentos em luz branca (2B), vermelha (7B) e azul (12B) respectivamente



Fonte: Arquivo próprio



## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em geral, os dois experimentos contribuíram para o conhecimento da fisiologia das espécies, além de acrescentar informações importantes para utilização dessas microalgas como fonte de biocombustível.

No experimento com diferentes concentrações de nitrogênio, o tratamento controle foi mais eficaz em crescimento e biomassa, além dos níveis pigmentares mais elevados. Porém, em relação ao teor lipídico final, as unidades experimentais em depleção de nitrogênio alcançaram um melhor resultado, que esteve diretamente relacionado ao biovolume das células.

Visto que o tratamento submetido à privação de nitrogênio obteve a melhor resposta no que tange a produção de lipídios e, os poucos trabalhos relacionados à microalga alvo de estudo (*K. obesa*), se faz necessário novas abordagens alterando as baixas concentrações de nitrogênio e as condições estressantes ao organismo, como diferentes temperaturas e intensidades luminosas principalmente, já que a intensidade de luz utilizada é considerada baixa se comparada aos vários estudos já realizados com microalgas independente da espécie.

Na análise qualitativa de luz, as principais respostas estiveram associadas ao comprimento de onda de luz azul. Este tratamento resultou em maior crescimento e produção lipídica, entretanto, a biomassa foi mais elevada em espectro de luz vermelho, e os pigmentos variaram nesses dois tratamentos.

Apesar dos vários estudos realizados com a microalga *Scenedesmus acuminatus* em diferentes condições estressantes, não foram encontrados trabalhos visando o estresse qualitativo de luz para qualquer espécie, logo, é importante (principalmente para as já listadas como potenciais produtoras de lipídios) realizar novos testes a partir deste, visto a eficácia da resposta de maior crescimento associado ao maior conteúdo lipídico, sendo esta a maior dificuldade com relação à utilização das microalgas como fonte para produção de biodiesel, já que o alto crescimento está geralmente ligado ao baixo teor de lipídios e vice-versa, inviabilizando financeiramente a produção em larga escala.

Novos trabalhos podem ser feitos alterando a fonte de luz para LEDs e lasers, por exemplo, e alternância de período de exposição às cores azul e vermelha, além da

junção das duas cores em um mesmo tratamento, por já existirem bons resultados em alguns trabalhos feitos com vegetais superiores. Ou ainda, realizar experimentos com um conjunto de variáveis que proporcionam melhor condição lipídica como a utilização do comprimento de luz azul e depleção de nitrogênio analisando o perfil de ácidos graxos.

É importante salientar que as respostas obtidas no presente trabalho envolveram uma variedade de condições internas e externas aos cultivos, sendo estas respostas passíveis de alteração, por diferenças na sazonalidade, linhagem-alvo, fonte de luz e meio de cultura.

## REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS, 2012. **Comercialização de biocombustíveis**. Disponível em:

<http://www.anp.gov.br/?pg=60468&m=&t1=&t2=&t3=&t4=&ar=&ps=&cachebust=1359568985545>. Acesso em 02 jun. 2014.

AZEREDO, V. B. S. **Produção de biodiesel a partir do cultivo de microalgas:**

Estimativa de custos e perspectivas para o Brasil. 2012. 171 f. Tese (Pós Graduação) - Curso de Ciências em Planejamento Energético, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012. Disponível em:

[http://www.ppe.ufrj.br/pppe/production/tesis/vinicius\\_barbosa.pdf](http://www.ppe.ufrj.br/pppe/production/tesis/vinicius_barbosa.pdf). Acesso em: 20 ago. 2014.

BARROS, K. K. S. **Produção de biomassa de *Arthrospira platensis* (*Spirulina platensis*) para alimentação humana**. 2010. 110 f. Dissertação (Mestrado em

Ciência e Tecnologia de Alimentos), Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Ciência e Tecnologia de Alimentos, Centro de Tecnologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2010. Disponível em:

[http://bdtd.biblioteca.ufpb.br/tde\\_arquivos/15/TDE-2010-10-14T150702Z-687/Publico/arquivototal.pdf](http://bdtd.biblioteca.ufpb.br/tde_arquivos/15/TDE-2010-10-14T150702Z-687/Publico/arquivototal.pdf). Acesso em: 9 set. 2014.

