

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DA BAHIA - UFOB  
CENTRO MULTIDISCIPLINAR DE LUÍS EDUARDO MAGALHÃES**

**TAYANE PAULO DA SILVA**

**CULTIVO DE *Coelastrum* sp. E *Scenedesmus* sp. OBTIDAS EM FONTES DE ÁGUA  
DE LUÍS EDUARDO MAGALHÃES E AVALIAÇÃO DE PIGMENTOS  
FOTOSSINTÉTICOS**

**LUÍS EDUARDO MAGALHÃES**

**2019.2**

TAYANE PAULO DA SILVA

CULTIVO DE *Coelastrum* sp. E *Scenedesmus* sp. OBTIDAS EM FONTES DE ÁGUA DE  
LUÍS EDUARDO MAGALHÃES E AVALIAÇÃO DE PIGMENTOS FOTOSSINTÉTICOS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado Universidade Federal do Oeste da Bahia como requisito parcial para avaliação da disciplina TCC II do curso de Engenharia de Biotecnologia, sob a orientação do professor Dr. Felipe Figueira.

LUÍS EDUARDO MAGALHÃES

2019.2

FICHA CATALOGRÁFICA

---

S586 Silva, Tayane Paulo da.

Cultivo de *Coelastrum sp.* e *Scenedesmus sp.* obtidas em fontes de água de Luís Eduardo Magalhães e avaliação de pigmentos fotossintéticos / Tayane Paulo da Silva. – 2019.

50 f.; il.

Orientador: Prof. Dr. Felipe da Silva Figueira.

Trabalho de Conclusão de Curso: (Graduação em Engenharia de Biotecnologia) – Universidade Federal do Oeste da Bahia. Centro Multidisciplinar do *Campus* de Luís Eduardo Magalhães, Luís Eduardo Magalhães, BA, 2019.

1. Microalgas – Cultivo. 2. Técnica de Cultivo de Célula. 3. Microalgas de água doce. I. Figueira, Felipe da Silva. II. Universidade Federal do Oeste da Bahia – Centro Multidisciplinar do *Campus* de Luís Eduardo Magalhães. III. Título.

CDD: 660.6

---

BIBLIOTECAS UFOB - Biblioteca Universitária de Luís Eduardo Magalhães



UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DA BAHIA  
Centro Multidisciplinar do *Campus* de Luís Eduardo Magalhães - CMCLEM  
Colegiado do Curso de Engenharia de Biotecnologia - CEB

**Ata da Defesa de Trabalho de Conclusão de Curso do Colegiado do Curso de  
Engenharia de Biotecnologia**

1        **Aos dezoito dias do mês de dezembro de 2019 (dois mil e dezenove)**, as 10h00min (dez  
2        horas), na sala 04 da sede da Universidade Federal do Oeste da Bahia, UFOB, localizada na  
3        rua Itabuna esquina com a rua Juazeiro, quadra 97B, nº 1278, Santa Cruz, Luís Eduardo  
4        Magalhães-BA, reuniu-se a banca examinadora de defesa de Trabalho de Conclusão de Curso  
5        II de 2019.2, sob a presidência do professor orientador, professor **Felipe da Silva Figueira**,  
6        com o professor **Jamilly Ribeiro Lopes**, 2º Membro Docente, e o professor **Raphael Contelli**  
7        **Klein**, 3º Membro Docente, para avaliar o trabalho de conclusão de curso (TCC) intitulado  
8        **CULTIVO DE *COELASTRUM* sp. E *SCENEDESMUS* sp. OBTIDAS EM FONTES DE**  
9        **ÁGUA DE LUIS EDUARDO MAGALHÃES E AVALIAÇÃO DE PIGMENTOS**  
10       **FOTOSSINTÉTICOS**, apresentado por **Tayane Paulo da Silva** como requisito para  
11       obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Biotecnologia. Após análise do trabalho, da  
12       apresentação e da arguição, a banca atribuiu média igual a 8,7 e, assim, considerou o  
13       trabalho aprovado. E nada mais havendo às 12:00, eu, Jamilly Ribeiro Lopes,  
14       coordenadora de TCC do curso de Engenharia de Biotecnologia, lavrei a presente ata que  
15       depois de lida será assinada por quem de direito.

*Felipe Figueira*  
Dr. Felipe da Silva Figueira – UFOB/LEM

*Jamilly Ribeiro Lopes*  
Dr. Jamilly Ribeiro Lopes – UFOB/LEM

*Raphael Contelli Klein*  
Dr. Raphael Contelli Klein – UFOB/BARREIRAS

*Tayane Paulo da Silva*  
Tayane Paulo da Silva

*Dedico esse trabalho aos meus amados pais, Josinaldo Paulo e Maria José pelo empenho e confiança empregados a mim e aos meus queridos irmãos, Tatiane Maria, Thayan Paulo, Thayná Paulo, Diego Duarte e Breno Henrique, que em suma representam a base da minha vida.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por estar comigo em todos os momentos, principalmente nos dias difíceis e momentos de aflição, me guiando e mostrando soluções incríveis quando desacreditava. E por sempre colocar pessoas maravilhosas em minha vida.

A minha família, principalmente meus pais Maria José (Mainha) e Josinaldo Paulo (Painho) e meus irmãos Tatiane (Tati), Thayan (Dede), Thayná (Ná), Diego e Breno por todo carinho, amor, cuidado, assistência e atenção que tive durante toda minha jornada. Sou grata por sempre apoiarem e confiarem em mim, quando eu mesma desacreditava, por serem sempre tão incríveis, afetuosos, compreensivos, companheiros e por me proporcionarem momentos inesquecíveis de alegria e felicidade. Sem vocês nada disto valeria a pena! A minha tia Josicleide (Quêka) e Jeovane por me acolherem em seu lar durante boa parte da graduação.

Ao meu orientador Dr. Felipe Figueira por me oportunizar trabalhar em seu projeto de pesquisa que resultou este trabalho. Além de também ser grata pelas correções e orientações do TCC, pelo apoio, disposição, incentivo, lições, amizade e paciência no decorrer do curso, e, principalmente por confiar e acreditar em meu potencial.

A Ozania e Uandalla pela amizade, auxílio, dedicação e trabalho em laboratório para obtenção dos resultados deste trabalho.

Aos meu amigos e colegas, Alan, Amanda, Bruna, Bruno T., Dalcin, Deburah, Eduardo G., Gabriela S., Gustavo, Jéssica, Luís e Sindy que a UFOB me deu de presente para alegrar e descontrair meus dias e principalmente agregar aos momentos de estudos. Em especial, Pedro pela parceria companheirismo e amizade prestada em inúmeras circunstâncias.

A Jayara por tantos momentos vividos durante toda graduação, em que foi professora&psicóloga e principalmente por ser amiga, parceira e irmã e estar sempre presente em todas as situações.

A Waleska por sempre acreditar em mim e dispor de sua amizade em todos os instantes, pelo cuidado e preocupação prestados e por ser como uma irmã acima de tudo.

Aos Professores Dr. Raphael Klein e Dra. Jamilly Lopes por aceitarem o convite de compor a banca de avaliação deste trabalho, bem como as sugestões e correções deste trabalho.

Agradeço a Universidade Federal do Oeste da Bahia e a todo corpo docente do CMCLEM por todo aprendizado que a mim disponibilizaram e demonstração de comprometimento com a qualidade e excelência de ensino. Também a todos os

técnicos administrativos do *Campus*, em especial a Adriana, Juliana, Anizia e Elielton por toda assistência que a mim prestaram.

Agradeço a todos os que fizeram parte da minha formação, seja direta ou indiretamente, que de alguma maneira agregaram de maneira positiva, o meu muito obrigada!

*Tayane Paulo da Silva*

## RESUMO

As microalgas são seres fotossintéticos presentes em ambientes aquáticos e zonas úmidas. Dentre os pigmentos fotossintéticos estão as três classes, as ficobilinas, as clorofilas e os carotenoides. Quanto as aplicações desses pigmentos no mercado comercial, destacam-se os corantes para alimentação humana, animal, uso farmacêutico e área médica para tratamento de câncer. Este trabalho objetivou analisar os parâmetros de crescimento dos cultivos das microalgas *Coelastrum* sp. e *Scenedesmus* sp. isoladas na região, bem como avaliação do potencial de pigmentos fotossintéticos. Amostras de *Coelastrum* sp. e *Scenedesmus* sp. foram cultivadas em biorreatores do tipo Erlenmeyer contendo meio ASM-1, com volume de cultivo de 125 mL, sendo 10% de inóculo aclimatados em incubadora, à temperatura de 25°C, submetidos a agitação orbital de 130 rpm e fotoperíodo de 18 horas com luz e 6 horas sem luz por um período de 30 dias, com acompanhamento dos valores de absorvância, temperatura e pH do meio. Os valores de rendimento máximo  $R_{m\acute{a}x}(g/L)$ : 1,35 g/L; 1,98 g/L, produtividade  $P_x(g/Ld)$ : 0,05g/L.d; 0,08 g/L.d e velocidade específica de crescimento  $\mu_x(d^{-1})$ : 0,09  $d^{-1}$ ; 0,10  $d^{-1}$  foram obtidos nos cultivos de *Scenedesmus* sp. e *Coelastrum* sp. respectivamente. A partir dos cultivos foi possível obter os valores de clorofila *a*: 0,0612 (mg/L); 4,0903(mg/L), clorofila *b*: 0,3539 (mg/L); 8,8990 (mg/L), carotenoides totais: 0,0244 (mg/L); 0,0028 (mg/L) e das ficobiliproteínas: ficocianina: 0,0108 (mg/L); 0,0090 (mg/L), aloficocianina: 0,0145 (mg/L); 0,1874 (mg/L) e ficoeritrina: 0,0104 (mg/L) referentes aos respectivos cultivos de *Scenedesmus* sp. e *Coelastrum* sp. O cultivo de *Coelastrum* sp. apresentou valor de teor de clorofila *a*, dentro da faixa encontrada na literatura e um ótimo valor de clorofila *b*, cerca de 8 vezes maior ao da literatura. Os cultivos de microalgas *Scenedesmus* sp. e *Coelastrum* sp. avaliadas não apresnetaram valores significativos de ficobiliproteínas e de carotenoides.

**Palavras-chave:** *Coelastrum* sp; *Scenedesmus* sp; Cultivo; Pigmentos.

## ABSTRACT

Microalgae are photosynthetic beings present in aquatic environments and wetlands. Photosynthetic pigments include the three classes, phycobilins, chlorophylls and carotenoids. As for the applications of these pigments in the commercial market, we highlight the dyes for human food, animal, pharmaceutical use and medical area for cancer treatment. This work aimed to analyze the growth parameters of the microalgae *Coelastrum* sp. and *Scenedesmus* sp. isolated in the region, as well as evaluation of the potential of photosynthetic pigments. *Coelastrum* sp. and *Scenedesmus* sp. were cultured in Erlenmeyer bioreactors containing ASM-1 medium with a culture volume of 125 mL, 10% of inoculum acclimated in incubator at 25 ° C, submitted to orbital agitation of 130 rpm and photoperiod of 18 hours with light and 6 hours without light for a period of 30 days, with monitoring of absorbance values, temperature and pH of the medium. The maximum yield values  $R_{m\acute{a}x}$  (g/L): 1.35 g /L; 1.98 g/L, productivity  $P_x$  (g/Ld): 0.05 g/L.d; 0.08 g/L.d and specific growth rate  $\mu_x(d^{-1})$ :  $0.09 d^{-1}$  ;  $0.10 d^{-1}$  were obtained from *Scenedesmus* sp. and *Coelastrum* sp. respectively. A partir dos cultivos foi possível obter os valores de clorofila *a*: 0,0612 (mg/L); 4,0903(mg/L), clorofila *b*: 0,3539 (mg/L); 8,8990 (mg/L), carotenoides totais: 0,0244 (mg/L); 0,0028 (mg/L) e das ficobiliproteínas: ficocianina: 0,0108 (mg/L); 0,0090 (mg/L), aloficocianina: 0,0145 (mg/L); 0,1874 (mg/L) e ficoeritrina: 0,0104 (mg/L) referentes aos respectivos cultivos de *Scenedesmus* sp. e *Coelastrum* sp. The cultivation of *Coelastrum* sp. presented a chlorophyll a content value, within the range found in the literature and an excellent chlorophyll b value, about 8 times higher than the literature. The cultivation of microalgae *Scenedesmus* sp. and *Coelastrum* sp. evaluated did not present significant values of phycobiliproteins and carotenoids.

