

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

DANIEL PAMPLONA NETO

PRODUÇÃO DE BIOMASSA MICROALGAL DE *Desmodesmus subspicatus* EM CONDIÇÃO AUTOTRÓFICA E MIXOTRÓFICA

CURITIBA

2017

DANIEL PAMPLONA NETO

**PRODUÇÃO DE BIOMASSA MICROALGAL DE *Desmodesmus*
subspicatus EM CONDIÇÃO AUTOTRÓFICA E MIXOTRÓFICA**

Monografia de conclusão do curso de
Bacharel em Ciências Biológicas, da
Universidade Federal do Paraná,
Departamento de Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Miguel D. Nosedá

CURITIBA

2017

A minha mãe, por possibilitar a realização desse sonho e aos meus amigos, que estiveram presentes dando apoio durante os anos de graduação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Professor Doutor Miguel Daniel Nosedá e à Professora Doutora Maria Eugênia Nosedá pelo apoio e oportunidade de conhecer o universo da bioquímica durante o estágio que foi de suma importância para minha formação.

Agradeço à Universidade Federal do Paraná, CNPq, Fundação Araucária e PIBIC, pelas bolsas concedidas. Agradeço também a PRAE pelo auxílio aos alunos com fragilidade sócio-econômica.

Agradeço a minha mãe, Ana Gomes Correa, mulher forte, que me criou sozinha com dois empregos. Sem ela e sem seus esforços, eu não estaria aqui, tendo a oportunidade de concluir uma Graduação.

Agradeço ao meu namorado, Juliano, por todo suporte prestado e por ser essencial na minha vida.

Agradeço aos meus amigos de graduação, Rafael, Paloma, Luiza, Amanda e Aline, por todo suporte em momentos difíceis. Tê-los foi essencial nos bons e maus dias.

Agradeço a Amanda Oliveira, pelos ensinamentos nesses dois anos de pesquisa.

Agradeço aos colegas de laboratório, Cassiano, Mariana, Pauline, Luciana, Diego, Jaqueline, André, Cláudia, Franciele, Ester, Estela, Mieko, André, Lucas

e Michele, por todo o conhecimento compartilhado, pela companhia, risadas e momentos que jamais esquecerei.

RESUMO

Recentemente, o potencial biotecnológico das microalgas tem despertado muito interesse, devido a vários fatores, tais como: à identificação de diversas substâncias sintetizadas por estes organismos, ao rápido crescimento e a possibilidade de controle das condições de cultivo para direcionamento da produção de compostos de interesse, entre outros. No presente trabalho, foi avaliado o efeito de diferentes condições de cultivo visando a produção de biomassa microalgal da espécie *Desmodesmus subspicatus*, que já tem demonstrado em estudos prévios do efeito bioestimulante vegetal. Inicialmente, a cepa disponível foi submetida a sucessivos tratamentos com vários antibióticos e ao isolamento das microalgas após crescimento em meio sólido. A cepa axênica obtida foi mantida em cultivo, sob condições controladas de temperatura, iluminação, fotoperíodo e aeração. Os cultivos foram avaliados por meio de análises de biomassa seca e crescimento celular, utilizando o meio de cultivo BG-11. Foram avaliados o cultivo autotrófico e mixotrófico, utilizando como fonte de carbono glucose comercial em diferentes concentrações (5, 10 e 20 g L⁻¹). Na avaliação do cultivo autotrófico e mixotrófico alcançou-se a máxima produtividade de biomassa seca (1,9 g L⁻¹) no meio BG-11 com glucose (10 g L⁻¹). Os resultados demonstraram que a microalga teve maior desenvolvimento em condições mixotróficas. As análises realizadas por cromatografia líquida, acoplada à espectrometria de massas (HPLC-MS), identificaram a presença de zeatina, um importante regulador vegetal para a divisão celular. A zeatina pode ser uma das moléculas responsáveis pela atividade bioestimulante vegetal apresentada pela microalga *D. subspicatus*.

Palavras-chave: Microalga; Meios de cultivo; *Desmodesmus*; Zeatina.

ABSTRACT

Recently, the biotechnological potential of microalgae has grown great interest, due to several factors, such as: the identification of several substances synthesized by these organisms, fast growth, and possibility of controlling culture conditions to direct the production of compounds of interest, amongst others. In the present work, the effect of different cultivation conditions was evaluated aiming the production of microalgal biomass of the species *Desmodesmus subspicatus* that has already shown in previous studies plant biostimulating effect. Initially the available strain was submitted to successive treatments with several antibiotics followed by the isolation of microalgae after growth in solid medium. The resulting axenic strain was maintained in culture, under controlled conditions of temperature, lighting, photoperiod and aeration. The cultures were evaluated through analyzes of dry biomass and cell growth using the BG-11 culture medium. Autotrophic and mixotrophic culture conditions were evaluated using commercial glucose as carbon source at different concentrations (5, 10 and 20 g L⁻¹). In the evaluation of autotrophic and mixotrophic cultivation, the maximum yield of dry biomass (1.9 g L⁻¹) was reached in the BG-11 medium with glucose (10 g L⁻¹). The results showed that the microalgae had greater development under mixotrophic conditions. Analyzes performed by liquid chromatography, coupled to mass spectrometry (HPLC-MS), identified the presence of zeatin, an important plant regulator for cell division. Zeatin may be one of the molecules responsible for the plant biostimulant activity shown by microalga *D. subspicatus*.

Keywords: Microalgae; Culture medium; *Desmodesmus*; Zeatin.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01 – MICROSCOPIA ÓPTICA DA MICROALGA <i>Desmodesmus subspicatus</i>	17
FIGURA 02 – MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DA MICROALGA <i>Desmodesmus subspicatus</i>	17
FIGURA 03: FLUXOGRAMA DO PROJETO.....	21
FIGURA 04 – ESQUEMA DE REPIQUE REALIZADO PARA O CULTIVO DA MICROALGA.....	23
FIGURA 05 – SISTEMA DE CULTIVO DA MICROALGA <i>Desmodesmus subspicatus</i>	24
FIGURA 06: PLACAS COM ÁGAR E MEIO BG-11, ONDE FOI ADICIONADA UMA ALÍQUOTA DO CULTIVO DA MICROALGA EM MEIO CONTENDO DIFERENTES VOLUMES DA SOLUÇÃO DE ANTIBIÓTICOS: A: 0,125 mL. B: 0,25 mL. C: 0,5 mL. D: 1,0 mL. E: 2,0 mL. e F: 5,0 mL.....	30
FIGURA 07: COM O AUXÍLIO DE UM PALITO, A MICROALGA ISOLADA É RETIRADA DA PLACA E TRANSFERIDA ATÉ O TUBO DE ENSAIO CONTENDO MEIO DE CULTIVO.....	31
FIGURA 08: CRESCIMENTO DA MICROALGA EM MEIO BG-11 E GLUCOSE COMERCIAL SEM CONTAMINAÇÃO DE OUTROS ORGANISMOS.....	32
FIGURA 09: CURVAS DE CRESCIMENTO DE <i>Desmodesmus subspicatus</i> , EM MEIO DE CULTIVO AUTOTRÓFICO (BG-11) E MIXOTRÓFICO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE GLUCOSE (5, 10 E 20 g L ⁻¹).....	34
FIGURA 10: PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE <i>Desmodesmus subspicatus</i> . CULTIVADA EM CONDIÇÃO, AUTOTRÓFICA E MIXOTRÓFICA COM MEIO BG-11 E 5, 10 E 20 g L ⁻¹ DE GLUCOSE COMERCIAL.....	35
FIGURA 11 - CROMATOGRAMA E ESPECTRO DE MASSAS DO PADRÃO DE ZEATINA.....	37
FIGURA 12 - CROMATOGRAMA E ESPECTRO DE MASSAS DA ZEATINA EM AMOSTRA FRAÇÃO "E".....	37

LISTA DE TABELAS

TABELA 01: COMPOSIÇÃO DO MEIO BG11 (STANIER, et al. 1971).....	22
TABELA 2 - COMPOSIÇÃO DA BIOMASSA DE MICROALGA <i>Desmodesmus subspicatus</i> CULTIVADA EM MEIO BG EM CONDIÇÕES AUTOTRÓFICAS E MIXOTRÓFICAS.....	36

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

°C – Grau Celsius

CO₂ – Dióxido de Carbono

L – Litro

mL – Mililitro

pH – Potencial Hidrogeniônico

nm – Nanômetros

V – Volume de cultivo filtrado (L)

µg – Micrograma

µL – Microlitro

% – Por cento

Glc – Glucose

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	14
2.1 OBJETIVO GERAL	14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3 REVISÃO DA LITERATURA	15
3.1 CARACTERÍSTICAS DAS MICROALGAS	15
3.2 A MICROALGA <i>Desmodesmus subspicatus</i>	16
3.2.1 ESTUDO COM MICROALGAS	18
3.3 CULTIVO DE MICROALGAS	18
3.3.1 CULTIVO AUTOTRÓFICO	19
3.3.2 CULTIVO HETEROTRÓFICO	19
3.3.3 CULTIVO MIXOTRÓFICO	19
3.3.4 NUTRIENTES	20
3.3.5 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO	20
4 MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1 MICROALGA	21
4.2 MEIO DE CULTIVO	21
4.3 OBTENÇÃO DE CEPAS AXÊNICAS	22
4.4 PREPARAÇÃO DE INÓCULO	23
4.5 CONDIÇÕES DE CULTIVO	24
4.6 ANÁLISES DOS CULTIVOS	25
4.6.1 BIOMASSA SECA	25
4.6.2 CONTAGEM DE CÉLULAS	25
4.6.3 DETERMINAÇÃO DE CARBOIDRATOS TOTAIS	25
4.6.4 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS	26
4.6.5 EXTRAÇÃO AQUOSA	27