BAUMGARTNER, T. R. da S.; BURAK, J. A. M.; KOGIKOSKI, M. E.; SEBASTIEN, N. Y.; ARROYO, P. A. Avaliação da produtividade da microalga *Scenedesmus*

*acuminatus* (Lagerhein) Chordat em diferentes meios de cultivo. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 11, n. 2, p. 250-255, jun. 2013. Disponível em:

<http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/viewFile/2541/1194>. Acesso em: 12 ago. 2014.

BECKER, W. Microalgae in Human and Animal Nutrition. . In: RICHMOND, A.

**Handbook of Microalgae Culture: Biotechnology and Applied Phycology**. Ames: Blackwell, 2004. p. 312-351.

BHATTACHARYA, D.; MEDLIN, L. Algal phylogeny and the origin of land plants.

**Plant Physiology**, Bremerhaven, v.116, n. 1, p. 9-15, 1998. Disponível em:

<http://www.plantphysiol.org/content/116/1/9.full.pdf+html>. Acesso em: 21 mar. 2014.

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.

BODIESELBR, **O que é biodiesel?** Curitiba, 2012a. Disponível em:

<http://www.biodieselbr.com/biodiesel.htm>. Acesso em: 2 nov. 2014.

BODIESELBR, **História e biodiesel**. Curitiba, 2012b. Disponível em:

<http://www.biodieselbr.com/biodiesel/historia/biodiesel-historia.htm>. Acesso em: 2 nov. 2014.

BODIESELBR, **Biodiesel no mundo**. Curitiba, 2012c. Disponível em:

<http://www.biodieselbr.com/biodiesel/mundo/biodiesel-no-mundo.htm>. Acesso em: 2 nov. 2014.

- BIODIESELBR, **Regiões e oleaginosas**. Curitiba, 2012d. Disponível em: <http://www.biodieselbr.com/biodiesel/brasil/regioes.htm>. Acesso em: 2 nov. 2014.
- BIODIESELBR, **Biodiesel no Brasil**. Curitiba, 2012e. Disponível em: <http://www.biodieselbr.com/biodiesel/brasil/biodiesel-brasil.htm>. Acesso em: 2 nov. 2014.
- BIODIESELBR, **Soja**. Curitiba, 2012f. Disponível em: <http://www.biodieselbr.com/plantas/soja/soja.htm>. Acesso em 2 nov. 2014.
- BIODIESELBR, **Algodão**. Curitiba, 2012g. Disponível em: <http://www.biodieselbr.com/plantas/algodao/algodao.htm>. Acesso em: 2 nov. 2014.
- BIODIESELBR, **Girassol**, 2012h. Disponível em: <http://www.biodieselbr.com/plantas/girassol/girassol.htm>. Acesso em: 2 nov. 2014.
- BIODIESELBR, **Tudo sobre a Mamona**, 2012i. Disponível em: <http://www.biodieselbr.com/plantas/mamona.htm>. Acesso em 2 nov. 2014.
- BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Journal Biochemistry Physiology**, v. 37, p. 911-917, 1959. Disponível em: <http://www.nrcresearchpress.com/sci-hub.org/doi/pdf/10.1139/o59-099>. Acesso em: 30 out. 2014.
- BRASIL, Ministério da Ciência e Tecnologia. **Plano Nacional de Agroenergia**. 4. ed. Brasília, p. 114, 2006.
- BRUM, A. A. S.; ARRUDA, L. F. de; REGITANO-D'ARCE, M. A. B. Métodos de extração e qualidade da fração lipídica de matérias-primas de origem vegetal e animal. **Química Nova**, Piracicaba, v. 32, n. 4, p.849-854, fev. 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/qn/v32n4/v32n4a05>. Acesso em: 01 jun. 2014.
- CHAGAS, B. M. E. das. **Influência do estresse nutricional programado na composição da microalga *Isochrysis galbana***. 2010. 107 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2010. Disponível em: [http://repositorio.ufrn.br:8080/jspui/bitstream/1/11264/1/BrunaMEC\\_DISSERT.pdf](http://repositorio.ufrn.br:8080/jspui/bitstream/1/11264/1/BrunaMEC_DISSERT.pdf). Acesso em: 18 set. 2014.
- CHINNASAMY, S.; RAMAKRISHNAN, B.; BHATNAGAR, A.; DAS, K. C. Biomass Production Potential of a Wasterwater Alga *Chlorella vulgaris* ARC 1 under Elevated Levels of CO<sub>2</sub> and Temperature. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 10, n. 2, p. 518-532, feb. 2009. Disponível em: <http://www.mdpi.com/1422-0067/10/2/518/htm>. Acesso em: 15 ago. 2014.
- CHISTI, Y. Biodiesel from Microalgae. **Biotechnology Advances**, New Zeland, v.25, n. 3, p. 294-306, feb. 2007. Disponível em: <http://www.massey.ac.nz/~ychisti/Biodiesel.pdf>. Acesso em: 16 maio 2014.