**Keywords:** *Coelastrum* sp. *Scenedesmus* sp. Cultivation. Pigments.

## Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. OBJETIVOS.....	13
2.1. OBJETIVO GERAL.....	13
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
3.1. MICROALGAS.....	14
3.1.1. <i>Coelastrum sp.</i> .....	15
3.1.2. <i>Scenedesmus sp.</i> .....	16
3.2. CULTIVO DE MICROALGAS.....	17
3.2.1. Sistemas de cultivo.....	18
3.2.2. Condições que favorecem o crescimento microalgal.....	20
3.2.2.1. Temperatura.....	21
3.2.2.2. Fotoperíodo e Intensidade de luz.....	22
3.2.2.3. pH.....	22
3.2.2.4. Macronutrientes e micronutrientes.....	22
3.2.2.5. Aeração.....	23
3.3. PARÂMETROS DE CRESCIMENTO CELULAR.....	24
3.4. PIGMENTOS FOTOSSINTÉTICOS.....	25
3.4.1. Clorofila.....	26
3.4.2. Carotenoides.....	27
3.4.3. Ficobiliproteínas.....	28
4. METODOLOGIA.....	30
4.1. CULTIVO.....	30
4.1.1. Meio de cultura.....	30
4.1.2. Preparo de cultivo.....	31
4.1.3. Acompanhamento de crescimento celular.....	32
4.2. EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE PIGMENTOS FOTOSSINTÉTICOS..	33
4.2.1. Clorofila <i>a</i> e clorofila <i>b</i> .....	33

4.2.2. Carotenoides totais.....	34
4.2.3. Ficobiliproteínas.....	35
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
6. CONCLUSÃO.....	44
7. SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS.....	45
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46

## 1. INTRODUÇÃO

As algas são seres fotossintéticos presentes em ambientes aquáticos e zonas úmidas, sendo muito distintas entre si quanto a morfologia, origem e composição química. Esse grupo abriga seres unicelulares e multicelulares com dimensões macroscópicas e microscópicas que recebem os nomes de macroalgas e microalgas, respectivamente. As microalgas por sua vez, são seres constituintes do plâncton, sendo apresentadas em agrupamentos formando colônias, células isoladas ou em segmentos lineares (LOURENÇO, 2006).

O cultivo de microalgas pode ser realizado de maneira artificial em biorreatores que apresentam variadas formas e tamanhos. Ganha destaque pois não compete com o cultivo de alimentos e rações, podendo então ser cultivadas em áreas consideradas não férteis (CHRISTAKI *et al.*, 2015).

As microalgas são cultivadas nos mais variados sistemas produtivos, apresentando ou não controle de temperatura e luminosidade, em volumes variáveis de produção. Muitos desses cultivos têm foco na produção de biomassa microalgal, mas, diversos outros cultivos focam em produzir espécies de microalgas que sejam capazes de sintetizar compostos nutracêuticos que apresentam propriedades terapêuticas (DERNER, *et al.* 2006).

É comum entre os organismos fotossintéticos a presença de pigmentos orgânicos responsáveis pela absorção de luz. Destes, se destacam três classes sendo elas as ficobilinas, as clorofilas e os carotenoides (MASOJÍDEK, *et al* 2004). Estes pigmentos por sua vez, são resultantes da resposta de diferentes condições de luminosidade (ANDRADE, 2014a).

O avanço da biotecnologia aplicada às microalgas busca obter sistemas que possuam maiores rendimentos produtivos, não apenas quanto a biomassa, mas também objetivando a otimização da produção de pigmentos fotossintéticos, visando diversas aplicações, uma vez que estes servem de matéria prima na produção comercial de diversos produtos (GUERREIRO *et al.* 1999).

É crescente a demanda de pigmentos derivados das microalgas no mercado, principalmente por serem provenientes de fonte biológica e natural. Quanto as

aplicações desses pigmentos no mercado comercial, destacam-se os corantes para alimentação humana e animal, além disso, alguns desses pigmentos se tratam de corantes superconcentrados, aplicados principalmente nas indústrias de cosméticos e farmacêuticas (CHRISTAKI *et al.*, 2015).

Considerando o exposto, é de interesse avaliar o potencial dos pigmentos fotossintéticos das microalgas isoladas em Luís Eduardo Magalhães uma vez que, este trabalho faz parte dos primeiros estudos com microalgas na região oeste da Bahia, que visa analisar os parâmetros de crescimento dos cultivos de microalgas isoladas na região, bem como avaliar o potencial de pigmentos fotossintéticos das microalgas cultivadas.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. OBJETIVO GERAL**

Cultivo das microalgas *Coelastrum* sp. e *Scenedesmus* sp. isoladas em Luís Eduardo Magalhães e avaliação do potencial de produção de clorofila, carotenoides e ficobiliproteínas.

### **2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Cultivar as microalgas das espécies *Coelastrum* sp. e *Scenedesmus* sp.;
- Avaliar os parâmetros cinéticos de crescimento das microalgas cultivadas;
- Avaliar a produção de clorofila nos cultivos das microalgas isoladas;
- Avaliar a produção de carotenoides nos cultivos das microalgas isoladas;
- Avaliar a produção de ficobiliproteínas nos cultivos das microalgas isoladas.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. MICROALGAS

Semelhante às plantas, as algas necessitam essencialmente de dióxido de carbono, água e luz solar para seu desenvolvimento. A maior parte das algas existentes no planeta, sejam naturais de sistemas aquáticos marinhos, águas doces ou zonas úmidas, efetuam fotossíntese (processo bioquímico de conversão da luz solar em energia química). Por se tratarem de organismos diversos quanto a sua conformação vegetativa, apresentam distinção celular entre si quanto à origem, composição química e morfologia, podendo ser encontrados na natureza como estrutura unicelular e multicelular. Deste modo, as algas que possuem dimensões microscópicas são denominadas microalgas, constituintes fotoautotróficos do plâncton (LOURENÇO, 2006; DEMIRBAS *et al.*, 2010).

O fitoplâncton e as algas filamentosas compõe as duas populações de algas de maior relevância. Em especial, o fitoplâncton apresenta característica de aumentar com rapidez a quantidade de células, elevando o volume de biomassa em menor tempo. Estes micro-organismos fotossintéticos unicelulares podem ser encontrados em distintos ambientes como solos úmidos, água doce ou salina. O aumento da biomassa é feito a partir da conversão de luz solar, água e dióxido de carbono, onde, o armazenamento energético destes seres é acumulado na forma de lipídios, carboidratos e proteínas. (DEMIRBAS *et al.*, 2010; OZKURT, 2009).

As microalgas compreendem organismos do grupo procariontes, conhecidas como algas azuis, cloroxibactérias, cianobactérias ou cianofitas, e também do grupo eucariontes onde se tem as chamadas algas verdes ou clorófitas. As diferenças apresentadas entre os grupos é que as clorófitas possuem organelas envoltas por membrana, núcleo e maior tamanho de células individuais quando comparadas às cianófitas (ANDRADE *et al.*, 2014a; TORTORA *et al.*, 2012; BARSANTI *et al.*, 2014).

As microalgas podem ser divididas em classes conforme suas características estruturais (eucariótica e procariótica) e bioquímicas (como natureza e localização dos pigmentos, carboidratos de reserva e disposição dos tilacóides). Estes micro-organismos se dividem nas classes *Chlorophyceae* (algas verdes), *Bacillariophyceae*

(diatomáceas), *Chrysophyceae* (algas amareladas), *Cyanophyceae* (cianobactérias), *Rhodophyceae* (algas vermelhas) e *Phaeophyceae* (algas marrons) (RICHMOND, 2004; DERNER et al., 2006).

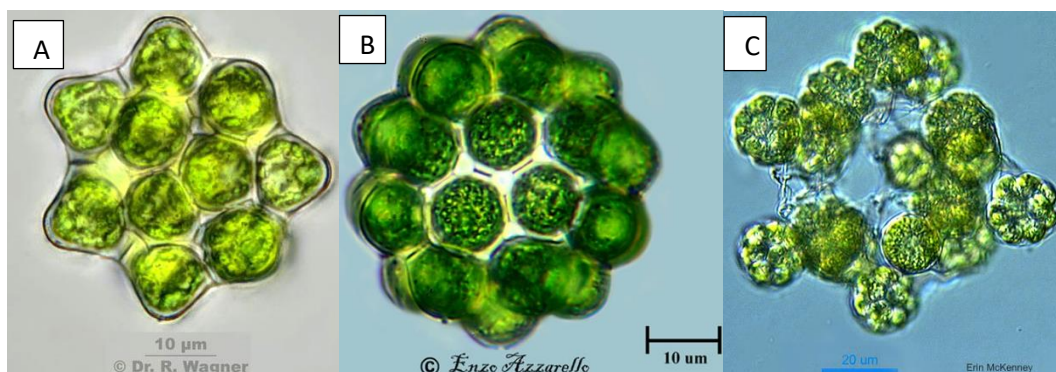
A principal estrutura destes organismos é denominada de talo, onde, a depender da espécie possui variação entre 0,2-2,0  $\mu\text{m}$ . Existem duas diferenciações celulares referente aos talos das microalgas. Os acianetos são uma delas, onde, apresentam capacidade de acumular uma quantidade de substâncias de reservas a partir de espessamento da parede celular conferindo presença de poros de resistência. Essas células vegetativas possuem capacidade de resistir a condições adversas. O outro tipo de diferenciação de talo é constituído a partir de células vegetativas de cianobactérias filamentosas, chamadas de heterócitos, que também, assim como os acianetos, apresentam espessamento da parede celular, auxiliando na fixação do nitrogênio atmosférico, atuando também no acúmulo de clorofila  $\alpha$  (ANDRADE et al., 2014a; LOURENÇO, 2006; FRANCESCHINI et al., 2010; BARSANTI et al., 2014).

Oliveira (2019) em seu trabalho de avaliação do potencial lipídico de microalgas isoladas de corpos d'água de Luís Eduardo Magalhães fez coletas de amostras de microalgas e obteve êxito no isolamento de *Coelastrum* sp. e *Scenedesmus* sp., que foram cultivados no laboratório 3 da UFOB no Centro Multidisciplinar *Campus* de Luís Eduardo Magalhães com apoio do Grupo de Pesquisa de Microalgas do *Campus*. A partir destes isolados foi possível executar os objetivos deste trabalho.

### **3.1.1. *Coelastrum* sp.**

As microalgas das espécies *Coelastrum* sp. apresentam células poligênicas microscópicas que possuem camada única de paredes finas, sendo encontradas no plâncton de rios e lagos que possuem baixo fluxo. Caracterizam-se pela organização reticulada oco-esférica, unidas parenquimaticamente (Figura 3.1). O conjunto que pode variar ente 3-40 células que formam uma malha circular vazia, no qual, a caracterização do tipo de família irá depender do número de células contidas em cada agrupamento e o tipo de formato celular, podendo ser esféricas (*C. sphaericum*) ou em forma de cubo (*C. cubicum*). O interior destas células possui coloração uniforme esverdeada podendo apresentar leve granulação (NÄGELI, 1849; BELLINGER et al., 2010). A *Coelastrum* sp. pertence a divisão: Chlorophyceae (algas verdes), ordem Chlorococcales e família Coelastraceae (SANT'ANNA et al. 2012).

As *Coelastrum* sp. se apresentam como cenóbios esféricos (colônias esféricas, em que as células se mantêm unidas) com dimensões aproximadas entre 16-63 micrometros e diâmetro celular variável de 5-9 micrometros. Possui cloroplasto único e uniformidade na parede celular de superfície lisa, contendo cavidade no local de contato célula-célula, com espaços intercelulares triangulares, parietal (RAMOS, 2013; MALONE, 2010; NÄGELI, 1849).



**Figura 3.1.** Imagens de microscopia de diferentes espécies de *Coelastrum*. A) *Coelastrum astroides*<sup>1</sup>. B) *Coelastrum microporum*<sup>2</sup>. C) *Coelastrum* sp.<sup>3</sup>.

### 3.1.2. *Scenedesmus* sp.

Trata-se de um dos gêneros mais comuns e abundantes, sendo encontradas com formato oblongo (oval alongado de largura menor que o comprimento) com extremidades arredondadas ou pontiagudas com paredes finas, podendo estar apresentadas em uma ou duas filas transversais, conforme ilustrado na Figura 3.2. Os tamanhos das células diferem de acordo com a espécie, possuindo diâmetro do comprimento celular de 2-4 vezes a espessura e com perfil transversal circular. As famílias são formadas pela união da superfície lateral celular entre 2, 4 ou 8 células em uma única linha variando a altura, podendo ser a mesma, maior ou menor. Não ocorre modificação entre as posições das células. A divisão celular ocorre de maneira simultânea quando as células estão totalmente crescidas. A coloração e textura variam de acordo com a idade, sendo verde mais fraco e homogêneo para células mais jovens e verde mais intenso com granulação para as mais velhas. Cada célula

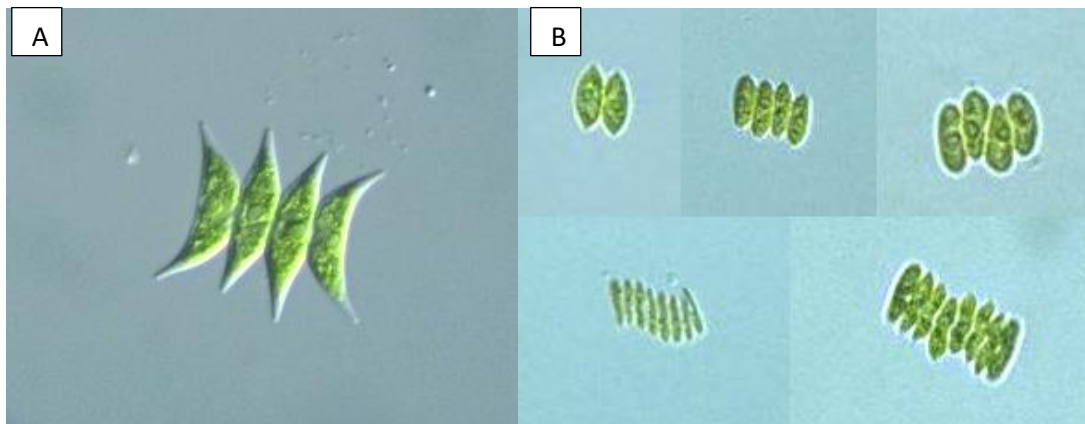
<sup>1</sup> Dr. Ralf Wagner, [http://www.dr-ralf-wagner.de/Bilder/Coelastrum\\_astroideum.jpg](http://www.dr-ralf-wagner.de/Bilder/Coelastrum_astroideum.jpg);

<sup>2</sup> Enzo Azzarello, [https://www.naturamediterraneo.com/forum/topic.asp?TOPIC\\_ID=147607](https://www.naturamediterraneo.com/forum/topic.asp?TOPIC_ID=147607);

<sup>3</sup> Erin McKenney,

[http://cfb.unh.edu/phycokey/Choices/Chlorophyceae/colonies/colonies\\_not\\_flagellated/COELASTRUM/Coelastrum\\_Image\\_page.htm](http://cfb.unh.edu/phycokey/Choices/Chlorophyceae/colonies/colonies_not_flagellated/COELASTRUM/Coelastrum_Image_page.htm)).

apresenta uma ou mais vesículas de clorofila e espaçamentos incolor no meio intracelular (NÄGELI, 1849; BELLINGER *et al.*, 2010). Segundo Sant'Anna *et al.* (2012) a *Scenedesmus* sp. pertence a divisão: Chlorophyceae (algas verdes), ordem Chlorococcales e família Scenedesmaceae.