4.6.6 ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS E ESPECTROSCÓPICAS.....	27
4.6.7 CULTIVO MIXOTRÓFICO.....	28
4.6.8 ANÁLISES.....	28
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
5.1 OBTENÇÃO DE CEPAS AXÊNICAS.....	29
5.2 ANÁLISE DOS CULTIVOS.....	32
5.2.1 DENSIDADE CELULAR.....	33
5.2.2 PRODUÇÃO TOTAL DE BIOMASSA.....	34
5.2.3 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS E CARBOIDRATOS DA BIOMASSA.....	35
5.2.4 ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSA.....	36
6 CONCLUSÃO.....	38
7 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	38
8 REFERÊNCIAS.....	39

1 INTRODUÇÃO

Pesquisas em biotecnologia empregando microalgas vêm aumentando significativamente. Várias espécies são cultivadas comercialmente em alguns países e a biomassa produzida tem sido utilizada principalmente como fonte de produtos para a indústria de alimentos (PULZ & GROSS, 2004), química e farmacêutica, como por exemplo, *Spirulina* spp., *Chlorella* spp (CERTIK; SHMIZU, 1999; BOROWITZKA et al., 2015).

Desde a última década, estudos com microalgas ganharam a atenção da comunidade científica pela sua grande diversidade, variabilidade na composição bioquímica, sendo fonte de quantidade ilimitada de produtos, como lipídios e carboidratos (NORTON, 1996; PULZ & GROSS, 2004; BOROWITZKA et al., 2013). Nesse sentido, cultivos de microalgas têm sido realizados visando à produção de biomassa tanto para a elaboração de alimentos, quanto para a obtenção de compostos bioativos (MOLINA GRIMA et al., 2003). No Brasil, a utilização mais comum tem sido na aquicultura e, mais recentemente, como matéria-prima para a produção de biodiesel, nesse caso, com destaque para a microalga *Desmodesmus* sp.

A grande diversidade de microalgas, juntamente com sua composição bioquímica, é de grande interesse para a biotecnologia, pois o efeito das condições ambientais sobre o crescimento delas reflete diretamente na sua composição bioquímica (AMARO et al., 2011; LIANG, 2013; ANDRULEVICIUTE et al., 2014).

Entretanto, existem poucos trabalhos desenvolvidos sobre o estabelecimento das condições de cultivo mixotrófico com o gênero *Desmodesmus*, objetivo do presente trabalho.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Produzir biomassa da microalga *Desmodesmus subspicatus* em cultivo autotrófico e mixotrófico, avaliando seu crescimento.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Produzir biomassa da microalga *D. subspicatus* em sistemas de cultivo autotrófico e mixotrófico;
- b) Utilizar glucose comercial em diferentes concentrações como fonte de carbono para o cultivo mixotrófico.
- c) Comparar a produção de biomassa do cultivo autotrófico e mixotrófico;
- d) Determinar a porcentagem de carboidratos totais e proteínas solúveis da biomassa microalgal produzida nos dois sistemas de cultivo
- e) Realizar extrações aquosas das biomassas obtidas no cultivo mixotrófico;
- f) Identificar e quantificar as moléculas bioativas no extrato aquoso da microalga *Desmodesmus subspicatus*.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 CARACTERÍSTICAS DAS MICROALGAS

O grupo *Algae* foi descrito pela primeira vez por Linnaeus em 1793, reunindo algas, alguns líquens e briófitas. O grupo não tem origem monofilética, corroborado pela teoria da endossimbiose de cloroplastos e mitocôndrias que, mais tarde, ganhou estudos bioquímicos e de biologia molecular. Pode-se, então, conceituar algas como organismos fotossintéticos, unicelulares ou pluricelulares, com ausência de células estéreis ao redor de estruturas reprodutivas (TAYLOR et al., 2009). Apresentam morfologia simples, variando de formas unicelulares isoladas, agregados de células, colônias, filamentos simples ou ramificados, pseudoparênquimas, cenócitos (estruturas multinucleadas) e parênquima. (SOUTH & WHITTICK 1987; CAMBRA SÁNCHEZ et al., 1998; LEE et al., 2008).

Dentro das algas existe o grupo das microalgas que compreende um conjunto muito diverso de organismos fotossintetizantes, unicelulares, presentes tanto nos meios aquáticos (doce e salino), como no solo. Em termos de organização celular, as microalgas podem ser procarióticos ou eucarióticos, e podem variar em tamanho, morfologia e outras características (HOEK et al., 1995; MCHUGH 2003). O termo microalga não tem valor taxonômico, ou seja, não é um grupo com classificação filogenética.

De acordo com Lourenço (2006), as microalgas têm grande importância no sequestro de carbono, retirando CO₂ da atmosfera, com o auxílio da fotossíntese, e liberando em O₂. Sendo elas responsáveis por cerca de 90% de toda a fotossíntese marinha.

No Brasil, pesquisas relacionadas com a produção de biomassa microalgal são relativamente recentes e têm focado, principalmente, o aspecto de crescimento sob variadas condições: como meios de cultivo; disponibilidade de nutrientes; e controle de temperatura, salinidade e luz, entre outros (COSTA, et al., 2004; DERNER, et al., 2007). O cultivo de microalgas é normalmente realizado em condição autotrófica e em algumas espécies também pode ser implementado em condições heterotróficas ou mixotróficas (COSTA, et al., 2004; DERNER, et al., 2007).

3.2 A MICROALGA *Desmodesmus subspicatus*

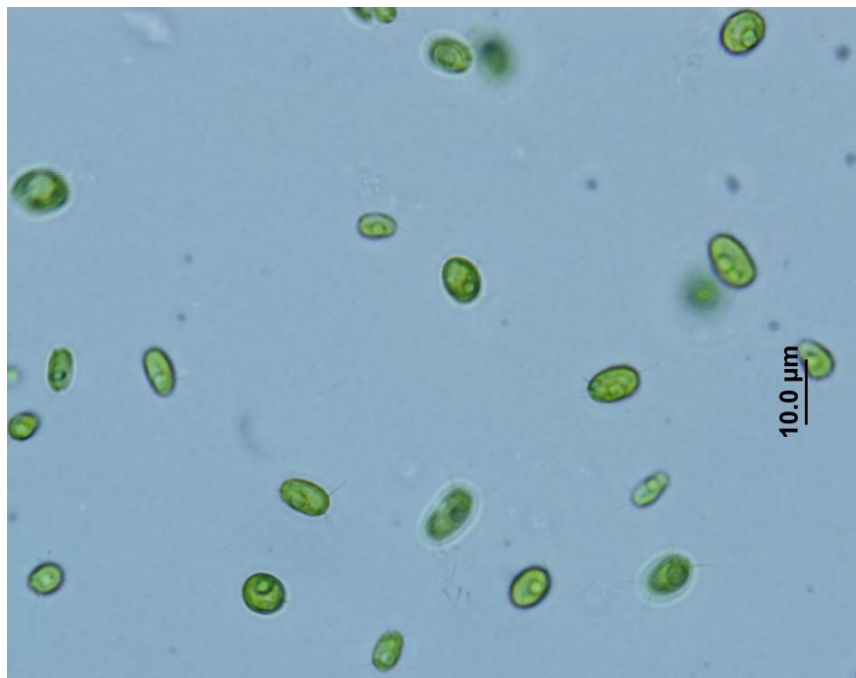
As microalgas do gênero *Desmodesmus*, são comumente encontradas em água doce e com menor frequência em água salgada, são microrganismos clorofilados, de estrutura unicelular, pertencentes à família *Scenedesmaceae* (CAMBRA SÁNCHEZ et al., 1998). Segundo Bicudo (2006), a divisão que compreende a família *Scenedesmaceae* (*Chlorophyta*), tem 88 famílias descritas no Brasil, com aproximadamente 319 espécies.

Material de estudo há quase 200 anos, o gênero *Scenedesmus* foi descrito por Meyen em 1829 e revisado por Chodat em 1926, assim, o gênero *Scenedesmus* incluía colônias cocóides e autospóricas, com e sem espinhos, entre outros caracteres. Com auxílio de técnicas de biologia molecular, as formas espinhosas e não espinhosas foram separadas de gênero por Hegewald e colaboradores (1999), por meio do sequenciamento do DNA ribossômico ITS2. As microalgas do gênero *Scenedesmus*, com a presença de espinhos na superfície celular foram remanejadas para o gênero *Desmodesmus* e aquelas com a estrutura ausente, continuaram na sua taxonomia original. Ainda assim, alguns pesquisadores da comunidade científica encaram os dois gêneros como sinônimos (TORGAN & HENTSCHE, 2010).

Após análises moleculares e morfológicas, como a quarta camada da parede celular, constituída de esporopolenina (polímero muito resistente a degradação), que possibilita a formação dos espinhos e das demais ornamentações, a microalga em estudo passou de *Scenedesmus subspicatus* para *Desmodesmus subspicatus* (HEGEWALD et al., 2000). Atualmente, *Desmodesmus* e *Scenedesmus* estão incluídos na classe Chlorophyceae, ordem Sphaeropleales, família Scenedesmaceae (LEWIS & MCCOURT 2004).