COLLA, L. M.; REINEHR, C. O.; REICHERT, C.; COSTA, J. A. V. Production of biomass and nutraceutical compounds by *Spirulina platensis* under different temperature and nitrogen regimes. **Bioresource Technology**, Rio Grande, v. 98, n. 7, p. 1489-1493, may. 2007. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/sci-hub.org/retrieve/pii/S0960-8524%2805%2900476-1>. Acesso em: 23 jun. 2014.

CONCEIÇÃO, R. C. da; FRASÃO, C. V.; SILVA, S. M. C. da; MEDEIROS, J. L. de; ARAÚJO, O. de Q. F.; PICARDO, M. C. Caracterização composicional e transesterificação de óleo de microalga: Uma abordagem computacional. **Química Nova**, São Paulo, v. 35, n. 7, jun. 2012. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-40422012000700010](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422012000700010). Acesso em: 01 jun. 2014

CORRÊA, I. M.; MAZIERO, J. V. G.; ÚGARO, M. R.; BERNARDI, J. A.; STORINO, M. Desempenho de motor diesel com misturas de biodiesel de óleo de girassol. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 3, jun. 2008. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1413-70542008000300033&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-70542008000300033&lng=en&nrm=iso). Acesso em: 02 jun. 2014.

COSTA, G. F. da; MARENCO, R. A. Fotossíntese, condutância estomática e potencial hídrico foliar em árvores jovens de anditoba (*Carapa guianensis*). **Acta Amazônica**. Manaus, v. 37, n. 2, p. 229-234, jun. 2007 Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/aa/v37n2/v37n2a08.pdf>. Acesso em: 16 out. 2014.

DELATORRE, A. B.; RODRIGUES, P. M.; AGUIAR, C. de J.; ANDRADE, V. V. V.; ARÊDES, A.; PEREZ, V. H. Produção de biodiesel: Considerações sobre as diferentes matérias-primas e rotas tecnológicas de processos. **Perspectivas online**, [S.I.], v. 1, n. 1, p. 21-47, 2011. Disponível em: [http://www.seer.perspectivasonline.com.br/index.php/biologicas\\_e\\_saude/article/view/510/422](http://www.seer.perspectivasonline.com.br/index.php/biologicas_e_saude/article/view/510/422). Acesso em: 13 out. 2014.

ERIKSEN, N.T.; GEEST, T.; IVERSEN, J. J. L., Phototrophic growth in the Lumostat: a photo-bioreactor with on-line optimization of light intensity. **Journal of Applied Phycology**, Denmark, v. 8, p. 345-352, 1996. Disponível em: <http://link.springer.com/article/10.1007%2FBF02178577#page-1>. Acesso em: 18 aug. 2014.