**Figura 3.2.** Imagens de microscopia de diferentes espécies de *Scenedesmus*<sup>4</sup>. A) *Scenedesmus acutus* f. *tetradesmiformis*. B) *Scenedesmus ecornis*.

### 3.2. CULTIVO DE MICROALGAS

As microalgas diferenciam-se da maioria dos micro-organismos por utilizarem energia luminosa como fonte de sobrevivência. De modo que, o cultivo desses seres são utilizados os conceitos básicos do cultivo microbiano associado ao fornecimento de luz, que precisa ser satisfeito desde o isolamento até seu cultivo (LEE *et al.*, 2004).

O cultivo de microalgas em grande escala deu-se início a partir do cultivo da *Chlorella* sp. em 1919, em que foi possível verificar a sua velocidade de duplicação. As condições físicas e químicas do cultivo são determinantes para o controle do processo de crescimento celular. Para as microalgas, em especial, a luz, o pH, os fatores nutricionais, a temperatura e salinidade se destacam como parâmetros de maior importância. Para cada espécie cultivada, os parâmetros e valores ideais podem variar, ou seja, um conjunto de condições ideais para uma espécie pode não ser favorável para outra (COUTTEAU, 1996; MORAES, 2001).

As microalgas fazem uso da energia solar e compostos inorgânicos para gerar matéria orgânica. O seu cultivo resulta em um sistema biológico efetivo para obtenção de elevados índices produtivos de biomassa. Estes seres não necessitam de nutrientes

<sup>4</sup> Y. Tsukii, <http://protist.i.hosei.ac.jp/pdb/images/chlorophyta/Scenedesmus/index.html>

complexos em seu cultivo e possuem capacidade de aumento de biomassa em pequenos intervalos de tempo (na maioria das espécies o ciclo de vida se completa em poucas horas), sendo possível manipular as variáveis de cultivo para obtenção de melhores resultados quanto ao volume de produção e de determinado metabólito de interesse. (WOJCIECHOWSKI *et al*, 2015).

O cultivo feito em laboratório ou ar livre corresponde a um ambiente característico em que o meio apresenta alta densidade de células, que ocasionam uma baixa irradiância por célula (ou seja, quanto maior a concentração celular em meio de cultivo, menor será a quantidade de luz recebida por célula), alta concentração de oxigênio dissolvido e fontes limitadas de carbono inorgânico. Desse modo, os fatores de irradiância média por célula, homogeneização, troca gasosa e temperatura são fundamentais para o crescimento (MASOJÍDEK, *et al* 2004.)

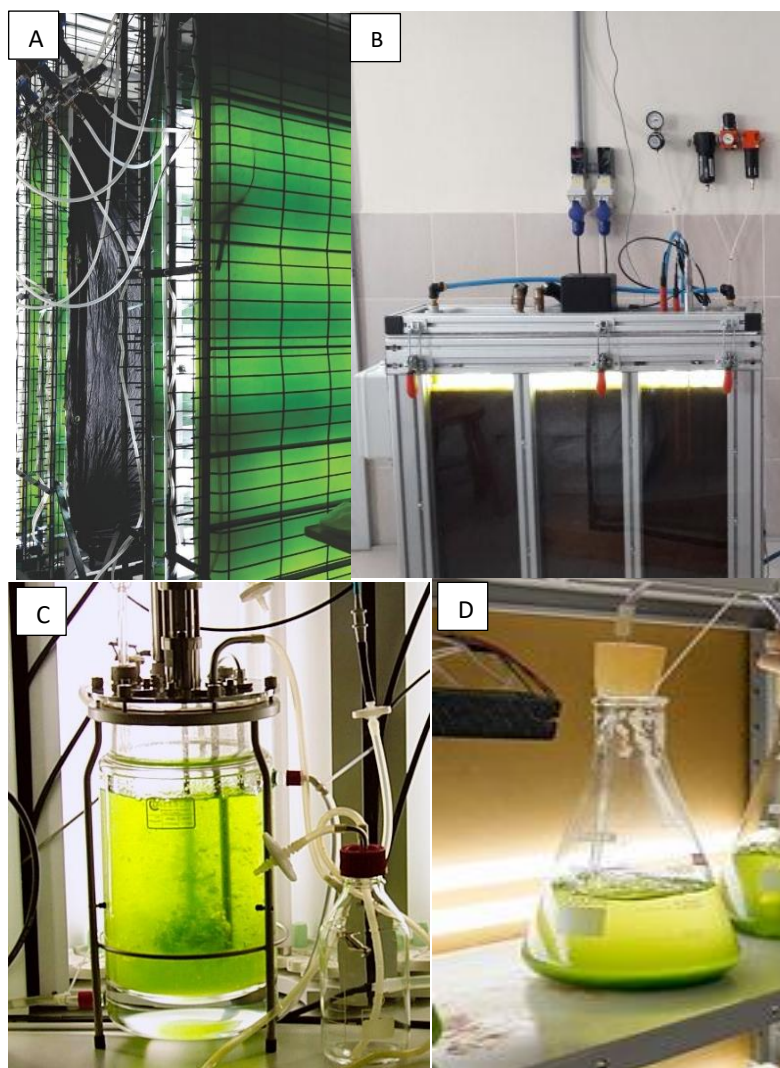
De acordo com Tredici (2004), as microalgas apresentam crescimento de forma abundante quando são submetidas a situações climáticas e nutricionais apropriadas. Em cultivo, as concentrações celulares de microalgas são superiores aos encontrados no ambiente. Os meios utilizados devem apresentar fatores nutricionais que sejam semelhantes ou até mesmo superiores aos que são encontrados na natureza, utilizando-se de suplementação nutricional (COUTTEAU, 1996).

### **3.2.1. Sistemas de cultivo**

Idealmente, para cultivo de seres fotossintetizantes, são utilizados fotobiorreatores, em razão de se tratarem de sistemas de cultura que permitem a incidência de consideráveis proporções de radiação luminosa, favorecendo o cultivo de seres fototróficos. Em cultivos em larga escala, se faz necessário cuidados quanto as condições de crescimento das microalgas, para que estejam próximas das condições ideais (TREDICI, 2004; KLEIN, 2014).

Os cultivos de sistemas fechados requerem que, necessariamente, as paredes do reator sejam transparentes, com intuito de que maiores quantidades de luz passem através da mesma e alcancem as células de microalgas cultivadas. Diversos materiais podem ser utilizados para construção dos fotobiorreatores, desde que seja considerado a transparência dos mesmos, como por exemplo o vidro e o plástico, este

último podendo apresentar característica rígida ou flexível, exemplificado na Figura 3.3. Este sistema não permite a troca com micro-organismos, poeira e gases presentes no ambiente. Além de possuírem maior controle de condições (temperatura, pH, aeração, etc.) quando comparados aos sistemas abertos, essas características são consideradas como vantagens de utilização desse sistema (TREDICI, 2004).



**Figura 3.3** – Sistemas fechados de cultivo de microalgas. A) Fotobiorreator plano vertical 125 L<sup>5</sup>. B) Fotobiorreator plano 25 L<sup>5</sup>. C)<sup>6</sup> e D) Fotobiorreatores de bancada<sup>7</sup>.

Nos sistemas abertos, os cultivos se encontram dispostos em ambiente aberto ou fechado (lagos e/ou tanques), em que a superfície da cultura entra em contato direto com o ar do ambiente. Esses sistemas possuem pouco ou nenhum controle de

<sup>5</sup> DERNER, 2017;

<sup>6</sup> João Rodrigues, <https://www.fcencias.com/2016/07/21/fotobiorreactores-laboratorio-online/>;

<sup>7</sup> Marcos Solivan, <http://www.nitpar.pr.gov.br/microalgas-produzidas-pela-ufpr-melhoram-producao-agricola-e-saude-de-animais/>.

parâmetros temperatura, pH e luminosidade (DERNER, 2017). Para caracterizar os sistemas de cultivo aberto, se destacam as lagoas artificiais e fontes naturais de armazenamento de água. Em escala industrial, esse tipo de sistema é comumente utilizado para cultivo de microalgas, por apresentarem menores custos e facilidade de manutenção e construção, conforme ilustra a Figura 3.4. (BRENNAN, 2010; JOHN *et al.*, 2011).



**Figura 3.4** – Representação de reator utilizados no cultivo de microalgas em larga escala<sup>8</sup>.

### **3.2.2. Condições que favorecem o crescimento microalgal**

Segundo Lee *et al.* (2004), as microalgas podem ser cultivadas em meio líquido ou ágar sólido, submetidas a irradiância luminosa à temperatura ambiente. A manipulação desses fatores garante um cultivo com melhores características físico-químicas, favorecendo o desenvolvimento de determinado grupo de microalgas, proporcionando um ambiente com características inibitórias para micro-organismos que não são de interesse.

Na Tabela 3.1 é possível observar os valores dos parâmetros das condições gerais de cultivo de microalgas. Os valores contidos na faixa ótima de temperatura, salinidade, intensidade da luz, fotoperíodo e pH que se mostram ideais para incubação e cultivo de uma grande variedade de espécies de microalgas (COUTTEAU, 1996).

---

<sup>8</sup> DERNER, 2017.

**Tabela 3.1 – Condições gerais para cultivo de microalgas**

<b>PARÂMETROS</b>	<b>ALCANCE</b>	<b>ÓTIMA</b>
<b>Temperatura (°C)</b>	16-27	18-24
<b>Salinidade (g.L<sup>-1</sup>)</b>	12-40	20-24
<b>Intensidade da luz (cd)</b>	1,000-10,000 (depende do volume e densidade)	2,500-5,000
<b>Fotoperíodo [claro: escuro (horas)]</b>	-	16:8 (mínimo) 24:0 (máximo)
<b>pH</b>	7-9	8,2-8,7

Fonte: Adaptado de ANONYMOUS (1991) apud COUTTEAU (1996, p. 10)

O alcance dos intervalos tolerados e a faixa ótima dos parâmetros das condições de cultivo são característicos de cada espécie. Visto que, valores que apresentam melhores índices produtivos de determinado grupo de microalgas, não é necessariamente ideal para outro, ou seja, os parâmetros podem ser independentes (BARSANTI *et al.*, 2014).

### 3.2.2.1. Temperatura

A faixa de temperatura ideal em que as culturas são mantidas devem estar necessariamente próximas da temperatura do ambiente de onde a espécie foi coletada, exemplificada na Tabela 3.2. Comumente a maioria das espécies de microalgas suportam temperaturas entre 16-27°C, variando de acordo com o conteúdo do meio de cultura, linhagem e espécie (BARSANTI *et al.*, 2014).

**Tabela 3.2 – Exemplos de valores de temperatura ideais para microalgas em diferentes zonas do globo**

<b>Zonas</b>	<b>Temperatura (°C)</b>
Polares	< 10
Temperado	10-25
Tropical	>20

Fonte: BARSANTI *et al* (2014)

Para garantir controle e valores constantes de temperatura nos cultivos são utilizadas incubadoras, contudo, alguns cultivos fazem uso de ciclos de temperatura. Para a maioria das espécies, as temperaturas inferiores a 16 °C acarretam em retardo do

crescimento e superiores a 35 °C ameaçam a integridade celular, sendo fatais para muitas espécies (BARSANTI *et al.*, 2014).