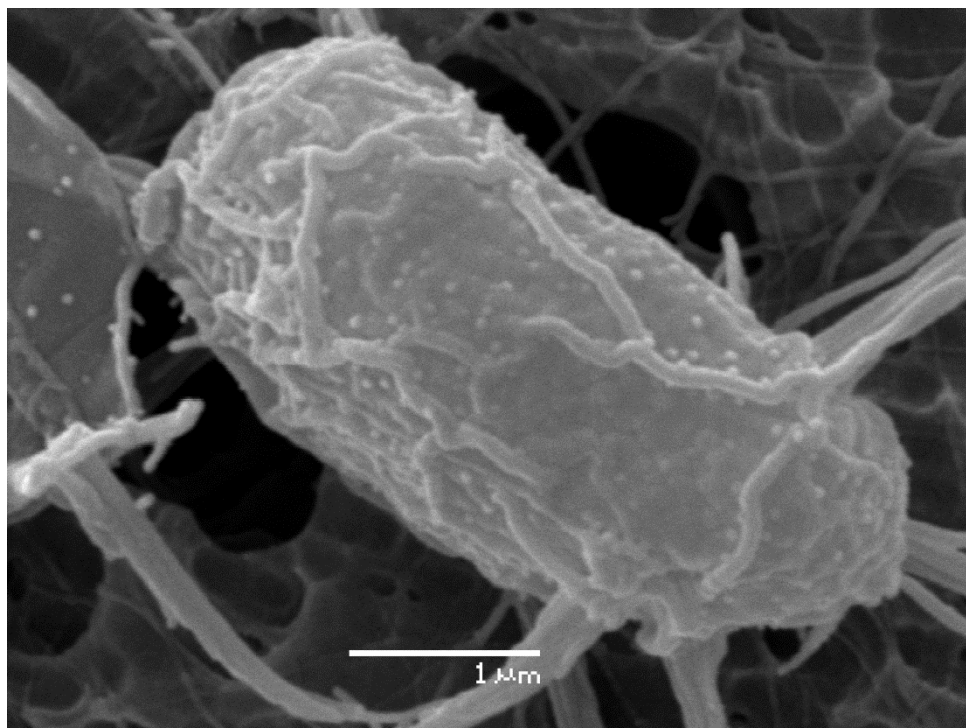
A morfologia do gênero é caracterizada por células planas, curvadas, geralmente formando colônias unidas lateralmente. A parede celular é granular, espinhosa ou dentada e com projeções de verruga. Com microscopia de luz, os espinhos são visíveis (Figura 1), enquanto outras características da parede só são visíveis em microscópio eletrônico de varredura (Figura 2).

FIGURA 01 – MICROSCOPIA ÓPTICA DA MICROALGA *Desmodesmus subspicatus*



FONTE: O autor (2016)

FIGURA 02 – MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DA MICROALGA *Desmodesmus subspicatus*



FONTE: O autor (2017)

3.2.1 Estudos com microalgas

As pesquisas com o perfil biotecnológico envolvendo a microalga *D. subspicatus* têm aumentado na última década. Pesquisas com a microalga são principalmente desenvolvidas nas áreas da toxicologia, biologia molecular e de biocombustíveis (STIRK et al, 2002; VOLKER et al, 2017). Por ter um curto ciclo de vida, fácil cultivo e modificação da composição bioquímica, é ideal para produção de biocompostos como lipídeos de cadeia longa.

Dentre inúmeras aplicações, a utilização de microalgas para biofertilizantes deve ser considerada. Apesar de estudos recentes com a utilização e aumento da composição lipídica, outras biomoléculas podem ser produzidas (RAZEGHIFARD, 2013; MAZEPA, 2013). Em 2002, Stirk et al, relataram uma provável ação promotora de crescimento com o extrato aquoso de *Scenedesmus sp*, identificando crescimento em calos de soja e Garcia-Gonzalez e Sommerfeld (2014), verificaram que a associação de substratos com a microalga apresentam ganhos no crescimento e desenvolvimento do cultivo de mudas de tomate.

3.3 CULTIVO DE MICROALGAS

Pode-se avaliar o desenvolvimento de microalgas em cultura por meio da determinação de sua massa viva, em peso seco ou úmido (LOURENÇO, 2006).

A obtenção de biomassa e de produtos metabólicos das microalgas pode ser influenciada pelas interações entre fatores biológicos, físicos e químicos (FALKOWSKI; RAVEN, 1997). Os fatores biológicos estão relacionados às taxas metabólicas características da espécie cultivada e a influência de outros microrganismos sobre o crescimento microalgal. Os principais fatores físico-químicos são: pH, iluminação, temperatura, salinidade e disponibilidade de nutrientes no meio e concentração de CO₂ (GUILLARD, 1975; RICHMOND, 2004; CHISTI, 2007). As características de crescimento e a composição das microalgas também são significativamente dependentes do tipo de cultivo, que pode ser autotrófico, heterotrófico e mixotrófico (AMARO et al., 2011; LIANG, 2013; ANDRULEVICIUTE et al., 2014).

3.3.1 Cultivo autotrófico

O cultivo autotrófico ocorre quando a microalga usa luz, por exemplo a luz solar, como fonte de energia, e carbono inorgânico, CO₂, como fonte de carbono para produzir energia química por meio do processo de fotossíntese (HUANG et al., 2010).

3.3.2 Cultivo heterotrófico

Algumas espécies de microalgas podem crescer na ausência de luz, utilizando moléculas orgânicas como fonte de carbono para a produção de energia, sendo esta condição denominada de crescimento heterotrófico (LIANG et al., 2013; XIONG et al., 2008). Quando o cultivo de microalgas é desenvolvido na ausência de luz e adicionando uma fonte orgânica de carbono o sistema é denominado de cultivo heterotrófico.

3.3.3 Cultivo mixotrófico

No cultivo mixotrófico, a microalga é submetida à fotossíntese e usa compostos orgânicos e inorgânicos como fonte de carbono para o crescimento, como glucose, glicerol e acetato de sódio. Assim, está apta a viver tanto em condições autotróficas quanto em heterotróficas. Ao utilizar compostos orgânicos, a microalga libera CO₂ via respiração celular e esta molécula pode ser absorvida e utilizada no metabolismo autotrófico (MATA et al., 2010). Nos cultivos, o carbono é o macronutriente mais importante, uma vez que constitui algo próximo de 50% da biomassa microalgal, sendo assim, é um composto limitante para o crescimento das microalgas (ABALDE et al., 1995). Desta forma, o emprego de fontes suplementares de carbono pode potencializar a taxa de crescimento, gerar maior biomassa e concentração de ácidos graxos poliinsaturados (CERÓN GARCIA et al., 2005).

3.3.4 Nutrientes

Para um maior crescimento, a microalga depende de um meio de cultivo rico em nutrientes. Existem variações entre as necessidades das espécies, assim como a quantidade. Os macronutrientes essenciais para as microalgas são C, N, O, H e P, além de Ca, Mg, S e K. E em menor quantidade Fe, Mn, Cu, Mo e Co. (GUILLARD, 1975; BOHUSTKYI, 2016; HONGQIN WU & XIAOLING MIAO, 2017)

