



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL  
CAMPUS LARANJEIRAS DO SUL  
CURSO ENGENHARIA DE AQUICULTURA**

**HENRIQUE BRONDANI DA SILVA**

**AVALIAÇÃO PROTEICA E LIPÍDICA DA MICROALGA *Desmodesmus* sp. CULTIVADA  
EM MEIO DE CULTURA ASM-1**

**LARANJEIRAS DO SUL, 2017**  
**HENRIQUE BRONDANI DA SILVA**

**AVALIAÇÃO PROTEICA E LIPÍDICA DA MICROALGA *Desmodesmus* sp. CULTIVADA  
EM MEIO DE CULTURA ASM-1**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de Engenharia de Aquicultura da Universidade Federal da Fronteira Sul, como requisito parcial para obtenção de grau de Bacharel em Engenharia de Aquicultura.

Orientador: Prof. Dr<sup>a</sup>: Josimeire Aparecida Leandrini

Co-orientador: Prof. Msc.. Alexandre Monkolski

**LARANJEIRAS DO SUL**

**2017**

**PROGRAD/DBIB - Divisão de Bibliotecas**

Silva, Henrique Brondani da  
AVALIAÇÃO PROTEICA E LIPÍDICA DA MICROALGA  
Desmodesmus sp. CULTIVADA EM MEIO DE CULTURA ASM-1/  
Henrique Brondani da Silva. -- 2017.  
34 f.:il.

Orientador: Josimeire Aparecida Leandrini.  
Co-orientador: Alexandre monkolski.  
Trabalho de conclusão de curso (graduação) -  
Universidade Federal da Fronteira Sul, Curso de  
Engenharia de Aquicultura , Laranjeiras do Sul, PR,  
2017.

1. . I. Leandrini, Josimeire Aparecida, orient. II.  
monkolski, Alexandre, co-orient. III. Universidade  
Federal da Fronteira Sul. IV. Título.

Elaborada pelo sistema de Geração Automática de Ficha de Identificação da Obra pela UFFS  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

HENRIQUE BRONDANI DA SILVA

**AVALIAÇÃO PROTEICA E LIPÍDICA DA MICROALGA *Desmodesmus* sp.  
CULTIVADA EM MEIO DE CULTURA ASM-1**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado como requisito para obtenção de grau de Bacharel em Engenharia de Aquicultura da Universidade Federal da Fronteira Sul.

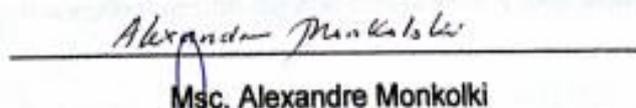
Orientadora professora Dr<sup>a</sup>. Josimeire Aparecida Leandrini

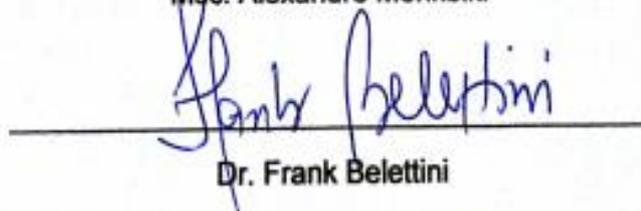
Este trabalho de conclusão de curso foi defendido e aprovado em:

19, 12, 2017

**BANCA EXAMINADORA**

  
Dr<sup>a</sup>. Josimeire Aparecida Leandrini

  
Msc. Alexandre Monkolki

  
Dr. Frank Belettini

  
Prof. Dr. Thiago Bergler Bitencourt

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por ter me dado saúde e força para superar as dificuldades.

A esta universidade que oportunizou uma janela que hoje vislumbro um horizonte superior, eivado pela confiança no mérito e ética aqui presentes.

À minha orientadora, prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Josimeire Aparecida Leandrini, pelos ensinamentos valiosos, paciência e disponibilidade de tempo para a realização deste trabalho de conclusão de curso. Ao meu Orientador prof. Msc Alexandre Monkolski pelo apoio e dedicação de seu tempo quando eu precisei. E pela sua dedicação nesta instituição que é muito importante. Tenho a total certeza de que colhi bons frutos dentro desta instituição.

Aos professores Thiago Bitencourt, Marcos Weingartner, Jorge Erick Garcia Parra Adriana Saccol Pereira, Ronan Marcos Maciel, Silvia Romão, Luciano Tormen, que fizeram parte desta caminhada e seus ensinamentos neste trabalho e disciplinas, foram de grande valia.

A todos os meus colegas e professores, quero agradece-los pela amizade, e ajuda. Com certeza nós aprendemos muitas coisas juntos, um auxiliando ao outro, crescendo juntos!

Agradecer aos meus amigos colegas de graduação Robimar P. da Silva, Valmir Souza, Ronaldo Cezar Dalibra, Davi Luiz Koester, Eder José de Oliveira, Cristian Zwetzch do Nascimento que de alguma forma ou outra colaboraram para eu chegar até esta etapa.

Aos técnicos de laboratório Frank Beletini e Fernanda Arpini de Souza pelos auxílios no desenvolvimento deste trabalho, que sempre estavam dispostos a ajudar e passar seus conhecimentos.

A Suelen Regina Gomes que apoiou e incentivou neste trabalho.

Aos meus pais Terezinha e Salomão que me incentivaram e apoiaram durante todos esses anos que estive na universidade.

A todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

## RESUMO

Algas são organismos com ampla diversidade de formas, funções e estratégias de sobrevivência, são organismos fotossintéticos que variam de unicelulares isoladas ou agregadas. O maior papel das microalgas se relaciona a fotossíntese produzindo o oxigênio atmosférico. Alguns gases como: CO<sub>2</sub> SO<sub>2</sub> e NO, os quais agravam o efeito estufa, as microalgas tem a capacidade de capturar estes gases nocivos e assimilam em seu metabolismo convertendo em ácidos graxos. O trabalho teve como objetivo estruturar o cultivo de microalgas na UFFS *campus* Laranjeiras do Sul, avaliar o desenvolvimento e manutenção e a composição lipídica e proteica da microalga *Desmodesmus* sp. Desta forma a partir de um cultivo de microalgas estabelecido, outros trabalhos poderão dar início quando se trata de alimento vivo ou mesmo utilizando na forma inerte. O sistema passou por algumas modificações e adequações para obtenção de uma estrutura de cultivo mínima; lâmpadas especiais foram necessárias para ativar o fotossistema das microalgas e assim ocorrer a proliferação das mesmas, que foi acompanhado por meio de contagem em câmara de Neubauer. Para avaliação das proteínas foram feitas pelo método de realizadas pelo método de Kjeldahl, com média de produção de 49,3295%. Para os valores de lipídios foram analisados conforme descrito com Bligh-Dyer (1959) com um resultado médio de 13,57%. Os resultados da cromatografia gasosa mostraram 11 elementos produzidos pela microalga *Desmodesmus* sp, que são de grande interesse onde os principais são o ácido palmítico, com a maior abundância na amostra, ácidos graxos linolênico e linoleico dos ômega 3, e 6 respectivamente. Este é um dos primeiros estudos com o cultivo de microalgas o que mostra precisa-se mais estudos e ajustes no sistema para produção de uma maior quantidade de proteína ou lipídeos.

Palavras-chave: Biomassa; Ácidos graxos; Condições de cultivo.