### **3.2.2.2. Fotoperíodo e Intensidade de luz**

Por se tratarem de seres fotossintetizantes, as microalgas absorvem o carbono inorgânico e o converte em matéria orgânica. A luz é utilizada como matriz energética responsável pela reação, em que a intensidade e o fotoperíodo são de grande importância. Quanto maior a densidade do cultivo, maior será a intensidade da luz necessária para penetrar através da cultura. A luz utilizada nos cultivos pode ser de fonte natural, como a luz do sol ou fonte sintética, como lâmpadas de led, fluorescentes, dentre outras. Os fatores de fotoinibição causadas por exemplo, por meio de alta intensidade de luz direta do sol, e o superaquecimento dos cultivos através da iluminação natural e artificial são pontos que devem ser evitados nos cultivos. Em cultivos que utilizam iluminação artificial, o tempo de iluminação fica a critério do pesquisador, com base nos objetivos do trabalho executado, sendo utilizados períodos que variam entre 10 e 24 horas de luz por dia (COUTTEAU, 1996; ZIJFFERS *et al.*, 2008; BARSANTI *et al.*, 2014).

### **3.2.2.3. pH**

Como descrito na Tabela 3.1, a faixa de pH para cultivo de grande parte das espécies de microalgas está contida entre 7 e 9. É comum os cultivos apresentarem falhas no controle do pH, devido ao rompimento de processos celulares e situação de alta densidade celular encontrados nos cultivos, que tem como consequência o aumento no valor de pH, dificultando a manutenção do valor dentro da faixa aceitável. Diante disso, correções regulares afim de promover a estabilidade do cultivo se fazem necessárias, como exemplo, o uso da injeção de dióxido de carbono que permite reduzir o valor do pH, visto que durante o crescimento das microalgas esses valores podem exceder ao valor limite de 9 (COUTTEAU, 1996; BARSANTI *et al.*, 2014).

### **3.2.2.4. Macronutrientes e micronutrientes**

Diversos compostos são utilizados para enriquecimento nutricional dos meios, como exemplo os macronutrientes (nitrato, fosfato, silicato) e micronutrientes (manganês, molibdênio, ferro, cobalto, cobre, zinco, selênio, boro, vitaminas tiamina (B1) e cianocobalamina (B12)). A partir destes, várias formulações específicas para meios de cultura de algas podem ser feitas. No comércio é possível encontrar soluções prontas para cultivo, que reduzem significativamente o tempo de preparo, sendo ideal para cultivos em pequena escala. Porém, quando se quer cultivar em maiores escalas o uso desse preparado não se torna viável, por apresentar um elevado custo (COUTTEAU, 1996; ANDRADE *et al.*, 2014b).

### 3.2.2.5. Aeração

A aeração do cultivo é indispensável, pois é a principal responsável por sua adequada homogeneização, evitando que as células fiquem depositadas no fundo do fotobiorreator e garantindo que todas as microalgas estejam expostas a luz e aos nutrientes de maneira uniforme. A aeração provoca melhores trocas gasosas entre o meio de cultura e o ar, além de evitar a estratificação térmica (acúmulo de camadas formando uma rocha). O ar inserido no cultivo contém dióxido de carbono, que se trata de uma das principais fontes de carbono utilizadas para a fotossíntese. O CO<sub>2</sub> contido naturalmente no ar possui concentração de cerca de 0,03%, suficiente para ser eluído em cultivos com baixa densidade celular. Para culturas que apresentam maior densidade, o ar pode ser suplementado com CO<sub>2</sub> até atingir uma taxa de 1% do volume do ar. A depender da proporção do cultivo diferentes tipos de mistura (observados na Tabela 3.3) podem ser feitas diariamente (COUTTEAU, 1996; BORGHETTI, 2009; BARSANTI *et al.*, 2014).

**Tabela 3.3 – Misturas para diferentes sistemas de cultivo de microalgas**

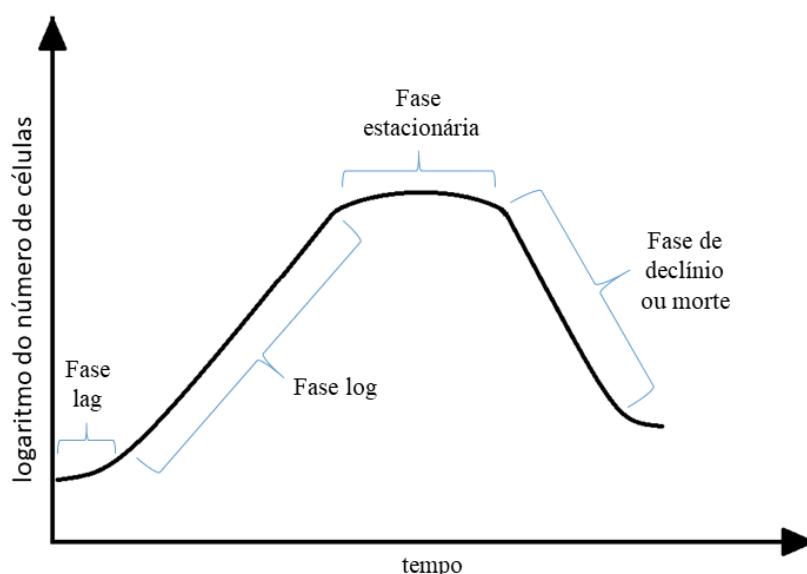
<b>Tipo de mistura</b>	<b>Sistema de cultivo</b>
Manual	Tubos de ensaio e Erlenmeyers
Arejando	Sacos e tanques
Pás	Lagoas

Fonte: (COUTTEAU, 1996; BARSANTI *et al.*, 2014)

### 3.3. PARÂMETROS DE CRESCIMENTO CELULAR

O crescimento celular é o aumento regular da massa de todos os componentes do protoplasma da célula. Em sua maioria as medidas de crescimento são feitas a partir de uma determinada população, seja em proporção de massa total ou em função da quantidade de indivíduos (ALTERTHUMM, 2001).

O crescimento microalgal pode ser expresso por uma curva exponencial de crescimento, dado pelo número de células presentes no meio em determinado intervalo de tempo. Essa curva é dividida em fases, sendo elas a fase *lag* onde se encontra uma intensa atividade metabólica referente a adaptação, a fase *log* em que ocorre o aumento da taxa de crescimento atingindo um valor constante expressando um crescimento exponencial, a fase de transição no qual ocorre uma redução relativa na taxa de crescimento, a fase estacionária em que o número de células novas é correspondente ao número de morte celular, e, a fase de morte celular, onde há taxa negativa de crescimento. O tempo de duração de cada fase depende de qual espécie está sendo cultivada. A partir da Figura 3.5 é possível observar um exemplo dessa curva de crescimento (ANDRADE et al., 2014a).



**Figura 3.5.** Fases da curva de crescimento microbiano. (Fonte: Adaptado de ALTERTHUMM, 2001).

Na fase logarítmica, a Equação 1 considera a variação de massa celular em função do tempo. Em que expressa a velocidade de crescimento proporcional a concentração

de micro-organismos em determinado instante de tempo. O  $\mu_x$  representa a velocidade específica de crescimento.

$$\frac{dX}{dt} = \mu_x X \quad (1)$$

Integrando a Equação 1 obtém-se a Equação 2, que, aplicada num gráfico, os valores de  $\log X$  respectivos a quantidade celular em determinados tempos resulta na reta de caráter exponencial do crescimento celular.

$$\ln \frac{X}{X_0} = \mu_x dt \quad (2)$$

A partir da Equação 2 obtém-se Equação 3 descreve o cálculo da velocidade de crescimento (ALTERTHUMM, 2001).

$$\mu_x = \frac{\ln x - \ln x_0}{t - t_0} \quad (3)$$

Segundo Hiss (2001) a produtividade de biomassa  $P_X$  pode ser calculada com a Equação (4), utilizada para avaliação do desempenho do processo.

$$P_X = \frac{X_m - X_0}{t_f} \quad (4)$$

Para concentração da biomassa no ponto máximo a ser analisado respectivo ao  $t$  de cultivo (g/L) é representado por  $X_m$ ,  $X_0$  é a concentração da biomassa no tempo inicial (g/L) e  $t_f$  representa o tempo total analisado (dias).

O rendimento total do cultivo pode ser calculado utilizando a Equação (5), em que subtrai a biomassa do tempo inicial do cultivo  $X_i$  (g/L) da biomassa no tempo final do cultivo  $X_f$  (g/L).

$$R_{m\acute{a}x} = X_f - X_0 \quad (5)$$

### 3.4. PIGMENTOS FOTOSSINTÉTICOS

A exploração da composição bioquímica das microalgas as emprega como fonte de moléculas de alto valor agregado. Esses micro-organismos apresentam em sua composição consideráveis índices de lipídeos, proteínas, minerais, carboidratos e

pigmentos, que são utilizados como fonte de matéria prima para produção de alimentos, medicamentos e biocombustíveis. Das classes existentes de pigmentos fotossintéticos encontrados em diversas espécies de microalgas se destacam as clorofilas, os carotenoides e as ficobiliproteínas (DEL CAMPO et al., 2007; WOJCIECHOWSKI *et al*, 2015).

A capacidade de produção de diferentes tipos de pigmentos fotossintetizantes se dá pela resposta das variações de luminosidade. O cultivo de microalgas visando a produção de pigmentos em escala comercial tem ganhado destaque nas últimas décadas, principalmente utilizando as microalgas do gênero *Spirulina*, *Dunaliella*, *Muriellopsis* e *Haematococcus* (RANGEL, 2000; BECHTOLD *et al.*, 2009).

Nos sistemas de membranas internas, chamadas de tilacoides, são encontrados uma grande variedade de pigmentos fotossintéticos como a clorofila, carotenoides e ficobiliproteínas, que atribuem diferentes colorações para as microalgas, a depender do tipo pigmento que se apresente predominante. Nas indústrias de alimentos e farmacêutica, por sua vez, esses pigmentos apresentam potencial de aproveitamento (ANDRADE et al., 2014a).

Em geral, para que ocorra a coleta de luz e energia em todos os organismos fotossintéticos, estes, necessariamente, precisam conter pigmentos orgânicos. As clorofilas são caracterizadas por pigmentos verdes, os carotenoides por pigmentos amarelo ou laranja, sendo ambos lipofílicos, em contrapartida, as ficobilinas são hidrofílicas caracterizadas por pigmentos azul ou vermelho (MASOJÍDEK *et al.*, 2004).

#### **3.4.1. Clorofila**

A clorofila é de um pigmento com função de captar luz solar para que ocorra a fotossíntese, sendo também responsável pela coloração verde das plantas, de algumas espécies de bactérias e das algas (LANFER-MARQUEZ, 2003). Esses pigmentos derivados das microalgas apresentam potencial de aplicação como corantes, uma vez que podem fazer parte da alimentação humana (RANGEL, 2000; ANDRADE, *et al.* 2004a).

Em todos os organismos fotossintéticos a clorofila a (Chl a) está presente, o que não acontece com as demais clorofilas (Chl b, c e d), assim, são consideradas como pigmentos acessórios atuando na absorção da luz e transferência de energia para os centros de reação. A partir do Tabela 3.4 é possível observar em que organismos se encontram cada tipo de clorofila (STREIT *et al.*, 2005).

**Tabela 3.4 – Organismos que contém clorofilas a, b, c e d**

<b>Clorofilas</b>	<b>Organismos</b>
Chl a	Todos os seres fotossintetizantes
Chl b	Vegetais superiores, algas verdes e algumas bactérias
Chl c	Feófitas e diatomáceas
Chl d	Algas vermelhas

Fonte: (STREIT *et al.*, 2005)

Segundo Lanfer-Marquez (2003), diversos estudos apontam que a partir de mecanismos indiretos, existe atividade antioxidante da clorofila aplicados à efeitos antimutagênicos e anticancerígenos. Streit *et al.* (2005) cita o uso de clorofilas no preparo de produtos enriquecidos com intuito de recompor o teor natural das moléculas em produtos alimentares e em corantes naturais, além de seus derivados serem utilizados também na área médica para tratamentos fotodinâmicos.

No trabalho de revisão de Volp *et al.* (2009) sobre pigmentos naturais bioativos foi relatado sobre o estudo que utilizou extratos oriundos de clorofilas capazes apresentar efeitos anti-inflamatórios e anti-oxidativos que previnem doenças vasculares aterotrombóticas.

### **3.4.2. Carotenoides**

Os carotenoides são micronutrientes que estão presentes em baixa concentração em vegetais, algas e microrganismos como fungos e bactérias. Esses compostos apresentam diversidade quanto a sua estrutura química e respectiva funções. Os animais não têm a capacidade de biossintetizar os carotenoides, e dependem do consumo alimentar para sua obtenção. No organismo, boa parte dos carotenoides se convertem em vitamina A, além de atuarem também como oxidantes diminuindo as chances do desenvolvimento de doenças crônicas (RODRIGUES-AMAYA *et al.* 2008; PEREIRA, *et al.* 2012).