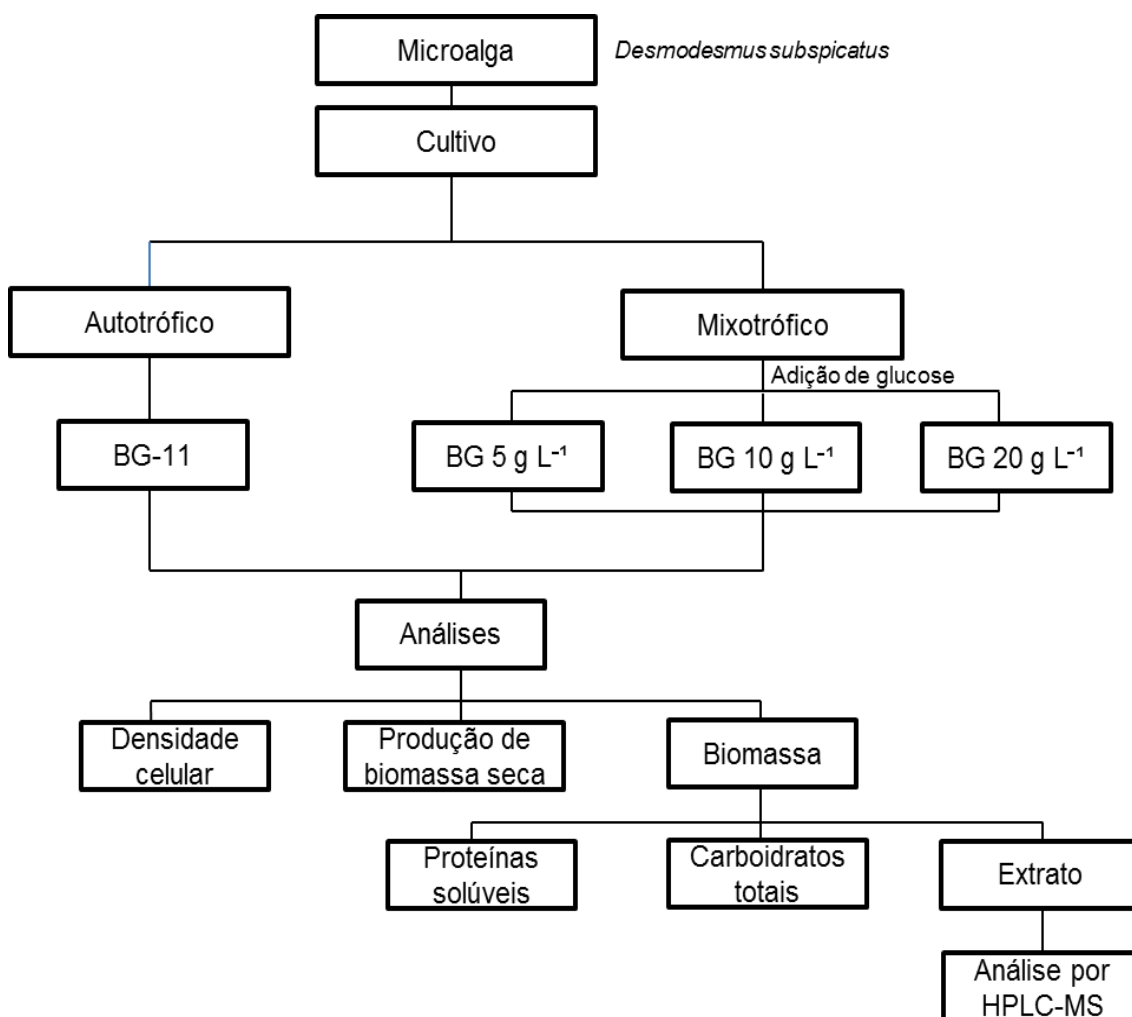
3.3.5 Avaliação do crescimento

De acordo com Tomaselli (2014), crescimento é definido como aumento de matéria viva, determinado pela densidade celular ou biomassa seca total. Para representação gráfica da evolução do crescimento do organismo é feita uma curva de crescimento. Nela, está expressa a relação de crescimento de biomassa ou densidade celular pelo tempo. As quatro fases de uma curva são: fase de indução ou fase lag; fase exponencial ou fase log; fase estacionária e fase de morte da cultura. (DERNER et al, 2004)

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O fluxograma abaixo apresenta a estratégia experimental utilizada durante o projeto.

FIGURA 03: FLUXOGRAMA DO PROJETO.



4.1 MICROALGA

A espécie de microalga que foi utilizada neste estudo, *Desmodesmus subspicatus* (Chodat, 1926), foi cedida pelo Grupo de pesquisa Integrado de Aquicultura (GIA-UFPR), identificada pelo Instituto de Botânica de São Paulo e preservada na coleção de culturas de microalgas na Universidade Federal Fluminense - UFF.

4.2 MEIO DE CULTIVO

O meio de cultivo utilizado é o BG11 (STAINER et al, 1971), como descrito na tabela 1. As soluções utilizadas no preparo do meio de cultivo foram preparadas com reagentes analíticos e com água destilada. Após seu preparo, as soluções foram autoclavadas e armazenadas em frascos âmbar e mantidas refrigeradas a 4°C.

TABELA 01: COMPOSIÇÃO DO MEIO BG11 (STANIER, et al. 1971).

MACRONUTRIENTES	MASSA (g L ⁻¹)
NaNO ₃	1,50
K ₂ HPO ₄	0,04
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,075
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,036
C ₆ H ₈ O ₇ ·H ₂ O	0,006
Citrato férrico	0,006
C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈	0,001
Na ₂ CO ₃	0,02
MICRONUTRIENTES	
H ₃ BO ₃	2,86
MnCl ₂ ·4H ₂ O	1,81
Zn SO ₄ ·7H ₂ O	0,222
Na ₂ Mo O ₄ ·2H ₂ O	0,39
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,079
Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	0,0494

4.3 OBTENÇÃO DE CEPAS AXÊNICAS

Para evitar o risco de contaminação por microrganismos durante os experimentos, é necessário que os cultivos sejam axênicos. As cepas foram submetidas a tratamentos com antibióticos de amplo espectro, em concentrações diferentes e cultivadas em meio sólido, isoladas pela técnica de

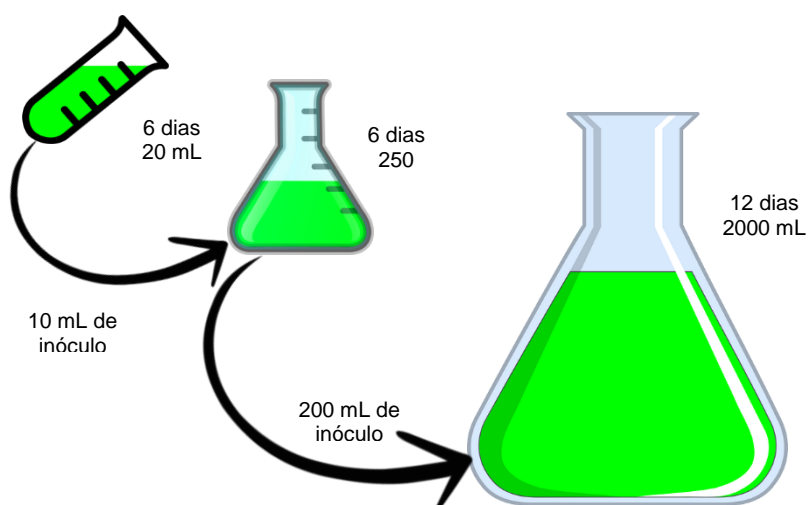
esgotamento da alça (LOURENÇO, 2006). Após esse processo, as cepas deram origem aos inóculos para os experimentos mixotróficos.

A solução de antibióticos foi preparada com penicilina, nistatina e estreptomicina, em concentrações de 100, 40 e 50 mg em 100 mL de água destilada, respectivamente. Para avaliar a eficácia do tratamento, foram pipetadas concentrações do antibiótico em tubos de ensaio contendo 5 mL do meio BG-11 e 50 µL de inóculo da microalga. As células foram mantidas nessas condições na sala de cultivo, sob temperatura controlada de 21 °C e fotoperíodo de 12:12 h. Com o crescimento algal nos tubos de ensaio, placas de Petri contendo ágar 5% e meio de cultivo foram preparadas, onde uma alíquota do cultivo tratado foi adicionada para o esfregaço. Após o crescimento da microalga em meio sólido, com o auxílio de um palito previamente autoclavado, foram retiradas as células isoladas e transferidas para um novo tubo de ensaio contendo meio de cultivo, dando origem as cepas para os cultivos mixotróficos.

4.4 PREPARAÇÃO DO INÓCULO

Para o preparo dos inóculos foram produzidas cepas da microalga *D. subspicatus*, as quais foram realizadas em tubos de ensaio devidamente autoclavados, por 20 min a 120°C, e repicadas em câmara de fluxo laminar, a fim de garantir que o procedimento fosse realizado em um ambiente o mais estéril possível, evitando, assim, contaminações que pudessem prejudicar o cultivo e comprometer etapas posteriores. As cepas foram mantidas em condições controladas de cultivo por 6 dias (fotoperíodo, temperatura, aeração, pH). Após este processo foi realizado repique para um Erlenmeyer de 250 mL, onde foram mantidas por mais seis dias nas mesmas condições citadas acima, e na última etapa, foi feito repique para Erlenmeyer de 2 L (Figura 4).

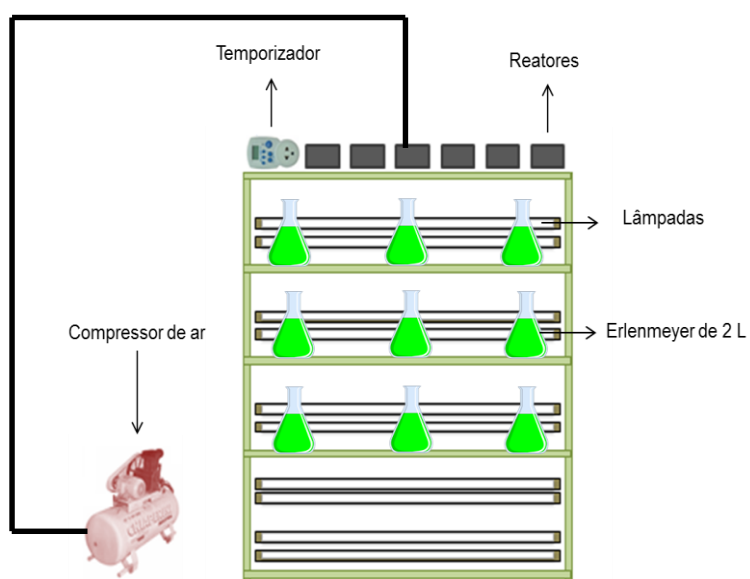
FIGURA 4 – ESQUEMA DE REPIQUE REALIZADO PARA O CULTIVO DA MICROALGA



4.5 CONDIÇÕES DE CULTIVO

Os cultivos foram realizados em escala laboratorial em Erlenmeyer de 2 L, mantidos em ambiente climatizado, com temperatura constante de 23 ± 2 °C, iluminação com (lâmpadas fluorescentes) intensidade luminosa, fotoperíodo de 12:12 h, com aeração constante realizado por compressor de ar (1,6 vvm). Os cultivos foram realizados em triplicata, em balão Erlenmeyer de 2 L de capacidade, com volume útil de 1,8 L.

FIGURA 5 – SISTEMA DE CULTIVO DA MICROALGA *Desmodesmus subspicatus*.