## **ABSTRACT**

Algae are organisms with a wide diversity of forms, functions and strategies of survival, are photosynthetic organisms that range from isolated or aggregated single-celled organisms. The major role of microalgae relates to photosynthesis producing atmospheric oxygen. Some gases such as CO<sub>2</sub> SO<sub>2</sub> and NO, which aggravate the greenhouse effect, microalgae have the ability to capture these harmful gases and assimilate into their metabolism by converting them into fatty acids. The objective of this work was to structure microalgae cultivation at the UFFS Campus Laranjeiras do Sul, to monitor the development and maintenance and to evaluate the lipid and protein composition of the microalgae *Desmodesmus* sp. Thus, from an established microalgae culture, other works may give when it comes to live food or even using it in inert form. The system underwent some modifications and adjustments to obtain a minimum structure of culture, special lamps were necessary to activate the photosystem of the microalgae and thus to occur the proliferation of the same ones, that was accompanied with counting in chamber of Neubauer, for evaluation of the proteins were made by the Kjeldahl method, with a production average of 49.3295%. For the lipid values were analyzed as described with Bligh-Dyer (1959) with an average result of 13.57%. The results of the gas chromatography showed 11 elements produced by the microalgae that are of great interest where the main ones are the palmitic acid, with the greatest abundance in the sample, fatty acids linolenic and linoleic of omegas 3, and 6 respectively. This is one of the first studies with the cultivation of microalgae which shows more studies and adjustments in the system to produce a greater amount of protein or lipids.

Keywords: Biomass; Fatty acids; Culture conditions.

## **LISTA DE GRÁFICO**

**Gráfico 1. Curva de crescimento da microalga em relação aos dias de cultivo**

## **LISTA DE IMAGENS**

Figura 1 Estrutura utilizada para o cultivo de microalgas, Laboratório de Limnologia da Universidade Federal da fronteira Sul, 2017.

Figura 2 Procedimentos para avaliação proteica Laboratório de Química Analítica da Universidade Federal da fronteira Sul, 2017.

Figura 3 Procedimentos para avaliação lipídica Laboratório de Química Analítica da Universidade Federal da fronteira Sul, 2017.

Figura 4 Imagem da câmara de Neubauer com as células de microalgas para contagem em microscópio óptico em 400x.

## **LISTA DE QUADROS E TABELAS**

Tabela 1- meio de cultura CHU.

Tabela 2- meio de cultura ASM-1.

Tabela 3- Percentual proteico e lipídico da microalga *Desmodesmus* sp., cultivados em cinco dias no laboratório de Limnologia, 2017.

Quadro 1. Resultado do CG, tempo que apareceram, nome do elemento, sua estrutura e a porcentagem em relação ao total da amostra.

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

% - porcentagem

g - Gramas

h – hora

l - litro

min – minuto

l/min – litros por minuto

mg - miligrama

ml – mililitro

µl. - micro litro

nm – nanometro

ND – não detectado

°C - graus Celsius

CG - Cromatografia Gasosa

UFFS - Universidade Federal da Fronteira Sul

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVO GERAL	15
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3	JUSTIFICATIVA	16
4	METODOLOGIA	17
4.1	ESTRUTURA PARA CULTIVO	18
4.2	CONTAGEM	20
4.3	AVALIAÇÃO PROTEICA	21
4.4	AVALIAÇÃO LIPÍDICA	23
4.5	ANÁLISES DE COMPOSTOS ORGÂNICOS EM <i>Desmodesmus</i> sp	24
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
5.1	CRESCIMENTO MICROALGAL	25
5.2	CROMATOGRAFIA GASOSA	30
6	CONCLUSÃO	32
	REFERÊNCIAS	34

## 1 INTRODUÇÃO

Algas apresentam ampla diversidade de formas, funções e estratégias de sobrevivência, são organismos fotossintéticos que variam de unicelulares isoladas ou agregadas, pluricelulares, colônias, filamentos simples ou ramificados, que reúne organismos eucariotos e procariotos, que apresentam, além de clorofila, outros pigmentos assimiladores o que determina sua coloração diversa (BICUDO, 2010).

Bicudo e Menezes (2006) denominam o termo “alga” e englobam uma grande discussão:

O termo “alga” foi proposto oficialmente como uma categoria taxonômica em 1753, por Lineu, no clássico *Species plantarum*. Após seu nascimento, o termo alga foi usado para determinar uma enorme variedade de organismos e sua interpretação tem sido tão discutida que hoje não se pode mais lhe atribuir um significado preciso. Alga é um termo de uso popular, como palmeira ou grama, utilizado para designar um verdadeiro universo de organismos tão diferentes quanto sua morfologia, reprodução, fisiologia e ecologia, o que torna praticamente impossível sua definição [...]. A natureza essencialmente negativa da caracterização das algas é decorrente da enorme variação de estrutura, formas de reprodução, históricos de vida, processos fisiológicos e de ambientes em que vivem os organismos reunidos sob tal denominação (BICUDO E MENEES, 2006 pg).

O maior papel das microalgas se relaciona a fotossíntese produzindo o oxigênio atmosférico tão necessário ao metabolismo da respiração, e fixando em seus tecidos o gás carbônico para convertê-lo em açúcar (glicose). Como possuem habilidade de acumular em seus tecidos carbono, fósforo, nitrogênio, incorporados a sua biomassa, representam uma excelente fonte de nutrientes aos organismos aquáticos, e são consideradas fontes inesgotáveis de compostos naturais (BATISTA et al., 2013).

Espécies como *Thalassiosira fluviatilis* e *Chaetoceros muelleri* (DERNER, 2006) ricas em ácidos graxos, poli-insaturados de cadeia longa (C20 e C22) e outras espécies de microalgas são ricas em ácidos graxos da cadeia dos ômega 3; 6; e 9 (CARVALHO, 1997) e acabam se tornando uma ótima fonte para alimentação, apresentando ciclo de vida curto, rápida proliferação (RADMANN; COSTA, 2008).

Para o cultivo destes organismos não há disputas por terras, que são produtivas com outras culturas, a água de cultivo não precisa ser água potável, podendo utilizar águas residuais provenientes de indústrias (VAZ et al., 2016).

São organismos exigentes de nutrientes para sua proliferação, as microalgas são capazes de duplicar a biomassa em apenas 2 a 5 dias, não sendo necessário a

utilização de compostos químicos para controle de pragas como pesticidas, fungicidas ou herbicidas (COSTA; MORAIS, 2011).

Dependendo da espécie, podem produzir uma reserva de energia na forma de óleos ou de amido, e nos óleos podem estar contidos substância da família Ômega, extremamente importantes para as funções metabólicas dos humanos.

Os peixes são animais que quando eclodem dos ovos, nos primeiros dias de vida, seu trato digestório não está totalmente desenvolvido e não possuem as enzimas proteolíticas necessárias para a digestão de um alimento inerte, por exemplo a ração, necessitando de alimento vivo para que ele absorva as enzimas proteolíticas contidas neste alimento (PORTELA, 1997; DABROWSKI, 1997). Quando larvas de peixes são criadas em uma cultura de água verde a sobrevivência larval é significativamente maior (FAULK, 2005). Portanto, a nutrição é um dos aspectos essenciais para aumentar as taxas de sobrevivência das larvas dos organismos cultiváveis, aumentando o número de indivíduos para o processo de estocagem e engorda (PIEDRAS; POUHEY, 2004).

Assim o desenvolvimento de culturas monoxênica de microalgas, bem como estudos referentes a sua composição química, tornam-se fundamentais para o desenvolvimento de novas possibilidade de produção de alimentos tanto para animais, peixes e ou zooplâncton ou até mesmo para o desenvolvimento de produtos para a incorporação de alimento humano.

## **2 OBJETIVO GERAL**

Estruturar o cultivo de microalgas no laboratório de limnologia da Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus* Laranjeiras do Sul, para possibilitar a manutenção de cepas e culturas para pesquisas, fins didáticos, acompanhar, desenvolver cepas, e avaliar a composição lipídica e proteica de *Desmodesmus* sp.

### **2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Adaptar protocolo de cultivo para a microalga *Desmodesmus* sp. no laboratório de limnologia da UFFS;
- Determinar o teor (%) proteico e lipídico da biomassa obtida a partir do cultivo;

- Realizar a especificação química lipídica por cromatografia gasosa.