Mesquita *et al.* (2017) apresentaram em seu trabalho de revisão alguns exemplos de carotenoides que são encontrados na natureza. Dentre estes, têm-se a Luteína que possui coloração amarela que pode ser encontrada em abóbora goianinha e em microalga *Chlorella sorokiniana*, a Zeaxantina com coloração entre amarela e laranja presente em milho-verde e na microalga *Dunaliella salina*, o  $\beta$ -caroteno, a Bixina e o Norbixina que apresentam coloração laranja e se encontram em espécies de levedura, acerola e urucum, a Cantaxantina com coloração entre o laranja e o vermelha existente em bactéria e microalga *Haematococcus pluvialis*, e a Astaxantina de coloração vermelha presente em levedura e microalga *Chlorella zofingiensis*.

A atual preocupação com a utilização aditivos químicos em alimentos, fez que com que houvesse um interesse por meios de obtenções naturais de carotenoides através de processos biotecnológicos. Na Índia, a microalga *Dunaliella* é produzida em grande escala para exploração de carotenoides para uso farmacêutico (VALDUGA *et al.* 2009).

Nas microalgas, os carotenoides são encontrados nos cloroplastos, onde sua concentração varia a depender da espécie, e desempenham um importante papel na fotossíntese. Além disso, mundialmente, existe uma grande demanda desse tipo de corante nas mais variadas aplicações como suplementos alimentícios humano e animal, também em ensaios clínicos para tratamento de câncer (ANDRADE, *et al.* 2014a).

### **3.4.3. Ficobiliproteínas**

As ficobilinas são pigmentos solúveis em água e ligados a apoproteína, formando uma estrutura chamada ficobiliproteína. As ficobiliproteínas se classificam em ficocianina (azul), ficoeritrina (vermelha) e aloficocianina (azul). Essas proteínas coloridas são encontradas em diversas microalgas incluindo o grupo das cianobactérias, em que possuem capacidade de captar energia solar nas regiões visíveis do espectro (ANDRADE *et al.* 2004; MASOJÍDEK, 2004).

As ficobiliproteínas são de fácil obtenção, isolamento e purificação, sendo utilizadas com frequência como agentes fluorescentes em fármacos. Esses pigmentos

apresentam um considerável valor terapêutico, sendo aplicados como imunomoduladores e em testes de reversão do fenótipo de múltipla resistência a fármacos de vários tipos de células tumorais (SCHLUCHTER *et al.*, 2002; VARGAS-RODRIGUEZ *et al.*, 2006).

A variação das condições ambientais, principalmente as relacionadas ao fotoperíodo do cultivo, influem no conteúdo de ficobiliproteínas. Das diversas aplicações, esse pigmento ainda se destaca na utilização como corantes naturais para alimentos (utilizados por exemplo em sorvetes, chicletes, balas e refrigerantes), cosméticos e marcadores fluorescentes na área médica (CHU, 2012).

## 4. METODOLOGIA

Os procedimentos experimentais foram desenvolvidos no Laboratório 3 do Centro Multidisciplinar do *Campus* de Luís Eduardo Magalhães – CMCLEM da Universidade Federal do Oeste da Bahia, equipado com material e equipamentos que supriam as necessidades de montagem e manejo do cultivo de microalgas. Os experimentos foram elaborados com suporte do Grupo de Pesquisa de Microalgas do *Campus*, bem como em acompanhamento das atividades e análises realizadas.

### 4.1. CULTIVO

#### 4.1.1. Meio de cultura

O meio ASM-1 foi preparado a partir da mistura das soluções estoque A:B:C:D na proporção 10:1:0,05:0,2 para cada litro de água destilada (descritos no Quadro 4.1).

**Quadro 4.1.** Reagentes utilizados no preparo do meio ASM-1.

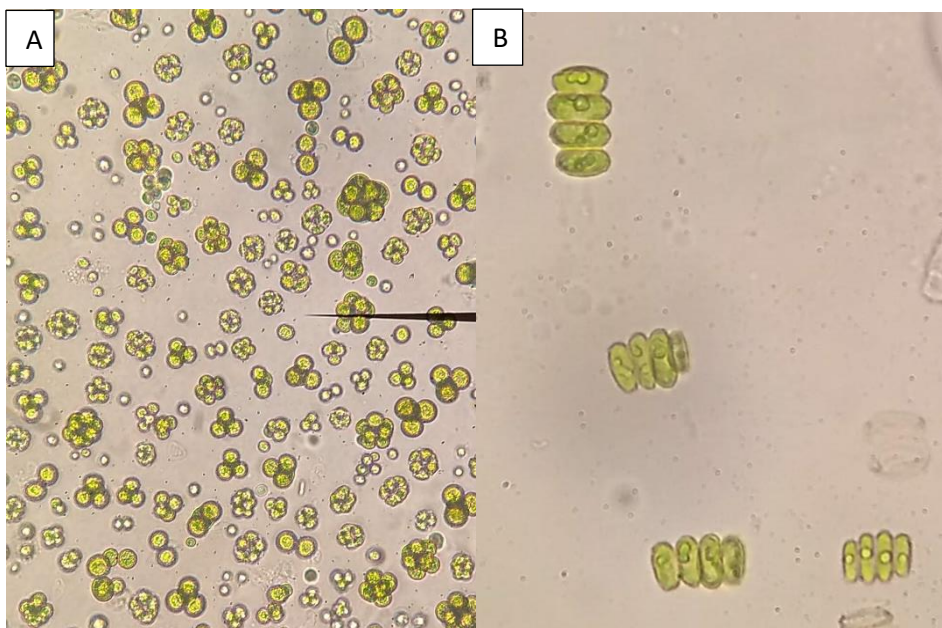
	Estoque A (g/L)	Estoque B (g/100 mL)	Estoque C (g/100 mL)	Estoque D (g/100 mL)
Reagentes	NaNO <sub>3</sub> (8,5); MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O (2,05); MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (2,45); CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O (1,45)	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .3H <sub>2</sub> O (0,87); Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .12H <sub>2</sub> O (1,78)	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> (2,48); MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O (1,39); FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O (0,65); ZnCl <sub>2</sub> (0,335); CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O (0,019); CuCl (0,0014)	Na <sub>2</sub> .EDTA.2H <sub>2</sub> O (1,86)

Fonte: (RICHMOND, 2004).

O pH do meio foi ajustado entre 7,6 e 7,8 com NaOH e HCl ambos à 1M (RICHMOND, 2004).

#### 4.1.2. Preparo de cultivo

Os isolados de microalgas *Coelastrum* sp. e *Scenedesmus* sp. (Figura 4.1) foram obtidos em pesquisas do Grupo de Pesquisa de Microalgas do CMCLEM (trabalhos não publicados) e cedidas para realização desse trabalho. Amostras de *Coelastrum* sp. e *Scenedesmus* sp. foram cultivadas em biorreatores do tipo Erlenmeyer contendo meio ASM-1, com volume de cultivo de 125 mL, sendo 10% de inóculo. Antes de inserir o inóculo, os meios foram previamente autoclavados a 121°C por 20 minutos. Realizou-se 4 repetições de cultivo para cada espécie.



**Figura 4.1** Espécies de microalgas isoladas. A) *Coelastrum* sp. B) *Scenedesmus* sp. *Coelastrum* sp. (Fonte: A Autora)

Após a inoculação os cultivos foram aclimatados em incubadora (Shaker, Refrigerada MSM 13), à temperatura de 25°C, submetidos a agitação orbital de 130 rpm e fotoperíodo de 18 horas com luz e 6 horas sem luz, conforme ilustra a Figura 4.2.



**Figura 4.2** Cultivos aclimatados em incubadora. (Fonte: A Autora)

#### **4.1.3. Acompanhamento de crescimento celular**

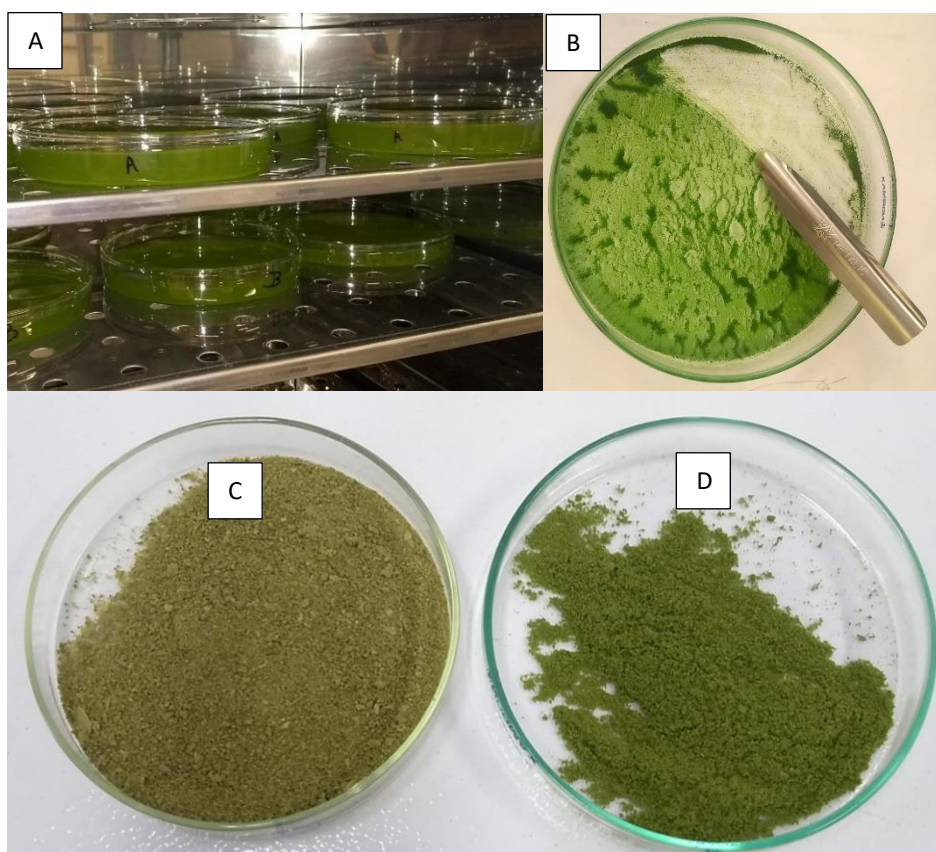
Os cultivos foram mantidos por 30 dias, com acompanhamento dos valores de absorvância, temperatura e pH do meio, concentração em gramas de biomassa/mL de cultivo e a quantidade de células/ $\mu$ L de cultivo. Realizaram-se 20 avaliações em que as 5 primeiras foram feitas em dias consecutivos e as demais com intervalos de 2 dias entre as avaliações. Para determinar a temperatura e pH utilizou-se um medidor de pH de bancada (Medbio, PHS-3C), e para determinar a absorvância um espectrofotômetro UV/VIS (Global Trade Technology) em comprimento de onda de 570 nm.

Para cada análise, foi coletado uma alíquota de 3 mL de cultivo de cada repetição (contendo as espécies de microalgas). Para contagem celular empregou-se a Câmara de Neubauer com auxílio de microscópio ótico (Zeiss, Primo Star). Para medir a biomassa seca das microalgas as placas de Petri utilizadas foram previamente secas em estufa (Lucadema, 81/81) a 105°C por 6 horas, mantidas em dessecador com sílica, pesadas em balança analítica (Shimadzu, AUY220) e identificadas. Então submeteu-se as alíquotas (3 mL) de amostras analisadas nas placas de Petri que

foram secas em estufa a 105°C por 24 horas, mantidas em dessecador com sílica e posteriormente aferiu-se a massa.

## 4.2. EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE PIGMENTOS FOTOSSINTÉTICOS

Volumes de 1,5 L com concentração de 1,350 g/L e 2,086g/L para de cultivos de *Scenedesmus* sp. e *Coelastrum* sp. respectivamente, foram cedidas pelo Grupo de Pesquisa de Microalgas do CMCLEM. Estes, foram submetidos a secagem em estufa em placas de Petri a 105°C por um período de 48 horas. Após, raspou-se as placas e obtiveram-se a biomassa seca das espécies *Scenedesmus* sp. e *Coelastrum* sp. (Figura 4.1), onde, usaram-se nas extrações e quantificações dos pigmentos fotossintéticos.



**Figura 4.1** – A) Cultivos de microalgas *Scenedesmus* sp. e *Coelastrum* sp. dentro da estufa para secagem. B) Placa de Petri com biomassa seca de microalga sendo raspada com auxílio de espátula. Biomassa seca de espécies C) *Scenedesmus* sp. e D) *Coelastrum* sp. (Fonte: A Autora)

### 4.2.1. Clorofila a e clorofila b

Para quantificação das clorofilas foi utilizada a metodologia proposta por Porra *et al.* (1989). A extração das clorofilas fez-se com o reagente N,N-dimetilformamida (DMF). Para 20 mg de biomassa seca, fez-se a extração com 1 mL do reagente extrator e posterior maceração. Os extratos obtidos foram centrifugados (Singer, Sirius 4000) a 9000 rpm por 10 minutos e transferidos para balões volumétricos. A operação (chamada de lavagem) foi repetida até não haver mais coloração no sobrenadante, não excedendo um volume máximo de 5 mL. Todo o procedimento realizou-se em sala escura e com os tubos de ensaio revestidos com papel alumínio, evitando a incidência de luz na amostra. A determinação dos teores de clorofilas foi realizada a partir de em espectrofotômetro UV/VIS. Os valores de absorbância considerados foram nos comprimentos de onda de 646,8 nm e 663,8 nm, de acordo com o que foi proposto nas equações de Porra *et al.* (1989).