4.6 ANÁLISE DOS CULTIVOS

4.6.1 Biomassa seca

A produção de biomassa seca em (g L^{-1}) dos cultivos foi determinada em triplicata, com base na metodologia de sólidos totais, adaptada do *Standard Methods* (2005). Para eliminar a influência da umidade presente nos papéis de filtro, estes foram secados em estufa a 60°C por aproximadamente 24 h, transferidos para um dessecador até atingir a temperatura ambiente e quantificados em balança analítica. Após este procedimento 30 mL da amostra de cultivo foram filtrados com auxílio de uma bomba de vácuo e o papel de filtro com a biomassa microalgal retida foi transferido para estufa a 60°C até que a massa ficasse constante. A determinação da biomassa seca foi feita através da diferença entre a massa inicial e final do papel de filtro.

4.6.2 Contagem de células

A determinação da densidade celular foi feita por meio da contagem das células com o auxílio da câmara de Neubauer espelhada e de microscópio óptico com aumento de 400 vezes.

4.6.3 Determinação de carboidratos totais na biomassa microalgal

Para a dosagem de açúcares totais na biomassa seca (10 - 20 mg), foi realizado um tratamento ácido prévio com 1 mL de H_2SO_4 a 80% (v/v) por 20 h (MYKLESTAD E HAUNG, 1972). Durante a adição do ácido e nas 4 h subsequentes os tubos contendo as amostras foram mantidos em contato com gelo para evitar a carbonização da amostra. Após o período de tratamento as amostras foram diluídas com 9 mL de água destilada e centrifugadas a $2600 \times g$ por 15 min a 4°C .

Os carboidratos totais foram determinados pelo método colorimétrico descrito por Dubois et al. (1956). Polímeros de carboidratos, quando em contato com um ácido forte e temperatura elevada, liberam pentoses e hexoses, que por

sua vez são desidratadas produzindo furfural e 5-hidroximetilfurfural, respectivamente. Estes aldeídos cíclicos condensam com o fenol formando um produto de coloração amarela, cuja absorbância a 490 nm é diretamente proporcional à quantidade de carboidrato presente na amostra. Foram preparadas soluções das amostras de polissacarídeos analisadas na concentração de 1 mg mL⁻¹ em água destilada. Uma alíquota de 500 µL dessa solução foi pipetada em tubo de ensaio e, em seguida, foi adicionado 500 µL de uma solução de fenol 5% (m/v) e 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado. Uma curva-padrão de glucose foi feita no intervalo de detecção de 10-50 µg, a partir de uma solução 0,1 mg mL⁻¹ do padrão em água destilada. As absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 490 nm. Amostras cujas absorbâncias excederam o limite da curva-padrão foram diluídas conforme necessário.

Os coeficientes de regressão obtidos com o ajuste linear dos pontos observados na curva foram utilizados para estimar a quantidade de carboidratos totais presente nas amostras, considerando a alíquota que foi tomada nas determinações. O percentual de carboidrato é dado pela relação entre a quantidade estimada de carboidratos totais e a massa de amostra presente na alíquota utilizada no ensaio.

4.6.4 Determinação de proteínas na biomassa microalgal

Para a dosagem de proteínas a biomassa seca foi submetida a um tratamento alcalino, adicionando 5 mL de NaOH 0,1 mol L⁻¹, e mantida a 100 °C em estufa por 1 h (VEGA et al., 2007). Na sequência, o material tratado foi centrifugado a 2600 x g por 15 min a 4°C. A dosagem de proteínas totais foi realizada no sobrenadante de acordo com o método de LOWRY et al. (1951), utilizando o reagente de *Folin-Ciocalteu* na concentração final de 1 M e uma mistura das soluções reativas A, B e C, na proporção de 100:1:1. Estas, por sua vez, foram preparadas conforme segue:

- a) Solução A: foram dissolvidos 20 g de carbonato de sódio (Na₂CO₃) anidro e 4 g de hidróxido de sódio (NaOH) em quantidade suficiente de

água, e completado o volume para 1 L;

b) Solução B: foram dissolvidos 2 g de sulfato de cobre (CuSO_4) em quantidade suficiente de água e completado o volume para 100 mL;

c) Solução C: foram dissolvidos 4 g de tartarato de sódio em água e completado o volume para 100 mL.

Uma curva-padrão de soroalbumina bovina (BSA, 1 mg mL^{-1}) foi feita no intervalo de detecção de 10-90 μg . As absorvâncias foram lidas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 660 nm. Amostras cujas absorvâncias excederam o limite da curva-padrão foram diluídas conforme necessário.

Os coeficientes de regressão obtidos com o ajuste linear dos pontos observados na curva foram utilizados para estimar a quantidade de proteína presente nas amostras, considerando a alíquota que foi tomada nas determinações. O percentual de proteína é dado pela relação entre a quantidade estimada de proteínas e a massa de amostra presente na alíquota utilizada no ensaio.

4.6.5 Extração aquosa

A biomassa microalgal foi submetida à extração aquosa, na concentração 10% (p/v), sob agitação mecânica e temperatura ambiente por 1 h. A amostra foi centrifugada a 9000 rpm, por 15 min, a 10°C . A partir da biomassa residual, este processo foi repetido e os dois extratos (sobrenadantes) foram reunidos e submetidos à diálise em sistema fechado (membrana *cut off* de 1 kDa) contra água ultrapura (MilliQ), com 4 trocas de água a cada 2 h, gerando as frações E (eluído) e R (retido), as quais foram liofilizadas e armazenadas para as análises posteriores.

4.6.6 Análises cromatográficas e espectroscópicas

As análises cromatográficas começaram com o preparo dos padrões de reguladores vegetais a fim de verificar seus íons precursores e tempo de

retenção. O resultado dessa análise permitiu identificar cada padrão por seu íon molecular e, posteriormente, comparar com as amostras da fração E, provenientes da extração aquosa. A fração E foi fracionada por cromatografia de exclusão em coluna (120 cm x 1,5 d.i.) de Bio-Gel P-2 (limite de exclusão de 1800-100 Da), utilizando água ultrapura como eluente, num fluxo de 1 mL/min, coletando amostras de 0,5 mL com coletor de frações. As frações eluídas foram analisadas pelo método de fenol-sulfúrico (490 nm) e absorvância em UV (280 nm), para gerar o cromatograma correspondente que permitiu a separação das subfrações, as quais foram analisadas por cromatografia líquida de alta performance acoplada a espectrometria de massas (HPLC-MS), da mesma maneira que os padrões, sendo assim possível identificar os reguladores vegetais. A coluna utilizada na cromatografia líquida de alta eficiência foi uma coluna Ascentis® C18 (15 cm x 2,1 mm), com tamanho de partícula de 3 µm.

4.6.7 Cultivo mixotrófico

No cultivo mixotrófico, a microalga utiliza compostos orgânicos e inorgânicos como fonte de crescimento. Nesse projeto, o cultivo mixotrófico foi suplementado com glucose comercial em três concentrações diferentes (5, 10 e 20 g L⁻¹), em triplicata, para avaliar em qual condição o organismo em estudo tem melhor resposta, comparando sua densidade celular, produtividade em termos de biomassa seca e produção de carboidratos e proteínas. Os resultados obtidos no cultivo mixotrófico foram comparados com os dados do cultivo autotrófico, onde a microalga fixa o carbono proveniente do CO₂.

4.6.8 Análises

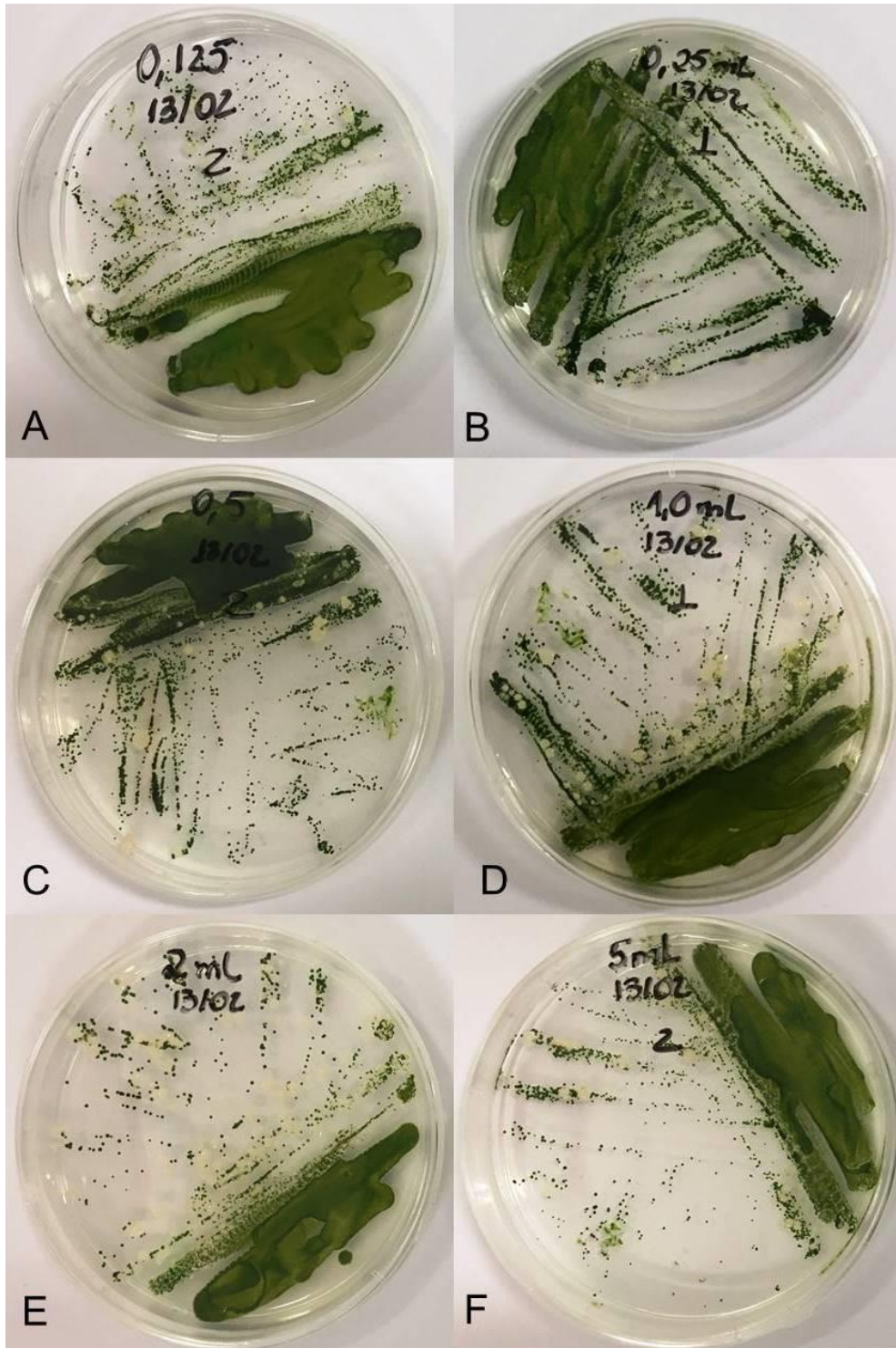
Diferenças entre médias foram determinadas usando teste de Tukey. Dados com valor de p menor de 0,05 foram considerados estatisticamente significativos. Todos os gráficos foram gerados a partir do software GraphPad Prism 7 (version 7.03, GraphPad Software Inc, 2017, San Diego, USA).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 OBTENÇÃO DE CEPAS AXÊNICAS