### 3 JUSTIFICATIVA

As microalgas são os produtores primários e fazem parte da primeira alimentação de muitos organismos presentes no ambiente aquático. Responsáveis principalmente pela fotossíntese, produzindo O<sub>2</sub>, dependendo de sua espécie pode produzir uma reserva de energia na forma de óleos ou de amido, muitas delas possuem grande potencial para a extração de óleos para fabricação de biodiesel, como é o caso da espécie *Clorocystis* sp. que apresentou melhor rendimento em ésteres metílicos de ácidos graxos 115% superior ao da soja (MENEZES, 2013).

Na aquariofilia, a alimentação adequada é um fator chave para a manutenção das espécies, além de determinar uma pigmentação mais viva garante um ganho de tamanho comercial em menor tempo (FRANÇA, 2015). Na piscicultura voltada para alimentação humana, a falta de alimentação natural para larvas de peixes, em quantidade e qualidade, bem como a ausência de uma alimentação artificial para substituir essa, pelo menos em parte comprometem a produção final (LOPES et al., 1994).

O valor nutricional do alimento natural na fase de larvicultura, possibilita que os peixes consigam balancear suas dietas, escolhendo no ambiente itens que supram melhor suas exigências nutricionais. Em cativeiro essas exigências devem ser supridas por alimentos que sejam similares aqueles encontrados em seus habitats naturais (LUZ; ZANIBONNI-FILHO, 2001).

Hardy e Castro (2000) avaliaram a qualidade nutricional de três espécies de clorofíceas cultivadas em laboratório, entre elas estão *Scenedesmus quadricauda* (Brébisson & Godey 1835), *Ankistrodesmus gracilis* (Korshikov 1953) e *Pediastrum duplex* (Meyen 1829). A qualidade de uma alga não depende somente de sua composição química, mas também de seu tamanho e forma. As três espécies algais apresentam alto valor nutricional, Contudo, *Scenedesmus quadricauda* apresentou a maior percentagem de carbono em relação ao peso seco (21%), sendo considerada como alimento adequado para organismos filtradores.

Conhecendo a capacidade de produção de lipídios e proteínas das microalgas, seu uso e aplicação em diversas áreas, desde a retirada de gases responsáveis pelo efeito estufa na atmosfera produção de alimentos e medicamentos, sua manutenção

e multiplicação, facilitaram a manutenção de outros organismos que as utilizam como alimento, e que os mesmos são utilizados para alimentação de larvas de peixes. Ainda, com a implantação de uma linha de estudos possibilitando que outras espécies sejam avaliadas em sua composição proteica, lipídica.

Há protocolos para o cultivo de microalgas, contudo, todo cultivo e instalações tem suas peculiaridades e necessitam de adaptações para que se possa obter melhor desempenho. Em geral o que vai determinar a eficiência são os objetivos para que se quer produzir as algas, se em quantidades suficientes para alimentar organismos vivos ou para produção de biodiesel ou extração de outros metabolitos. A sempre um ponto de partida e adaptações a serem feitas, para que os experimentos que possam obter maior produtividade e eficiência, principalmente na produção de óleos e proteínas, além de poder utilizar fontes alternativas para o meio de cultivo (MIYAWAKI; 2014).

Na produção alimentícia, afirma Fragoso (2016), podem incorporar um adicional de microalgas na fabricação de alimentos, como de bolachas e assim, propiciar aumento proteico e redução dos hidratos de carbono, ou estas serem incorporadas em outras áreas.

A instalação de um cultivo de microalga proporciona a produção de um alimento vivo, que conseqüentemente desenvolve outras pesquisas utilizando esta microalga na cadeia trófica, alimento para o zooplâncton e este posteriormente irá alimentar larvas de peixes.

Neste contexto, as microalgas cultivadas neste laboratório servirão para posteriores trabalhos relacionados com alimento vivo, dando seqüência neste caso a mais trabalhos de conclusão de curso, e muitos outros que estão por vir, há um amplo campo e aplicação das microalgas, que muitas vezes passa por despercebido por se tratar de um organismo microscópico, mas essencial na manutenção de ecossistemas aquáticos.

#### **4 METODOLOGIA**

Os experimentos microalgais foram conduzidos no Laboratório de Limnologia da Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS, *campus* Laranjeiras do Sul, no período de agosto a dezembro de 2017.

#### 4.1 ESTURURA PARA CULTIVO

A partir de uma estrutura já montada no laboratório de Limnologia, para cultivo de microalgas. Foram feitas algumas alterações para obter maior potencial do espaço que é constituído por uma estante em madeira, com as dimensões de dois metros de comprimento por 2,3 metros de altura e 0,3 metros de profundidade, dividida em quatro prateleiras, cada prateleira possuía uma lâmpada fluorescente de 35w (figura 1), a temperatura foi controlada por climatizador de ar a 24 °C. Nesta estrutura foi adaptado um sistema de aeração com compressor de ar, com capacidade de 25 l/min, acoplado em uma estrutura de cano pvc de 40mm e este cano foi adicionado saídas de ar individuais e com regulagem.

Figura 1. Estrutura utilizada para o cultivo de microalgas no laboratório de Limnologia da Universidade Federal da Fronteira Sul.



Fonte: SILVA, 2017

#### 4.2 CULTIVO

Na natureza, a microalga *Desmodesmus* sp. é encontrada na forma agregada e em cultivos de forma unicelular, caracteristicamente planctônico de água doce. Esta alga pertence à família Scenedesmaceae e a divisão Chlorophyta, que apresenta como principal pigmento a clorofila *a* e *b* e tem como substância de reserva amido. Este táxon apresenta associado ao cloroplasto o pirenoide, que serve como característica para sua identificação. Suas células apresentam forma elipsoidal com

extremidades arredondadas, o empilhamento de células forma o que conhecemos como cenóbios (colônia de organismos cujo número de células é geneticamente fixo), estes podem ser planos, formadas por quatro a seis células (número este determinado geneticamente para cada táxon) cujos eixos mais longos são paralelos entre si. A colonização de *Desmodesmus* sp. em geral é por auto esporulação, cada célula produz um cenóbio completo, o cenóbio-filho pode permanecer unido pelos fragmentos geleificados à membrana materna (LOURENÇO, 2006).

A microalga *Desmodesmus* sp. foi obtida através de uma doação da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), sede Ecoville. Em meio de cultura CHU, (tabela 1) conforme protocolo (ABNT-NBR 12648/2004).

#### 4.2.1 – Meio de Cultura ASM-1

Os meios de cultura CHU (tabela 1) e ASM-1 (tabela 2) são indicados respectivamente para Cyanobacteria e Chlorophyta, contudo neste trabalho optou-se trabalhar com meio ASM-1, já nos ensaios o desenvolvimento foi rápido.

Tabela 1. Soluções estoque para o meio de cultura CHU (ABNT, 2004).

SOLUÇÃO	FÓRMULA	CONCENTRAÇÃO DA SOLUÇÃO ESTOQUE (mg)	CONCENTRAÇÃO DO MEIO DE CULTIVO (g.L <sup>-1</sup> )
1	NaNO <sub>3</sub>	25000	2,50.10 <sup>-2</sup>
2	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	2500	2,50.10 <sup>-3</sup>
3	MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	7500	7,50.10 <sup>-3</sup>
4	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	7500	7,50.10 <sup>-3</sup>
5	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	17500	1,75.10 <sup>-2</sup>
6	NaCl	2500	2,50.10 <sup>-3</sup>
7	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>8</sub> 2H <sub>2</sub> O	50000	5,00.10 <sup>-2</sup>
8	KOH	31000	3,10.10 <sup>-2</sup>
9	FeSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	4980	4,98.10 <sup>-3</sup>
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	11420	1,14.10 <sup>-2</sup>
10	ZnSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	8,82	8,82.10 <sup>-7</sup>
	MnCl <sub>2</sub> . 4H <sub>2</sub> O	1,44	1,44.10 <sup>-5</sup>
	MoO <sub>3</sub>	0,71	7,10.10 <sup>-6</sup>
	CuSO <sub>4</sub> . 5H <sub>2</sub> O	1,57	1,57.10 <sup>-5</sup>
	Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O	0,49	4,90.10 <sup>-6</sup>

Fonte: -NBR 12648/2004

Tabela 2. Preparo das soluções estoque para o meio de cultura ASM-1, modificado por Gorham; Mclachalan; Hammer (1964).