ESTEVEES, F. de A. **Fundamentos de limnologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Interciência, 1998.

ESTEVEES, F. de A. **Fundamentos de limnologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Interciência, 2011.

FERRARI, R.A.; OLIVEIRA, V.S.; SCABIO, A. Biodiesel de soja – taxa de conversão em ésteres etílicos, caracterização físico-química e consumo em gerador de energia. **Química Nova**, Ponta Grossa, v. 28, n. 1, p.19-23, fev. 2005. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-40422005000100004](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422005000100004). Acesso em: 01 jun. 2014.

FOLCH, J.; LEES, M. & SLOANNE-STANLEY, G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipid from animal tissue. **Journal Biology Chemistry**, Boston, v. 226, p. 497-509, 23 ago. 1956. Disponível em: <http://www.aufsi.auburn.edu/recommendedmethods/05B01c03a.pdf>. Acesso em: 27 set. 2014.

FRASZCZAK, B. Effect of short-term exposure to red and blue light on dill plants growth. **HortScience**, [S.l.], v. 40, n. 4, p. 177-185, 2013. Disponível em: <http://www.agriculturejournals.cz/publicFiles/106952.pdf>. Acesso em 23 set. 2014.

GODINHO, L. R., **Família Scenedesmaceae (Chlorococcales, Chlorophyceae) no Estado de São Paulo: levantamento florístico**. 2009. 66 p. Tese de doutorado – Instituto de Botânica da Secretaria de Meio Ambiente do Estado de São Paulo, São Paulo, 2009. Disponível em: [http://www.ambiente.sp.gov.br/pgibt/files/2013/09/Luciana\\_Rufino\\_Godinho\\_DR.pdf](http://www.ambiente.sp.gov.br/pgibt/files/2013/09/Luciana_Rufino_Godinho_DR.pdf). Acesso em: 05 set. 2014.

GORHAM, P. R.; MCLACHLAN, R. W.; HAMMER, U. T. Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena flos-aquae* (Lyngb.) de Breb. **Verh. Internat. Verein. Limnol.**, v. 15, p. 796–804, 1964.

GREENWELL, H.C., LAURENS, L.M.L., SHIELDS, R.J., LOVITT, R.W., FLYNN, K.J.; Placing microalgae on the biofuels priority list: a review of the technological challenges. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 7, p. 703-726, 2010. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sci-hub.org/pubmed/20031983>. Acesso em: 17 set. 2014.

GROBBELLAR, J. U., Algal Nutrition: Mineral Nutrition. In: RICHMOND, A. **Handbook of Microalgae Culture: Biotechnology and Applied Phycology**. Ames: Blackwell, 2004. p. 97-115.

GUILLARD, R.R.L.; MORTON, S.L. Culture Methods. In: ENEVOLDSEN, H. O. **Manual on Harmful Marine Microalgae**. Paris: UNESCO Publishing, 2003. p. 77-97.

HEGEWALD, E.; WOLF, M., Phylogenetic relationships of *Scenedesmus* and *Acutodesmus* (Chlorophyta, Chlorophyceae) as inferred from 18S rDNA and ITS-2 sequence comparisons. **Plant Systematics and Evolution**. Wurzburg, v.241, p. 185-191, 4 nov. 2003. Disponível em: <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00606-003-0061-7#page-1>. Acesso em 17 jul. 2014.

HENTSCHKE, G. S.; PRADO, J. F. *Chlorococcales s. l. (Chlorophyceae) e Zygnematales (Zygnematophyceae) em um açude do Balneário do Lérmen, Rio Grande do Sul, Brasil*. **Iheringia: Série Botânica**, Porto Alegre, v. 67, n. 1, p. 59-74, 30 jun. 2012. Disponível em: [http://www.fzb.rs.gov.br/upload/20140328101155ih67\\_1\\_p059\\_074.pdf](http://www.fzb.rs.gov.br/upload/20140328101155ih67_1_p059_074.pdf). Acesso em: 14 set. 2014.