Com o objetivo de eliminar os organismos contaminantes das cepas da microalga *Desmodesmus subspicatus*, foram realizadas placas por meio da técnica de esgotamento da alça, onde uma pequena alíquota da microalga cultivada foi pipetada e espalhada na superfície do ágar em zig-zag. As placas continham diferentes volumes da solução de antibióticos (0,125 até 5 mL). Nas placas em que a concentração de antibiótico foi menor, foram obtidos melhores resultados do isolamento, com menor contaminação. A Figura 6 apresenta o resultado dos experimentos. Após 7 dias, com o crescimento da microalga em meio sólido, com o auxílio de um palito, a microalga isolada foi transferida para tubos de ensaio com meio BG11 (Figura 7).

FIGURA 6: PLACAS COM ÁGAR E MEIO BG11, ONDE FOI ADICIONADA UMA ALÍQUOTA DO CULTIVO DA MICROALGA EM MEIO CONTENDO DIFERENTES VOLUMES DA SOLUÇÃO DE ANTIBIÓTICOS: A: 0,125 mL. B: 0,25 mL. C: 0,5 mL. D: 1,0 mL. E: 2,0 mL. e F: 5,0 mL.



FONTE: O autor (2017)

FIGURA 7: COM O AUXÍLIO DE UM PALITO, A MICROALGA ISOLADA É RETIRADA DA PLACA E TRANSFERIDA ATÉ O TUBO DE ENSAIO CONTENDO MEIO DE CULTIVO.



FONTE: O autor (2017)

Após o isolamento da microalga em meio BG-11, um novo esgotamento da alga foi realizado, para confirmação de cepas axênicas. Foi utilizada uma alíquota da microalga, em placa de petri com meio BG-11 e Glc 1%. Os resultados são mostrados na figura abaixo.

FIGURA 8: CRESCIMENTO DA MICROALGA EM MEIO BG-11 E GLUCOSE COMERCIAL SEM CONTAMINAÇÃO DE OUTROS ORGANISMOS.



FONTE: O autor (2017)

O tratamento realizado foi importante para permitir o isolamento de cepas com elevado grau de pureza para cultivo em condição mixotrófica. No cultivo mixotrófico devida à presença de fonte de carbono orgânica, a possibilidade de desenvolvimento de organismos heterótrofos (bactérias, fungos, etc) é potencializada e, por isso, se faz necessária a utilização de cepas puras e axênicas.

5.2 ANÁLISE DOS CULTIVOS

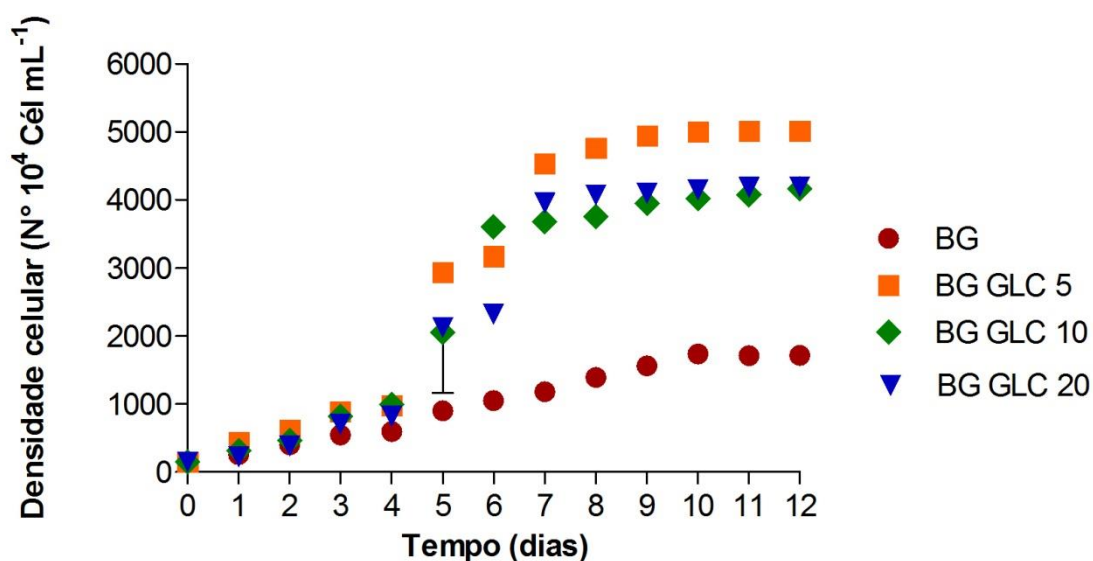
Para se visualizar o comportamento de crescimento da microalga *Desmodesmus subspicatus*, ela foi cultivada em meio BG-11, durante 12 dias, sem glucose (condição autotrófica) e com adição de glucose nas concentrações de 5, 10 e 20 g L⁻¹ (condição mixotrófica). O carbono é o elemento necessário em maiores concentrações para as microalgas. Sua elevada demanda decorre do fato de que o carbono constitui-se no componente mais abundante de todas

as substâncias orgânicas sintetizadas pelas as células (proteínas, carboidratos, ácidos nucleicos, vitaminas, etc) (LOURENÇO, 2006).

5.2.1 Densidade celular dos cultivos

O crescimento celular foi avaliado a partir da determinação da densidade celular, o que permite obtenção de resultados sobre a evolução do cultivo ao longo do tempo. A curva de crescimento mostrada na Figura 9 indica que do dia 0 ao dia 2, foi o período de adaptação ao meio e a partir do dia 3 o organismo entrou na fase de crescimento exponencial. O cultivo com concentrações de 5 g L⁻¹ teve maior crescimento que os demais, aproximadamente 5000 x 10⁴ células mL⁻¹. Comparando os cultivos com a fonte de carbono nas concentrações de 10 e 20 g L⁻¹, a média de produtividade total de células foi de 4100 e 4200 x 10⁴ cel mL⁻¹ para os cultivos de 10 e 20 g L⁻¹ respectivamente. Ainda assim, comparado com o meio de cultivo controle, sem a adição de glucose, os crescimentos dos três experimentos mixotróficos foram superiores ao cultivo sem adição de fonte de carbono orgânico (autotrófico), que teve média de produção celular de 1700 x 10⁴ cel mL⁻¹, o que representa um aumento de entre 2,9 e 2,4 vezes em termos do número de células comparando os cultivos mixotróficos com o autotrófico.

FIGURA 9: CURVAS DE CRESCIMENTO DE *Desmodesmus subspicatus*, EM MEIOS DE CULTIVO AUTOTRÓFICO (BG-11) E MIXOTRÓFICO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE GLUCOSE (5, 10 E 20 g L⁻¹).