Soluções Estoque	Nutrientes	Quantidade (g)
Sol. A	NaNO <sub>3</sub>	8,5000
	MgSO <sub>4</sub> + 7H <sub>2</sub> O	2,4500
	MgCl <sub>2</sub> + 6H <sub>2</sub> O	2,0500
	CaCl <sub>2</sub> + 2H <sub>2</sub> O	1,4500
Sol. B	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	8,7000
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> + 12H <sub>2</sub> O	17,8000
Sol. C	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	28,4000
	MnCl <sub>2</sub> + 4H <sub>2</sub> O	13,9000
	FeCl <sub>2</sub> + 6H <sub>2</sub> O	10,8000
	ZnCl <sub>2</sub>	3,3500
	CoCl <sub>2</sub> + 6H <sub>2</sub> O	0,1900
	CuCl <sub>2</sub> + 2H <sub>2</sub> O	0,0140
Sol. D	EDTA titriplex	18,6000

Fonte: Gorham; Mclachalan; Hammer (1964).

Para a preparação do meio de cultura ASM-1 é necessária preparação das soluções A, B, C e D, onde os compostos são diluídos em 1.000 mL de água deionizada e armazenados na geladeira em frascos de vidro âmbar, que chamamos de solução estoque. Para preparação de um litro meio de cultivo serão utilizados 20 ml solução A, 5 ml da solução B e 0,4 ml da solução D, para o uso faz-se necessário que o meio de seja homogeneizado e seu pH ajustado em  $7,2 \pm 0,4$  (pHmetro modelo PH- 1900). Em seguida o meio de cultivo é autoclavado a 121 °C por 15 min, após atingir a temperatura do ambiente o meio está pronto para que se faça a inoculação das algas.

#### 4. 2. 2 CONTAGEM

Para verificação do crescimento microalgal até obtenção de uma concentração de  $10 \times 10^6$  células, foram feitas contagens diárias de 0,1 ml de amostra, em câmara de Neubauer para determinação da curva de crescimento das microalgas.

Após cinco dias de cultivo, os galões foram acondicionados na geladeira para decantação das microalgas, e retirando apenas o sobrenadante, após foram acondicionados em tubos Falcon de 50 ml e centrifugados (centrifuga sigma 3-16 KL refrigerada a 15 °C), por quatro minutos há 9.500 rotações por minuto. As amostras centrifugadas foram congeladas, para em seguida serem liofilizadas, com, a fim de

obter as microalgas livres da água. As amostras foram liofilizadas no laboratório de fisiologia vegetal da UFFS, *campus* Laranjeiras do Sul- PR., com o liofilizador L-101.

#### 4.3 AVALIAÇÃO PROTEICA

O conteúdo de proteína bruta do alimento é determinado através do seu conteúdo em nitrogênio, embora o nitrogênio possa ser proveniente de outros componentes (e não somente das proteínas) como ácidos nucleicos, prótidos, aminoácidos, sais de amônio, nitratos, bases púricas, etc. A determinação do nitrogênio total nos fornece uma informação muito reduzida do valor de proteínas de um alimento. Assim, conhecendo-se a proporção de uma proteína em particular, multiplica-se o valor do nitrogênio pelo seu fator e, desta forma, estima-se o conteúdo em proteína.

As análises de proteínas insolúveis foram realizadas pelo método de Kjeldahl, conforme procedimento AOAC (1995). Para estimar o conteúdo de proteínas encontradas para *Desmodesmus* sp. foi utilizado o fator de conversão de nitrogênio em proteína de 6,25, que é o indicado para alimentos em geral.

Material:

- Erlenmeyer de 200 ml
- Tubos de Digestão
- Balança Analítica
- Bloco Digestor micro Solab SL-25/40
- Destilador de Nitrogênio Tecnal TE-0363

Soluções:

- Ácido Sulfúrico P.A.
- Catalisador Misto (sulfato de cobre e sulfato de sódio anidro 3:1)
- Solução de Ácido Bórico 4 %
- Solução de Ácido Clorídrico 0,1 mol/L
- Solução de Hidróxido de Sódio 40 %
- Solução de Indicador Misto (vermelho de metila e verde de bromocresol em solução alcóolica).

Este método consiste em três etapas:

Digestão: foi pesado aproximadamente 0,5 gramas de amostra (figura 2 A) em tubo micro digestor, e adicionando 1,5 g de catalisador misto e 10 ml de ácido sulfúrico

P. A. e conduzido à digestão em bloco micro digestor (figura 2 B), a temperatura do bloco foi acrescida de 50 °C a cada 40 minutos até atingir 380 °C. O processo de digestão procedeu até que a coloração das amostras mudasse para cor esverdeada clara (figura 2 C). Após o resfriamento das amostras foram adicionados 10 ml de água destilada em cada tubo.

Destilação: Em Erlenmeyer de 200 ml foram adicionados 25 ml de ácido bórico 4% e três a quatro gotas de indicador misto (vermelho de metila + verde de bromocresol) (Figura 2 D) e colocado na saída do condensador (figura 2 E). Na outra extremidade foi acoplado o tudo micro digestor ao equipamento e adicionando aproximadamente 40 ml de NaOH 40 % (figura 2 E) até neutralização da amostra, sendo recolhido 75 ml do destilado, neste mesmo, Erlenmeyer (figura 2 E).

Titulação: Após a destilação foi realizada a titulação da amostra recolhida no Erlenmeyer utilizando-se HCl 0,1 mol/L até a coloração rosa clara (figura 2 F). Seguindo o cálculo (formula 1) para a determinação da concentração de proteínas na amostra:

Formula 1: cálculo para avaliação proteica

$$proteínas = \frac{V \times F \times 0,0014 \times 6,25 \times 100}{P}$$

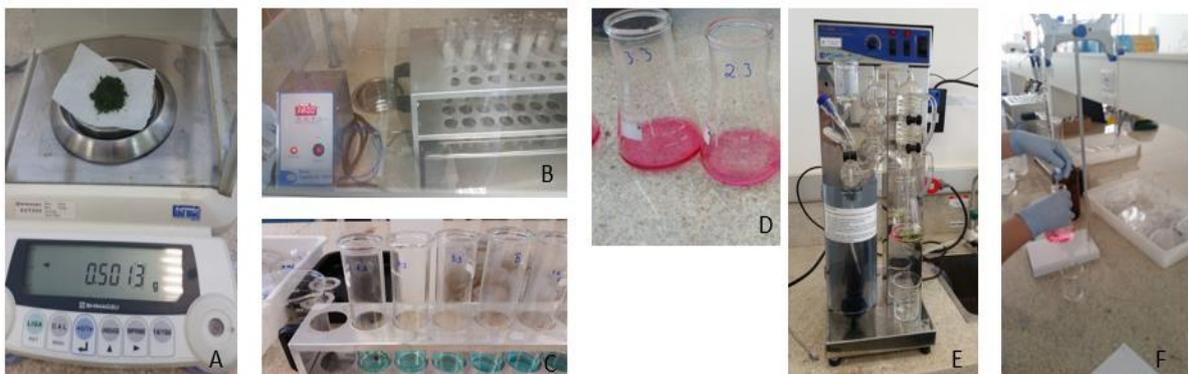
Onde:

V = nº de ml de HCl gasto na titulação

F = fator de correção do HCl, onde o fator de correção do HCL foi de 1,15

P= peso da amostra

Figura 2. Procedimentos para avaliação proteica da microalga *desmodesmos* sp. realizado no laboratório de Operações Unitárias da UFFS, *campus* Laranjeiras do Sul-PR.



Fonte: SILVA, 2017

#### 4.4 AVALIAÇÃO LIPÍDICA

Análise de lipídios presentes nas amostras foi realizada conforme descrito com Bligh-Dyer (1959) com modificações.