HOPKINS, W. G. **Introduction to Plant Physiology**. 2. ed. New York: John Wiley & Sons, 2000. Disponível em: <http://www.mdpi.com/1422-0067/9/7/1188/htm>. Acesso em: 10 jul. 2014.

HU, Q. Environmental Effects on Cell Composition. In: RICHAMOND, A. **Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology**. Ames: Blackwell, 2004. p. 83-93.

JOHN, D.M.; WHITTON, B.A.; BROOK, A.J. **The freshwater algal flora of the British Isles**. Cambridge University Press, Cambridge, 2002. Disponível em: [http://books.google.com.br/books?id=Sc4897dfM\\_MC&printsec=frontcover&hl=pt-BR#v=onepage&q&f=false](http://books.google.com.br/books?id=Sc4897dfM_MC&printsec=frontcover&hl=pt-BR#v=onepage&q&f=false). Acesso em: 16 ago. 2014.

JORGE, R.R; MORIOKA, L.R.; RIBEIRO, M. L. L.; PINOTTI, M. H. P. Cultivo de *Nostoc sp* em diferentes luminosidades para produção de biomassa e ficobiliproteínas, **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 20/21, n. 2, p. 67-71, jun. 1999. Disponível em: <http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/seminabio/article/viewFile/7120/6312>. Acesso em: 20 ago. 2014.

KNOTHE, G.; KRAHL, J.; GERPEN, J. V.; RAMOS, L. P.; **Manual de Biodiesel**. São Paulo: Edgard Blucher, 2007.

KRETTLE, R. H. **Avaliação dos efeitos de diferentes intensidades luminosas no crescimento de *Scenedesmus acuminatus* (Lagerheim) Chodat var. *acuminatus***. 2011. 40 p. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Ciências Biológicas) – Departamento de Ciências Biológicas do Centro de Ciências Humanas e Naturais, Universidade Federal do Espírito Santo, Espírito Santo, 2011.

LARCHER, W. **Ecofisiologia Vegetal**. São Carlos: Rima, 2006.

LEE. **Phycology**. Melbourn: Cambridge University Press, 2008. Disponível em: <http://www.dbbe.fcen.uba.ar/contenido/objetos/PhycologyLee.pdf>. Acesso em: 04 out. 2014.

LIN, KUAN-HUNG; HUANG, MENG-YUAN; HUANG, WEN-DAR; HSU, MING-HUANG; YANG, ZHI-WEI; YANG, CHI-MING. The effects of red, blue, and white light-emitting diodes on the growth, development, and edible quality of hydroponically grown lettuce (*Lactuca sativa* L. var *capitata*). **Scientia Horticulturae**, Taipei, v. 150, n. 1, p. 86-91, oct. 2012.

LORENZEN, C. J. Determination of chlorophyll and phaeophytin: spectrophotometric equations. **Limnology and Oceanography**, La Jolla, v.12, p. 343-346, 1967. Disponível em: [http://www.aslo.org/lo/toc/vol\\_12/issue\\_2/0343.pdf](http://www.aslo.org/lo/toc/vol_12/issue_2/0343.pdf). Acesso em 12 out. 2014.

LOURENÇO, S. de O. **Cultivo de microalgas marinhas: Princípios e aplicações**. São Carlos: Rima, 2006.

MARINHO, Y. F.; SANTOS, A. P. F. dos; SANTOS, L. B. G. dos; VASCONCELOS, R. F. L.; KALAZANS, N. K. F.; NASCIMENTO, R. D. M. do; DANTAS, D. M. de M.; GALVEZ, A. O. Avaliação do crescimento da *Chlorella vulgaris* em diferentes pH objetivando sua inserção na matéria-prima do biodiesel. In: IX JORNADA DE ENSINO PESQUISA E EXTENSÃO, n. 358-1, 2009, Recife. **Anais da IX Jornada de Ensino Pesquisa e Extensão**. Recife: UFRPE, 2009. p. 4-6.