As equações 6 e 7 representam a clorofila *a* e clorofila *b*.

$$\text{Clorofila } a = 12,00A_{663,8} - 3,11A_{646,8} \quad (6)$$

$$\text{Clorofila } b = 20,78A_{646,8} - 4,88A_{663,8} \quad (7)$$

Onde,  $A_{663,8}$  é a absorbância da solução no comprimento de onda de 663,8 nm;  $A_{646,8}$  é a absorbância da solução no comprimento de onda de 646,8 nm.

#### 4.2.2. Carotenoides totais

A determinação do teor de carotenoides seguiu protocolo de Porra *et al.* (1989), adaptado por Huang e Cheung (2011). Foi utilizada como solução extratora uma mistura de acetona:hexano (9:1). Pesaram-se aproximadamente 100 mg de biomassa dos cultivos em meio de cultivo específico e adicionou-se o solvente extrator. Todas as replicatas foram submetidas a sonicação (UNIQUE, USC - 1400) por 20 minutos (Figura 4.2). Todo o procedimento realizou-se em sala escura e com os tubos de ensaio revestidos com papel alumínio, evitando a incidência de luz na amostra.

Após, o extrato centrifugado a 9000 rpm por 10 minutos. Submeteu-se o sobrenadante coletado em espectrofotômetro UV/VIS nos comprimentos de onda de 440,5 nm; 646,6 nm e 663,6 nm. Calculou-se o conteúdo de carotenoides totais de acordo com a equação .

$$\text{Carotenoides totais} = \frac{4,69A_{440,5} - 4,74A_{646,6} - 1,96A_{663,6}}{(\text{concentração da amostra}_{\text{g/L}})} \quad (8)$$

No qual,  $A_{440,5}$  é a absorvância da solução no comprimento de onda de 440,5 nm;  $A_{646,6}$  é a absorvância da solução no comprimento de onda de 646,6 nm e  $A_{663,6}$  é a absorvância da solução no comprimento de onda de 663,6 nm.

### 4.2.3. Ficobiliproteínas

Para a determinação do teor de ficobiliproteínas foi utilizado o tampão fosfato de sódio com pH 8 como solvente extrator na concentração de 400 mg de biomassa seca para cada 2,5 mL de solvente (MORAES *et al.*, 2010). Conduziu-se as amostras para banho ultrassônico a temperatura ambiente por 30 minutos. Após, foram centrifugadas a 4000 rpm por 20 minutos. A partir do sobrenadante analisou-se as amostras em espectrofotômetro UV/VIS nos comprimentos de onda 562 nm, 615 nm, e 652 nm. Determinou-se a concentração de ficocianina, alofocianina e ficoeritrina utilizando as equações 9, 10 e 11.

$$CF = (A_{615} - 0,474A_{652})/5,34 \quad (9)$$

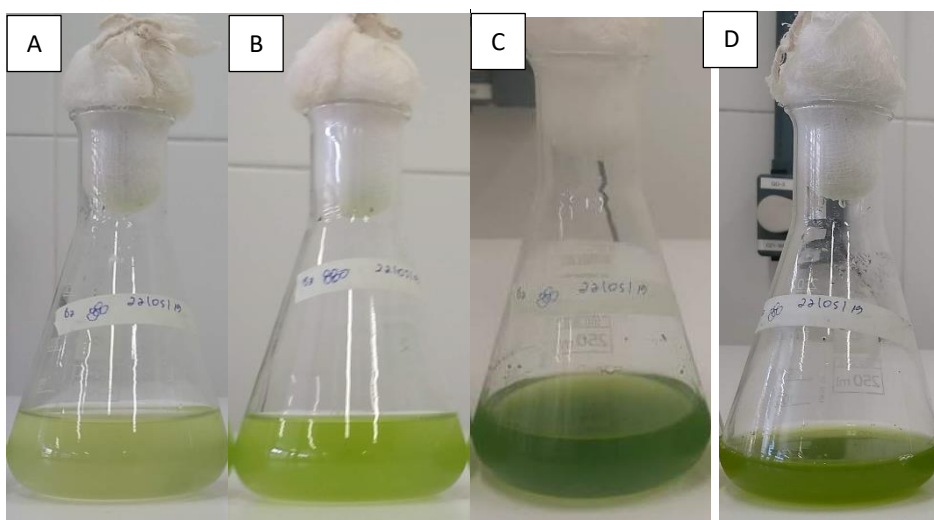
$$CAF = ((A_{652} - 0,208A_{615}))/5,09 \quad (10)$$

$$CFE = (A_{562} - 2,41CF - 0,849CAF)/9,62 \quad (11)$$

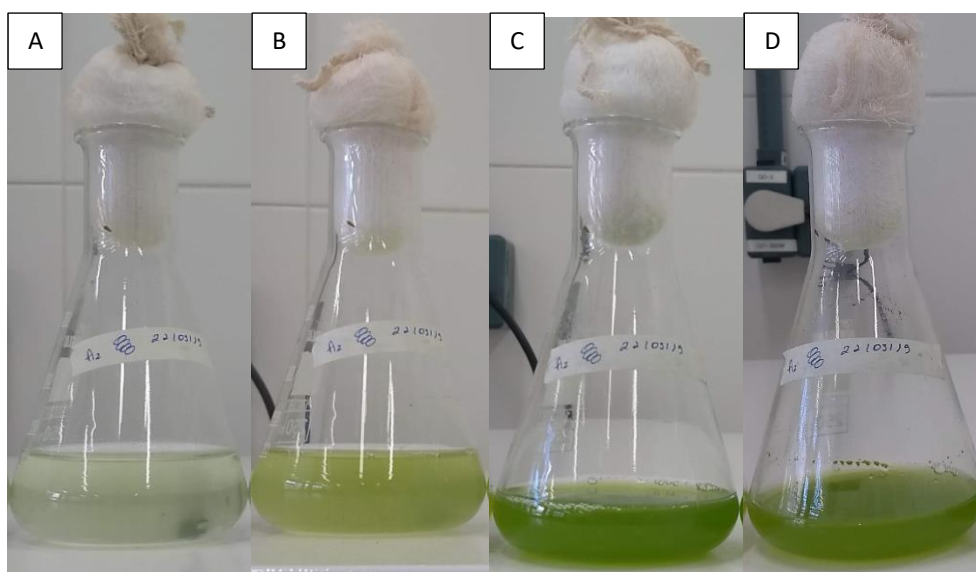
Sendo,  $CF$  a concentração de ficocianina (g/L);  $CAF$  a concentração de alofocianina (g/L) e  $CFE$  a concentração de ficoeritrina (g/L).  $A_{562}$ ,  $A_{615}$  e  $A_{652}$  as densidades óticas das amostras a 562, 615, 652 nm, respectivamente.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A avaliação do crescimento celular foi feita a partir do cultivo de *Scenedesmus* sp. e *Coelastrum* sp. em 4 repetições no decorrer de 30 dias. Os cultivos continham volume de 125 mL, sendo 10% de inóculo dos isolados das espécies de microalgas. A partir das Figuras 5.1 e 5.2, é possível observar a diferença de coloração dos cultivos no decorrer de 30 dias. Os cultivos de 1 dia possuem coloração esverdeada com tom claro, este, possui menor quantidade celular em relação aos demais cultivos de 4, 11 e 30 dias, que por sua vez, apresentam colorações de verde mais escuros por apresentarem aumento de população celular em meio de cultivo com o decorrer da batelada simples.

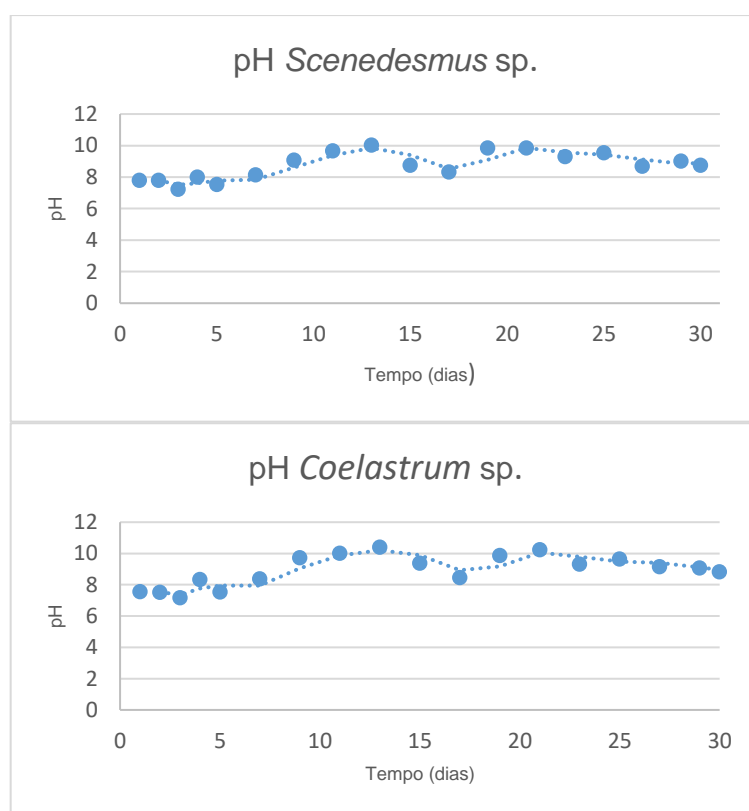


**Figura 5.1** – Cultivo de *Coelastrum* sp. em A) 1 dia, B) 4 dias, C) 11 dias e D) 30 dias de cultivo em estufa sob condições controladas. (Fonte: A Autora)



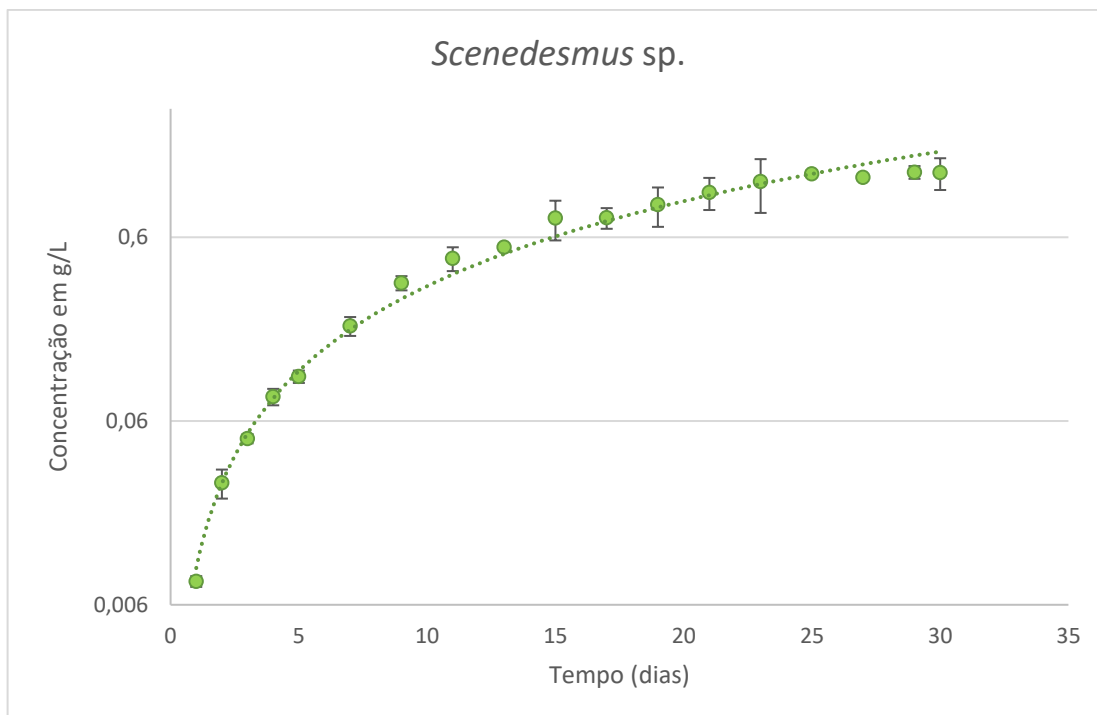
**Figura 5.2** – Cultivo de *Scenedesmus* sp. em A) 1 dia, B) 4 dias, C) 11 dias e D) 30 dias de cultivo em estufa sob condições controladas. (Fonte: A Autora)

Os cultivos iniciaram com valores de pH 7,8 para *Scenedesmus* sp. e pH 7,6 para *Coelastrum* sp. A partir do 10º dia dos cultivos o pH apresentava-se entre 8 e 10 (Figura 5.3). Esse resultado já era esperado, visto que, segundo Coutteau (1996) e Barsantini (2014) os valores de pH obtidos no experimento correspondem aos valores contidos na faixa de pH para cultivo de grande parte das espécies de microalgas. De acordo com os mesmos autores, as sucessivas variações de pH no decorrer dos dias dos cultivos, possivelmente são decorrentes dos aumentos da densidade celular e eventuais rompimentos de processos celulares.