Material:

- Balança analítica
- Erlenmeyer 250 ml
- Béquer 50 ml
- Pipetas com graduação de 1ml
- Pi-pump para pipetas

Reagentes:

- Clorofórmio
- Metanol
- Sulfato de sódio anidro

O procedimento para determinação do valor lipídico seguiu protocolo. Conforme descrito: foi pesado 1 g da amostra e adicionado 20 ml de álcool metílico mais 10 ml de clorofórmio e posto no agitador por 30 min (figura 3 A). com adição de amostra 10 ml de clorofórmio (98.9%) e 10 ml de sulfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) 15 % e permanecendo por mais 5 min em agitação. Após este tempo as amostras foram retiradas para separação das fases (figura 3 B). Com o auxílio de uma pipeta, retirou-se, aproximadamente 15 ml da fase inferior e depositado em tubo de ensaio (figura 3 C), logo após foi adicionado 1 g de sulfato de sódio e agitado manualmente (figura 3 D). Para mensuração do percentual lipídico é necessário saber o peso inicial e final de 5ml dessa solução. Para tanto, esta foi acondicionada em béquer e devidamente pesado, e após deixados para a evaporação dos reagentes (figura 3 E) no laboratório de Limnologia da UFFS, restando apenas os lipídios. O cálculo do percentual lipídico (formula 2) foi realizado após verificar modificação no volume e textura da solução residual, quando se faz a pesagem final.

Formula 2: Cálculo utilizado para avaliação lipídica

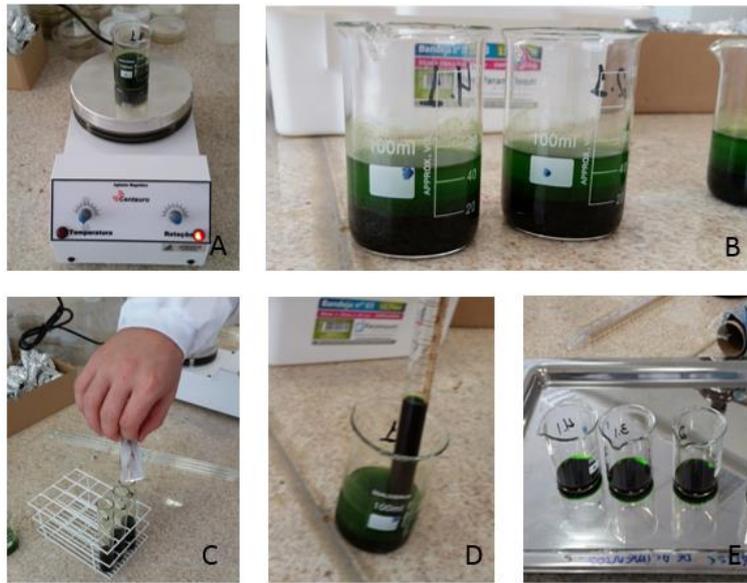
$$\% \text{ lipídios totais} = \frac{P \times 4}{\text{Peso da amostra}} \times 100$$

Onde:

$P = \text{peso do b\u00e9quer final} - \text{o peso do b\u00e9quer inicial}$

Peso da amostra = peso das microalgas que se quer saber o percentual lip\u00eddico

Figura 3. Procedimentos para avalia\u00e7\u00e3o lip\u00eddica da microalga *Desmodesmus* sp. realizada no laborat\u00f3rio de Qu\u00edmica Anal\u00edtica no *campus* Laranjeiras do Sul-PR.



Fonte: SILVA, 2017

#### 4.5 AN\u00c1LISES DE COMPOSTOS ORG\u00c2NICOS EM *Desmodesmus* sp.

A an\u00e1lise em cromatografia gasosa (CG) dos \u00e1cidos graxos, encontrados nos lip\u00eddios extra\u00eddos da microalga estudada foi realizada no CG modelo GCMS-QP2010 ultra, no laborat\u00f3rio de Central Anal\u00edtica da UFFS, *campus* laranjeiras do Sul. A amostra lip\u00eddica foi metilada de acordo com protocolo.

Em seguida, para a determina\u00e7\u00e3o dos \u00e1cidos graxos foram usados 1  $\mu\text{l}$  da amostra lip\u00eddica metilada, e as leituras feitas em cromat\u00f3grafo com a temperatura da coluna de 110  $^{\circ}\text{C}$  e a temperatura do injetor a 250  $^{\circ}\text{C}$  por um tempo de 40 min.

## 5 RESULTADOS E DISCUSS\u00c3O

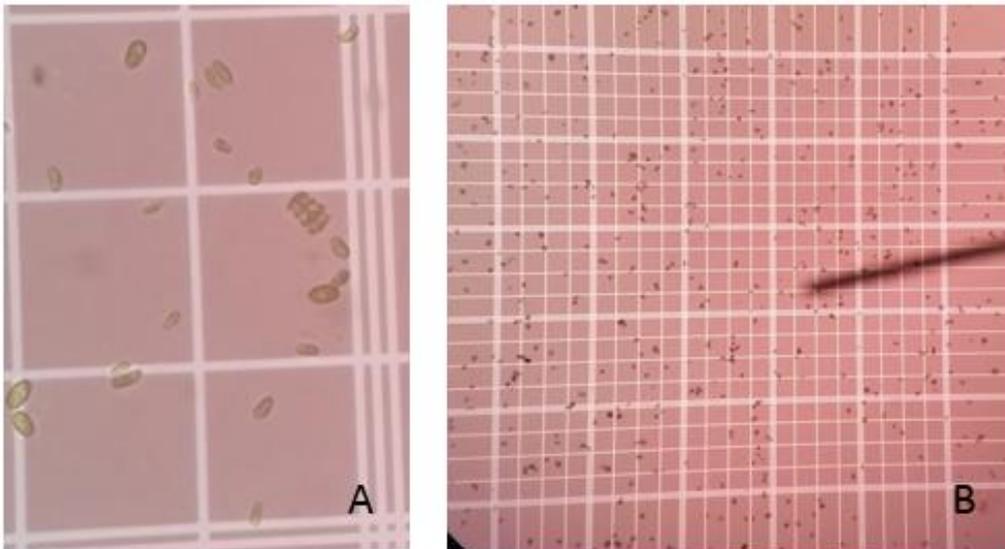
No cultivo desenvolvido no laborat\u00f3rio de limnologia, observa-se que apresentavam cen\u00f3bios com quatro e duas c\u00e9lulas ocorreram com menor frequ\u00eancia,

quando comparados com os indivíduos unicelulares, provavelmente dissociados devido a agitação do meio de cultura (figura 4A).

### 5.1 CRESCIMENTO MICROALGAL

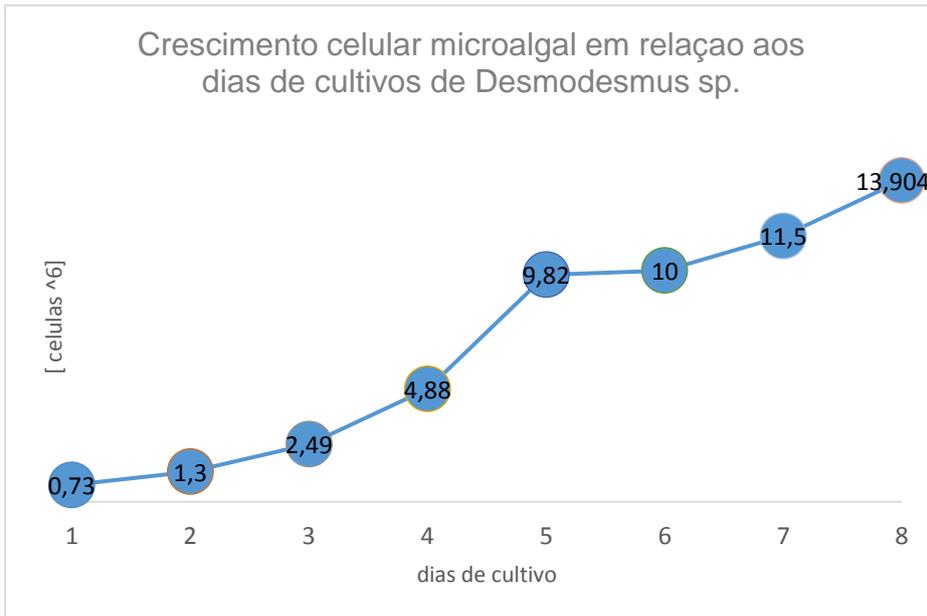
As microalgas foram contadas diariamente (figura 3) para acompanhar seu desenvolvimento (gráfico 1). Observa-se que do início do cultivo ao quinto dia o crescimento algal é exponencial, utilizou-se assim a coloração do frasco e número de indivíduos para que se fizesse nova replicação. Onde a coloração do frasco verde intenso (escuro) significava maior quantidade de células, coloração do frasco verde claro, menor densidade de células.