MARTINS, G. B. **Efeitos da depleção de nitrogênio sobre a biomassa e produção lipídica de três espécies de microalgas fitoplanctônicas**. 2014. 61 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal), Universidade Federal do Espírito Santo, Espírito Santo, 2014.

MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Portugal, v. 14, p. 217-232, may. 2009. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/sci-hub.org/science/article/pii/S1364032109001646>. Acesso em: 13 mai. 2014.

MILITÃO, F. P. **Efeito de diferentes intensidades luminosas no crescimento em biomassa de *Tetrastrum heteracanthum* (Nordstedt) Chodat como subsídio para a produção de biodiesel**. 2013. 83 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Curso de Biologia, Faculdade Católica Salesiana de Vitória, Vitória, 2013.

MIRANDA, Pâmela Ferreira. **Efeito de diferentes meios de cultura para o crescimento de *Tetrastrum heteracanthum* (Nordstedt) Chodat 1895 como base para a produção de biocombustíveis**. 2013. 80 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Curso de Biologia, Faculdade Católica Salesiana de Vitória, Vitória, 2013.

NASCIMENTO, S. M. **Um estudo ecofisiológico de *Synechocystis aquatilis* f. salina: A razão N/P e sua relação com o crescimento e a atividade fotossintética**. 1996, 106 f. Dissertação (mestrado em Geociências) – Universidade Federal Fluminense, Niterói, 1996. Disponível em: <http://leetc.biof.ufrj.br/sites/default/files/publicacoes/M%201996%20Silvia%20Nascimento.pdf>. Acesso em: 16 out. 2014.

OLOFSSON, M.; LAMELA, T.; NILSSON, E.; BERGÉ, JEAN-PASCAL; PINO, V. del.; URONEN, P.; LEGRAND, C. Combined Effects of Nitrogen Concentration and Seasonal Changes on the Production of Lipids in *Nannochloropsis oculata*. **Marine Drugs**, [S.l.], v. 12, n. 1, p. 1891-1910, mar. 2014.

ORTEGA-SALAS, A. A.; REYES-BUSTAMANTE, H. **Cultivo de las microalgas dulceacuícolas *Kirchneriella obesa*, *Scenedesmus quadricauda* y *Chlorococcum infusorium* empleando tres medios de cultivo**. **Avances En Investigación Agropecuaria**, Mazatlán, v. 2, n. 16, p.35-44, mar. 2012. Disponível em: <http://www.ucol.mx/revaia/portal/pdf/2012/mayo/3.pdf>. Acesso em: 02 jun. 2014

PATIL, V., TRAN, K.Q., Giselrod, H.R. Towards sustainable production of biofuels from microalgae. **International Journal of Molecular Sciences**, Sarpsborg, v.9, n.

7, p. 1188-1195, jul. 2008. Disponível em: <http://www.mdpi.com/1422-0067/9/7/1188/htm>. Acesso em: 14 jun. 2014.

PEQUENO, M.A.G. **Avaliação do Potencial Produtivo de Óleos Obtidos a Partir de Microalgas por Cromatografia Gasosa**. 2010. 66 p. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Química, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2010. Disponível em: [http://www.quimica.ufpb.br/posgrad/dissertacoes/Dissertacao\\_Marcos\\_Pequeno.pdf](http://www.quimica.ufpb.br/posgrad/dissertacoes/Dissertacao_Marcos_Pequeno.pdf). Acesso em: 8 set. 2014.

PLÁ, J. A. Perspectivas do biodiesel no Brasil. **Indicadores Econômicos FEE**, Porto Alegre, v. 30, n. 2, p.179-190, set. 2002. Disponível em: <http://revistas.fee.tche.br/index.php/indicadores/article/view/1396/1758>. Acesso em: 02 jun. 2014.

RÊGO, G. M.; POSSAMAI, E. Efeito do Sombreamento sobre o teor de Clorofila e Crescimento Inicial do Jequitibá-rosa. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 53, p. 179-194, jul./dez. 2006. Disponível em: <http://pfb.cnpf.embrapa.br/pfb/index.php/pfb/article/view/210/160>. Acesso em: 28 out. 2014.