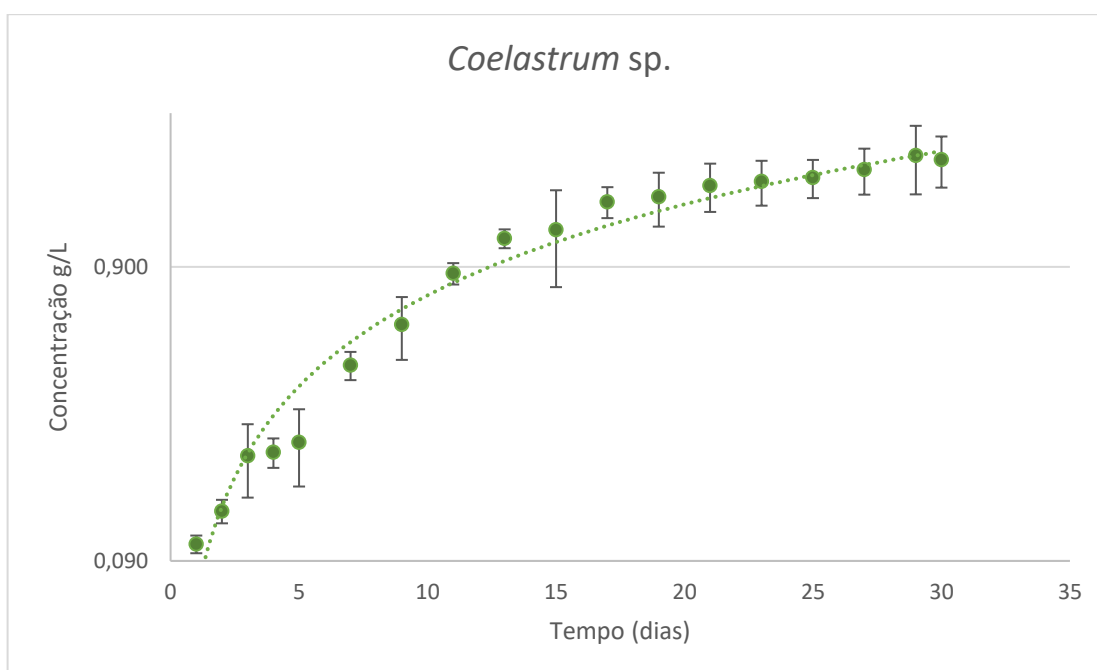


**Figura 5.3** – Curvas de pH dos cultivos de *Scenedesmus* sp. e *Coelastrum* sp. com meio de cultivo ASM-1 no decorrer de 30 dias. (Fonte: A Autora)

A partir das Figuras 5.4 e 5.5 é possível observar as curvas de crescimento celular características dos cultivos de *Scenedesmus* sp. e *Coelastrum* sp. respectivamente. Cada figura relaciona a concentração celular de biomassa seca em gramas por litro de cultivo no decorrer de 30 dias.



**Figura 5.4** – Perfil cinético de cultivo de *Scenedesmus sp.* com meio de cultivo ASM-1, em temperatura de 25°C no decorrer de 30 dias. (Fonte: A Autora)



**Figura 5.5** – Perfil cinético de cultivo de *Coelastrum sp.* com meio de cultivo ASM-1, em temperatura de 25°C no decorrer de 30 dias. (Fonte: A Autora)

Analisando as Figuras 5.4 e 5.5 é possível observar que as fases de adaptação celular (lag) foram expressas entre o 1º e o 8º dia para o cultivo de *Scenedesmus sp.* e entre o 1º e o 6º dia para o cultivo de *Coelastrum sp.*, em que houveram pequenas variações quanto ao aumento da biomassa. Na fase de crescimento exponencial (log),

expressas entre 9<sup>o</sup> e 15<sup>o</sup> dias de cultivo para *Scenedesmus* sp. e 7<sup>o</sup> e 13<sup>o</sup> dias de cultivo para *Coelastrum* sp. é possível observar o aumento na taxa de crescimento celular, que atinge velocidade constante, uma vez que é nesta fase que há maior atividade metabólica. A fase de transição é pode ser notada no 16<sup>o</sup> e 14<sup>o</sup> dias para *Scenedesmus* sp. e *Coelastrum* sp. respectivamente, em que há redução relativa na taxa de crescimento. Entre 17<sup>o</sup> e 29<sup>o</sup> dias para *Scenedesmus* sp. e 15<sup>o</sup> e 29<sup>o</sup> dias para *Coelastrum* sp. é possível observar a fase estacionária em que houve redução na velocidade de crescimento em que o número de morte celular é igual ao número de células novas. No 30<sup>o</sup> dia para ambos os cultivos apresentaram menores valores de biomassa em relação ao dia anterior, constatando o início da fase de morte celular.

Durante o cultivo, as duas espécies isoladas apresentaram bons rendimentos quanto a produção de biomassa. Na Tabela 5.1, é possível observar os valores de rendimentos de biomassa em gramas/litro (g/L) obtidos em análise após 30 dias de cultivo de *Scenedesmus* sp. e *Coelastrum* sp.

**Tabela 5.1** Rendimento em gramas de biomassa seca por litro de cultivo de *Scenedesmus* sp. e *Coelastrum* sp. em meio de cultivo ASM-1 no decorrer de 30 dias de incubação em biorreator.

	<b>Dias</b>	<b><i>Scenedesmus</i> sp.</b>	<b><i>Coelastrum</i> sp.</b>
Rendimento (g/L)	1	0,008	0,103
	2	0,028	0,133
	3	0,048	0,205
	4	0,081	0,211
	5	0,105	0,228
	7	0,198	0,417
	9	0,339	0,573
	11	0,461	0,855
	13	0,530	1,125
	15	0,763	1,204
	17	0,766	1,499
	19	0,901	1,557
	21	1,053	1,702
	23	1,205	1,760
	25	1,330	1,811
	27	1,271	1,928
	29	1,357	2,152
30	1,350	2,086	

Fonte: A Autora.

Em 17 dias de cultivo de *Scenedesmus* sp. em meio de cultura *Chu*, Oliveira (2013) obteve 1,14 g/L de produtividade de biomassa seca e 0,73 g/L utilizando meio de cultura *Chu* associado com 15% de meio alternativo. Souza (2017) obteve rendimento de 0,316 g/L em cultivo de *Coelastrum cambricum* com meio WC com aplicação de estresse nutricional, com duração do cultivo de 10 dias. Nos estudos feitos por Berthold (2016) em 20 dias de cultivo em meio de cultura BG-11, foram feitas três repetições submetidas as mesmas condições de cultivo, que resultaram em 0,30 g/L, 0,50g/L e 0,83 g/L para cultivos de *Coelastrum* sp. e 0,33 g/L, 0,33 g/L e 0,23 g/L para cultivos de *Scenedesmus* sp. Diante destes resultados, comparando com os rendimentos descritos na Tabela 3.1, é possível notar que os valores obtidos durante este trabalho são aproximados e até superiores aos encontrados na literatura, podendo constatar um bom desenvolvimento dos cultivos de ambas as espécies. O meio de cultivo *Chu* no trabalho de Oliveira (2013) para o cultivo de *Scenedesmus* sp. mostrou-se melhor quanto ao rendimento, isto demonstra a importância do tipo do meio de cultivo a ser utilizado, uma vez que ele influi diretamente no rendimento e consequentemente nos custos do cultivo.

A partir da Tabela 5.2 é possível observar os valores de rendimento máximo  $R_{m\acute{a}x}(g/L)$ , produtividade  $P_X (g/Ld)$  e velocidade específica de crescimento  $\mu_x(d^{-1})$  obtidos nos cultivos de *Scenedesmus* sp. e *Coelastrum* sp. deste trabalho.

**Tabela 5.2.** Valores de rendimento máximo  $R_{m\acute{a}x}(g/L)$ , produtividade  $P_X (g/Ld)$  e velocidade específica de crescimento  $\mu_x(d^{-1})$  obtidos nos cultivos de *Scenedesmus* sp. e *Coelastrum* sp.

	<b><i>Scenedesmus</i> sp.</b>	<b><i>Coelastrum</i> sp.</b>
$R_{m\acute{a}x}$	1,34 g/L	1,98 g/L
$P_X$	0,04 g/L. d	0,07 g/L. d
$\mu_x$	0,30 d <sup>-1</sup>	0,17 d <sup>-1</sup>

Fonte: A autora

É possível notar que o cultivo de *Coelastrum* sp. apresentou maiores valores quanto ao rendimento e produtividade, entretanto a velocidade de crescimento apresentou valor inferior quando comparada aos valores obtidos no cultivo de *Scenedesmus* sp. É importante ressaltar que os dois cultivos foram submetidos as mesmas condições de cultivo como temperatura, agitação, meio de cultivo e fotoperíodo, concluindo

assim, que para as condições utilizadas neste trabalho o cultivo de *Coelastrum* sp. mostrou melhor adaptação.

Utilizando as biomassas secas, foi possível realizar as extrações e quantificações de carotenoides, clorofila e ficobiliproteínas. Os resultados obtidos estão expressos na Tabela 5.3.

**Tabela 5.3.** Valores (valores médios e seus respectivos desvios padrões) das quantificações de carotenoides, clorofila e ficobiliproteínas obtidas a partir de extrações feitas da biomassa seca de *Scenedesmus* sp. e *Coelastrum* sp.

<b>Rendimento</b>	<b><i>Scenedesmus</i> sp.</b>	<b><i>Coelastrum</i> sp.</b>
<b>Clorofila a</b>	0,061 ± 0,027(mg/g)	4,090 ± 0,899 (mg/g)
<b>Clorofila b</b>	0,344 ± 0,115 (mg/g)	8,899 ± 1,751 (mg/g)
<b>Carotenoides totais</b>	0,024 ± 0,001 (mg/g)	0,003 ± 0,001 (mg/g)
<b>Ficobiliproteínas</b>		
<b>Ficocianina</b>	0,011 ± 0,001 (mg/g)	0,009 ± 0,001 (mg/g)
<b>Aloficocianina</b>	0,015 ± 0,002 (mg/g)	0,187 ± 0,031 (mg/g)
<b>Ficoeritrina</b>	0,010 ± 0,001 (mg/g)	0,026 ± 0,002 (mg/g)

Fonte: A Autora.

Na Tabela 5.4 encontram-se valores encontrados por Lima (2016), Rauytanapanit, (2019), Nascimento (2016), Soares (2019) e Dawah (2007) referentes as suas respectivas extrações.

**Tabela 5.4.** Valores encontrados por diferentes autores em seus respectivos trabalhos.

<b>Rendimento</b>	<b>LIMA, 2016</b>	<b>Literatura</b>
		<b>RAUYTANAPANIT, 2019</b>
	<i>S. obliquus</i>	<i>Coelastrum</i> sp.
<b>Clorofila a</b>	8,5 mg/L	3,37-5,08 mg/g
<b>Clorofila b</b>	-	0,92-1,09 mg/g
	<b>NASCIMENTO <i>et al</i>, 2016</b>	<b>SOARES, 2019</b>
	<i>S. obliquus</i>	<i>Coelastrum sphaericum</i>
<b>Carotenoides total</b>	0,2999 mg/g	18,78 mg/g
<b>Ficobiliproteínas</b>		
<b>Ficocianina</b>		-
<b>Aloficocianina</b>		-
<b>Ficoeritrina</b>		-

Fonte: A Autora

Os resultados de *Coelastrum* sp. obtidos experimentalmente, referentes aos valores de clorofila *b*, se mostrou cerca de 8 vezes maior em comparação com os obtidos por Rauytanapanit (2019), e ainda, o valor de clorofila *a* apresentou valor dentro do intervalo obtido pelo mesmo autor. A partir do rendimento em g/L do cultivo de *Scenedesmus* sp. (Tabela 5.1), o valor de clorofila *a* de 0,061 mg/g foi convertido em 0,045 mg/L, sendo este muito inferior quando comparando o valor de clorofila *a* no cultivo de *Scenedesmus obliquus* encontrado por Lima (2016).

Os resultados experimentais das quantificações de teor de carotenoides em *Coelastrum* sp. e *Scenedesmus* sp. (Tabela 5.3) foram muito inferiores em comparação com os resultados encontrados por Nascimento et al. (2016) e Soares (2019) (Tabela 5.4). Podendo verificar que as espécies de microalgas estudadas neste trabalho sob as condições de cultivo descritas na metodologia, não apresentaram quantidades de carotenoides próximas aos encontrados por Nascimento et al. (2016) e Soares (2019).

Não foram encontrados trabalhos com *Scenedesmus* sp. e *Coelastrum* sp. que objetivavam analisar os teores de ficocianina, aloficocianina e ficoeritrina. No trabalho de Ores (2014) com a microalga *Spirulina* sp. foi possível obter concentrações de 69,9 mg/g de aloficocianina e 100,05 mg/g de ficocianina, que são muito superiores quando comparados aos valores experimentais com *Scenedesmus* sp. e *Coelastrum* sp. deste trabalho (Tabela 5.3). Ainda, de acordo com o trabalho de Rich (2013) não foi identificado conteúdo de ficocianina na *Scenedesmus* sp., em que alterações desse efeito não são esperadas.