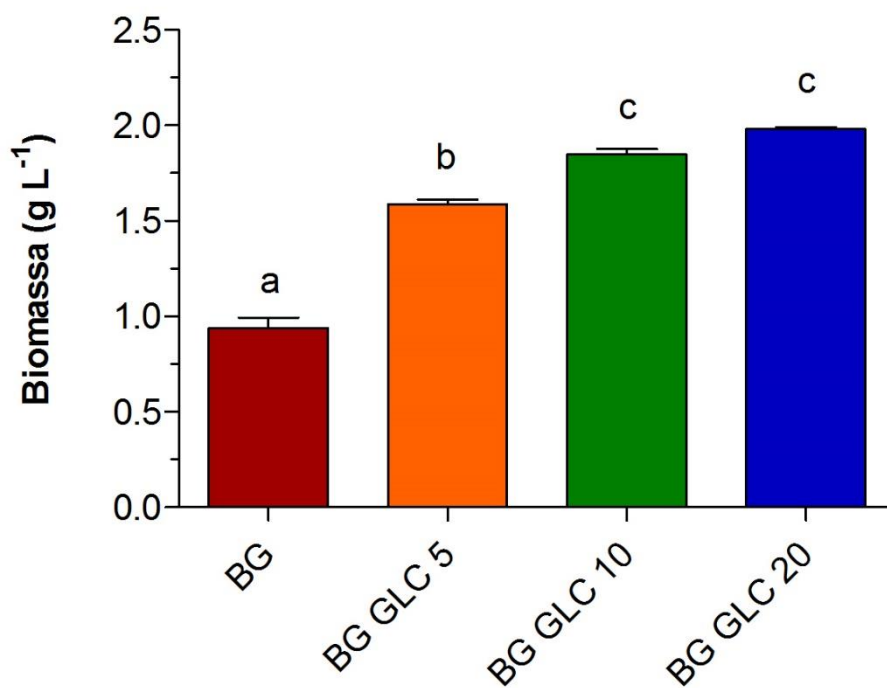


5.2.2 Produção total de biomassa

A Figura 10 apresenta a produção total de biomassa seca em g L⁻¹ dos cultivos BG-11 (autotrófico) e BG Glc 5, BG Glc 10 e BG Glc 20 (mixotróficos). O cultivo BG Glc 20 mostrou o valor de biomassa dentre as condições avaliadas (2,0 g L⁻¹). Nos cultivos com 5 e 10 g L⁻¹ de glucose a produtividade total de biomassa seca foi de 1,5 e 1,9 g L⁻¹, respectivamente. O cultivo BG-11 apresentou uma produção de biomassa de 0,9 g L⁻¹, sendo estatisticamente inferior a todos os cultivos mixotróficos. Assim, a diferença entre o BG-11 e o melhor resultado (Glc 20g L⁻¹) foi de 1,1 g L⁻¹. O resultado obtido para o cultivo autotrófico é similar ao encontrado na literatura para o gênero *Desmodesmus*. Não foram encontrados dados de cultivos mixotróficos na literatura.

Com o auxílio de teste estatístico ANOVA, é possível afirmar que não existe diferença significativa na produção de biomassa microalgal entre os cultivos mixotróficos utilizando 10 e 20 g L⁻¹ de glucose.

FIGURA 10: PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE *Desmodesmus subspicatus*. CULTIVADA EM CONDIÇÕES AUTOTRÓFICA E MIXOTRÓFICA COM MEIO BG-11 E 5, 10 E 20 g L⁻¹ DE GLUCOSE.



A produção de compostos não varia somente em relação ao meio de cultivo utilizado, também é dependente da espécie microalgal. A limitação de nutrientes nos meios de cultura afeta em grandes proporções a composição química das algas, assim como sua taxa de crescimento (YEH & CHENG, 2012).

5.2.3 Quantificação de proteínas e carboidratos da biomassa microalgal

A dosagem de proteínas totais foi realizada no sobrenadante de acordo com o método de LOWRY et al. (1951), os carboidratos totais foram determinados pelo método colorimétrico descrito por Dubois e colaboradores (1956).

Os resultados obtidos (Tabela 2) demonstram que quando a microalga é cultivada em condição mixotrófica, seu percentual de proteínas diminui 1,5% e

de cinzas, 7%, comparado ao cultivo controle. Já o método colorimétrico para determinação do teor de carboidratos, indica que os cultivos com 5 e 10 g L⁻¹ tiveram um aumento considerável na porcentagem de carboidratos, sendo que o cultivo de maior concentração de glucose teve um valor próximo ao cultivo autotrófico.

TABELA 2 - COMPOSIÇÃO DA BIOMASSA DE MICROALGA *Desmodesmus subspicatus* CULTIVADA EM MEIO BG EM CONDIÇÕES AUTOTRÓFICAS E MIXOTRÓFICAS

Cultivo	Proteína (%)	Carboidrato (%)	Cinzas (%)
Meio BG	14,4	17,2	23,5
BG GLC 5	12,9	21,9	16,5
BG GLC 10	10,3	34,2	15,1
BG GLC 20	10,6	15,9	11,1

Resultados obtidos na literatura para o gênero *Desmodesmus*, indicam que a porcentagem de proteínas em condição autotrófica pode variar de 8-18%, e para carboidratos de 21-52% (PRIYADARSHANI et al., 2012). O baixo teor de carboidratos apresentado pela biomassa produzida em condição autotrófica comparado com resultados da literatura, pode estar relacionado com as diferenças no meio de cultivo utilizado.

5.2.4 Análise por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa.

As análises de fitohormônios utilizando cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (HPLC-MS) indicaram a presença de zeatina (Z), um regulador vegetal pertencente ao grupo das citocininas, com um íon molecular (m/z) de 218,10 (FIGURAS 11 e 12).

FIGURA 11 - CROMATOGRAMA E ESPECTRO DE MASSAS DO PADRÃO DE ZEATINA

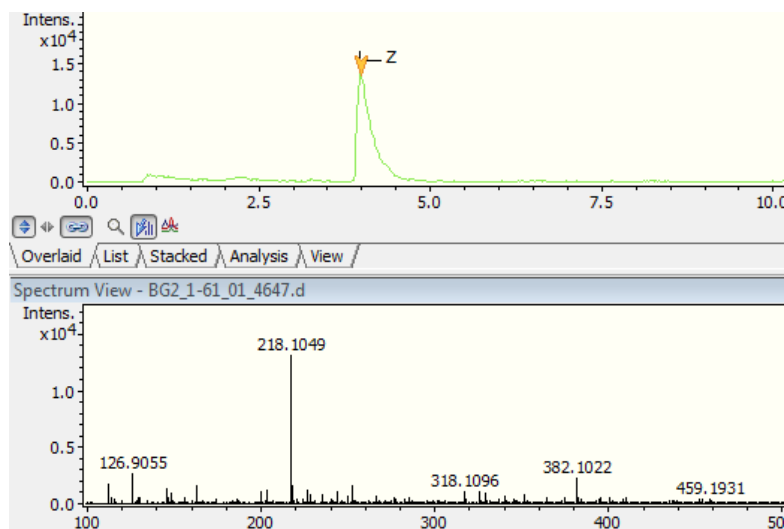
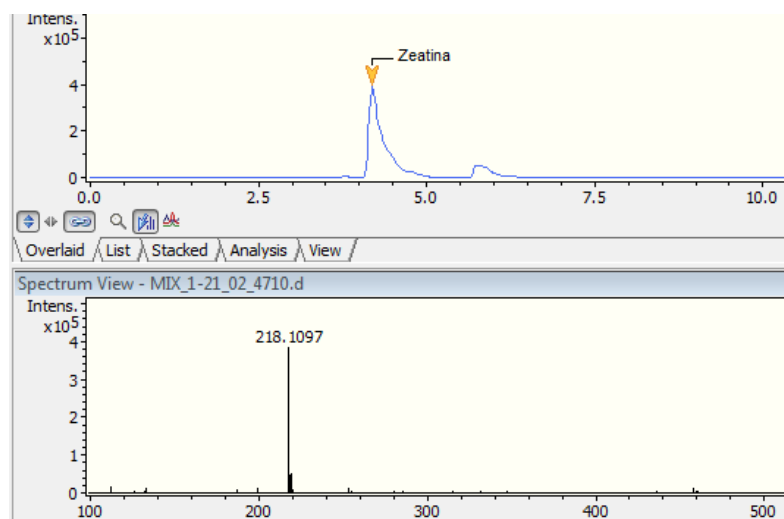


FIGURA 12 - CROMATOGRAMA E ESPECTRO DE MASSAS DA ZEATINA EM AMOSTRA FRAÇÃO "E".



A zeatina tem função de promover o crescimento de plantas e o alongamento celular. Também participa na maturação de flores e frutos (KERBAUY, 2004). Mazepa et al (2013), constatou que a fração eluída, proveniente da extração da *D. subspicatus* possuía atividade promotora de crescimento, comparando-a com produto comercial, proveniente de macroalgas. Os resultados obtidos reforçam a hipótese de que o extrato aquoso da *D. subspicatus* possui atividade bioestimulante vegetal.

6 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos é possível concluir que a microalga *Desmodesmus subspicatus* teve maior desenvolvimento em condição mixotrófica avaliado a partir de seu rendimento de biomassa. Comparando os meios estatisticamente, concluiu-se que não há diferença significativa entre as condições 10 e 20 g L⁻¹, sendo que, visando uma maior produção, a condição intermediária de glucose é mais viável. O resultado de densidade celular mostra o cultivo com 5 g L⁻¹ com um maior crescimento. Os dados diferem porque a concentração de células mL⁻¹ não é diretamente proporcional ao peso de biomassa seca. Analisando a composição química da microalga, o cultivo com 10 g L⁻¹ também teve maior rendimento de carboidratos em sua biomassa. Com as análises de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas, foi identificado um regulador vegetal, que pode confirmar um potencial bioestimulante vegetal.

7 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Para dar continuidade a este estudo, apresentam-se as seguintes sugestões:

- a) Testar a atividade bioestimulante vegetal com a microalga para verificar possível atividade promotora de crescimento através da zeatina;
- b) Testar a condição mixotrófica com outras fontes de carbono, como glicerol e acetato de sódio.

8 REFERÊNCIAS

ABALDE, J. et al. Microalgas: cultivo e aplicaciones. España: **Universidade da Coruña**, p. 210. 1995.