REYNOLDS, C.S. **Ecology of Phytoplankton**. New York: Cambridge, 2006. Disponível em: [http://www.jlakes.org/book/ecology-of-phytoplankton\\_2006.pdf](http://www.jlakes.org/book/ecology-of-phytoplankton_2006.pdf). Acesso em: 14 out. 2014.

REPOSSI, B. F. **Avaliação de diferentes intensidades luminosas e concentrações de nitrogênio sobre o crescimento e o incremento da produção de lipídeos em *Stichococcus fragilis* Gerneck**. 2013. 45 p. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Ciências Biológicas) – Departamento de Ciências Biológicas do Centro de Ciências Humanas e Naturais. Universidade Federal do Espírito Santo, Espírito Santo, 2013.

RODOLFI, L; ZITTELLI, G.C.; BASSI, N.; PADOVANI, G.; BIONDI, N.; BONINI, G.; TREDICI, M. R.; Microalgae for oil: Strain Seletion, Induction of Lipid Synthesis and Outdoor Mass Cultivation in a Low-Cost Photobioreactor. **Biothecnogy and Bioengineering**, Firenze, v. 102, n. 1, p. 100-112, jun. 2008. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/sci-hub.org/doi/10.1002/bit.22033/abstract;jsessionid=D4211583ECC1FBF808564A81C7777880.f04t02>. Acesso em: 30 nov. 2014.

ROUND, F. E. **Biologia das Algas**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1983.

SAMUOLIENÉ, G.; BRAZAITYTÉ, A.; URBONAVICIUTÉ, A.; SABAJEVIENÉ, G; DUCHOVSKIS, P. The effect of red and blue light component on the growth and development of frigo strawberries. **Zemdirbyste-Agriculture**, Kaunas, v. 97, n.2, p.99-104, 2010.

SANTOS, L. B. G. et al. Influência do fotoperíodo no crescimento da *Chlorella vulgaris* (Chlorophyceae) visando produção de biodiesel. In: IX JORNADA DE

ENSINO PESQUISA E EXTENSÃO, n. 358-1, 2009, Recife. **Anais da IX Jornada de Ensino Pesquisa e Extensão**. Recife: UFRPE, 2009. p. 1-3.

SANTOS, R. R. dos. **Estudo de diferentes condições de cultivo de *Chlorella vulgaris* visando o aumento da produtividade em biomassa e lipídios**. 2013, 79p. Dissertação (mestrado em Tecnologia de processos químicos e bioquímicos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

SCALON, S. de P. Q.; MUSSURY, R. M.; RIGONI, M. R.; FILHO, H. S. Crescimento inicial de mudas de *Bombacopsis glabra* (Pasq.) A. Robyns sob condição de sombreamento. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 27, n. 6, dez. 2003.

SCHENK P., Second Generation Biofuels: High-Efficiency Microalgae for Biodiesel Production. **Bioenergy Research**, v.1, p.20–43, mar. 2008. Disponível em: <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs12155-008-9008-8#page-1>. Acesso em: 04 out. 2014.

SCHNEIDER, R. C. S.; BJERK, T. R.; GRESSLER, P. D.; SOUZA, M. P.; CORBELLINI, V. A.; LOBO, E. A. Potential Production of Biofuel from Microalgae Biomass Produced in Wastewater. In: FANG, Z. **Biodiesel - Feedstocks, production and Applications**, Santa Cruz do Sul: InTech, 2012. p. 12-27. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/biodiesel-feedstocks-production-and-applications/potential-biofuel-from-the-microalgae-biomass-produced-in-wastewater>. Acesso em: 30 out. 2014.

SENGER, H.; WAGNER, C.; HERMSMEIER, D.; HOHL, N.; URBIG, T.; BISHOP, N. I. The influence of light intensity and wavelength on the contents of  $\alpha$ - and  $\beta$ -carotene and their xanthophylls in green algae. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, Marburg, v. 18, p. 273-279, jan. 1993.