É importante ressaltar que já era esperado que os cultivos de determinadas espécies de microalgas não se mostrassem bons em todos os parâmetros de rendimentos avaliados, uma vez que, geralmente os cultivos são feitos com intenção de extração e quantificação de um metabolito específico, além de serem submetidas a diferentes condições de cultivo a serem avaliados.

É importante ressaltar a importância deste trabalho, por fazer parte dos primeiros estudos com microalgas na região oeste da Bahia. Os resultados de avaliação dos pigmentos fotossintéticos servem para direcionar estudos de cultivo de *Scenedesmus* sp. e *Coelastrum* sp. na região. Os valores obtidos experimentalmente podem ser

submetidos a diferentes condições na tentativa de potencializar a produção de um metabolito de interesse. Partindo principalmente do tipo de meio de cultura utilizado e do manejo do cultivo, bem como o controle das condições físicas e químicas que irão afetar diretamente no aumento da biomassa, bem como na produção dos metabolitos das microalgas.

## 6. CONCLUSÃO

Os experimentos realizados foram importantes para a consolidação de elementos teóricos de cultivo de microalgas, onde a realização do cultivo de *Scenedesmus* sp. e *Coelastrum* sp. mostraram-se viáveis por apresentarem valores de rendimento aproximados e até superiores aos encontrados na literatura. Os parâmetros cinéticos de crescimento e condições de cultivo adotados servirão para uso na análise de evolução dos valores da concentração de microalgas no cultivo em função do tempo no desenvolvimento de trabalhos posteriores com *Scenedesmus* sp. e *Coelastrum* sp.

Por meio de análises dos valores de quantificação clorofila obtidos experimentalmente, foi possível verificar que a *Scenedesmus* sp. apresentou valores inferiores aos encontrados na literatura, da mesma maneira, os resultados de quantificação de carotenoides não foram viáveis para *Scenedesmus* sp. e *Coelastrum* sp. Entretanto, o cultivo de *Coelastrum* sp. apresentou bom valor quanto ao teor de clorofila *a*, dentro da faixa encontrada na literatura e ótimo valor de clorofila *b*, cerca de 8 vezes maior em comparação com resultados do mesmo autor, sendo um resultado muito importante em que demonstra o potencial desta microalga como de fonte alternativa para obtenção deste pigmento.

Foi possível comprovar que as microalgas avaliadas não contém valores significativos de ficobiliproteínas, injustificando assim a realização de trabalhos de otimização da produção destes biopigmentos.

## **7. SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS**

Possíveis melhorias podem ser empregadas aos próximos cultivos das microalgas *Scenedesmus* sp. e *Coelastrum* sp., como, testes de outros meios de cultura, exposição a estresse por fotoperíodo, pH e salinidade, bem como o acompanhamento dos fatores físico e químicos diários do cultivo contínuo ou em batelada em determinado intervalo de tempo com posterior análise teores de clorofila e carotenoides.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTERTHUMM, F. Elementos de microbiologia. In: BORZANI, W., *et al.* **Biotecnologia Industrial: Fundamentos**. Vol 1. São Paulo: Blucher, 2001.
- ANDRADE, D. V; FILHO, A. C. **Microalgas de águas continentais: Potenciais e desafios do cultivo**. V.1. / Instituto Agrônômico do Paraná. – Londrina: IAPAR, 2014a.
- ANDRADE, D. V; FILHO, A. C. **Microalgas de águas continentais: Produção de biomassa e coprodutos**. V.2. / Instituto Agrônômico do Paraná. – Londrina: IAPAR, 2014b.
- BARSANTI, L.; GUALTIERI, P. **Algae: anatomy, biochemistry, and biotechnology**. 2 Ed. Boca Raton. Taylor & Francis Group, 2014.
- BECHTOLD, T.; MUSSAK, R. Chlorophylls. In: RICHMOND, A. **Handbook of natural colorants**: New Jersey: John Wiley and Sons Ltd, 2009. p. 243-254.
- BELLINGER E. G.; DAVID C. **Freshwater Algae: Identification and Use as Bioindicators**. 2010. John Wiley & Sons, Ltd.
- BERTHOLD, E. D. **Enhancing Algal Biomass and Lipid Production through Bacterial and Fungal Co-Culture**. FIU Electronic Theses and Dissertations. Florida International University. Miami, Florida. 2016.
- BORGHETTI, I. A. **Avaliação do crescimento da microalga Chlorella minutissima em meio de cultura com diferentes concentrações de manipuiera**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009. 103 p.
- BRENNAN, L., OWENDE, P. **Biofuels from microalgae - A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products**. Renewable and Sustainable Energy Reviews, v. 14, p. 557-577, 2010.
- CHRISTAKI, E.; Bonos, E.; Florou-Paneri, P. Innovative Microalgae Pigments as Functional Ingredients in Nutrition. **Handbook of Marine Microalgae**, 233-243p. 2015

CHU, W. L. **Biotechnological applications of microalgae.** *leJSME* 2012: 6 (Suppl 1): S24-S37.

COUTTEAU, P. Micro-alga. In: ELAVENS, P; SORGELOOS, P. **Manual on the production and use of live food for quaculture.** *Fisheries Technical Paper*. No. 361. Rome, FAO. 1996. 7-48p.

DAWAH, A. M. **Efficacy of inoculating the green algae *Chlorella* and *Scenedesmus* to prevent cyanobacteria growing in Nile tilapia culture.** *Egypt. J. Aquat. Biol. & Fish.*, Vol. 11, No.3:115 -126 (2007) ISSN 1110 – 6131.

DEL CAMPO, J.; GARCÍA-GONZÁLEZ, M.; GUERRERO, M. Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current state and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 74, n. 6, p. 1163-1174, 2007.

DEMIRBAS, A.; DEMIRBAS, M. F. **Green Energy and Technology: Algae Energy.** New York. Springer-Verlag London Limited, 2010.

DERNER, R. B.; et al. Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural**, 2006, 36.6: 1959-1967.

FRANCESCHINI, I. M. *et al.* (Ed.). **Algas: uma abordagem filogenética, taxonômica e ecológica.** Porto Alegre: Artmed, 2010. 332 p.

GUERREIRO, M. G. et al. Biotecnología y aplicaciones de microorganismos pigmentados. **IV Simposio científico en biología celular y molecular**; 1999: 215-232.

HISS, H. Cinética de processos fermentativos. In: SCHMIDELL, W., *et al.* **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica.** Vol 2. São Paulo: Blucher, 2001.

HUANG, J. J.; CHEUNG, P. C. + UVA treatment increases the degree of unsaturation in microalgal fatty acids and total carotenoid content in *Nitzschia closterium* (Bacillariophyceae) and *Isochrysis zhangjiangensis* (Chrysophyceae). **Food chemistry**, v. 129, n. 3, p. 783-791, 2011.

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

KLEIN, B. C. **Cultivo de microalgas para produção de bioetanol de terceira geração**. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas - Faculdade de Engenharia Química. Campinas, SP: [s.n.], 2013.

LANFER-MARQUEZ, U. M. O papel da clorofila na alimentação humana: uma revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. vol. 39, n. 3, jul./set., 2003.

LEE, Y.; SHEN H. Basic Culturing Techniques. In: RICHMOND, A. **Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology**. Blackwell Publishing Ltd. Copyright © 2004. 40-56p.

LIMA, R. M. M. **AÇÃO Antimicrobiana e antioxidante in vitro das frações proteicas da microalga *Scenedesmus obliquus***. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Ceará. Fortaleza. 2016.

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

MALONE, C. F. S. - **Biodiversidade de algas e cianobactérias de duas lagoas salinas do Pantanal da Nhecolândia, MS, Brasil**. Dissertação de mestrado. São Paulo: Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, 2010.

MASOJÍDEK, J. *et al.* Photosynthesis in Microalgae. In: RICHMOND, A. **Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology**. Blackwell Publishing Ltd. Copyright © 2004. 40-56p.

MESQUITA, S. S.; *et al.* Carotenoides: Propriedades, Aplicações e Mercado. **Rev. Virtual Quim.**, 2017, 9 (2), 672-688.

MORAES, C.; BURKERT, J. F. M.; KALIL, S. J. C-phycoyanin extraction process for large-scale use. **Journal of food biochemistry**, v. 34, n. s1, p. 133-148, 2010.

MORAES, I. O. Produção de microrganismos. In: LIMA, U. A. *et al.* **Biotecnologia Industrial - Processos fermentativos e enzimáticos**. Vol 3. São Paulo: Blucher, 2001.

NÄGELI, C. **Gattungen Einzelliger Algen physiologisch und systematisch bearbeitet**. Zürich, 1849.

NASCIMENTO, T.C.; *et al.* Determinação do perfil de carotenoides a partir de *Scenedesmus obliquus* (cpcc05). **XXV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos**. FAURGS. Gramado. 2016.

OLIVEIRA, A. C. **Produção de biomassa de microalgas *Scenedesmus* sp. em efluente de bovinocultura biodigerido**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Paraná. Curitiba. 2013.

ORES, J. C. **Produção e Extração da Enzima Anidrase Carbônica de Ficobiliproteínas a partir de Microalgas**. Tese Doutorado( Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) Química dos Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2014.

OLIVEIRA, J. D. D. **Avaliação do potencial lipídico de microalgas isoladas de corpos d'água de Luís Eduardo Magalhães**. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal do Oeste da Bahia. Luís Eduardo Magalhães. 2019.

OZKURT, I. Qualifying of safflower and algae for energy. **Energy Educ Sci Technol**. 23:145–151, 2009.

PEREIRA, R. J.; *et al.* Vegetable secondary metabolites and antioxidants benefits. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**. Vol. 3, N. 4: pp. 146-152, November 2012.

PORRA, R. J.; THOMPSON, W. A.; KRIEDEMANN, P. E. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics**, v. 975, n. 3, p. 384-394, 1989.

RAMOS, G. J. P. **Algas verdes cocóides (chlorophyta) de duas áreas do Pantanal dos Marimbus (Baiano e Remanso), a APA Marimbus-Iraquara, Chapada Diamantina, Bahia, Brasil.** Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Botânica da Universidade Estadual de Feira de Santana. Feira de Santana, BA. 2013.

RANGEL, C. O. **Influência da luz e ureia no crescimento e conteúdo de clorofila da biomassa de *Spirulina platensis*.** 2000. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Bioquímica Farmacêutica) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

RAUYTANAPANIT, M. Nutrient Deprivation-Associated Changes in Green Microalga *Coelastrum* sp. TISTR 9501RE Enhanced Potent Antioxidant Carotenoids. **Marine drugs.** Mar. Drugs 2019, 17, 328.

RICH, Saul (Ed.). Developments in Industrial Microbiology: Volume 1. **Proceedings of the Sixteenth General Meeting of the Society for Industrial Microbiology.** Held at State College, Pennsylvania, August 30–September 3, 1959. Springer, 2013.

RICHMOND, A. **Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology.** Blackwell Publishing Ltd. Copyright © 2004.

RODRIGUES-AMAYA, D. B.; *et al.* **Fontes brasileiras de carotenóides: tabela brasileira de composição de carotenóides em alimentos.** Brasília: MMA/SBF, 2008. 100p.: il. Color.

SANT'ANNA, C. L., *et al.* **Atlas de cianobactérias e microalgas de águas continentais brasileiras.** Instituto de Botânica. Publicação on-line São Paulo -2012.

SCHLUCHTER, W. M.; BRYANT, D. A. Analysis and reconstitution of phycobiliproteins: methods for the characterization of bilin attachment reactions. In: SMITH, A. G; WITTY, M. (Ed.). **Heme, chlorophyll, and bilins.** Totowa: Humana Press, 2002. p. 311-334.

SOARES, A. T.; *et al.* Analysis of major carotenoids and fatty acid composition of freshwater microalgae. **Elsevier Heliyon.** Apr; 5(4): e01529. 2019.

SOUZA, A. A. **Viabilidade de produção lipídica da microalga *Coelastrum cambricum* utilizando meio de cultura alternativo e estresse nutricional.**

Monografia. Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa. 2017.

STREIT, N. M.; *et al.* As Clorofilas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.35, n.3, p.748-755, mai-jun, 2005.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. (Ed.). **Microbiologia**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

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

VALDUGA, E.; *et al.* Produção de Carotenoides: Microrganismos como fonte de pigmentos naturais. **Quim. Nova**, Vol. 32, No. 9, 2429-2436, 2009.

VARGAS-RODRIGUEZ, A. L. *et al.* Efecto in vitro de las ficobiliproteínas en el tratamiento del carcinoma cervicouterino. **Revista del Centro de Investigación - Universidad La Salle**, México, v. 7, n. 25, p. 5-12, 2006.

VOLP, A. C. P.; *et al.* Pigmentos Naturais Bioativos. **Alim. Nutr.**, Araraquara. v.20, n.1, p. 157-166, jan./mar. 2009.

WOJCIECHOWSKI, U. STRAUBE, A.; CAVALCANTE, K. P. *et al.* **Isolamento e cultivo de microalgas**. 1 ed. [S.L.]: ResearchGate, 2015. 91 p.

ZIJFFERS, J. W. F.; M. JANSSEN; *et al.* Design process of an area-efficient photobioreactor. **Marine Biotechnology**, v. 10, n. 4, p. 404-415. 2008.