Figura 4: visualização de células únicas e agrupadas (A). Imagem da câmara de Neubauer com as células microalgais para contagem (B).



Fonte: SILVA, 2017

Gráfico 1. Curva de crescimento das microalgas *Desmodesmus* sp. ao longo de 8 dias em meio de cultura ASM-1.



Fonte: SILVA, 2017

Baungartner et al. (2013) em trabalho realizado com *Scenedesmus acuminatus* em diferentes concentrações de nutrientes verificou que a concentração do meio de cultura MC em concentração de dez vezes menor que o proposto inicialmente não compromete a quantidade de biomassa produzida.

No cultivo realizado optou-se por fazer novas replicações a partir do quinto dia, já que ao realizar contagem, verificou-se que a quantidade de novos organismos adicionados a curva não aumentavam proporcionalmente como no início. Os frascos contendo as microalgas eram deixados em repouso por 24 horas para sedimentação das mesmas, o que se mostrou como tempo suficiente para a separação do sobrenadante.

O sobrenadante retirado depois da sedimentação das algas, eram adicionados em erlenmeyer o que propiciava a continuidade do processo de replicação das algas. Estes eram levados a sala de cultivo e após o desenvolvimento este era usado para a alimentação de rotíferos e copepodos. O reaproveitamento reduz o custo com as perdas dos meios de cultura. Com isto sugere-se que sejam testadas novas diluições para verificar se o meio de cultura seja melhor aproveitado, ou exaurido a sua capacidade de produção.

Luminosidade, temperatura, pH, nutrientes e agitação são fatores que interferem diretamente no cultivo de algas, afetando seu desenvolvimento e produção de metabolitos.

Durante a fase de implantação do cultivo, a estrutura estava equipada com luz fluorescente de 32 w 6500 k. Contudo, após alguns dias não houve a proliferação de *Desmodesmus* sp. Na segunda semana de experimento foram adaptadas Lâmpadas LedGrow 28 w, que são adequadas para o cultivo de plantas “indor”, o que propiciou um ótimo desenvolvimento das algas.

De acordo com Soares (2010) alguns cultivos se adaptam bem a intensidade luminosa gerada pelas lâmpadas fluorescentes tipo “luz do dia” de 40w, o que não foi verificado neste estudo. Soares (2010), afirma que os pigmentos responsáveis pela ativação dos fotossistemas são classificados em clorofilas, carotenoides e ficobilinas. Cada um deles com pigmentação que diferem quimicamente e tem a capacidade de absorver luz em determinado comprimento de onda.

A temperatura para o cultivo da microalga *Scenedesmus* sp. de acordo com Xin; Hon-ying e Yu-pig (2011) apresenta uma variação entre 10 a 30 °C, sendo que a maior produção de lipídios foi observada por estes autores a temperatura de 20 °C. Em experimento conduzido por Soares (2010) o máximo de produção de *Scenedesmus* sp. foi na temperatura de  $20 \pm 2$  °C. Outros cultivos de *Scenedesmus* sp. em temperaturas acima de 24 °C observou uma redução no ganho lipídico (ROSSI, 2013). No presente estudo a temperatura manteve-se a 24 °C.

O pH influencia diretamente o crescimento das microalgas já que consumo das formas inorgânicas do carbono faz com que o pH se eleve (LOPES, 2007). Rossi (2013) destaca que as maiores concentrações de microalgas foram obtidas com o pH entre 9,2 e 11,2 e as menores concentrações observadas foram em pH 6,2. Para o estudo realizado o pH foi ajustado inicialmente para  $7,2 \pm 0,4$ .

Para prover agitação dos meios de cultura foi utilizado um soprador de ar com capacidade de 25 l ar min<sup>-1</sup>. O sistema foi eficiente até 10 erlenmeyers de um litro e 3 galões PET (poli tereftalato de etila) de 5 litros as culturas se mantinham em suspensão, ao adicionar mais um galão pet de cinco litros as algas começaram a sedimentar.

A agitação da cultura de microalgas tem como objetivo diminuir o efeito de estratificação térmica, permitir que todas as microalgas ali presentes tenham acesso a luz, facilitar as trocas gasosas e a distribuição dos nutrientes uniformemente (SOARES, 2010).

Para o desenvolvimento das microalgas, outros fatores são considerados limitantes para o seu desenvolvimento são os nutrientes como: carbono, nitrogênio, fósforo e ferro.

O carbono pode compor 50 % da biomassa microalgal (SOARES, 2010). Em sistemas autotróficos o CO<sub>2</sub> atmosférico é incorporado através de sopradores de ar, por borbulhamento, e através da fotossíntese obtém energia da luz e fixam o carbono a partir do CO<sub>2</sub> (LOPES, 2007).

Quando se faz um cultivo de microalgas em laboratório os nutrientes necessários para o desenvolvimento devem ser supridos artificialmente, a UTFPR utiliza o meio de cultivo CHU, porém ao usar este meio as microalgas não se desenvolveram, o que levou a utilização do meio ASM-1 (CARMICHAEL E GORHAN, 1977) adaptado foi que obteve melhor resultado.

Em estudo realizado por Miranda (2013) o meio CHU foi o que obteve o melhor resultado em relação ao crescimento das algas, levando apenas seis dias para obter um ótimo desempenho, quando comparado como o meio ASM-1 que teve seu melhor desempenho a partir do oitavo dia de experimento, mas ainda a baixo que o anterior.

No cultivo de *Desmodesmus* sp. o meio ASM-1 apresentou ótimo desenvolvimento chegando a dobrar o número de células no sexto dia, apesar de geralmente ser utilizado para o cultivo de cianobactérias.

A otimização da produção de proteínas e lipídios poderiam ser intensificados a partir de algas que fossem melhoradas geneticamente e apresentassem gatilhos específicos para ampliação da produção de substâncias de interesse. O uso de microalgas transgênicas para aplicações comerciais ainda não foi relatado, mas é uma promessa significativa. As cepas modificadas podem produzir em maior quantidade compostos que algas tradicionais ou recém-descobertas produzem, podendo também expressar genes específicos que não podem ser expressos em leveduras. No entanto, uma descoberta de drogas bem-sucedida é o aspecto mais promissor da biotecnologia microalgal, porque o potencial é imenso, embora a seleção permaneça limitada (SPOLAORE, 2006).

Uma das utilizações das algas produzidas, em laboratório, além da produção de biodiesel e a incorporação das mesmas em rações e alimentos podem-se usadas no tratamento de efluentes. Para conhecer o potencial de produção proteico de *Desmodesmus* sp. foi realizada a análise de conteúdo de proteína (tabela 1), demonstrando um ótimo potencial de aproveitamento desta alga já que a mesma

produziu em média 49.3295 % de proteína a partir de sua biomassa. Superior ao teor de proteína encontrado por Rossi (2013) em seu experimento controle chegando a níveis de 43,6 % de proteína.