SORANSO, Ana M.; FILHO, A. G.; LOPES, A.; SOUZA, E. G. de; DABDOUB, M. J.; FURLANI, C. E. A.; CAMARA, F. T. da. Desempenho dinâmico de um trator agrícola utilizando biodiesel destilado de óleo residual. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 12, n. 5, p. 553-559, out. 2008. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1415-43662008000500018&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-43662008000500018&lng=en&nrm=iso). Acesso em: 02 jun. 2014

TABILE, Rubens A.; LOPES, A.; CAMARA, F. T. da; FURLANI, C. E. A.; SILVA, R. P. da. Biodiesel de mamona no diesel interior e metropolitano em trator agrícola. **Engenharia Agrícola**, Jaboticabal, v. 29, n. 3, p.412-423, 16 maio 2009. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-69162009000300008&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-69162009000300008&lng=en&nrm=iso). Acesso em: 27 maio 2014.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.

TEPE, Y.; NAZ, M.; TÜRKMEN, M. Utilization of Different Nitrogen Sources by Cultures of *Scenedesmus acuminatus*. **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, Antakya, v. 6, p. 123-127, jun. 2006. Disponível em: <http://dergipark.ulakbim.gov.tr/trjfas/article/view/5000045098/5000042569>. Acesso em: 24 out. 2014.

TEIXEIRA, C.M.; MORALES, M. E. Microalga como matéria-prima para a produção de biodiesel. In: I CONGRESSO DA REDE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DO BIODIESEL, 1, 2006, Brasília. **Anais...** Brasília, DF: MCT/ABIPTI, 2006, p. 91-96. Disponível em: [http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/agroenergia+\\_PDeI\\_Biodiesel\\_Algas\\_000g6f3kcwr02wx5ok0o71pxt430fm5w.pdf](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/agroenergia+_PDeI_Biodiesel_Algas_000g6f3kcwr02wx5ok0o71pxt430fm5w.pdf). Acesso em: 26 set. 2014.

TOMASELLI, L. The Microalgal cell. In: RICHMOND, A. **Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology**. Ames: Blackwell, 2004. p. 3-19.

TREDICI, M. R. Mass Production of Microalgae: Photobioreactors. In: RICHMOND, A. **Handbook of Microalgae Culture: Biotechnology and Applied Phycology**. Ames: Blackwell, 2004. p. 178-214.

VASCONCELOS, R. F. L.; SANTOS, A. P. F. dos; MARINHO, Y. F.; SANTOS, L. B. G. dos; CALAZANS, N. K. F.; NASCIMENTO, R. D. M. do; DANTAS, D. M. de M.; COSTA, W. de M.; GÁLVEZ, A. O. Avaliação do crescimento de três microalgas : *Isochysis galbana*, *Chaethoceros calcitrans* e *Chlorella vulgaris*, visando a utilização como biocombustíveis. In: IX JORNADA DE ENSINO PESQUISA E EXTENSÃO, n. 358-1, 2009, Recife. **Anais da IX Jornada de Ensino Pesquisa e Extensão**. Recife: UFRPE, 2009. p. 9-17. Disponível em: <http://www.eventosufrpe.com.br/jepex2009/cd/resumos/R0160-1.pdf>. Acesso em: 25 out. 2014.

VICTÓRIO, C. P.; LAGE, C. L. S. Efeitos da qualidade de luz na germinação e desenvolvimento inicial *in vitro* de *Phyllanthus tenellus*. **Revista Ciência e Agronomia**, Fortaleza, v. 40, n. 3, p. 400-405, set. 2009.

WESTBROOK, C. K. Biofuels Combustion. **Annual Review of Physical Chemistry**, Livermore, v. 64, p. 201-219, jan. 2013. Disponível em: <http://www.annualreviews.org/sci-hub.org/doi/pdf/10.1146/annurev-physchem-040412-110009>. Acesso em: 10 out. 2014.