ANDRULEVICIUTE, V.; MAKAREVICIENE, V.; SKORUPSKAITE, V; GUMBYTE, M. Biomass and oil content of *Chlorella* sp., *Haematococcus* sp., *Nannochloopsis* sp. and *Scenedesmus* sp. under mixotrophic growth conditions in the presence of technical glycerol. **Journal Applied Phycology**, v. 26, p. 83-90. 2014.

BARSANTI, L.; GUALTIERI, P. Algae: anatomy, biochemistry, and biotechnology. **CRC press**, 2014. ISBN 1439867321.

BELARBI, E. H.; MOLINA, E., CHRISTI, Y. A. A process for high yield and scaleable recovery of high purity eicosapentaenoic acid esters from microalgae and fish. **Process Biochemistry**, n. 35, p. 951-969. 2000.

BICUDO, C. E. M.; MENEZES, M. Gênero de Algas de águas Continentais do Brasil. Chave para identificação e descrição. **Ed. Rima**. 2ª edição, 2006.

BOROWITZKA, M. A. High-value products from microalgae: their development and commercialisation. **J Appl Phycol**, n. 25, p. 743–756. 2015.

CAMBRA SÁNCHEZ, J., ÁLVAREZ COBELAS, M. & ABOAL SANJURJO, M. Lista florística y bibliográfica de los clorófitos (*Chlorophyta*) de la Península Ibérica, Islas Baleares e Islas Canarias. Burgos: **Asociación Española de Limnología**. 1998.

CARDOSO, A.S.; VIEIRA, G.E.G.; MARQUES, A.K. O uso de microalgas para a obtenção de biocombustíveis. **Revista Brasileira de Biociências**. v. 9, n. 4, p. 542-549. 2011.

COSTA, J. A. V.; COLLA, L. M.; DUARTE FILHO, P. F. Improving *Spirulina platensis* biomass yield using a fed-batch process. **Bioresource Technology**, v. 92, p. 237-241, 2004.

DERNER, R. B.; OHSE, S.; LAMARCA, C. P. Revision on carbon sequestration by microalgae and forests and the production of lipids for the microalgae. **Cienc. Rural**, v. 36, p. 250-253, 2007.

DUBOIS, M., GILLES, K. A., HAMILTON, J. K., REBERS, P. A., SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v.28, p.350-356, 1956.

FALKOWSKI, P.G, RAVEN, J.A. Aquatic photosynthesis. **Blackwell Science**, p. 375. 1997.

GARCIA-GONZALEZ, J.; SOMMERFELD, M. Evaluation of Potential Agricultural Applications of the Microalga *Scenedesmus dimorphus*. Dissertação de Mestrado. **Arizona State University**, 2014.

GARCIA-GONZALEZ, J.; SOMMERFELD, M. Biofertilizer and biostimulant properties of the microalga *Acutodesmus dimorphus*. **Journal Applied Phycology**, v.28, p.1051–1061, 2015. DOI: 10.1007/s10811-015-0625-2

GRESSLER, P.; SCHNEIDER, V. C.; BJERK, T.; SOUZA, M.; ZAPPE, A.; LOBO, E. A. Microalgas: Aplicações em biorremediação e energia. **Caderno de Pesquisa. Série Biologia**, v. 24.

GUILLARD, R.R.L. AND J.H. RYTHER. Studies on marine planktonic diatoms I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacae* (Cleve) Gran. **Can. J. Microbiol**, n. 8, p. 229–239. 1962.

HEGEWALD, E. New combinations in the genus *Desmodesmus* (Chlorophyceae, Scenedesmaceae). **Algological Studies**, v, 96, p. 1-18. 2000.

HEGEWALD, E. HAGANATA, N. Phylogenetic studies on Scenedesmaceae (Chlorophyta). **Algological Studies**, v. 100, p. 29-49. 2000.

HONGQIN, W. XIAOLING M. Biodiesel quality and biochemical changes of microalgae *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus obliquus* in response to nitrate levels. **Bioresource Technology**, v. 170, p. 421-427. 2017.

HORNES, M.; SILVA1, A. G.; MITTERER, M. L.; Maria Isabel QUEIROZ, M. I. Influência dos compostos nitrogenados na concentração de proteína da cianobactéria *Aphanothece*. Laboratório de Biotecnologia, Departamento de Química, **Universidade Federal do Rio Grande**, Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, 30(2): 364-371, abr.-jun. 2010.

HUANG, G.; CHEN, F.; WEI, D. ZHANG, X.; CHEN, G. Biodiesel production by microalgal biotechnology. **Applied Energy**. v. 87, n. 1, p. 38-46. 2010.

KERBAUY, G. B. Fisiologia vegetal. **Guanabara Koogan**. Rio de Janeiro, 2004.

LEE, R. E. Phycology. Cambridge: **Cambridge University Press**. v. 4, p. 560. 2008. ISBN 978 0 521 68277 0.

LEWIS, L. A. & MCCOURT, R.M. Green algae and the origin of land plants. **American Journal of Botany**, v. 91, p. 1535–1556. 2004.

LIANG, Y. Production liquid transportation fuels from heterotrophic microalgae. **Applied Energy**, v. 104, p. 860–868. 2013.

LOURENÇO, Sergio O. Cultivo de microalgas marinhas: princípios e aplicações. 1 ed. **São Carlos: RiMa**, 2006.

LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L., RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v.193, p.265-275, 1951.

MANDAL, S. & MALLICK, N. Microalga *Scenedesmus obliquus* as a potential source for biodiesel production. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 84, p. 281-91. 2009.

MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N.S. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.14, p. 217–232. 2010.

MAZEPA, E. Fracionamento e caracterização estrutural de compostos presentes no extrato aquoso da microalga *Scenedesmus subspicatus* e sua potencial atividade bioestimulante vegetal. Dissertação (mestrado em bioquímica). **Universidade Federal do Paraná**, 2013.

MYKLESTAD, S. & HAUG, A. Production of carbohydrates by the marine *Chaetoceros affinis* var. *Willei* (Gran.). **Biol. Ecol.**, v.9, p.125-136, 1972.

RAZEGHIFARD, R. Algal biofuels. **Photosynthesis Research**, v.117, p.207–219, 2013.

OSWALD, W. J. Micro-algae and waste-water treatment. In: BOROWITZKA, M. A. **Microalgal Biotechnology**. Cambridge: Cambridge University Press, p. 305-328. 1988.

PULZ, O.; GROSS, W. Valuable products from biotechnology of microalgae. **Applied Microbiology and Biotechnology**, n. 35, p. 421-430. 1991.

SIMÕES, M. S.; MADAIL, R. H.; BARBOSA, S.; NOGUEIRA, M. de L. Padronização de bioensaios para detecção de compostos alelopáticos e toxicantes ambientais utilizando alface. **Biotemas**, 26 (3): 29-36. 2013.

SOUTH, G. R.; WHITTICK, A. An introduction to phycology. **Ed. Wiley**, 1987. ISBN 0632017260.

STANIER, R. Y.; KUNISAWA, R.; MANDEL, M.; COHEN-BAZIRE, G. Purification and Properties of Unicellular Blue-Green Algae (Order *Chroococcales*). **Bacteriological Reviews. American Society for Microbiology**. v. 35, p. 171-205. 1971.

SUMMER, J. B. The estimation of sugar in diabetic urine using dinitrosalicylic acid. **J. Biol. Chem.**, v. 62, p. 287-290, 1924.

TAYLOR G. J.; MCDONALD-STEPHENS J. L.; HUNTER D. B.; BERTSCH P. M.; ELMORE D.; RENGEL Z. Direct measurement of aluminum uptake and distribution in single cells of *Chara corallina*. **Plant Physiol**, n. 123, p. 987–996. 2009.

THOMAS N. TAYLOREDITH L. TAYLORMICHAEL KRINGS. Paleobotany: the biology and evolution of fossil plants. 2 ed. **Academic Press**, p. 121-160. 2009.

TRAINOR., E. The Culture Collection of Algae, **University of Texas of Austin**, 1990.

TOMASELLI, L., LAMENTI, G., BOSCO, M. & TIANO, P. Biodiversity of photosynthetic micro-organisms dwelling on stone monuments. **Int Biodeterior Biodegradation**, v. 46, p. 251–258. 2014.

TORGAN, L.C., BECKER, V. & SANTOS, C.B. *Skeletonema potamos* (Bacillariophyta) in Patos Lagoon, Southern Brazil: Taxonomy and distribution. **Revista Peruana de Biologia**, v. 6, p. 93-96. 2010.

VOLKER, J.; VOGT, T.; CASTRONOVO, S.; WICK, A.; JOSS, A. Extended anaerobic conditions in the biological wastewater treatment: Higher reduction of toxicity compared to target organic micropollutants. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 116, p. 220-230. 2017.

XIONG, W.; LI, X.; XIANG, J.; WU, Q. High-density fermentation of microalga *Chlorella protothecoides* in bioreactor for microbiodiesel production. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 78, p. 29–36. 2008.

WALTER, Alfredo. Estudo do processo biotecnológico para obtenção de ficocianina a partir da microalga *Spirulina platensis* sob diferentes condições de cultivo. Dissertação (Mestrado em Processos Biotecnológicos). **Universidade Federal do Paraná. Curitiba**, 2011.

YEH, K.L. & CHANG, J.S. Effects of cultivation conditions and media composition on cell growth and lipid productivity of indigenous microalga *Chlorella vulgaris*, ESP-31. **Bioresource Technology**, v. 105, p. 120-127. 2012.