Tabela 3- Percentual proteico e lipídico da microalga *Desmodesmus* sp., cultivados em meio ASM-1, em cinco dias, no laboratório de Limnologia, 2017.

Repetições	1	2	3
<b>Análise proteica %</b>	49,178	ND	49,481
<b>Análise lipídico %</b>	14,32	13,46	13,26

Fonte: Silva, 2017

Uma das microalgas mais estudada e com um pacote tecnológico para seu cultivo, e que possui comercialização em forma desidratada e encapsulada destinada para alimentação humana é a *Chlorella* sp. (alga verde). Os principais ácidos graxos sintetizados pelas microalgas são: ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poliinsaturados, de acordo com suas condições de cultivo podem sintetizar uma maior quantidade destes ácidos graxos (COSTA et al., 2006).

Outra aplicação das microalgas é voltada para a alimentação sendo humana ou animal, porém trabalhos rementem-se para as microalgas com maior estudos e conteúdos publicados que é o caso da *Spirulina platensis* (cianobactéria) que seu rendimento proteico é superior da carne bovina onde foi obtido o percentual proteico de 75,97%, (LUPATINI,2016).

Fatores como tempo de cultivo, principalmente a síntese de ácidos graxos poliinsaturados, influenciam na produção de determinados compostos sintetizados pelas microalgas. No cultivo de *Isochrysis galbana* a produção de ácidos graxos no oitavo dia de cultivo apresentou ganho superior total, comparado com uma cultura de apenas 4 dias (POISSON; ERGAN, 2001).

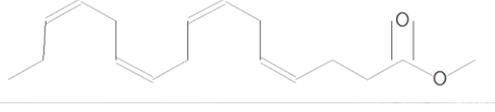
A produção de lipídios por microalgas demonstra que tem capacidade maior que culturas perenes utilizadas hoje em dia para extração de óleos. Alguns autores como Pinto et al. (2015). Também pesquisaram a produtividade da microalga *Desmodesmus* sp. para a produção de lipídios e chegaram a valores de 10,6 %. Gressler (2012) obteve um teor de lipídio de 18% com a incorporação de CO<sub>2</sub> e 12% sem a incorporação deste gás.

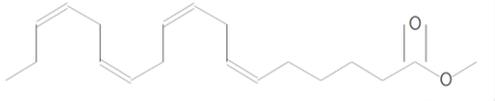
Os resultados para a porcentagem lipídica de *Desmodesmus* sp. com uma média de 13.57 % valor próximo ao encontrado por Rossi (2013) com o meio de cultura sintético.

## 5.2 CROMATOGRAFIA GASOSA

Os resultados da cromatografia gasosa (Quadro 1) após, fazer a filtragem dos resultados, mostraram 11 compostos orgânicos produzidos pelas microalgas que são de grande interesse. Os principais são: o ácido palmítico, com a maior abundância na amostra, ácidos graxos linolênico e linoleico dos ômega 3, e 6 respectivamente, requerendo mais pesquisas para que as produções destes compostos sejam viáveis economicamente.

Quadro 1. Resultado do CG, tempo que apareceram, nome do elemento, sua estrutura e a porcentagem em relação ao total da amostra.

TEMPO	NOME	ESTRUTURA	% da amostra
14,57	Ácido hexadecanóico, éster metílico ----- ácido palmítico, metilo		42,79
13,810	4,7,10,13-hexadecatetraenoato de metilo		18,19
19,23	Ácido 8,11,14-docosatrienoico, éster metílico		18,12
19,70	2-hexadecen-1ol-3,7,11,15 tetrametil		6,38
19,01	Ácido Linoleico, Ômega 6		5,13
14,07	ácido Linolenico, Ômega 3		3,13

13,962	Ácido hexadecadidienoico		1,99
13,10	Tetrametil 2 hexadecenico 1 ol		1,63
18,659	Estearidonato de metilo		0,64
13,50	Tetrametil 2 hexadecenico 1 ol		0,49
11,42	Ester metílico do ácido mirístico		0,23

Fonte: SILVA, 2017

Algumas metodologias demonstram que a temperatura da coluna influencia a detecção dos elementos. Para a análise em questão teve início a 140°C, sendo aquecida até 250 °C a 5°C.min<sup>-1</sup>. E a temperatura do detector foi mantida em 220 °C E a do injetor em 260 °C. Outro protocolo para análise por cromatografia gasosa seguiu da seguinte forma: o gás de arraste foi nitrogênio a 0,5 mL min<sup>-1</sup>. As temperaturas do injetor e do detector foram 250 e 280 °C, respectivamente. A temperatura inicial da coluna foi 100 °C seguida de aumento de 8 °C min<sup>-1</sup> até 230 °C, permanecendo por 20 min (RANDMAN E CASTRO, 2008).

As microalgas possuem a capacidade de sintetizar óleos essenciais para a nutrição humana, animal e para cosméticos, produzem moléculas de alto valor por exemplo ácidos graxos, pigmentos e isótopos bioquímicos estáveis (SPOLAORE, 2006). Uma cultura de microalga é dependente de vários fatores como temperatura, pH, salinidade que podem intensificar ou limitar sua proliferação (SILVA, 2011) e compostos sintetizados podendo alcançar altos teores de óleo (o rendimento de óleo em microalgas pode exceder 75% em peso (POKOO-AIKINS et al., 2010).

Alguns fatores influenciam no desenvolvimento das microalgas, são fatores biológicos relacionados ao metabolismo da espécie cultivada (DERNER et al., 2006). Desta forma as interações relacionadas a intensidade luminosa, temperatura, pH, agitação e nutrientes podem contribuir para a otimização do cultivo microalgal (BAUGNGARTNER, 2013). Os principais estímulos físicos para acumulação de lipídios em microalgas é a temperatura e intensidade luminosa, e os fatores químicos são pH, salinidade, sais minerais e fonte de carbono, outra estratégia é a limitação da fonte de carbono (ROSI, 2013).

## 6 CONCLUSÃO

*Desmodesmus* sp. apresentou alto teor proteico em apenas cinco dias de cultivo, o que revela ser um gênero que merece mais estudos comparativos entre as diferentes espécies para verificar se mais indivíduos apresentam potencial para a produção em massa.

O sistema implantado no laboratório de limnologia se mostrou satisfatório, quanto aos objetivos propostos: a melhora da estrutura do laboratório de cultivo de forma estabelecer uma produção mínima que permitisse análises de proteína e lipídio; definição do melhor meio de cultivo que possibilitou o desenvolvimento das microalgas; o método de desidratação das microalgas e seu preparo para as análises de proteína e lipídio; possibilitou a comparação de resultados com diferentes artigos sobre o assunto; estabelecer uma rotina de laboratório quanto a produção de microalgas em pequena escala.

Observa-se que serão necessários ainda ajustes ao sistema. Tais como: para o sistema de aeração foram providenciados um aerador maior, para aumentar a produtividade e propiciar que outras pesquisas usem estas microalgas; Verificação do ótimo luz.

Sugere-se testar ou outros meios de culturas e nutrientes, variando as concentrações do meio de cultura; ampliar o número de espécies trabalhadas e buscar outros potenciais para que sejam usadas na forma *in-natura* ou extraíndo óleos, para fabricação de rações para peixes, no tratamento de efluentes, na produção de biodiesel.

Com a realização deste trabalho foi possível adquirir conhecimento sobre as diferentes utilizações das microalgas e seu potencial ainda pouco explorado para as

espécies brasileiras, que muitas vezes passa despercebidos por serem organismos na maioria das vezes microscópicos mas fundamentais na cadeia trófica.

## REFERÊNCIAS

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas. 2004. **Ecotoxicologia aquática – Toxicidade crônica – Método de ensaio com algas (Chlorophyceae)**. Pp.1-20. Rio de Janeiro, Projeto NBR 12648:2004. 28ª reunião.

AOAC - Association of Official Analytical Chemists. **Official methods of analysis of the Association of the Analytical Chemists**. 16th ed. Washington, 1995.

BATISTA, Ana Paula et al. Comparison of microalgal biomass profiles as novel functional ingredient for food products. **Algal Research**, v. 2, n. 2, p. 164-173, 2013.

BICUDO, CEM., and MENEZES, M. Introdução: As algas do Brasil. In: FORZZA, RC., org., et al. INSTITUTO DE PESQUISAS JARDIM BOTÂNICO DO RIO DE JANEIRO. Catálogo de plantas e fungos do Brasil [online]. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson Estúdio: Instituto de Pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010. p. 49-60. Vol. 1. ISBN 978-85-8874-242-0. Available from SciELO Books.

BICUDO, C. E. de M.; MENEZES, M. Gêneros de algas de águas continentais do Brasil (chave para identificação e descrições). São Carlos: Rima, 2006. 502 p.

BLIGH, E.G.; Dyer, W.J. **A rapid method os total lipid extraction and purification**. Can. J. Biochem. Physiol, v. 37, n8, p. 911-917, 1959.

CARVALHO, Maria do Céu Rodrigues de. **Caracterização bioquímica de microalgas produzidas industrialmente em aquacultura**. 1997. Tese de Doutorado.

Carmichael, W.W.; Gorhan P.R. Factors influencing the toxicity and animal susceptibility of *Anabaena flos-aquae* (cyanophyta blooms). J. Physiol., 13:97-101, 1977.

COSTA, J.A.V.; Radmann, E.M.; Cerqueira, V.S.; Santos, G.C. e Calheiros, M.N. (2006b) Perfil de ácidos graxos das microalgas *Chlorella vulgaris* e *Chlorella minutissima* cultivadas em diferentes condições. Alimentos e Nutrição, vol.17, n.4, p. 429-436.

COSTA, Jorge Alberto Vieira; DE MORAIS, Michele Greque. The role of biochemical engineering in the production of biofuels from microalgae. **Bioresource technology**, v. 102, n. 1, p. 2-9, 2011.

DABROWSKI, K.; GLOGOWSKI, J. Studies on the role of proteolytic enzymes in digestion processes in fish. 1997.

DA SILVA BAUMGARTNER, Tatiana R. et al. Avaliação da produtividade da microalga *Scenedesmus acuminatus* (Lagerheim) Chodat em diferentes meios de cultivo. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 11, n. 2, 2013.

DA SILVA VAZ, Bruna et al. Microalgae as a new source of bioactive compounds in food supplements. **Current Opinion in Food Science**, v. 7, p. 73-77, 2016.

DE MORAIS, Michele Greque et al. Biologically active metabolites synthesized by microalgae. **BioMed research international**, v. 2015, 2015.

DERNER, Roberto Bianchini et al. Efeito de fontes de carbono no crescimento e na composição bioquímica das microalgas *Chaetoceros muelleri* e *Thalassiosira fluviatilis*, com ênfase no teor de ácidos graxos poliinsaturados. 2006.

FAULK, Cynthia K.; HOLT, G. Joan. Advances in rearing cobia *Rachycentron canadum* larvae in recirculating aquaculture systems: live prey enrichment and greenwater culture. **Aquaculture**, v. 249, n. 1, p. 231-243, 2005.

FRAGOSO, Solange Pereira. **Desenvolvimento de bolachas com incorporação de diferentes microalgas**. 2016. Tese de Doutorado. ISA-UL.

GRESSLER, P., Schneider, R., Corbellini, V., Bjerk, T., Souza, M., Zappe, A., & Lobo, E. A. (2012). Microalgas: aplicações em biorremediação e energia. *Caderno de Pesquisa*, 24(1), 48-67.

GROBBELAAR, J.U. (2004) - Algal biotechnology: real opportunities for Africa. *South African Journal of Botany*, vol.70, n.1, p. 140-144.

HARDY, Elsa R.; CASTRO, José Gerley D. Qualidade nutricional de três espécies de clorófitas cultivadas em laboratório. **Acta Amazônica**, v. 30, n. 1, p. 39-47, 2000.

LOPES, Eduardo Jacob et al. Sequestro de dióxido de carbono em fotobiorreatores. 2007.

LOURENÇO, S. O. **Cultivo de Microalgas Marinhas: Princípios e Aplicações**. 1 ed. São Paulo: Rima, 2006.606 p.

LUPATINI, Anne Luize et al. **Extração de proteínas e carboidratos da biomassa de *Spirulina platensis* e caracterização da fração proteica**. 2016. Dissertação de Mestrado. Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

MENEZES, Rafael Silva et al. Avaliação da potencialidade de microalgas dulcícolas como fonte de matéria-prima graxa para a produção de biodiesel. **Quim Nova**, v. 36, p. 10-15, 2013. MOREIRA, Ricardo Lafaiete;

MIYAWAKI, B., Selesu, N., de Oliveira Corrêa, D., Mariano, A. B., & Vargas, J. V. (2013, November). Biogas purification through Microalgae cultivation in photobioreactor. In *Proceedings of 22nd International Congress of Mechanical Engineering [Online]*. Ribeirão Preto, Brazil (pp. 3-7).

PIEDRAS, S.R.N; POUHEY, J.L.O.F. Alimentação de alevinos de peixe-rei (*Odontesthes bonariensis*) com dietas naturais e artificiais. **Ciência Rural**, v.34, p.1203-1206, 2004.

POISSON L.; ERGAN, F. Docosahexaenoic acid ethyl esters from *Isochrysis galbana*, **Journal of Biotechnology**, v.91, p.75–81, 2001.

RADMANN, Elisangela Martha; COSTA, Jorge Alberto Vieira. Conteúdo lipídico e composição de ácidos graxos de microalgas expostas aos gases CO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub> e NO. 2008.

PINTO, L. F. R., de Almeida, V. F., Maciel, M. R. W., & Maciel Filho, R. ESTUDO DA EXTRAÇÃO DE LIPÍDIOS EM TRES CEPAS DE MICROALGA. 10º congresso internacional de bioenergia, São Paulo, 2015.

PORTELLA, Maria Célia et al. Produção de organismos planctônicos para alimentação inicial de larvas de peixes de água doce. **Boletim Instituto de Pesca, São Paulo (Bra)**, v. 24, p. 79-89, 1997.

POKOO-AIKINS, Grace et al. A multi-criteria approach to screening alternatives for converting sewage sludge to biodiesel. **Journal of Loss Prevention in the Process Industries**, v. 23, n. 3, p. 412-420, 2010.

ROSSI, Raquel Andrade de. Seleção de microalgas dos gêneros *Desmodesmus* e *Scenedesmus* produtoras de lipídeos: otimização do cultivo e aplicação do efluente doméstico de reator UASB como substrato alternativo à produção de biodiesel. 2013. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

RADMANN, Elisangela Martha; COSTA, Jorge Alberto Vieira. Lipid content and fatty acids composition variation of microalgae exposed to CO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub> and NO. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1609-1612, 2008.

RUBIO, F. C., Camacho, F. G., Sevilla, J. M., Chisti, Y., & Grima, E. M. (2003). A mechanistic model of photosynthesis in microalgae. *Biotechnology and bioengineering*, 81(4), 459-473.

SILVA, Maria Célia Cavalcante de Paula et al. TRATAMENTO TERCIÁRIO DE EFLUENTE SECUNDÁRIO, USANDO A MICROALGA *Chlorella* sp. IMOBILIZADA EM MATRIZ DE ALGINATO DE CÁLCIO. 2011.

SOARES, Diniara. Avaliação do crescimento celular e da produtividade de lipídeos de microalgas marinhas em diferentes regimes de cultivo. 2010.

SPOLAORE, Pauline et al. Commercial applications of microalgae. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 101, n. 2, p. 87-96, 2006.

XIN, Li; HONG-YING, Hu; YU-PING, Zhang. Growth and lipid accumulation properties of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. under different cultivation temperature. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 3, p. 3098-3102, 2011.